

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf**

**Direktor: Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse**

## **Untersuchungen zur Rolle dezidualisierter Endometriumzellen in der Invasivität von extravillösen Trophoblastzellen in einem Zellkulturmodell**

---

### **Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Marina A. González Martínez**

**aus Mendoza, Argentinien**

**Hamburg 2009**

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 16.12.2009**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:** Prof. Dr. C. Bamberger

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:** PD Dr. K. Milde-Langosch

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:** PD Dr. V. Müller

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>2</b>
2.1	Das menschliche Endometrium .....	2
2.2	Der Menstruationszyklus .....	3
2.2.1	Proliferative Phase des Menstruations-Zyklus .....	4
2.2.2	Sekretorische Phase des Menstruations-Zyklus .....	5
2.2.2.1	Stroma Differenzierung: Dezidualisierung .....	5
2.2.2.2	Epithel Differenzierung und Implantationsfenster .....	7
2.2.3	Menstruation .....	10
2.3	Trophoblast-Differenzierung .....	11
2.4	Regulation der Trophoblast-Invasion .....	13
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1	Material .....	18
3.1.1	Allgemein für die Zellkultur .....	18
3.1.2	Sphäroide Expansion Assay .....	20
3.2	Methoden .....	22
3.2.1	Isolierung der ESZ .....	22
3.2.2	Kultivierung der AC-1M88 und ESZ .....	23
3.2.3	<i>In vitro</i> -Dezidualisierung der ESZ .....	23
3.2.4	Sphäroide Expansion Assay .....	24
3.2.4.1	Sphäroide-Bildung .....	24
3.2.4.2	Ausplattierung der ESZ .....	25
3.2.4.3	Ansatz der Matrigelschicht auf den verschiedenen Trägern .....	25
3.2.4.4	Ausplattierung der Sphäroide und Stimulation mit Faktoren .....	26
3.2.4.5	Doppelfärbung durch Immunzytochemie .....	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
4.1	Bildung und Ausplattierung der AC-1M88 Sphäroide .....	29
4.2	ESZ: <i>In vitro</i> -Dezidualisierung und Bildung der ESZ-Monolayer .....	31
4.3	Kokultur: AC-1M88 Sphäroide auf ESZ-Monolayer .....	32
4.3.1	Färbung der Zellen durch Immunzytochemie .....	33
4.3.2	Auswertung .....	34
4.3.3	Effekt von 8-Br-cAMP auf die AC-1M88 Sphäroide und ESZ .....	37
4.3.4	Einfluss der ESZ auf die AC-1M88 Sphäroide .....	40
4.3.5	Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die AC-1M88 Sphäroide .....	41
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	45
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>52</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>59</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>61</b>

## 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

---

Die Fetus-Mutter-Interaktion bestehend aus der mütterlichen Dezidua und einem hochinvasiven Trophoblasten reguliert auf kritische Art und Weise die Funktion der Plazenta, das Wachstum und die Entwicklung des Embryos.

Die hochinvasive Natur des extravillösen Trophoblasten unterliegt physiologischerweise zahlreichen zeitlichen und räumlichen Kontrollmechanismen um eine adäquate Versorgung für den Embryo zu schaffen und um die Gesundheit der Mutter nicht zu gefährden. Bemerkenswerterweise teilen die Zellen des extravillösen Trophoblast (EVT) mehrere Besonderheiten mit denen eines bösartigen Tumors, die nicht nur hochinvasiv sind, sondern auch vom Wirt immunotoleriert werden und in dessen Gefäße disseminieren. Diese invasiven Prozesse sind essentiell für eine normal verlaufende Schwangerschaft und ihre Dysregulation führt zu einigen der häufigsten Schwangerschaftspathologien wie intrauterine Wachstumsrestriktion und Präeklampsie. Ungehindertes Wachstum und bösartige Transformation der Trophoblastzellen sind allerdings seltene Ereignisse. Die erstaunliche Präzision bei der Ausdehnung der Invasion des Trophoblasten stellt ein äußerst interessantes Forschungsmodell der kontrollierten Invasion dar.

Die Mikroumgebung, die durch die verschiedenen Komponenten der Dezidua-Trophoblast-Interaktion geschaffen wird, spielt in diesem Prozess eine sehr wichtige Rolle.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bedingungen, unter welchen die Trophoblastzellen ihre invasiven Fähigkeiten verändern. Des Weiteren wird untersucht, welche Rolle die Dezidualisierung der endometrialen Stromazellen (ESZ) für diesen Prozess spielt und, ob die Wachstumsfaktoren *Heparin binding epidermal growth factor* (HB-EGF), *Epidermal growth factor* (EGF), Hepatozyt-Wachstumsfaktor (*Hepatocyte growth factor*, HGF), die Cytokine *Leukemia inhibitory factor* (LIF) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und die Steroidhormone Östrogen und Progesteron die Invasivität beeinflussen.

Zur Bearbeitung der genannten Fragestellungen wird ein Kokulturmodell verwendet. Multizelluläre Trophoblastsphäroide werden hierbei mit dezidualisierten und nicht dezidualisierten Stromazellen konfrontiert. Der Einfluss der genannten Wachstumsfaktoren, Cytokine und ovarieller Steroidhormone wird durch Anreicherung der Kultur-Medien mit diesen Faktoren in diesem Modell untersucht.

Wesentliche theoretische Grundlagen, die zum Verständnis der durchgeführten Experimente von Bedeutung sind, werden in den Kapiteln der Einleitung zusammengefaßt.

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Das menschliche Endometrium

Der menschliche Uterus ist das weibliche Geschlechtsorgan, in welchem sich eine Schwangerschaft entwickelt. Er besteht aus einer Muskelschicht, die sich anatomisch in die folgenden drei Bestandteile gliedern lässt: Corpus uteri, den eigentlichen Uteruskörper mit seiner die Adnexabgänge überragenden Kuppel, auch Fundus uteri genannt, Isthmus uteri, wegen der Enge auch als Zwischenstück des Uterus bezeichnet und Cervix uteri, den Gebärmutterhals (Leidenberger 1998).

Histologisch ist der Uterus aus mehreren Schichten aufgebaut, die sich von außen nach innen folgendermaßen aufbauen: Serosa, Myometrium, Endometrium (Pfleiderer und Kaufmann 2008) (Abb. 1).

Das Endometrium setzt sich aus einer basalen (Stratum basale) und einer oberflächlichen Schicht (Stratum functionale) zusammen, die wiederum in eine lumennahe „Zona spongiosa“ und in eine lumenferne „Zona compacta“ unterteilt wird. Das Stratum functionale wird während der Menstruation weitgehend abgebaut und abgestoßen (Pfleiderer und Kaufmann 2008).

Die wichtigsten zellulären Bestandteile des Endometriums sind Epithelzellen, Stromazellen, Zellen des Immunsystems und blutgefäßbildende Zellen (Dockery und Burke 2008; Leidenberger 1998).

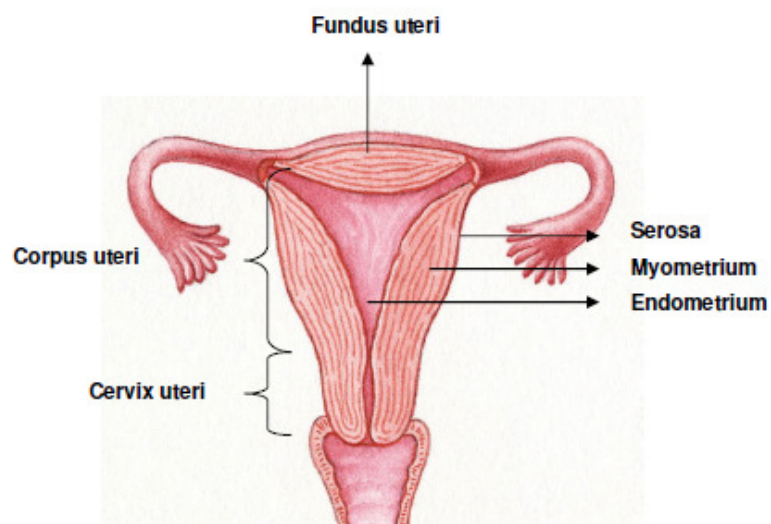


Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Uterus

Modifiziert nach [www.dkimages.com](http://www.dkimages.com)

Die Epithelzellen werden weiterhin in Luminal- und Drüsenepithel unterteilt, wobei die Luminalzellen ein Kontinuum mit den Epithelzellen der Drüsen darstellen. Das luminale

Epithel des Endometriums ist die erste mütterliche Kontakt-Oberfläche, auf die die Blastozyste während der Implantation trifft (Dockery und Burke 2008).

Das endometriale Stroma besteht ebenfalls aus einer heterogenen Zellpopulation. Den wichtigsten Zelltyp stellen die stromalen Fibroblasten dar, die regionale und zyklusabhängige Unterschiede zeigen. Das Endometrium enthält des Weiteren ein breites Spektrum an immunkompetenten Zellen. Dies beinhaltet T-Lymphozyten, Makrophagen und uterine natürliche Killerzellen (uNK, *Uterine natural killer cells*). Die Leukozytenmenge von ca. 7% der Stromazellen in der proliferativen Phase steigt bis zu 30% an in der frühen Schwangerschaft mit Variationen bei Frauen mit unerklärbarer Infertilität. Das Endometrium ist des Weiteren reich an zahlreichen Blutgefäßen. Die Zellen des Endothels und der Muskelschicht dieser Gefäße sind ein wichtiger Bestandteil des endometrialen hormonabhängigen Gewebes (Dockery und Burke 2008).

Die verschiedenen Komponenten des Endometriums (Epithel, Stroma, Blutgefäßzellen, Zellen des Immunsystems) interagieren miteinander durch komplexe parakrine Mechanismen und beeinflussen einander in ihrer koordinierten Entwicklung und Differenzierung innerhalb des Zyklus und in der Schwangerschaft (Leidenberger 1998).

### **2.2 Der Menstruationszyklus**

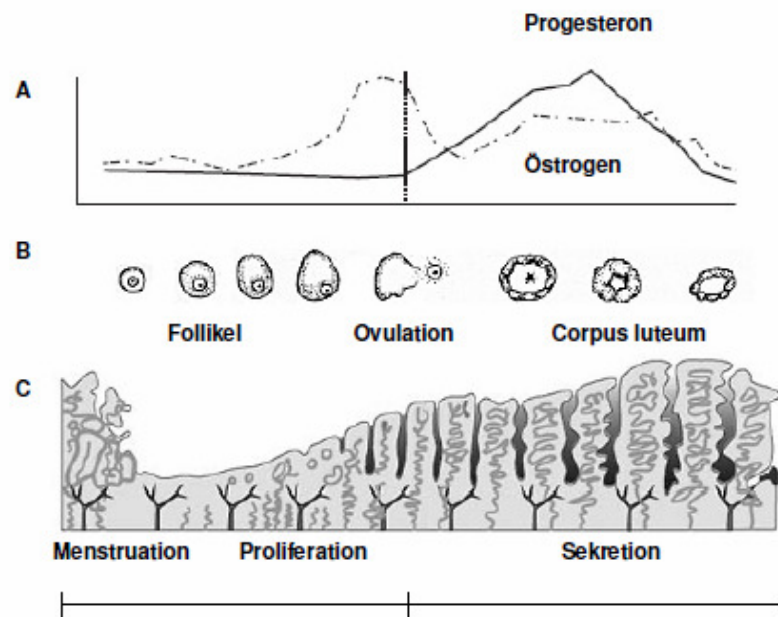
Das Endometrium ist ein hoch dynamisches Gewebe, das bestimmte zyklisch-morphologische Veränderungen während jedes Menstruationszyklus erfährt. Unter dem Einfluss einer wechselhaften hormonellen Umgebung kommt es zu Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose sowie Änderungen in der extrazellulären Matrix und des Leukozytenverkehrs (Salamonsen 2008).

Zwischen den verschiedenen Spezies sind diese zyklischen Veränderungen beim Menschen extrem, indem das ganze Stratum functionale während der Menstruation abgestoßen wird. Die anschließende Geweberegeneration erfolgt vom Stratum basale ab (Leidenberger 1998). Die Funktion des Stratum functionale dagegen ist es die Blastozyste während der Implantation aufzunehmen und gleichzeitig stellt es die mütterliche Komponente der Plazenta dar (Leidenberger 1998).

Ziel der endometrialen Antwort auf die zyklische Steroidhormon-Variation ist es spezielle Voraussetzungen des uterinen Milieus zu schaffen, die die Implantation ermöglichen oder verhindern (Dockery und Burke 2008).

Bei Menschen ist der Menstruationszyklus in drei Phasen aufgeteilt: Menstruation, Proliferative (Follikulär-) Phase und Sekretorische (Luteal-) Phase (Salamonsen 2008) (Abb. 2).

Der standardisierte Zyklus dauert 28 Tage. Tag 1 ist als erster Blutungstag (Beginn der Menstruation) festgelegt und die Ovulation erfolgt nach Anstieg des luteinisierenden Hormons (LH) ca. am Tag 14. Schwankungen der Zykluslänge zwischen 26 und 32 Tage sind jedoch nicht ungewöhnlich (Salamonsen 2008).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Menstruationszyklus**

Parallel ablaufende Ereignisse in Eierstöcken und Endometrium während eines normalen Menstruationszyklus. A) Zyklische Veränderungen der Steroidhormone Östrogen und Progesteron. B) Eierstockzyklus mit Follikelproliferation, Eisprung und Gelbkörperbildung. C) Endometrialer Zyklus mit Menstruationsphase, proliferativer Phase und sekretorischer Phase.

Modifiziert nach Salamonsen 2008.

### 2.2.1 Proliferative Phase des Menstruations-Zyklus

Die proliferative Phase (Tag 5-14) wird charakterisiert durch die postmenstruale Re-epithelisierung und das Wachstum der Stroma- und Drüsenelemente. Als Folge nimmt das Endometrium in der ersten Zyklushälfte sichtbar an Dicke zu und erreicht eine Höhe von 3-4 mm am Tag 14 (Ovulation). Das ovariale vom Follikel gebildete Östrogen (17- $\beta$  Östradiol) ist das dominante Hormon in diesem Teil des Zyklus und ist wiederum abhängig vom in der Adenohypophyse gebildeten FSH (Follikelstimulierendes Hormon). Östrogen induziert in dieser Phase die Ausbildung von Progesteronrezeptoren als Voraussetzung der folgenden Progesteronwirkung. In der Histologie findet man in der frühen Proliferationsphase (Tag 4-7) ein Oberflächenepithel charakterisiert durch die Anwesenheit von geraden, kurzen und engen Drüsenschläuchen. Im Querschnitt zeigt sich ein proliferierendes glanduläres Epithel, ein kompaktes Stroma und einige stromale Mitosen. In der mittleren Proliferationsphase findet man eine Oberfläche mit Säulenepithel, die Drüsenschläuche beginnen sich zu schlängeln und erscheinen deshalb im Querschnitt etwas oval oder angeschnitten. Das Drüsenepithel proliferiert und das Stroma erscheint etwas ödematös. Die Stromazellen zeigen wenig



Zytoplasma und zahlreiche Mitosen. Zwischen Tag 11 und 14 in der späten Proliferationsphase findet man schnell wachsende Drüsen, die sich typischerweise als korkenzieherartig gewunden darstellen. Es kommt zur akzelerierten Proliferation der elongierten glandulären Epithelzellen, das Stroma ist weniger ödematös als in der mittleren proliferativen Phase, aktives Wachstum findet statt (Leidenberger 1998; Salamonsen 2008).

### **2.2.2 Sekretorische Phase des Menstruations-Zyklus**

Die sekretorische Phase des Menstruations-Zyklus beginnt nach der Ovulation, mit der Herausbildung des Corpus luteum. In dieser Phase (Tag 14-28) wird die Entwicklung des Endometriums durch Progesteron, das vom Corpus luteum gebildet wird, beeinflusst und weniger durch Östrogen. Progesteron blockiert die epitheliale und stromale Proliferation des Endometriums und verursacht jene morphologischen Veränderungen, die man unter dem Begriff sekretorische Umwandlung zusammenfasst. Unter dem Einfluss von Progesteron entwickeln sich die charakteristischen Spiralarterien. Die sekretorische Phase ist in ihrer Frühphase gekennzeichnet durch Akkumulation von Glykogen in den glandulären Epithelien, durch Bildung histologisch nachweisbarer Vakuolen und durch eine Erweiterung und stärkere Windung der Drüsenschläuche. In der späteren sekretorischen Phase nimmt die Zahl der Vakuolen ab, sie werden kleiner, und die in der Frühphase der Corpus-luteum-Funktion in der Mitte der Zellen befindlichen Kerne liegen wieder basal. In den Drüsenschläuchen kann man Sekret nachweisen und es fehlen Mitosefiguren (Dockery und Burke 2008; Leidenberger 1998).

#### **2.2.2.1 Stroma Differenzierung: Dezidualisierung**

Nach der Ovulation, während der Sekretorischen Phase des Menstruations-Zyklus, differenziert sich ein großer Teil der Endometriumzellen morphologisch und funktional um adäquate Umgebungsbedingungen für die Implantation des Embryos zu schaffen. Dieser Prozess ist direkt bzw. indirekt durch Progesteron gesteuert. Das eindrucksvolle Ereignis ist jedoch die tiefgreifende Transformation der endometrialen Stromafibroblasten zu sekretorischen, epitheloid-ähnlichen Deziduazellen (Gellersen *et al.* 2007b).

Der Dezidualisierungsprozess setzt beim Menschen jeden Monat in der mittleren sekretorischen Phase ein, unabhängig von der Anwesenheit einer Blastozyste. Er umfasst zunächst das gefäßumgebende Stroma und breitet sich später über das gesamte sublinale Endometrium aus, um im Fall einer Schwangerschaft die Dezidua zu bilden. Morphologisch nehmen die elongierten, fibroblastartigen Zellen eine vergrößerte und abgerundete Form ein. Dezidualisierung findet bei allen Spezies statt, bei denen im Rahmen der Implantation das luminale Epithel von der Blastozyste durchdrungen wird (Gellersen *et al.* 2007b; Gellersen und Brosens 2008).

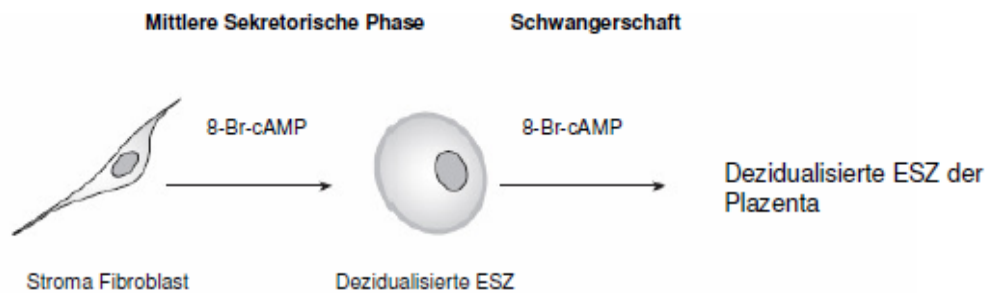
Biochemisch ist die Differenzierung gekennzeichnet durch das Auftreten deziduaspezifischer Sekretprodukte. Hierzu zählen das IGFBP-1 (*insulin like growth factor binding protein 1*), das Prolaktin, Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin und Fibronectin und der Proteaseinhibitor PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1) (Gellersen *et al.* 1994; Leidenberger 1998).

Im Rahmen der Dezidualisierung entwickeln die ESZ spezielle Zellfunktionen wie Kontrolle der Trophoblastinvasion, erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress und Schutz der Plazenta gegenüber der mütterlichen Immunantwort. Während der Schwangerschaft wird der Dezidua außerdem eine wichtige Rolle in der Ernährung des Embryos und der Regulation von Immunfunktionen zugeschrieben (Gellersen *et al.* 2007b; Kliman 2000).

Deziduazellen sind des Weiteren außerordentlich gut gegenüber freien Sauerstoffradikalen adaptiert um einen möglichen Zelltod zu verhindern. Das zeigt ihre Relevanz in der Aufrechterhaltung der Homöostase während der Schwangerschaft (Burton *et al.* 1999). Der Dezidualisierungsprozess spielt eine wichtige Rolle in der Wahrung der Immuntoleranz gegenüber der fetoplacentalen Einheit. Gleichzeitig schützt dieser Mutter und Fetus vor Pathogenen. Zum Beispiel Dezidua wie auch Synzytiotrophoblast exprimieren das Tryptophan-katabolisierende-Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (Kudo *et al.* 2004a; Kudo *et al.* 2004b). Tryptophan ist eine seltene aber essenzielle Aminosäure, die für die Zellproliferation benötigt wird. Bei Mäusen produziert IDO-Inhibitor 1-methyl-L-Tryptophan eine extensive Entzündung, massive Komplementablagerung und hämorrhagische Nekrose in der feto-mütterlichen Kontakt-Oberfläche. Daher schützt die IDO-Aktivität den Fetus vor der durch die T-Zellen als Antwort auf die fetalen Alloantigene induzierten Entzündungsreaktion (Lee *et al.* 2002).

Die Dezidualisierung der Stromazellen kann auch *in vitro* wiederholt werden durch die Behandlung von proliferativen isolierten Zellen mit cAMP-Analogon (Brosens *et al.* 1999; Gellersen und Brosens 2003; Salamonsen 2008) (Abb. 3). Das cAMP ist ein vom Adenosintriphosphat (ATP) abgeleitetes biologisches Molekül, welches als sekundärer Botenstoff bei der zellulären Signaltransduktion dient und insbesondere zur Aktivierung von Proteinkinasen führt.

Obwohl weithin angenommen wird, dass Progesteron den Dezidualisierungsprozess startet, ist eigentlich die cAMP-Aktivierung das obligatorische Ereignis, mit dem dieser Prozess beginnt. Der Dezidua-Phänotyp wird jedoch nicht nur durch cAMP-Signale aufrechterhalten, denn deziduale Markergene von Zellen, die nur durch cAMP *in vitro*-dezidualisiert wurden nehmen nach 6-8 Kulturtagen deutlich ab. Zellkulturen mit Progestin verbessern merklich die cAMP Antwort und ermöglichen die Expression des Deziduaphänotyp in der Langzeit-Kultur (Gellersen und Brosens 2003).



**Abb. 3: Dezidualisierung der ESZ**

Isolierte Stroma-Fibroblasten können *in-vitro* dezidualisiert werden durch Inkubation mit 8-Br-cAMP für 4-6 Tage. Der Prozess kann an den morphologischen Veränderungen der ESZ erkannt werden.

Modifiziert nach Salamonsen 2008.

## 2.2.2.2 Epithel Differenzierung und Implantationsfenster

Während des größten Teils des Zyklus ist das menschliche Endometrium nicht empfänglich für die Implantation des Embryos. Nur während einer kurzen Zeitspanne nämlich in der mittleren sekretorischen Phase (postovulatorische Tage 6-10) befindet sich das Endometrium in der empfangsbereiten Phase. Dieser Zeitraum wird auch als „Implantationsfenster“ bezeichnet (Kimber 2008; Lessey und Glasser 2008).

Molekulare und genetische Evidenz deuten an, dass lokal produzierte Signalmoleküle, wie Cytokine und Wachstumsfaktoren, zusammen mit Ovarialhormonen, als autokrine, parakrine und juxtakrine Faktoren wirken um die uterine Empfänglichkeit zu präzisieren (Wang und Dey 2006).

Die Differenzierung des Endometriumepithels, die durch Progesteron bewirkt wird, bedeutet die „Eröffnung des Implantationsfenster“ (Salamonsen 2008).

Der Implantationsprozess besteht aus drei Etappen: Apposition, Anhaftung (Adhäsion) und Penetration (Wang und Dey 2006).

Während der Apposition lagert sich der Trophoblast eng an das luminale Epithel an. Es beginnt die Etappe der Anhaftung, wenn die Verbindung zwischen Trophoblast und dem luminalen Epithel eng genug wird um ein Ablösen der Blastozyste durch uterin-luminale Spülung zu verhindern. Die Penetration beinhaltet die Invasion des Embryos durch das luminale Epithel in das Stroma um eine vaskuläre Verbindung mit der Mutter aufzubauen. Die dynamische Expression der Signalmoleküle im Verlauf dieser drei Etappen macht es schwierig zu unterscheiden welcher spezifische Signalweg zur jeder einzelnen Etappe gehört (Wang und Dey 2006) (Abb. 4).

### Apposition

Wie bereits gesagt, ist das luminale Epithel des Endometriums die erste mütterliche Kontakt-Oberfläche der Blastozyste, die während der Implantation gefunden wird (Dockery und Burke 2008). Die epitheliale Fläche ist mit einer schützenden Glycocalyx ausgelegt. Diese besteht aus komplexen glycosylierten Molekülen, deren Zusammensetzung während des Zyklus variiert. Das humane endometriale Mucin MUC-1 ist eine Glykokalyx-Komponente, die die Zell-Zell-Adhäsion hemmt und dessen Expression beim Menschen hormonell und durch die Anwesenheit der Blastozyste reguliert wird (Meseguer *et al.* 2001). Progesteron und Östrogen induzieren die Hoch-Regulation von MUC-1 im rezeptiven Endometrium. Während der Apposition bewirkt die Anwesenheit des Embryos die MUC-1-Steigerung in den Epithelzellen des Endometriums, wobei er jedoch an der Adhäsionsstelle eine parakrine Spaltung der epithelialen MUC-1 induziert. Dies deutet an, dass MUC-1 als ein endometriales antiadhäsives Molekül wirkt, das während der Anhaftung lokal durch die Blastozyste entfernt werden muss, um die Adhäsion des Embryos an der richtigen Stelle zu ermöglichen (Meseguer *et al.* 2001).

Die Östrogenwirkung löst auch andere Ereignisse, die die Implantation ermöglichen aus. Im uterinen Epithel stimuliert Östrogen die Produktion von Wachstumsfaktoren, vor allem der *Epidermal growth factor* Familie, wie EGF und HB-EGF und Cytokine wie LIF und IL-1 $\beta$  (Cross *et al.* 1994; Lim und Dey 2009; Staun-Ram und Shalev 2005).

Der Signalweg, der bei HB-EGF gestartet wird, ist während der Apposition und der Anhaftung ausführlich untersucht worden, weil HB-EGF ein früher molekularer Marker von Embryo und Uterus ist. Im menschlichen Endometrium ist die HB-EGF Expression an der apikalen Oberfläche des luminalen Epithels unmittelbar vor dem Implantationsfenster am höchsten. Die HB-EGF Expression wurde sowohl im Zytotrophoblast als auch im Synzytiotrophoblast nachgewiesen. Dies deutete an, dass HB-EGF mit der Promotion der Trophoblastentwicklung, -anhaftung und -invasion in Verbindung steht. HB-EGF wurde auch als ein Mitogen für Fibroblasten und glatte Muskelzellen identifiziert. HB-EGF wird ebenso wie andere Wachstumsfaktoren anfangs auf transmembranöse Art exprimiert. Danach kann HB-EGF enzymatisch verarbeitet werden und das reife HB-EGF wirkt als parakriner Faktor (Lim und Dey 2009).

HB-EGF verwendet verschiedene Moleküle als Rezeptoren. Die primären Rezeptoren von HB-EGF sind die des ErbB-Systems, vor allem ErbB1 und ErbB4. In der menschlichen Blastozyste ist ErbB1 in der inneren Zellmasse lokalisiert, während ErbB4 im Trophektoderm gelegen ist. Diese Beobachtungen deuten an, dass endometriales HB-EGF mit ErbB4 der Blastozyste interagiert um die Implantation zu vermitteln (Lim und Dey 2009).

HB-EGF scheint auch andere Faktoren zu regulieren, die ebenso eine Rolle in der Regulation der Implantation spielen. Dies sind unter anderem LIF und  $\beta_3$  Integrin (Lessey *et al.* 2002).

### Anhaftung

Signalsysteme der Adhäsion sind für die Anhaftungsphase notwendig. Zahlreiche Glycoproteine und Carbohydratliganden und ihre Rezeptoren befinden sich im luminalen Epithel und in den Trophoblastzellen während des Zeitraums der Implantation. Bei den wichtigsten Adhäsionsmolekülen, die in diesen Prozess eingebunden sind, handelt es sich um Integrine, Selektine, Galektine, Heparansulfat-Proteoglycane (HSPGs), MUC-1, Cadherin und den Trophinin-Tastin-Bystin-Komplex (Dey *et al.* 2004). Integrine und Selektine sind hierbei aufgrund ihrer Funktionen besonders interessant. Integrine bilden eine Rezeptor-Familie verschiedener extrazellulärer Matrix-Liganden, die die Zell-Zell Adhäsion und Signal-Transduktion modulieren. Jedes Integrin besteht aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , wobei jede  $\alpha\beta$ -Kombination eine einzigartige Bindungsspezifität und einzigartige Signaleigenschaften hat. Im humanen Uterus befindet sich Integrin  $\alpha\beta3$  im luminalen Epithel während der rezeptiven Phase und seine anormale Expression ist mit rezidivierendem Schwangerschaftsverlust verbunden (Wang und Dey 2006). Selektine bilden eine Gruppe von Zell-Adhäsions-Molekülen, die Kohlenhydrate binden. Es ist erwiesen, dass Selektin-Signalwege wichtig für die Implantation sind. Beim Menschen werden Selektin-Oligosaccharidliganden im rezeptiven luminalen Epithel exprimiert, während die Oberfläche der Trophoblastzelle mit L-Selectin-Molekülen bedeckt ist. Weitere Hinweise deuten an, dass dieses Ligand-Rezeptor-Signal wichtig für die humane Implantation ist (Genbacev *et al.* 2003).

LIF, ein Mitglied der Interleukin-6-Familie, scheint ebenso eine essentielle Rolle bei der Implantation zu spielen. In Mäusen ist LIF spezifisch am Tag 4 der Schwangerschaft in den Uterus-Drüsen exprimiert, und ebenso anschliessend in den Stromazellen, die die Blastozyste während der Anhaftung abgrenzen (Stewart *et al.* 1992).

Dies deutet darauf hin, dass LIF eine duale Rolle spielt, zunächst in der uterinen Implantationsvorbereitung und darauf folgend in der Anhaftung. Die Expression ist unter mütterlicher Kontrolle und geht immer der Implantation voraus. Weibliche Mäuse ohne funktionales LIF Gen sind fertil, aber ihre Blastozysten scheitern an der Implantation und entwickeln sich nicht weiter (Stewart *et al.* 1992). Die molekularen Mechanismen durch welche LIF an der Implantation mitwirkt sind noch nicht bekannt. Die Uterus LIF-Expression ist um den Zeitpunkt der Implantation in verschiedenen Spezies einschließlich der menschlichen Spezies hoch (Dey *et al.* 2004).

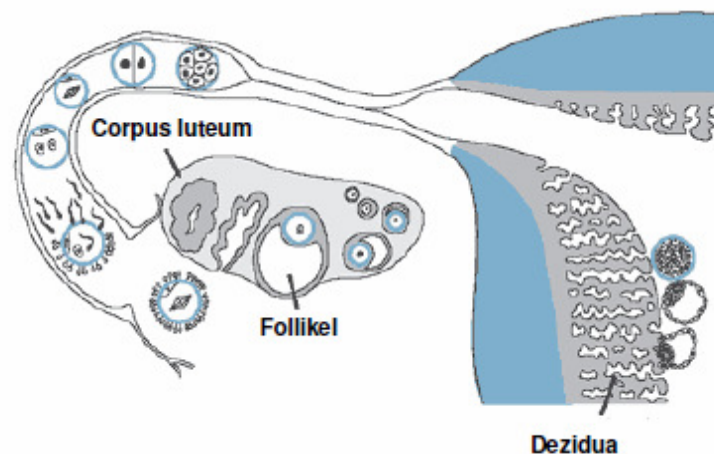
Bei der Implantation spielen nicht nur die mütterlichen Ereignisse eine wichtige Rolle, sondern auch sekundäre Ereignisse bei denen die Blastozyste essentiell ist. Zum Beispiel wird IL-1 $\beta$  bei Mäusen im Trophoblast produziert und der IL-1 Rezeptor wird vom Trophoblast, vom uterinen Epithel und vom endometrialen Stroma exprimiert (Simon *et al.* 1994). IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) verhindern die Implantation in Mäusen, jedoch hat IL-1ra keinen Effekt auf die Blastozysteanhaftung in Kultur (Simon *et al.* 1994). Es ist noch nicht

geklärt, ob IL-1 $\beta$  einen direkten Effekt auf den Uterus hat, nichtsdestotrotz sind autokrine Effekte möglich. IL-1 $\beta$  wird auch vom menschlichen Trophoblast produziert (Simon *et al.* 1993). Diese Ereignisse zeigen die bedeutende Rolle, die diese Faktoren in der Implantation spielen auf.

### Penetration

Eines der Hauptereignisse während der Implantation ist die Erhöhung der endometrialen vaskulären Permeabilität am Ort der Anheftung und Penetration. Dieser Prozess umfasst die Wirkung von Prostaglandinen (PGs). Cyclooxygenase 1 (COX1) und COX2 vermitteln die PGs-Synthese und werden durch Ptgs1 und Ptgs2 entsprechend kodiert. Die Ptgs2-Expression findet bei der Maus insbesondere im Uterus statt, Ptgs2 wird im luminalen Epithel exprimiert und unterliegt den ESZ am Implantationsort (Lim *et al.* 1997).

Es wird spekuliert, dass im Uterus und Embryo produziertes HB-EGF zu uteriner Ptgs2 Expression führt. Ptgs2<sup>-/-</sup> weibliche Mäuse sind infertil und haben eine defekte Ovulation, Befruchtung (Fertilisation), Implantation und Dezidualisierung (Lim *et al.* 1997).



**Abb. 4: Implantation**

Nach erfolgreicher Anheftung der Blastozyste an das luminal Epithel invadiert der Trophoblast in das nun als Dezidua bezeichnete Gewebe.

Modifiziert nach [www.thaisuperiorart.com/images/implantation](http://www.thaisuperiorart.com/images/implantation)

### **2.2.3 Menstruation**

Der entscheidende Auslöser der Menstruation ist der Progesteron- (und Östradiol-) Abfall als Folge der zusammenbrechenden Corpus-luteum-Funktion. Die Folgen sind Ischämie und Verlust von Gewebsflüssigkeit. Die Ischämie geht dem Beginn der Menstruation um ca. 2 Tage voraus. Anschließend kommt es zu einer umschriebenen Vasodilatation. Die im Gefolge dieser Gefäßreaktionen auftretenden zellulären Prozesse im Endometrium sind Zellschäden und Zelltod, Verlust interzellulärer Brücken, Zerstörung der extrazellulären Matrix, sowie

verminderte Koagulumbildung und ausgeprägte Fibrinolyse (Leidenberger 1998; Pfeleiderer und Kaufmann 2008).

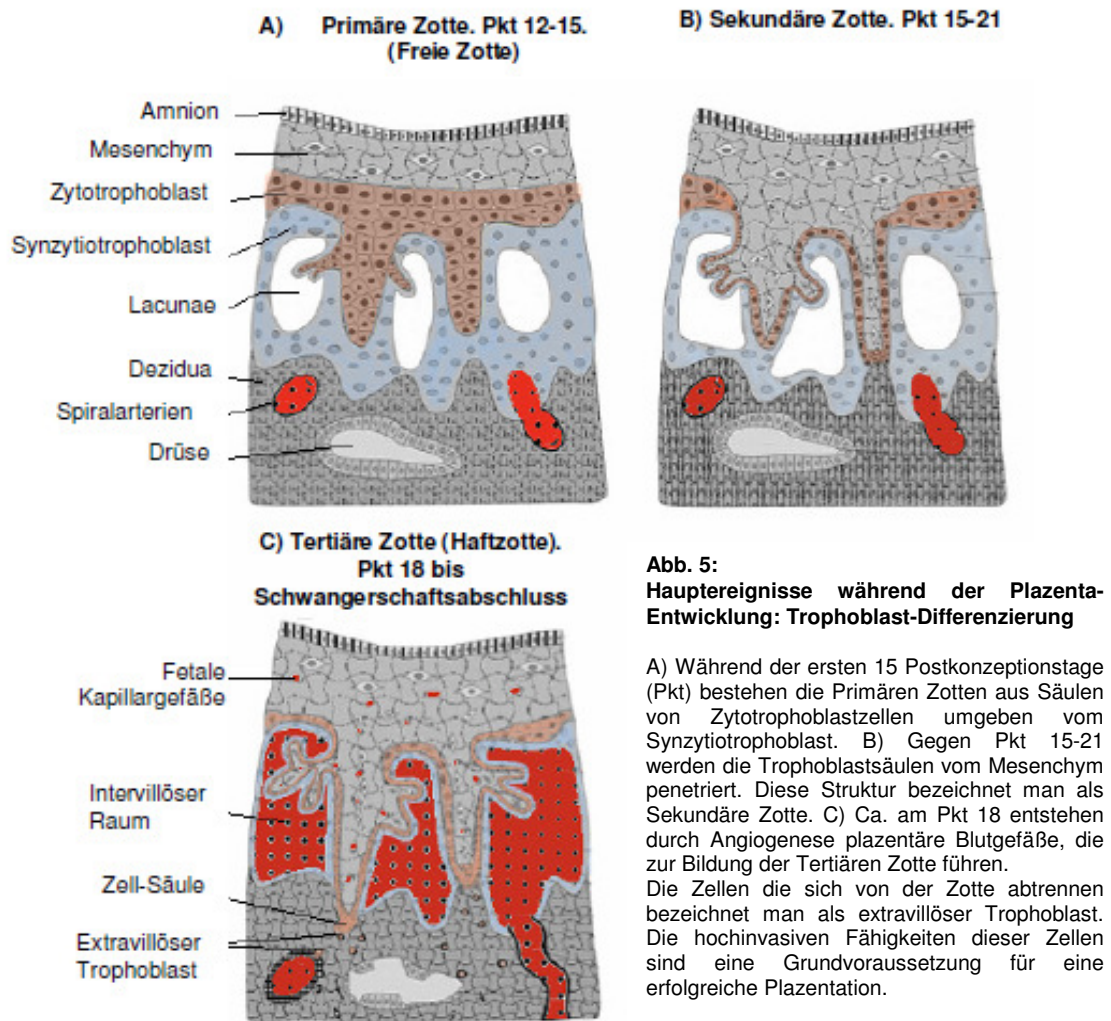
Durch anhaltende überwiegend lokale Vasokonstriktion ist der während der 3-4 Tage andauernden Menstruation nachweisbare Blutverlust auf ca. 60 ml begrenzt. Das Menstruationsblut ist durch hohe fibrinolytische Aktivität gekennzeichnet, dadurch koaguliert es sichtbar nicht. Der Prozess der Regeneration der Endometriumoberfläche ist durch östradiolinduzierte Proliferation und Gefäßneubildung (Angiogenese) gekennzeichnet. Die endometriale Stabilisierung ist bis zum Zeitpunkt der Ovulation abgeschlossen (Leidenberger 1998; Pfeleiderer und Kaufmann 2008).

### 2.3 Trophoblast-Differenzierung

Die Plazentation beginnt mit der Implantation der Blastozyste in das uterine Epithel und mit der Differenzierung zwischen embryonalem und extra-embryonalem Gewebe (Chaddha *et al.* 2004).

Im Verlauf der Nidation kommt es nun zur Ausbildung von verschiedenen Trophoblastpopulationen. Proliferative Zytotrophoblast-Stammzellen sind in der Basalmembran verankert und bilden zwei Chorionzotentypen, Freie Zotte und Haftzotte. Sowohl aus dem Zytotrophoblast der Freien Zotte (ohne Kontakt zur Dezidua) als auch aus dem Zytotrophoblast der Haftzotte (in Kontakt mit Dezidua) differenziert sich der Synzytiotrophoblast (ST). Jedoch entfernen sich ausgehend von bestimmten Anhaftungsstellen der Haftzotte Subpopulationen des Zytotrophoblasten von der Basalmembran. Diese Zellen durchdringen den ST um Kontakt mit dem uterinen Stroma aufnehmen zu können und um dieses Gewebe zu invadieren (Cross *et al.* 1994) (Abb. 5).

Diese intensive Proliferation und Sprossung läßt andere neue Strukturen erkennen: alle Trophoblastzellen, die den ST durchbrechen bezeichnet man als extravillöser Trophoblast (EVT) (Abb. 5 und 6). Diese Zellen proliferieren in der Zellsäule (Abb. 5 und 6). Von hier lösen sich Interstitielle extravillöse Trophoblastzellen ab, die nicht mehr proliferieren, sondern das uterine Interstitium der Dezidua und das innere Drittel des Myometriums invadieren (Kaufmann *et al.* 2003) (Abb. 5 und 6). Eine Subpopulation infiltriert anschließend die Wände der Spiralarterien, wird nun als endovaskulärer Trophoblast bezeichnet und nimmt später endotheliale Eigenschaften an (Abb. 6). Diese Zellen blockieren zu Beginn des ersten Trimesters den Spiralarterienfluss und verursachen eine intraplazentale Hypoxie, die die Angiogenese stimuliert und den Embryo gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies schützt (Chaddha *et al.* 2004). Am Ende des ersten Trimesters wird diese Blockierung aufgehoben und maternales Blut tritt mit der Zotte in Kontakt und die Oxygenation der Plazenta findet statt. Dafür ersetzen die endovaskulären Trophoblastzellen die muskuläre Wand der Spiralarterien mit fibrinoider Matrix und ermöglichen durch passiv dilatierte Gefäße den Blutfluss zum intervillösen Raum (Chaddha *et al.* 2004).

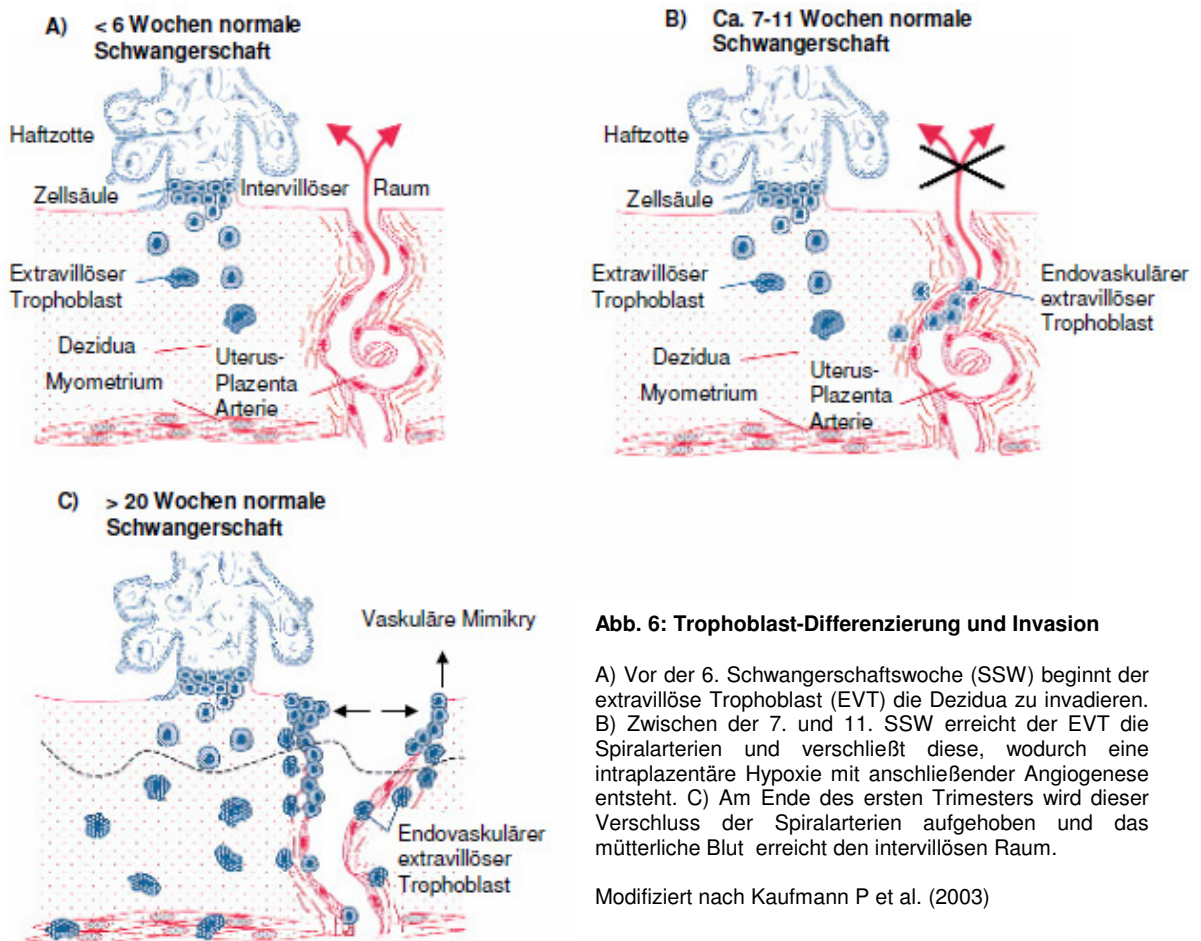


**Abb. 5: Hauptereignisse während der Plazenta-Entwicklung: Trophoblast-Differenzierung**

A) Während der ersten 15 Postkonzeptionstage (Pkt) bestehen die Primären Zotten aus Säulen von Zytotrophoblastzellen umgeben vom Synzytiotrophoblast. B) Gegen Pkt 15-21 werden die Trophoblastsäulen vom Mesenchym penetriert. Diese Struktur bezeichnet man als Sekundäre Zotte. C) Ca. am Pkt 18 entstehen durch Angiogenese plazentäre BlutgefäÙe, die zur Bildung der Tertiären Zotte führen. Die Zellen die sich von der Zotte abtrennen bezeichnet man als extravillöser Trophoblast. Die hochinvasiven Fähigkeiten dieser Zellen sind eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Plazentation.

Modifiziert nach Chaddha V et al. (2004)





**Abb. 6: Trophoblast-Differenzierung und Invasion**

A) Vor der 6. Schwangerschaftswoche (SSW) beginnt der extravillöse Trophoblast (EVT) die Dezipia zu invadieren. B) Zwischen der 7. und 11. SSW erreicht der EVT die Spiralarterien und verschließt diese, wodurch eine intraplazentäre Hypoxie mit anschließender Angiogenese entsteht. C) Am Ende des ersten Trimesters wird dieser Verschluss der Spiralarterien aufgehoben und das mütterliche Blut erreicht den intervillösen Raum.

Modifiziert nach Kaufmann P et al. (2003)

## 2.4 Regulation der Trophoblast-Invasion

Die Invasion und Migration des Trophoblasten durch die Uteruswand wird durch molekulare und zelluläre Interaktion vermittelt, die wiederum vom Trophoblast selbst und der mütterlichen Mikroumgebung kontrolliert werden. Eine erfolgreiche Implantation ist abhängig von der Synchronisierung der Trophoblastentwicklung mit komplexen molekularen Ereignissen, die durch parakrine und autokrine Regulatoren induziert werden (Cross *et al.* 1994).

Der menschliche Trophoblast ist überaus invasiv. Er durchquert das Uterusepithel und invadiert die Dezipia, den innere Teil des Myometriums und die mütterlichen Arterien (Cross *et al.* 1994).

Eine erfolgreiche Plazentation hängt von dieser hohen Invasivität der Trophoblastzellen ab. Diese Prozesse sind essentiell für eine normal verlaufende Schwangerschaft. Ihre Dysregulation führt zu den häufigsten Schwangerschaftspathologien wie intrauterine Wachstumsrestriktion und Präeklampsie. Diese Invasivität muss jedoch einer engen Kontrolle unterliegen um eine adäquate Versorgung für den Embryo zu schaffen und dem Leben der Mutter nicht zu schaden.

Die Dezipia produziert eine dichte extrazelluläre Matrix (EZM), die eine essentiell wichtige Rolle in der Kontrolle der Invasion des Trophoblasten spielt. Einerseits generiert sie eine

lokale Mikroumgebung von Cytokinen, die die Trophoblast-Anhaftung fördert und andererseits begrenzt sie aggressive Invasion (Fazleabas *et al.* 2004).

Während der Invasion treten die Trophoblastzellen in Kontakt mit unterschiedlichen Matrix-Proteinen und Basalmembranen. Die Komponenten der extrazellulären Matrix beinhalten Kollagen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Tropin und Tastin. Diese Proteine beeinflussen die Zell-Funktion über die Integrin-Bindung. Dabei beeinflussen sie auch Adhäsion, Migration, Differenzierung und Ausbreitung (Bischof und Campana 2000).

Um die Uterusinvasion zu ermöglichen produziert der Trophoblast verschiedene Proteinasen, die die EZM degradieren (Behrendtsen *et al.* 1992). Diese Enzyme werden als Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bezeichnet. MMPs gehören zu einer Familie Zink-enthaltender Endopeptidasen, die fähig zur Degradation von EZM und von der Basalmembran sind. MMPs spielen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung (Dey 2005). MMPs regulieren das Zell-Verhalten auf verschiedenen Wegen, inklusive Zell-Matrix- und Zell-Zell Interaktionen, Freisetzung, Aktivierung oder Inaktivierung von parakrinen oder autokrinen Signal-Molekülen und Zelloberflächerezeptoren (Sternlicht und Werb 2001). MMPs werden auf verschiedenen Stufen reguliert, wie auf der Stufe der Transkription, Sekretion, Aktivierung, Inhibition und Degradation. Die transkriptionale Regulation ist Zellgewebe- und MMPs-spezifisch und umfasst verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren (Staun-Ram und Shalev 2005).

*In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass eine erfolgreiche Implantation und Plazentation das Ergebnis einer Balance zwischen MMPs-Sekretion und ihrer Inhibition durch TIMPs (*Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*) ist (Dey *et al.* 2004; Niu *et al.* 2000). Die Gelatinasen MMP-2 und -9 degradieren Kollagen IV, die Hauptkomponente der Basalmembran, weshalb diese Enzyme bei der Implantation eine sehr wichtige Rolle spielen, da sie die Trophoblast-Invasion durch die Dezidua und durch die mütterlichen Gefäße ermöglichen (Librach *et al.* 1991). Die MMPs-Expression beim Trophoblast variiert mit dem Schwangerschaftsstadium: MMP-2 überwiegend während der Wochen 6 bis 8, MMP-9 überwiegend während der Wochen 9 bis 12 (Salamonsen 1999).

TIMPs sind die Haupt-MMPs-Inhibitoren. TIMPs werden durch den Trophoblast und die Dezidua-Zellen während der Gestation produziert (Niu *et al.* 2000). Cytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen auch die Trophoblast-Invasion durch Hoch- und Herunterregulieren der TIMPs (Staun-Ram und Shalev 2005).

Außer MMPs trägt auch Plasmin zur proteolytischen Umbildung der Dezidua bei. Die Plasmin-Aktivierung beruht auf der Bindung von Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) an den entsprechenden membranverankerten Rezeptor (uPAR). Dies führt über die Plasminogen-Aktivierung zur Serin-Protease Plasmin. Dieses System ist durch den Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) inhibiert (Vassalli *et al.* 1991). Außer seiner direkten proteolytischen Wirkung, hat dieses System auch einen indirekten Effekt auf die

proteolytische- Aktivierung der MMPs. Sowohl uPA als auch Plasmin wurden im Trophoblast beschrieben (Floridon *et al.* 1999).

Integrine beeinflussen die Zell-Adhäsion, Migration, Invasion, Zytoskelett-Reorganisation und die zellulären Signale (Burghardt *et al.* 2002). Der Trophoblast moduliert sein Integrin-Repertoire während der Stroma-Invasion und während der Differenzierung, und teilt sich in invasive und nicht invasive Zellen auf (Staub-Ram und Shalev 2005).

Dezidualisierte Stromazellen produzieren ebenso Cytokine, die den Dezidualisierungsprozess steuern und Chemokine, die als Chemoattraktantien auf bestimmte Leukozyten, wie uNK, Makrophagen, und auf die Migration des Trophoblast wirken.

Cytokine sind kleine pleiotrope Glykoproteinmediatoren, die häufig auf parakrine und autokrine Art wirken. Chemokine sind kleine chemotaktische Cytokine, wohlbekannt für ihr Mitwirken bei der Rekrutierung und Aktivierung der Leukozyten (Salamonsen *et al.* 2007).

Nach Beginn der Migration des Trophoblasten werden verschiedene Cytokine durch die endometrialen Drüsen und das lumenale Epithel produziert. Die Dezidualzellen und Leukozyten fördern wahrscheinlich die zelluläre Differenzierung, gleichzeitig wirken Chemokine als Chemoattraktantien für Leukozyten. Anschließend fördern Chemokine die Migration des EVT durch die Dezidua und in die Blutgefäße (Salamonsen *et al.* 2007).

Es wurde gezeigt, dass die *in vitro* Trophoblast-Invasion eine Antwort auf verschiedene Chemokine ist (Hannan *et al.* 2006; Red-Horse *et al.* 2001), wohingegen die Trophoblast-Aggregation dramatisch durch Hinzugabe von Substanzen gesteigert wurde, die die Chemokin-Aktivität stören. Dies bedeutet, dass Chemokine die Trophoblast-Migration durch die Dezidua induzieren (Red-Horse *et al.* 2005).

Die Cytokine LIF und IL-1 $\beta$  spielen, wie bereits schon erklärt, eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Anhaftung bzw. Implantation. Anscheinend beeinflussen sie auch die Trophoblast-Invasion. LIF inhibiert die Aktivität der Gelatinase im Zytotrophoblast, wodurch LIF auch auf die Zell-Invasion wirkt (Staub-Ram und Shalev 2005). IL-1 kann die MMP-9-Aktivität im Trophoblast stimulieren (Meisser *et al.* 1999) und seine Expression in endometrialen Stromazellen, womit die Invasion der Trophoblast Zellen induziert wird (Huang *et al.* 1998).

Neben den Cytokinen sind auch Wachstumsfaktoren an der Regulation der Trophoblast-Invasion beteiligt. Die epidermalen Wachstumsfaktoren EGF und HB-EGF spielen eine wichtige Rolle in diesem Prozess.

EGF ist bei der Dezidua-Trophoblast Interaktion gegenwärtig und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Plazenta. EGF wird von endometrialen epithelialen Zellen und auch durch ESZ produziert (Kaufmann *et al.* 2003). Es ist des weiteren in Trophoblastzellen beschrieben worden (Hofmann *et al.* 1991).

HB-EGF ist essentiell für den Implantationsprozess. Es wurde vorgeschlagen, dass EGF die Invasion (Bass *et al.* 1994; Staub-Ram *et al.* 2004), Differenzierung und Proliferation des Trophoblast stimuliere (Li und Zhuang 1997). Herausragende Evidenz besteht in Bezug auf

die Stimulation durch EGF der Metalloproteinase MMP-2 und MMP-9 in Trophoblast-Zellen und auch uPA und PAI-1. Hierdurch stimuliert dieser Faktor die Trophoblast-Invasion (Anteby *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2004; Staun-Ram *et al.* 2004).

Der Hepatozyt-Wachstumsfaktor (*Hepatocyte growth factor*, HGF) hat zahlreiche verschiedenen biologische Funktionen. Es ist ein potentes Mitogen, stimuliert die Dissoziation und Motilität von epithelialen Zellen und induziert die schlauchartige Struktur *in vitro*. HGF kommt in der Plazenta in hohem Maße vor und es wurde bereits gezeigt, dass HGF die Motilität und Invasivität einiger Trophoblast-Zelllinien stimuliert. Obwohl die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind, ist vorgeschlagen worden, dass HGF die Stickoxid-(NO)-Synthese stimuliert. Es gibt ein beachtliches Interesse an der Rolle des NO in der Schwangerschaft. Erhöhte NO-Synthese soll angeblich für einen Abfall des Blutdrucks in der frühen Schwangerschaft verantwortlich sein und es wurde außerdem die These aufgestellt, dass NO den Blutfluss reguliere und die Leukozyten-Adhäsion während der Plazentaentwicklung inhibiere. Außerdem ist bewiesen worden, dass HGF sowohl die NO-Produktion als auch die Trophoblast-Zell-Mobilität und Invasion stimuliert (Cartwright *et al.* 1999).

Auch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron beeinflussen die Trophoblast-Invasion. Progesteron spielt eine zentrale Rolle in der Reproduktion und ist beteiligt an der Ovulation, Implantation und Schwangerschaft. Es beeinflusst ebenso die Regulation der uterinen Funktionen während des Menstruations-Zyklus durch die Kontrolle von zyklischen Veränderungen in der Proliferation und Dezidualisierung. Progesteron ist essentiell für die Entwicklung der Dezidua und während der Fertilisation sind hohe Progesteronwerte nicht nur wichtig für das Zustandekommen der Implantation, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Letzteres wird über eine Stimulation des Uteruswachstums und über eine Gegenregulierung von Faktoren, die die Myometriumkontraktion stimulieren, bewirkt. Obwohl die Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, ist klar, dass Progesteron die Zell-Proliferation stimulieren aber auch inhibieren kann, abhängig vom Zell-Typ und physiologischem Kontext (Graham und Clarke 1997).

Es ist beschrieben worden, dass Progesteron die Trophoblast-Invasion durch die Herunterregulation der MMPs, genauer der MMP-9 beeinflusst (Shimonovitz *et al.* 1998). Dieser inhibitorische Effekt deutet an, dass Progesteron die Trophoblast-Zellen-Invasion hemmt. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass Progesteron die Invasion und die Gelatinase-Expression am Anfang des ersten Trimesters hemmt, aber dass dieses Hormon die MMP-2 Expression und dadurch die Invasion des späteren Trophoblasten stimuliert (Goldman und Shalev 2006).

Es ist berichtet worden, dass Östrogen auch einen inhibitorischen Effekt auf die Invasion des Trophoblasten hat. Untersuchungen am Primat haben gezeigt, dass die vaskuläre Invasion der Spiralarterien im Primat durch die mütterliche Östradiolproduktion gehemmt wird (Albrecht *et al.* 2006).

Jedoch wurde dieser negative Effekt als ein physiologischer Mechanismus angesehen um eine überschießende arterielle Invasion des Trophoblasten zu hemmen. Die niedrigen Östrogen-Werte während der frühen Gravidität des Primaten sind notwendig um eine normale vaskuläre Trophoblast-Invasion zu ermöglichen. Der Anstieg von Östrogen während des zweiten Drittels einer normalen Schwangerschaft hat physiologische Bedeutung, da Östrogen die Trophoblast-Invasion der Arterien modulieren dürfte. Dies gewährleistet einen optimalen Blutfluss durch das Uterus-Plazenta-Bett um dadurch ein normales fetales Wachstum und Entwicklung zu ermöglichen (Albrecht *et al.* 2006; Bonagura *et al.* 2008).

### 3 Material und Methoden

---

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Allgemein für die Zellkultur

Für diese Arbeit wurden die folgenden Zelltypen verwendet:

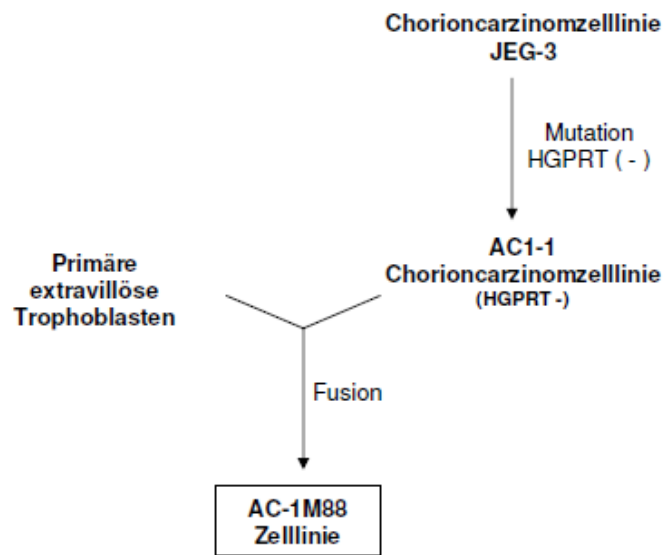
Primäre endometriale Stromazellen (ESZ): Zur Gewinnung von Primärzellen wurde uterines Gewebe aus Hysterektomien verwendet. Die Operationen wurden aufgrund von Senkungsbeschwerden oder der Diagnose "Uterus myomatosus " an prämenopausalen Frauen im ELIM-Krankenhaus, Hamburg vorgenommen. Die Verwendung solcher Gewebeproben wurde von der örtlichen Ethik-Kommission genehmigt.

AC-1M88 Zelllinie: Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Peter Kaufmann und Dr. H. G. Frank (Technische Universität Aachen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die *in vitro* proliferativen Fähigkeiten der primären extravillösen Trophoblastzellen sind sehr gering; aus diesem Grund sind verschiedene Zelllinien entwickelt worden, die die Kultivierung und Verwendung dieser Zellen im Labor ermöglichen.

Die Hybridom-Zelllinie AC-1M88 entstammt einer Fusion von primären extravillösen Trophoblasten mit der Chorionkarzinomzelllinie AC1-1, einer Mutante der JEG-3 Zelllinie (*DSM ACC 457 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Technical University of Aachen, Deutschland*) (Funayama *et al.* 1997; Gaus *et al.* 1997).

Die Zelllinie JEG-3 ist eine humane, adhärent wachsende Choriokarzinomzelllinie, die von Kohler und Bridson (Kohler und Bridson 1971) isoliert wurde. Sie verursacht in Nacktmäusen Tumore, die histologisch mit einem Chorionkarzinom vergleichbar sind (Grümmer *et al.* 1999). Mit der Hybridom-Technik wurden die extravillösen Trophoblastzellen durch Fusion mit ihrem bösartigen Gegenpart, dem Chorionkarzinom (in diesem Fall die Zelllinie JEG-3) immortalisiert. Eine wesentliche Voraussetzung für das Entstehen jeder Hybridomkultur ist die spezifische Elimination aller nichtfusionierter Tumorzellen, die aufgrund ihrer hochproliferativen Eigenschaften die niedriger proliferativen Hybridzellen sehr schnell überwachsen würden. Zur Lösung dieses Problems wurden Mutanten des Tumorgegenparts produziert, denen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT-negative Mutante, AC1-1 Zelllinie) fehlt. Nicht fusionierte Zellen können leicht nach Hybridisierung mit Azaserin-Behandlung eliminiert werden, wogegen die erfolgreichen Hybridome den HGPRT-Mangel durch die normale Aktivität des HGPRT-Enzyms der Trophoblastzellen kompensieren (Abb. 7).



**Abb. 7: Erhalt der Trophoblastzelllinie AC-1M88**

Die Trophoblastzelllinie AC-1M88 entstammt einer Fusion von invasiven primären Trophoblasten mit der Chorionkarzinomzelllinie AC1-1 (JEG-3 Mutant).

Für die Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel von der Firma NUNC, BD, Corning-Costar, Greiner, Sarstedt, Eppendorf, Milipore, Geyer und VWR bezogen, sowie sterile Lösungen und Medien verwendet. Alle Zellen wurden in Brutschränken (*Heraeus, Kendro Laboratory Products*, Deutschland) kultiviert. Die Zellkulturarbeit wurde unter einer sterilen Werkbank Klasse II Typ A/ B3 (SterilGard) durchgeführt.

Für die Zellkultur wurden die folgenden Lösungen und Medien verwendet:

#### Passagieren der Zellen

- 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung (PAA)
- *Phosphate buffered Saline* (PBS) (PAA)

#### Zellzahlbestimmungen

- 0,4 % Trypanblau-Lösung in PBS (Sigma)
- Neubauerkammer (Optiklabor)

#### Verdauung für die Isolierung der ESZ

(Konzentrationen der Stammlösungen sind in Klammern angegeben)

- 20 ml DMEM ohne Phenolrot (Sigma)
- 200 µl Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) (PAA)
- 200 µl Amphotericin B (Fungizone) (250 µg/ml) (GIBCO)

- 40 µl Primocin (50 mg/ml) (Invivogen)
- 1 ml DNase I (2000 Kunitz-U/ml) (ROCHE)
- 200 µl Kollagenase Typ 4 (10 mg/ml) (PAA)

### Minimalmedium für ESZ (MM1)

- 450 ml DMEM/HF-12 ohne Phenorot (Sigma)
- 50 ml fetales dialysiertes Kälberserum (FCS dial.) (PAA)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) (PAA)
- 1 ml Primocin (50mg/ml) (Invivogen)

### Kulturmedium für AC-1M88 Zellen

- 450 ml DMEM/ HF-12 (Sigma)
- 50 ml FCS (PAA)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) (PAA)

### Stimulationslösungen (Endkonzentrationen)

- 17-β- Östradiol (E<sub>2</sub>) (Sigma) 10<sup>-9</sup> M
- Progesteron (P<sub>4</sub>) (Sigma) 10<sup>-6</sup> M
- 8-Bromoadenosin- 3',5'-cAMP (8-Br-cAMP) (Biolog) 0,25 mM
- 8-Br-cAMP (Biolog) 0,5 mM (nur für *In vitro*-Dezidualisierung der ESZ)
- HB-EGF (Sigma) 20 ng/ml
- EGF (Sigma) 10 ng/ml
- HGF (Sigma) 10 ng/ml
- IL-1β ( Strathmann Biotec) 10 ng/ml
- LIF (Sigma) 10 ng/ml

### **3.1.2 Sphäroide Expansion Assay**

Der Assay wurde auf folgenden Trägern durchgeführt:

- 0,1 µm Poren-Zellkulturmembranen (Falcon). Die Membranen wurden im unserem Labor mit Matrigelbasalmembran-Matrix 10 mg/ml (BD Biosciences) beschichtet.
- 0,45 µm Poren-Matrigelbasalmembranen (BD BioCoat) (Diese Membranen werden schon mit einer Matrigelschicht geliefert.)
- 8-Kammer Permanox Objektträger (NUNC) ohne Matrigel.



Für die Bildung der Sphäroide wurde das folgende Material verbraucht:

- AC-1M88 Zellen und zugehöriges Medium
- sterile nicht adhärente 96-Well-Rundbodenplatten (Greiner)
- 0,25% Methylcellulose (R&D Systems)

Die Sphäroide wurden mit Phasenkontrast- und LBD-2N-Filter und unter Verwendung von 2x, 4x, 10x Objektiven mit einem CKX41 Olympus Mikroskop betrachtet und mit einer CC-12 Olympus Digitalkamera fotografiert.

Für die Fixierung der Sphäroide verwendete Materialien:

- Formaldehyd 37 % in Wasser (Sigma)
- Paraformaldehyd 4 % in PBS (Fluka). Paraformaldehyd wird als Pulver gekauft und wie folgt angesetzt: 4 g werden in 80 ml Wasser bei 60 °C gelöst, dazu wird 1N NaOH gegeben bis die Flüssigkeit klar wird schließlich auf 100 ml aufgefüllt.
- 0,2 % Triton X-100 in PBS (Sigma)
- PBS (PAA)

Für die Immunzytochemietechnik verwendete Materialien:

- Vectastain ABC Kit Universal PK-6200 (Linaris)
- Avidin/Biotin Blocking Kit (Linaris)
- DAB Substrat Kit für Peroxidase (Linaris)
- Vector SG Substrat Kit für Peroxidase (Linaris)
- Methanol 100 % (Merck)
- Wasserstoffperoxid 30 % (Merck)
- PBS (PAA)
- Antikörper (Tabelle 1)
- Faramount Aqueous Mounting Medium (Dako)

**Tabelle 1: Für die Immunzytochemie verwendete Antikörper**

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verwendet für die Markierung von</u>	<u>Verdünnung</u>
Cytokeration 7 (OV-TL 12/30)	DakoCytomation	Trophoblast/epitheliale Zellen	1:200
Vimentin (V9)	DakoCytomation	Dezidua/mesenchymale Zellen	1:1000

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Isolierung der ESZ**

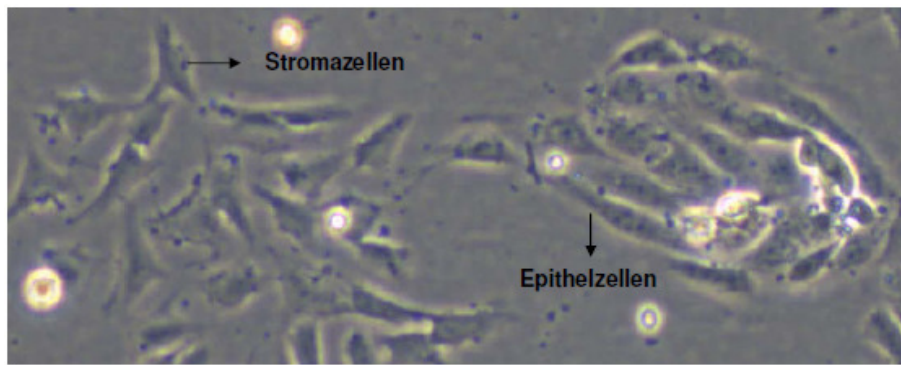
Das Gewebestück bestehend aus Myometrium und Endometrium wurde auf einer Petrischale mit 20 ml Verdauungslösung bearbeitet.

Das Endometrium wurde mit einem Skalpell vom Myometrium abgeschabt und so abgetrennt. Das Gewebe wurde so lange bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis die schlauchförmigen Drüsen freigelegt waren. Während der Verdauung wurde die Suspension geschwenkt oder pipettiert um die Zellen in Suspension zu halten.

Die Zellsuspension wurde auf eine T 75-Flasche mit 20 ml Minimalmedium überführt und eine Stunde inkubiert, damit die Stromazellen sich auf der Oberfläche des Flaschenbodens anhaften.

Der Überstand mit Drüsen wurde abgenommen. Zu den angehefteten Zellen wurde 10 ml Minimalmedium gegeben. Nach einer Stunde wurde der Überstand in eine neue T 75 Flasche überführt und dazu 10 ml Minimalmedium gegeben. Die Flaschen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

Da durch die Präparationsmethode eine Verunreinigung der ESZ mit Epithelzellen unvermeidbar war (Abb. 8), wurden die ESZ, wenn sie ausreichend konfluent waren mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und passagiert. Hierdurch wurden die Epithelzellen eliminiert, da sich diese nicht mehr an den Flaschenboden anhaften.



**Abb. 8: Stroma und Epithelzellen während der Isolierung der ESZ**

Die Stromazellen sind länglich und fibroblastähnlich. Die Epithelzellen sind rundlicher und bilden während ihres Wachstums eine Spiralforn.

### 3.2.2 Kultivierung der AC-1M88 und ESZ

Die Zellen wurden in verschiedenen Zellkulturflaschen (T 180; T 75; T 25) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Zellen sind als Monolayer gewachsen. Um die Zellen vom Flaschenboden lösen zu können, wurden die Zellen nach einer Konfluenz von circa 90% mit Trypsin behandelt. Nach circa fünf bis acht Minuten Behandlung erhielt man eine Zellsuspension. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert um die Zellen vom Trypsin zu trennen. Die Zellen wurden in einer 1:10 Verdünnung in das Medium resuspendiert und in einer neuen Flasche weiter kultiviert. Die ESZ wurden grundsätzlich in Kulturmedium, das mit steroidfreiem FCS (FCS dial.) versetzt worden war (MM1) kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

#### Stimulierung der Zellkulturen

Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Substanzen, wie Steroidhormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren wurden kultivierte Zellen mit Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (siehe Kapitel 3.1.1) inkubiert. Das hierbei für die Stimulierung verwendete Medium war ebenfalls MM1.

### 3.2.3 *In vitro*-Dezidualisierung der ESZ

Die kultivierten ESZ, die einen typischen Fibroblast-Phänotyp zeigten, wurden für diese Methode ausgewählt. Die Zellen wurden mit dem gewöhnlichen Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % in T 180 Kulturflaschen kultiviert. Um die *in vitro*-Dezidualisierung von ESZ zu ermöglichen, wurden die Zellen mit 8-Br-cAMP 0,5 mM in MM1 mehrere Tage lang inkubiert. Eine Kulturflasche mit ESZ, die nicht behandelt wurde, wurde parallel als zusätzliche Kontrolle kultiviert. Die Zellen wurden jeden Tag überwacht und mit den nicht

stimulierten Zellen verglichen. Sobald die Zellen morphologische Merkmale dezidualisierter Zellen zeigten, wurden sie für die verschiedenen Versuche verwendet.

### 3.2.4 Sphäroide Expansion Assay

#### 3.2.4.1 Sphäroide-Bildung

Für die Untersuchung der Dezidua-Trophoblast-Interaktion wurde ein Sphäroide Expansion Assay verwendet.

Primäre Zytotrophoblastzellen formieren sich in nicht adhärenen 96-Well-Rundbodenplatten mit Hilfe von Methylcellulose zu Bällchen (Sphäroide) (Korff *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde diese Methode für AC-1M88 Zellen angewendet. Dafür mischt man pro Well einer 96-Rundbodenplatte ca. 3000 Zellen mit 10 µl 0,25 % Methylcellulose (MC) und 90 µl Medium für AC-1M88 Zellen (Abb. 9).

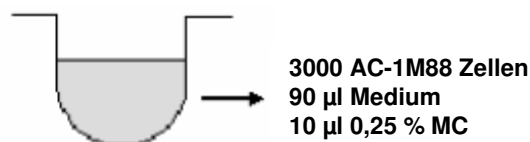


Abb. 9: Well einer 96- Well-Rundbodenplatte

Die Durchführung erfolgte in unserem Labor nach folgenden Schritten:

Eine T180 Kulturflasche mit AC-1M88 Zellen wurde kultiviert bis zu einer Konfluenz von 90%. Die Zellen wurden trypsiniert und durch anschließende Zentrifugation vom Trypsin erneut getrennt. Das Pellet wurde in 3 ml frisches Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubaukammer wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

Ca. 100 Sphäroide wurden in jedem Versuch gebildet. Für diese Sphäroidzahl wurden  $3 \times 10^5$  Zellen, 1000 µl 0,25 % MC und 9 ml Medium benötigt.

Die bei unseren Versuchen verwendete Methylcellulose war in einer Konzentration von 0,28 % geliefert worden, weshalb nur 890 µl 2,8 % MC und 9,11 ml Medium benötigt wurden.

Von der Volumenmenge des Mediums (ml) wurden immer die Anzahl ml, in der die Zellen zuvor suspendiert worden waren, abgezogen.

Dementsprechend wurden dann  $3 \times 10^5$  Zellen + 890 µl 2,8 % MC und (9,11 ml – ml Zellsuspension) Medium in einem Röhrchen gemischt.

100 µl dieser Mischung wurden pro Well auf einer 96-Well-Rundbodenplatte verteilt und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Abb. 10). Nach dieser Inkubationszeit erhielt man ein Sphäroid pro Well.

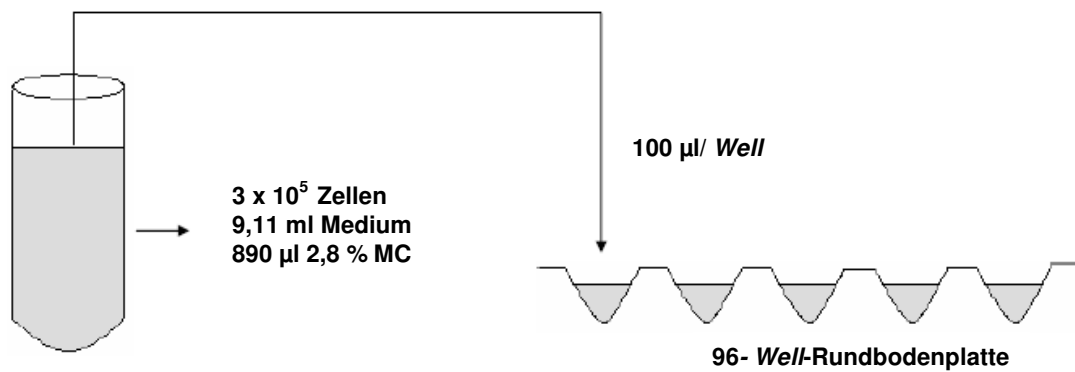


Abb. 10: Bildung von 100 Sphäroiden

### 3.2.4.2 Ausplattierung der ESZ

Am Tag, an dem die Sphäroide angesetzt worden waren, wurden auch die ESZ auf den verschiedenen Trägern ausplattiert.

Diese Zellen, die in Kulturflaschen als Monolayer gewachsen sind, wurden zuvor trypsinisiert und zentrifugiert. Hinterher wurde eine Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer durchgeführt. Die Zellen, die zuvor nicht dezidualisiert worden waren, wurden mit einer Anzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen/Well eines 8-Kammer-Permanox-Objekträgers ausplattiert, zuvor dezidualisierte Zellen aufgrund langsameren Wachstums und höheren Zellverlustes mit einer Anzahl von  $8 \times 10^4$  Zellen/Well. Die Zellen sind adhärent gewachsen.

Parallel und auf analoge Art und Weise wurden die ESZ auf einer Matrigelschicht ausplattiert. Dafür wurden die Träger vor der Ausplattierung der Zellen mit einer Matrigelschicht bedeckt.

### 3.2.4.3 Ansatz der Matrigelschicht auf den verschiedenen Trägern

Matrigel wird bei  $-20\text{ °C}$  solide geliefert. Vor der Verwendung wurde das Matrigel über Nacht bei  $4\text{ °C}$  aufgetaut.

Alle benötigten Materialien (Pipettenspitzen, Platten, Tubes, Scraper und das Verdünnungsmedium) wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert und während der Arbeit auf Eis gestellt.

$50\text{ µl}$  Matrigel/ $\text{cm}^2$  Wachstumsfläche verdünnt bis zum Verhältnis 1:1 mit Serum-freiem Medium (DMEM/HF-12) wurde mit gekühlten Pipettenspitzen pipettiert und mit einem gekühlten Scraper im Well verteilt. Die Platte wurde zwischen 10 und 30 min. auf Eis in den Kühlschrank gestellt um das Matrigel gleichmäßig im Well zu verteilen. Danach wurde die Platte für 30 min bei  $37\text{ °C}$  inkubiert um das Matrigel zu gelieren. Hinterher wurden die ESZ, wie früher schon erklärt, auf die Matrigelschicht ausplattiert.

Die Bearbeitung von Matrigel im Labor stellt gewisse Schwierigkeiten dar, die durch die physikalischen Eigenschaften des Matrigel bedingt sind. Aus diesem Grund wurden später auch Träger verwendet, die bereits mit einer Matrigelschicht geliefert werden.

#### 3.2.4.4 Ausplattierung der Sphäroide und Stimulation mit Faktoren

Am folgenden Tag standen die gebildeten Sphäroide und mit ESZ ausplattierten Träger zur Verfügung.

Nun wurden die Stimulationslösungen angesetzt und die Sphäroide auf Plastik, Matrigel oder ESZ-Monolayer umgesetzt.

Die Stimulationslösungen mit den verschiedenen Faktoren wurden in einem Röhrchen angesetzt. Das Medium, mit dem die Stromazellen ausplattiert worden war, wurde vorsichtig abpipettiert. Die Stimulationslösungen wurden auf die verschiedenen Träger verteilt (500 µl Stimulationslösung/Kammer).

Anschließend wurden die gebildeten Sphäroide von der 96-Well-Rundbodenplatte mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aufgesaugt (ca. 25 µl) und auf Plastik, eine Matrigelschicht, Stromazellen mit Stimulationsmedium oder Medium ohne Stimulation (Kontrolle) in den verschiedenen Kammern aufgesetzt (Abb. 11).

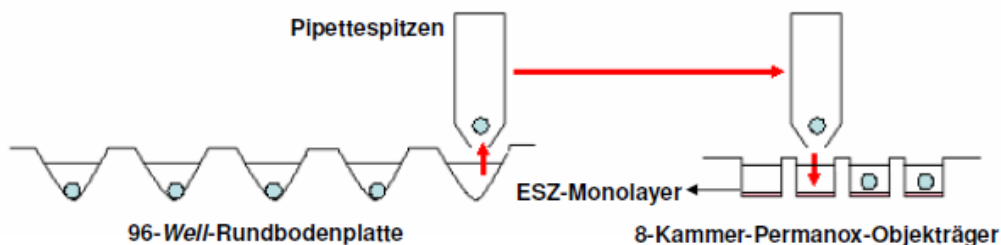


Abb. 11 : Ausplattierung der Sphäroide auf die ESZ

Diese Kokulturen wurden 2 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Tag, an dem die Sphäroide auf die verschiedenen Träger ausplattiert wurden, wurde „Tag 0“ genannt. Die Sphäroide wurden am Tag 0, 1 und 2 unter dem Mikroskop mit verschiedenen Objektiven (2x, 4x und 10x) und Filtern (Phasenkontrast, LBD-2N) beobachtet und fotografiert.

Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Kokulturen fixiert und mittels Immunzytochemietechnik gefärbt. Zur Kontrolle wurden die Sphäroide nicht auf ESZ, sondern direkt auf Plastik oder Matrigel gesetzt und ebenfalls mehrere Tage beobachtet und fixiert.

Auf diese Art und Weise wurde sowohl der Einfluss der verschiedenen Faktoren wie auch der dezidualisierten und nicht-dezidualisierten Stromazellen auf die Trophoblast-Sphäroide untersucht.

### **3.2.4.5 Doppelfärbung durch Immunzytochemie**

Um die verschiedenen Zellen des Sphäroide Expansion Assay erkennen zu können wurde als Färbungsmethode die Immunzytochemietechnik verwendet.

Die Färbungsprozedur wurde innerhalb von drei Tagen durchgeführt.

Am Tag 1 (Ende der Kokultur) wurden die Zellen (Sphäroide und ESZ) fixiert. Dafür wurde das Medium, mit dem die Zellen stimuliert worden waren, vorsichtig abpipettiert. Jede Kammer wurde danach mit 250 µl PBS gewaschen. PBS wurde abpipettiert und 250 µl Paraformaldehyd 4 % in PBS wurde in jede Kammer pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Kammern 3 mal jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Für die Permeabilisierung wurden die Kammern 10 Minuten bei RT mit 250 µl/Kammer 0,2 % Triton x-100 in PBS behandelt. Am Ende dieser Periode wurden die Kammern 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 10 Minuten Inkubation mit Wasserstoffperoxid 1:25 in Methanol blockiert. Danach wurden die Kammern 3 mal 5 Minuten mit 250 µl PBS gewaschen.

Hinterher wurden die Zellen 15 Minuten mit 5 Tropfen/Kammer Avidin-Lösung bei RT inkubiert. Nach kurzem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit 5 Tropfen /Kammer Biotin-Lösung bei RT inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen.

Normalserum aus ABC-KIT wurde 1:100 mit PBS verdünnt. 250 µl dieser Lösung wurden pro Kammer pipettiert und während 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das überschüssige Serum entfernt. Der CK7-Antikörper (Antikörper gegen AC-1M88-Zellen) wurde mit dem erwähnten verdünnten Normalserum auf ein Verhältnis von 1:200 verdünnt. 250 µl/Kammer wurden pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Tag 2 wurden die Objekträger 10 Minuten auf RT gebracht und 2 mal 3 Minuten mit PBS gewaschen. Der Sekundär-Antikörper (universeller biotinylierter SEK aus ABC-KIT) wurde in der Zeit wie folgt angesetzt: 100 µl SEK (2 Tropfen) auf 5 ml PBS plus 100 µl (2 Tropfen) Normalserum. Ca. 250 µl dieser Lösung wurden pro Kammer pipettiert und 30 Minuten bei RT inkubiert.

Avidin/Biotin-Komplex (aus dem ABC-KIT) musste 30 Minuten vor Gebrauch wie folgt angesetzt werden: 5 ml PBS plus 2 Tropfen (100 µl) Reagenz A, mischen, hinterher Zugabe von 2 Tropfen (100 µl) Reagenz B, und bei RT stehen lassen.

Nach der Inkubation mit SEK mussten die Kammern 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen werden. Ca. 250 µl Avidin/Biotin-Komplex mussten pro Kammer pipettiert und 30-60 Minuten bei RT inkubiert werden. Danach wurden die Zellen 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Das DAB-Suorat musste kurz vor Gebrauch wie folgt angesetzt werden: 5 ml H<sub>2</sub>O plus 2 Tropfen *Buffer Stock Solution*, gut mischen. Zugabe von 4 Tropfen DAB Stock Solution, gut mischen. Zugabe von 2 Tropfen *Hydrogen Peroxide Solution*, gut mischen. Ca. 250 µl der Mischung pro Kammer pipettieren. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT auf Farbumschlag achten und sofort Wässern. Hinterher 5 Minuten mit H<sub>2</sub>O waschen.

Bei den Sphäroiden, die direkt auf Plastik ausplattiert worden waren, war der Färbungsprozess hiermit abgeschlossen. Bei den Sphäroiden, die auf ESZ ausplattiert worden waren, wurde die Doppelfärbung wie folgt durchgeführt.

Zur Blockierung der Substratreaktion der 1. Färbung mussten die Kammern 10 Minuten mit der Methanolblockade inkubiert werden (siehe Tag 1). Danach mussten die Schritte mit *Avidin/ Biotin blocking Kit* und Normalserum genau wie am Tag 1 wiederholt werden. Dieses Mal wurden die Zellen anstatt mit CK7 mit Vimentin-Antikörper (Antikörper gegen ESZ) inkubiert. Der Antikörper musste zuerst 1:1000 mit verdünntem Normalserum verdünnt werden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper inkubiert (ca. 250 µl/Kammer).

Am Tag 3 wurden die Objektträger zu Beginn mit Ansetzen des Sekundär-Antikörpers und Avidin/Biotin-Komplexes genau wie an Tag 2 behandelt. Nach der Inkubation mit AB-Komplex wurde das Vector SG Substrat kurz vor Gebrauch wie folgt angesetzt: 5 ml PBS plus 2 Tropfen Chromogen, gut mischen. Zugabe von 2 Tropfen *Hydrogen Peroxide Solution*, gut mischen. Ca. 250 µl pro Kammer der Mischung pipettieren und 10 Minuten bei RT inkubieren, auf Farbumschlag achten und dann sofort Wässern. Hinterher 5 Minuten mit H<sub>2</sub>O waschen.

Die Objektträger wurden am Ende mit *Faramount Mounting Medium* eingedeckt und fotografiert.

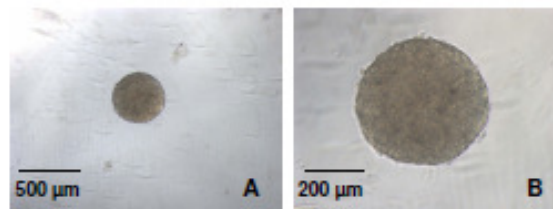


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bildung und Ausplattierung der AC-1M88 Sphäroide

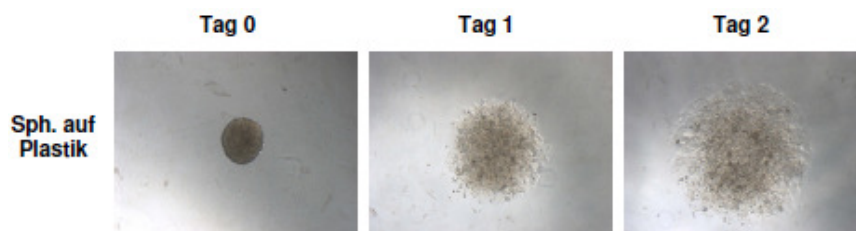
Für die Sphäroid-Bildung wurden AC-1M88 Zellen mit Methylcellulose in den *Wells* einer sterilen nicht adhärenenten 96-*Well*-Rundbodenplatten für 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit bildete sich ein Sphäroid pro *Well* (Abb. 12). Nur morphologisch gleichmäßig rundlich gebildete Sphäroide wurden für den Expansion Assay verwendet.

Nach der Aussortierung wurden alle Sphäroide plus 25  $\mu$ l Medium mit einer 20-200  $\mu$ l Pipettenspitze aufgesaugt und auf Plastik oder Matrigel ausplattiert. Dieser Tag wurde „Tag 0“ genannt. Die Sphäroide wurden zwei Tage kultiviert (Tag 1 und 2). In diesem Zeitraum haben sich die Sphäroide ausgebreitet (Abb. 13).



**Abb. 12: AC-1M88 Sphäroid**

Nach 24 Stunden Inkubation mit 0,25 % Methylcellulose bildeten circa 3000 Zellen der Zelllinie AC-1M88 ein Sphäroid. A) 4x Objektiv B) 10x Objektiv.  
(Repräsentativer Sphäroid am Tag 0 auf 8-Kammer Permanox Objektträger, Phasenkontrast-Mikroskopie)



**Abb. 13: Expansion eines Sphäroides während 2 Tage Inkubation**

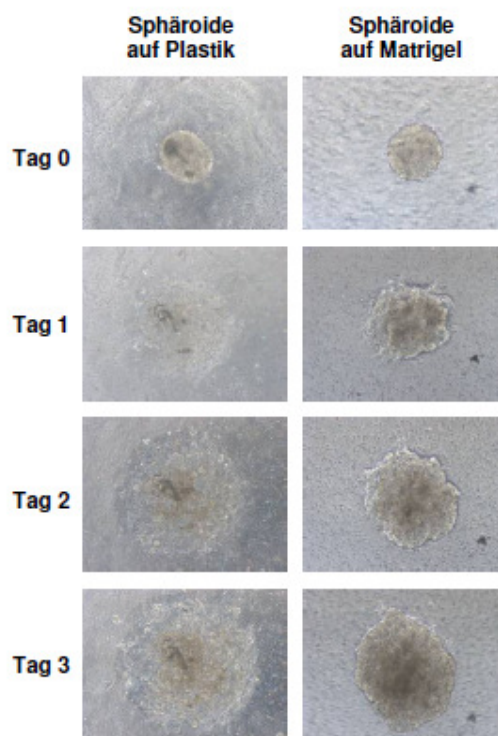
Repräsentativer Sphäroid auf 8-Kammer Permanox Objektträger, (Phasenkontrast-Mikroskopie, 4x Objektiv).

Ausbreitung der Sphäroide: Vergleich Plastik und Matrigel

Um die Dezidua zu invadieren, müssen die Trophoblastzellen die extrazelluläre Matrix auflösen, wofür diese Zellen verschiedene Proteinase produzieren müssen (Cross *et al.* 1994; Staun-Ram und Shalev 2005).

In unserem Modell wurde zu Anfang die Extrazellulärmatrix durch eine Matrigelschicht, mit der die verschiedenen Träger in unserem Labor bedeckt worden waren, ersetzt. AC-1M88 Sphäroide wurden auf die Matrigelschicht ausplattiert. Als Kontrolle wurden entsprechende Sphäroide auf Plastik inkubiert.

Die Matrigelschicht hatte einen negativen Einfluss auf die Expansion der Sphäroide im Vergleich mit den Kontrollen auf Plastik. Nach zwei Tagen Inkubation war die Zunahme auf Matrigel deutlich geringer als die auf Plastik. Dagegen verbreiterte sich die Fläche der Sphäroide auf Plastik offensichtlich (Abb. 14).



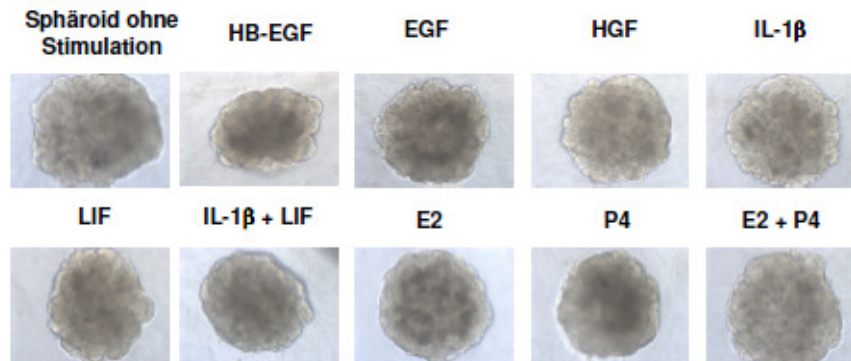
**Abb. 14: Expansion der Sphäroide. Vergleich Plastik und Matrigel.**

Sphäroide auf Plastik und auf 0,1  $\mu\text{m}$  Poren-Zellkulturmembran. Diese Membranen wurden in unserem Labor mit Matrigelbasalmembran-Matrix 10 mg/ml beschichtet. (Phasenkontrast Mikroskopie, 4x Objektiv).

In späteren Versuchen wurden die Sphäroide auf bereits mit Matrigel bedeckten gelieferten Trägern ausplattiert und mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (HB-EGF, EGF, HGF), Cytokinen (LIF, IL-1 $\beta$ ), und Steroidhormonen (E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub>) stimuliert.

Nach 48 Stunden Stimulation sieht man auf Matrigel keinen Einfluss der Faktoren. Alle Sphäroide wurden gleichmäßig größer, aber es wurde kein Unterschied in der Expansion

zwischen Kontrolle (unstimulierte Sphäroide) und den verschiedenen Faktoren beobachtet (Abb. 15).



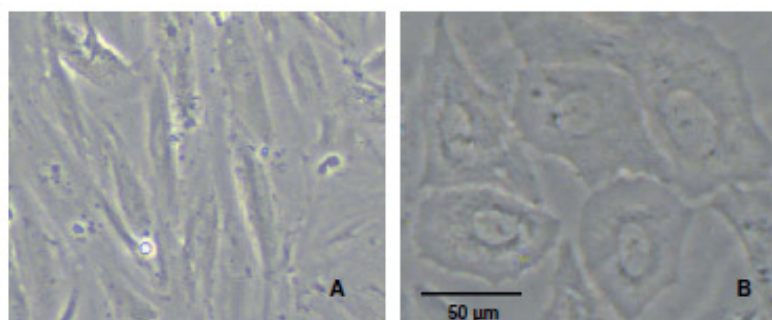
**Abb. 15: Expansion der Sphäroide auf Matrigel nach der Faktoren-Stimulation**

Repräsentativer Versuch: Sphäroide auf 0,45  $\mu\text{m}$  Poren-Matrigelbasalmembranen (diese Membranen werden schon mit einer Matrigelschicht geliefert.) (Phasenkontrast Mikroskopie, 4x Objektiv).

#### 4.2 ESZ: *In vitro*-Dezidualisierung und Bildung der ESZ-Monolayer

Die ESZ wurden *in vitro*-dezidualisiert. Dafür wurden diese Zellen, mehrere Tage mit 8-Br-cAMP behandelt. Vor und nach der Behandlung wurden die Zellen fotografiert. Parallel als Kontrolle wurden ESZ kultiviert, die nicht behandelt wurden.

Nach mehreren Tagen Inkubation haben sich die behandelten ESZ differenziert. Der längliche Fibroblast-Phänotyp wandelte sich zum rundlichen Dezidua-Phänotyp (Abb. 16), währenddessen die nicht behandelten Zellen ihre längliche Morphologie beibehielten.



**Abb. 16: *In vitro*-Dezidualisierung der ESZ**

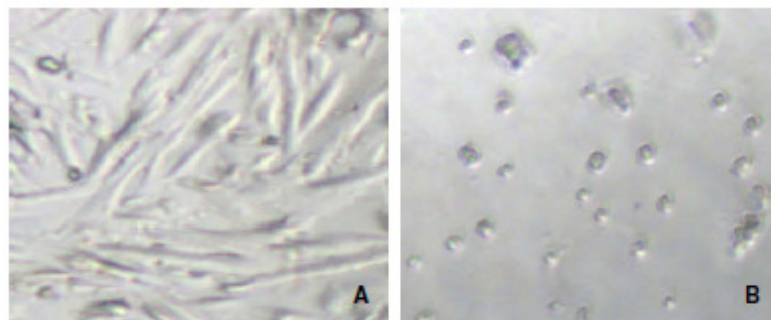
A) ESZ nach 4 Tagen Kultur ohne 8-Br-cAMP B) ESZ nach 4 Tagen Kultur mit 8-Br-cAMP. Nach der Behandlung mit dem cAMP-Analogon erhalten die Zellen die morphologischen Merkmale der Deziduazellen. (Phasenkontrast-Mikroskopie, 10 x Objektiv).

### Ausplattierung der ESZ. Vergleich Plastik und Matrigel

Der Einfluss von Matrigel wurde auf ESZ ebenfalls untersucht. ESZ wurden auf Plastik (Permanox) oder 0,45 µm Poren-Matrigelbasalmembranen plattiert.

Nach 24 Stunden Inkubation auf Plastik bildeten Stromazellen einen Monolayer auf dem Trägerboden (Abb. 17 A).

Im Gegensatz hierzu hatte die Anwesenheit von Matrigel einen negativen Einfluss auf die Ausbreitung der Stromazellen. Die Zellen, die auf Matrigel ausplattiert worden waren, haben sich nicht ausgebreitet. Die Zellen wurden kleiner und rundlich. Diese Morphologie hat sich im Laufe der Tage nicht verändert (Abb. 17 B).



**Abb. 17: Ausplattierung der ESZ. Vergleich Matrigel und Plastik**

A) ESZ auf Plastik (8-Kammer Permanox Objekträger). B) ESZ auf 0,45 µm Poren-Matrigelbasalmembranen. (Phasenkontrast-Mikroskopie, 10 x Objektiv).

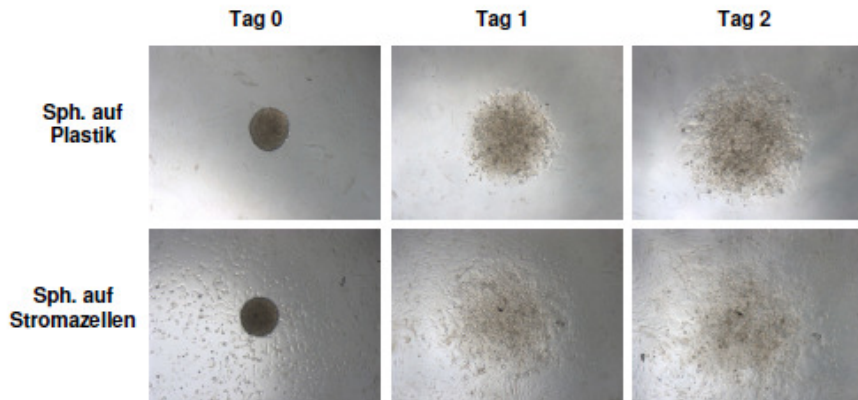
### **4.3 Kokultur: AC-1M88 Sphäroide auf ESZ-Monolayer**

Zuerst war geplant die Kokultur auf Matrigel zu etablieren. Da die vorherigen Ergebnisse jedoch gezeigt haben, dass beide Zelltypen Matrigel nicht gut tolerieren, wurde auf Matrigel verzichtet.

Die ESZ produzieren *in vivo* den größten Teil der Extrazellulärmatrix (Dockery und Burke 2008). Aus diesem Grund und um den negativen Effekt von Matrigel zu vermeiden, aber um trotzdem die *in vivo*-Bedingungen bestmöglich zu imitieren, wurde die Matrigelschicht durch eine ESZ- Monolayer ersetzt. In diesem Fall wurde keine zusätzliche Matrigelschicht benötigt und die Bedingungen wurden dadurch den *in vivo*- Bedingungen besser angeglichen.

Die AC-1M88 Sphäroide wurden danach auf die Stromazellen ausplattiert. Als Kontrolle wurden Sphäroide auf Plastik ausplattiert (Abb. 18).

Im Gegensatz zu den Sphäroiden auf Matrigel breiteten sich die Sphäroide auf ESZ deutlicher aus. Jedoch war die Grenze zwischen beiden Zelltypen und der Unterschied zur Kontrolle (Sphäroide auf Plastik) nicht deutlich zu sehen, weswegen die Zellen mittels Immunzytochemie gefärbt wurden.



**Abb. 18: Sphäroide auf Plastik und auf ESZ Monolayer.**

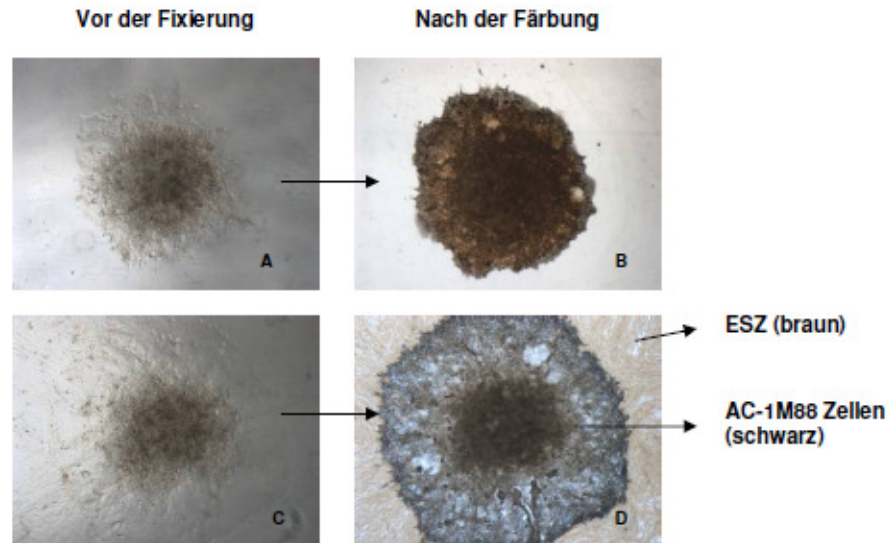
Oben) AC-1M88 Sphäroide auf Plastik. Unten) AC-1M88 Sphäroide auf ESZ Monolayer. 8-Kammer Permanox Objekträger. (Phasenkontrast-Mikroskopie, 4 x Objektiv).

#### **4.3.1 Färbung der Zellen durch Immunzytochemie**

Um die beiden Zelltypen unterscheiden zu können und um unsere Ergebnisse objektiv zu interpretieren wurden die verschiedenen Zellen mittels Immunzytochemie-Technik gefärbt (Abb. 19 und 20).

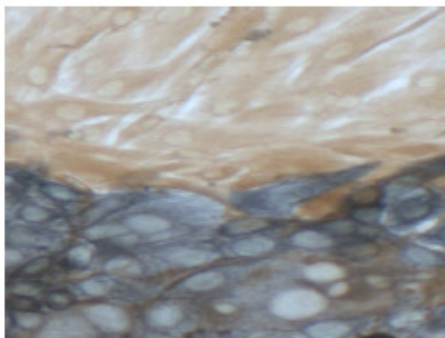
Als Antikörper wurden CK7 gegen AC-1M88-Zellen und Vimentin gegen ESZ verwendet.

Durch diese Technik konnten die zwei verschiedenen Zelltypen, wie auch die Expansion der Sphäroide und die Morphologie der ESZ, die den jeweiligen Differenzierungszustand der Zellen gezeigt hat beurteilt werden.



**Abb. 19: Immunzytochemie: Doppelfärbung.**

Sphäroide am Tag 2 vor der Fixierung (A und C) und nach der Färbung durch Immunzytochemie (B und D). A und B) Sphäroide auf Plastik, C und D) Sphäroide auf ESZ (8-Kammer Permanox Objektträger. (A und C: Phasenkontrast-Mikroskopie, B und D: LBD-2N-Filter, 4x-Objektiv).



**Abb. 20: Färbung der verschiedenen Zelltypen mittels Immunzytochemie (Vergrößerung).**

Durch die Immunzytochemietechnik wurden die Zellen gefärbt. Die verwendeten Antikörper, waren CK7 für die AC-1M88-Zellen (Schwarz) und Vimentin für die ESZ (Braun). Zellen auf 8-Kammer Permanox Objektträger. (Mikroskopie mit LBD-2N-Filter, 10 x Objektiv).

#### 4.3.2 Auswertung

Zur Bearbeitung unserer Fragestellung und nach Optimierung der Technik wurden in unserem Sphäroide Expansion Assay AC-1M88 Sphäroide auf Plastik, nicht-vor-dezidualisierten und vor-dezidualisierten ESZ plattiert. Zusätzlich wurde der Einfluss von verschiedenen Faktoren in diesem Modell getestet. Um unsere Ergebnisse zu objektivieren wurde die fotografierte Fläche jedes einzelnen Sphäroids am Tag 0 (sofort nach der Ausplattierung) und nach der Immunfärbung (Zustand am Tag 2 der Kokultur) mit Hilfe eines Computerprogramms (*Image J*) ausgemessen. Zur Absicherung der Versuchsergebnisse wurde jede Variable immer mindestens in Triplikaten untersucht, d.h. drei Sphäroide wurden gleichzeitig und identisch behandelt. Die Ergebnisse wurden in beliebigen Einheiten (b. E.) angegeben und in eine

Excel/ Tabelle eingetragen. Die Abbildung 21 zeigt ein Beispiel der Auswertung eines Versuchs.

**Sphäroide Expansion Assay. Versuch X**

Sphäroide auf Permanox-Kammern. Messung der Fläche mittels mit *ImageJ* (b.E.)

**Sphäroide auf Plastik. Tag 0- Fotos mit 4 x Objektiv**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1b	LIF	IL-1b + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	56747	64079	66568	66543	62119	58861	59089	56642	61056	60249
Sphäroid 2	61232	69660	59909	60738	68092	63192	60200	60119	59565	54283
Sphäroid 3	66398	66218	59397	57428	64042	61940	59587	55813	61462	62082

**Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1b	LIF	IL-1b + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	61942	66437	59445	62749	56044	61099	58726	60725	61528	62042
Sphäroid 2	60973	63796	58771	59574	59253	60684	56333	57514	60667	64555
Sphäroid 3	66087	62914	63612	58115	63276	58718	57198	62774	64804	56882

**Sphäroide auf vor-dezidualisierten ESZ**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1b	LIF	IL-1b + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	63322	62275	62004	62897	65555	61332	62483	70356	62787	62982
Sphäroid 2	60427	59782	57733	61150	62721	64351	60156	62143	67381	66731
Sphäroid 3	59064	67827	61491	60905	67421	60511	59325	65380	66388	65959

**Sphäroide auf Plastik. Tag 2- Korrigierte Werte für 4x Objektiv \***

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1β	LIF	IL-1β + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	502440	549788	597024	546664	504568	525688	528132	546996	523524	568184
Sphäroid 2	538912	522144	605504	525224	568748	748672	610720	537316	528016	490000
Sphäroid 3	605312	548924	593888	550016	532084	661268	576116	508872	498592	534408

**Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1β	LIF	IL-1β + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	869404	972252	771900	846004	926864	905840	844068	803540	828088	888184
Sphäroid 2	828192	969484	922448	826340	934624	967892	956424	824408	882180	874568
Sphäroid 3	879132	999904	954940	746832	844176	906208	1076216	858724	863436	873204

**Sphäroide auf vor-dezidualisierten ESZ**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1β	LIF	IL-1β + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	981288	917588	773900	899244	1216048	1005508	1320328	970220	860768	934464
Sphäroid 2	923012	1019920	916136	800868	1063888	1020124	1205636	945352	888072	929596
Sphäroid 3	923564	1054872	1059556	862636	1015800	992352	1255876	866556	901444	879896

**Abb. 21: Fläche der Sphäroide am Tag 0 und Tag 2. Excel-Tabellen**

\* Beispielversuch zur Erklärung: Die Sphäroide wurden am Tag 0 mit einem 4x-Objektiv und am Tag 2 mit einem 2x-Objektiv fotografiert. Auf diese Art und Weise wurden die Sphäroide auch ausgemessen.

Um diese Daten vergleichen zu können wurde das Ergebnis der Messung des Tag 2 entsprechend auf ein 4x-Objektiv umgerechnet (wie am Tag 0). Dafür wurden am Tag 2 gemessene Werte mit dem Faktor 4 multipliziert nach der mathematischen Formel des Flächeninhalts  $A = \pi \times r^2$ .

Ergebnisse in beliebigen Einheiten (b. E.) angegeben.

Das Expansionsverhältnis der drei einzelnen Sphäroide zwischen Tag 2 und Tag 0 wurde mittels Normalisierung errechnet um die Sphäroidausbreitung am genauesten zu objektivieren (Abb. 22).

## Ergebnisse

Um die Signifikanz von unseren Ergebnissen zu bestimmen wurden die Werte von drei repräsentativen und ähnlichen Versuchen mit dem Statistikprogramm *Graph Pad PRISM* bearbeitet. Die Abweichungsanalyse (ANOVA) (Abb. 23) und der *Post-hoc-Test Bonferroni* (Abb. 24) wurden mit diesem Programm durchgeführt und entsprechende Grafiken wurden erstellt.

**Normalisierung = Tag 2 / Tag 0**  
**Sphäroide auf Plastik**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1 $\beta$	LIF	IL-1 $\beta$ + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	8,9	8,6	9,0	8,2	8,1	8,9	8,9	9,7	8,6	9,4
Sphäroid 2	8,8	7,5	10,1	8,6	8,4	11,8	10,1	8,9	8,9	9,0
Sphäroid 3	9,1	8,3	10,0	9,6	8,3	10,7	9,7	9,1	8,1	8,6

**Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1b	LIF	IL-1 $\beta$ + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	14,0	14,6	13,0	13,5	16,5	14,8	14,4	13,2	13,5	14,3
Sphäroid 2	13,6	15,2	15,7	13,9	15,8	15,9	17,0	14,3	14,5	13,5
Sphäroid 3	13,3	15,9	15,0	12,9	13,3	15,4	18,8	13,7	13,3	15,4

**Sphäroide auf vor-dezidualisierten ESZ**

	ohne Stimul.	HB-EGF	EGF	HGF	IL-1b	LIF	IL-1 $\beta$ + LIF	E <sub>2</sub>	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub> + P <sub>4</sub>
Sphäroid 1	15,5	14,7	12,5	14,3	18,6	16,4	21,1	13,8	13,7	14,8
Sphäroid 2	15,3	17,1	15,9	13,1	17,0	15,9	20,0	15,2	13,2	13,9
Sphäroid 3	15,6	15,6	17,2	14,2	15,1	16,4	21,2	13,3	13,6	13,3

**Abb. 22: Normalisierung**

Die Ausbreitung der Sphäroide wurde durch Normalisierung objektiviert. Beispiel: Sphäroid 1 auf Plastik, ohne Stimulation. Fläche am Tag 2= 502440. Fläche am Tag 0= 56747. Normalisierung=  $502440 / 56747 = 8,9$



Repeated Measures ANOVA			
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	10		
F	6.552		
R squared	0.4502		
Was the pairing significantly effective?			
R squared	0.6707		
F	33.34		
P value	< 0.0001		
P value summary	***		
Is there significant matching? (P < 0.05)	Yes		
ANOVA Table			
	SS	df	MS
Treatment (between columns)	277.9	9	30.88
Individual (between rows)	1257	8	157.1
Residual (random)	339.3	72	4.713
Total	1874	89	

**Abb. 23: ANOVA-Test**

Beispieltabelle: Die Werte von drei repräsentativen Versuchen wurden mit dem Programm GraphPad Prism analysiert. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde hierbei bestimmt.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary
Kontrolle vs HB-EGF	-3.889	3.800	Yes	*
Kontrolle vs EGF	-2.756	2.693	No	ns
Kontrolle vs HGF	-2.778	2.714	No	ns
Kontrolle vs IL-1 $\beta$	-4.567	4.462	Yes	**
Kontrolle vs LIF	-2.767	2.703	No	ns
Kontrolle vs IL-1 $\beta$ + LIF	-5.944	5.809	Yes	***
Kontrolle vs E2	-1.267	1.238	No	ns
Kontrolle vs P4	-1.056	1.031	No	ns
Kontrolle vs E2 + P4	-0.8222	0.8034	No	ns

**Abb. 24: Bonferroni-Test**

Beispieltabelle: Durch diesen Test wurde die Signifikanz unserer Ergebnisse im Vergleich mit einer Kontrolle (nicht stimulierte Sphäroide) getestet.

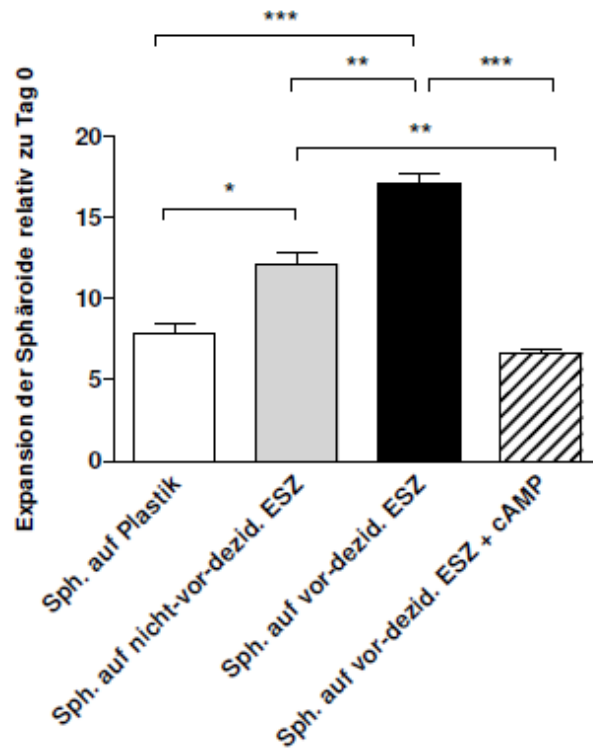
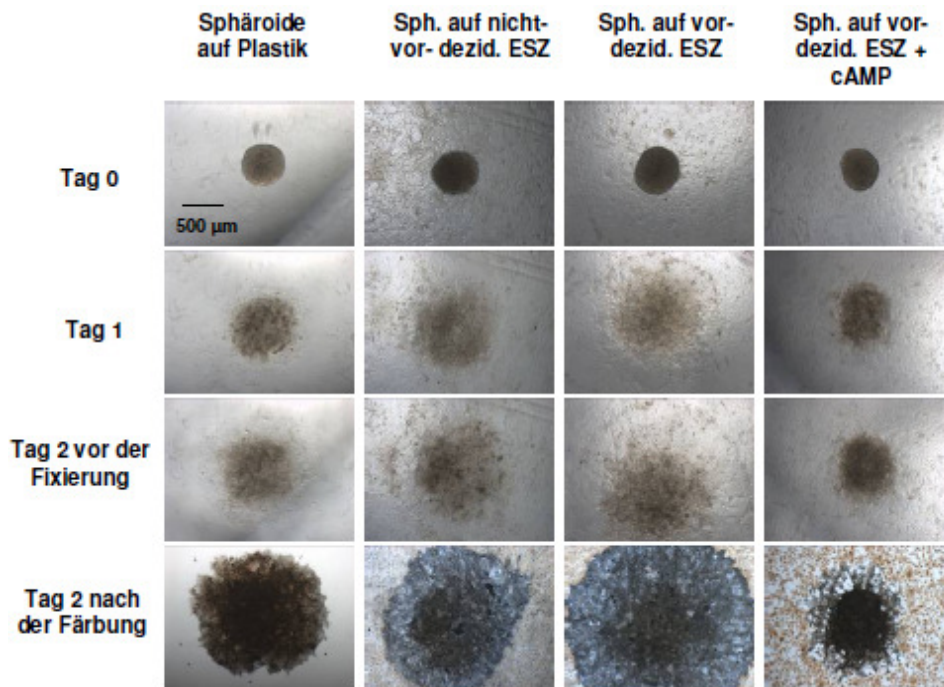
### 4.3.3 Effekt von 8-Br-cAMP auf die AC-1M88 Sphäroide und ESZ

Um den bei der *in vitro* Dezidualisierung erhaltenen Phänotyp der ESZ aufrechtzuerhalten, müssten die Zellen kontinuierlich mit 8-Br-cAMP stimuliert werden. Aus diesem Grund wurde untersucht wie die Sphäroide auf die Anwesenheit von 8-Br-cAMP reagieren (Abb. 25). Drei ähnliche Sphäroide wurden auf vor-dezidualisierten ESZ ausplattiert und weiter mit 8-Br-

cAMP behandelt. Die Ergebnisse wurden - wie bereits im vorangegangenen Kapitel erklärt - ausgewertet.

Das cAMP-Analogon übte hier einen negativen Einfluss auf die Expansion der Sphäroide aus. Nach zwei Tagen Behandlung war die Fläche dieser Sphäroide kleiner, als die derjenigen auf vor-dezidualisierten ESZ, die nicht mit cAMP-Analogon weiterbehandelt worden waren (Abb. 25). Die behandelten Sphäroide breiteten sich nicht aus, im Gegensatz dazu nahmen die Fläche der Sphäroide auf Plastik, auf nicht-vor-dezidualisierten und vor-dezidualisierten ESZ ohne 8-Br-cAMP zu (Abb. 25).

Interessanterweise zeigte dieser Versuch auch, dass die Ausbreitung der Sphäroide auf ESZ stärker, als die der Sphäroide auf Plastik war und, dass die Expansion noch weiter zunahm, wenn die ESZ vor-dezidualisiert worden waren.

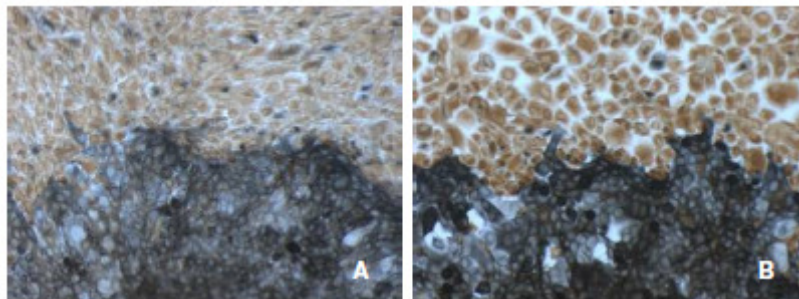


**Abb. 25: Effekt von 8-Br-cAMP auf die AC-1M88 Sphäroide**

Bilder: Repräsentativer Versuch. 8-Kammer Permanox Objektträger (Mikroskopie vor der Fixierung und Färbung mit Phasenkontrast- und danach mit LBD-2N-Filter, 4x-Objektiv).

Grafik: Statistische Darstellung desselben Versuchs, n= 3 Sphäroide, Mittelwerte ± SD, \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Im Gegensatz zu den AC-1M88 Zellen tolerierten die ESZ die Behandlung mit 8-Br-cAMP gut. Jedoch war eine weitergehende Stimulation mit cAMP-Analogen während der Kokultur nicht mehr möglich, da die Sphäroide diese Behandlung nicht ausgehalten hätten. Aus diesem Grund wurden die ESZ in allen weiteren Versuchen, sofort nach dem Prozess der Dezidualisierung auf den Trägern ausplattiert und nicht weiter mit 8-Br-cAMP behandelt. Trotzdem haben diese Zellen während der Kokultur den dezidualisierten Phänotyp beibehalten (Abb. 26).



**Abb. 26: Dezidua-Phänotyp nach der Kokultur**

Während der Kokultur über 2 Tage wurden die Zellen nicht weiter mit 8-Br-cAMP stimuliert. Trotzdem haben die ESZ die morphologischen Merkmale der Deziduazellen beibehalten. A) Nicht-vor-dezidualisierte ESZ. B) Vor-dezidualisierte ESZ (nach Fixierung und Färbung, 8-Kammer Permanox Objekträger).

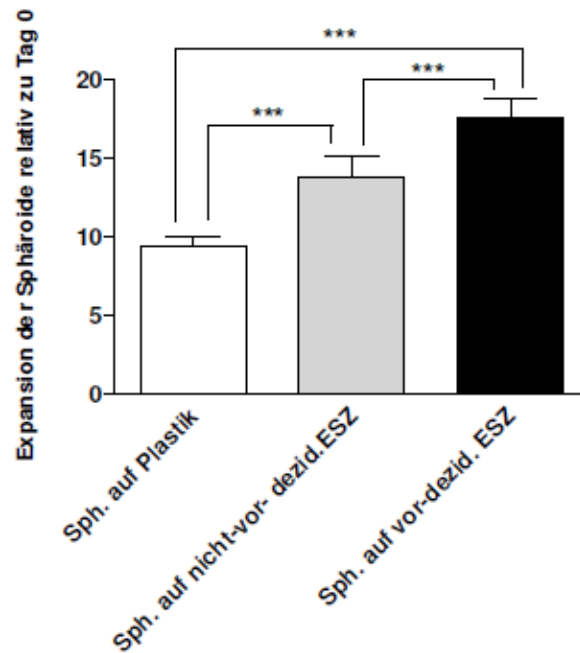
(Mikroskopie mit LBD-2N-Filter, 10 x- Objektiv).

#### 4.3.4 Einfluss der ESZ auf die AC-1M88 Sphäroide

Vorherige Versuche zeigten, dass die ESZ einen Einfluss auf die Expansion der Sphäroide haben (Abb. 25). Diese Versuche wurden jedoch immer mit der gleichen ESZ-Population durchgeführt. Um den Effekt der ESZ auf die Trophoblastzellen zu bestätigen, wurden daher diese Versuche mit verschiedenen ESZ-Populationen wiederholt.

In unserem Sphäroide Expansion Assay wurde die Expansion der Sphäroide auf vor- und nicht-vor-dezidualisierten ESZ mit der Expansion der Sphäroide auf Plastik verglichen.

Nach 2 Tagen Kokultur war die Ausbreitung der Sphäroide auf ESZ deutlich größer, als die der Sphäroide, die auf Plastik kultiviert worden waren. Die statistische Auswertung bestätigte, dass die Dezidualisierung einen signifikanten Einfluss auf die Expansion der Sphäroide hat (Abb. 27).



**Abb. 27: Sphäroide Expansion Assay: Effekt der ESZ auf die AC-1M88 Sphäroide**  
 Statistische Darstellung, n= 3 unabhängige Versuche, Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*\*\* P < 0,001.

#### 4.3.5 Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die AC-1M88 Sphäroide

Wie bereits erklärt wurden AC-1M88 Sphäroide auf Plastik, nicht-vor-dezidualisierten und vor-dezidualisierten ESZ ausplattiert.

Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren (HB-EGF, EGF, HGF), Steroidhormonen ( $E_2$ ,  $P_4$ ) und Cytokine (LIF und  $IL-1\beta$ ) wurde in unserem Dezidua-Trophoblast-Interaktionsmodell untersucht. Hierfür wurde das Medium unserer Kokultur mit den verschiedenen Faktoren angereichert und für 2 Tage kultiviert.

Der Einfluss der Faktoren auf die Sphäroide, die auf Plastik ausplattiert worden waren war nicht statistisch signifikant (Abb. 28).

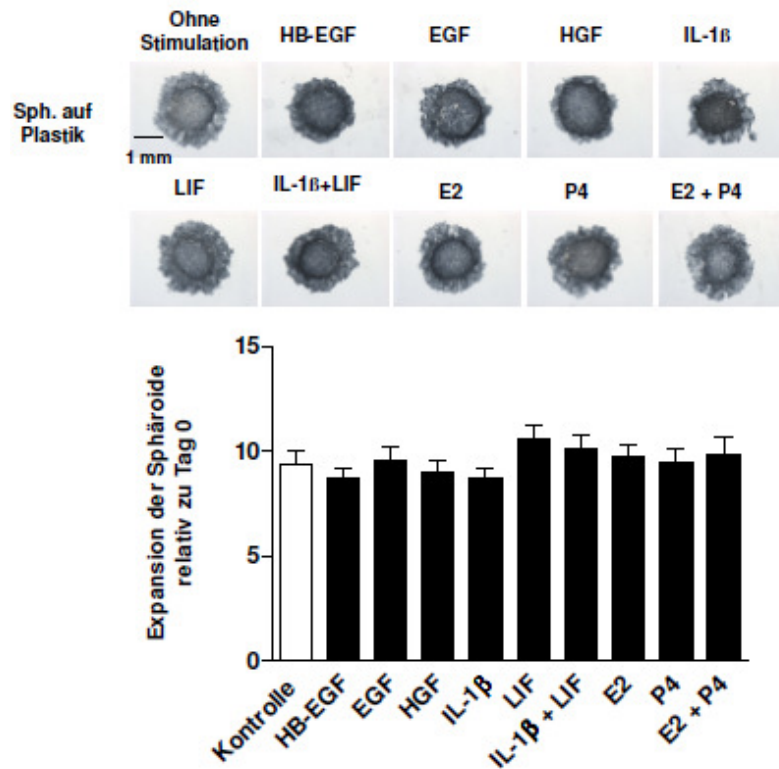
Dagegen übten bei den Sphäroiden, die auf nicht-vor-dezidualisierten Zellen ausplattiert worden waren, die Faktoren den deutlichsten Einfluss auf die Expansion aus. Bei HB-EGF, der Kombination von LIF +  $IL-1\beta$  und  $IL-1\beta$  war diese Stimulation statistisch signifikant (Abb. 29).

Bei den vor-dezidualisierten Zellen war nur die Kombination zwischen LIF und  $IL-1\beta$  signifikant (Abb. 30).

Die Abbildung 31 zeigt in getrennten Grafiken den Einfluss nur der Faktoren, die einen positiven Effekt auf die Sphäroide ausgeübt haben.

Die Grafik "Kontrolle" zeigt den Einfluss, den die ESZ (ohne Faktoren) auf die Sphäroide haben. Man sieht, dass bei der Abwesenheit der Faktoren die Ausbreitung der Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ geringer war, als auf vor-dezidualisierten ESZ. Bei

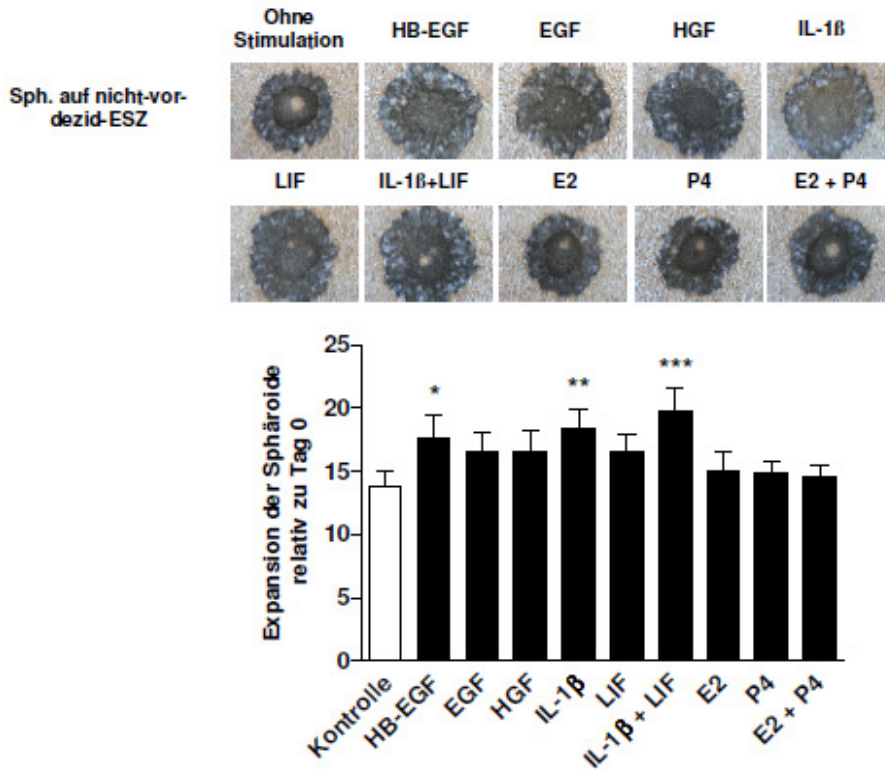
Anwesenheit der Faktoren war die Expansion der Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ fast so stark, wie wenn die Sphäroide auf vor-dezidualisierten ESZ plattiert worden waren. Diese Daten bestätigen den positiven Einfluss dieser Faktoren auf die Expansion der Sphäroide, wenn diese auf nicht-vor-dezidualisierten Zellen plattiert worden waren.



**Abb. 28: Sphäroide Expansion Assay: Effekt von verschiedenen Faktoren auf die Sphäroide auf Plastik**

Bilder: Repräsentativer Versuch. 8-Kammer Permanox Objektträger (Mikroskopie nach der Fixierung und Färbung mit LBD-2N-Filter, 2x-Objektiv)

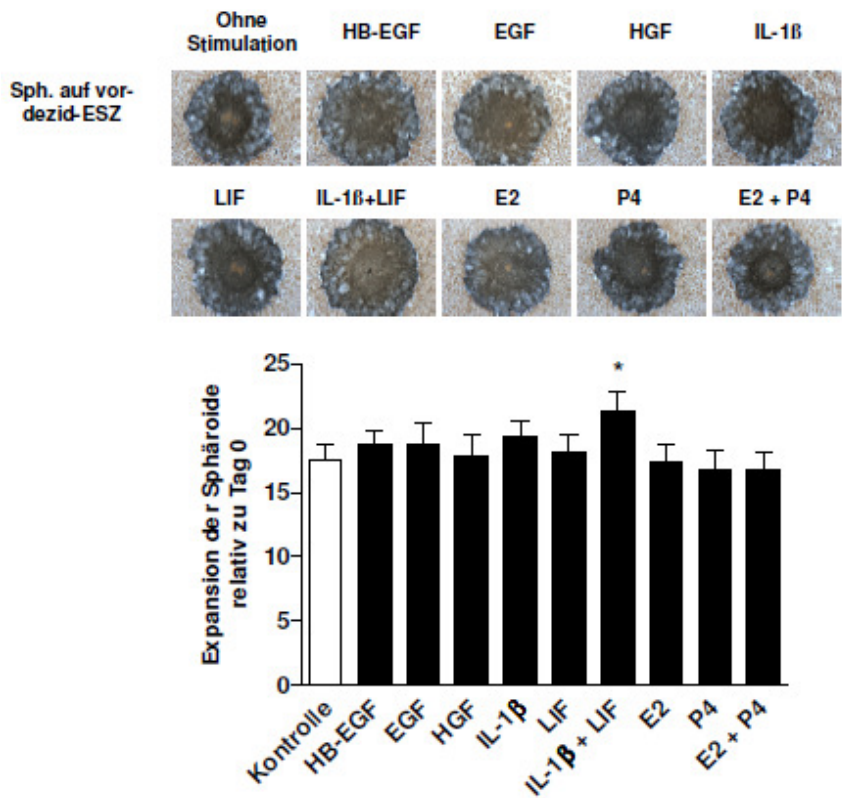
Grafik: Statistische Darstellung, n= 3 unabhängige Versuche, Mittelwerte ± SEM im Veraleich zur Kontrolle (ohne Stimulation).



**Abb. 29: Sphäroide Expansion Assay: Effekt von verschiedenen Faktoren auf die Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten-ESZ**

Bilder: Repräsentativer Versuch. 8-Kammer Permanox Objektträger (Mikroskopie nach der Fixierung und Färbung mit LBD-2N-Filter, 2x-Objektiv).

Grafik: Statistische Darstellung, n= 3 unabhängige Versuche, Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle (ohne Stimulation).



**Abb. 30: Sphäroide Expansion Assay: Effekt von verschiedenen Faktoren auf die Sphäroide auf vor-dezidualisierten-ESZ**

Bilder: Repräsentativer Versuch. 8-Kammer Permanox Objektträger (Mikroskopie nach der Fixierung und Färbung mit LBD-2N-Filter, 2x-Objektiv).  
 Grafik: Statistische Darstellung, n= 3 unabhängige Versuche, Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (ohne Stimulation).



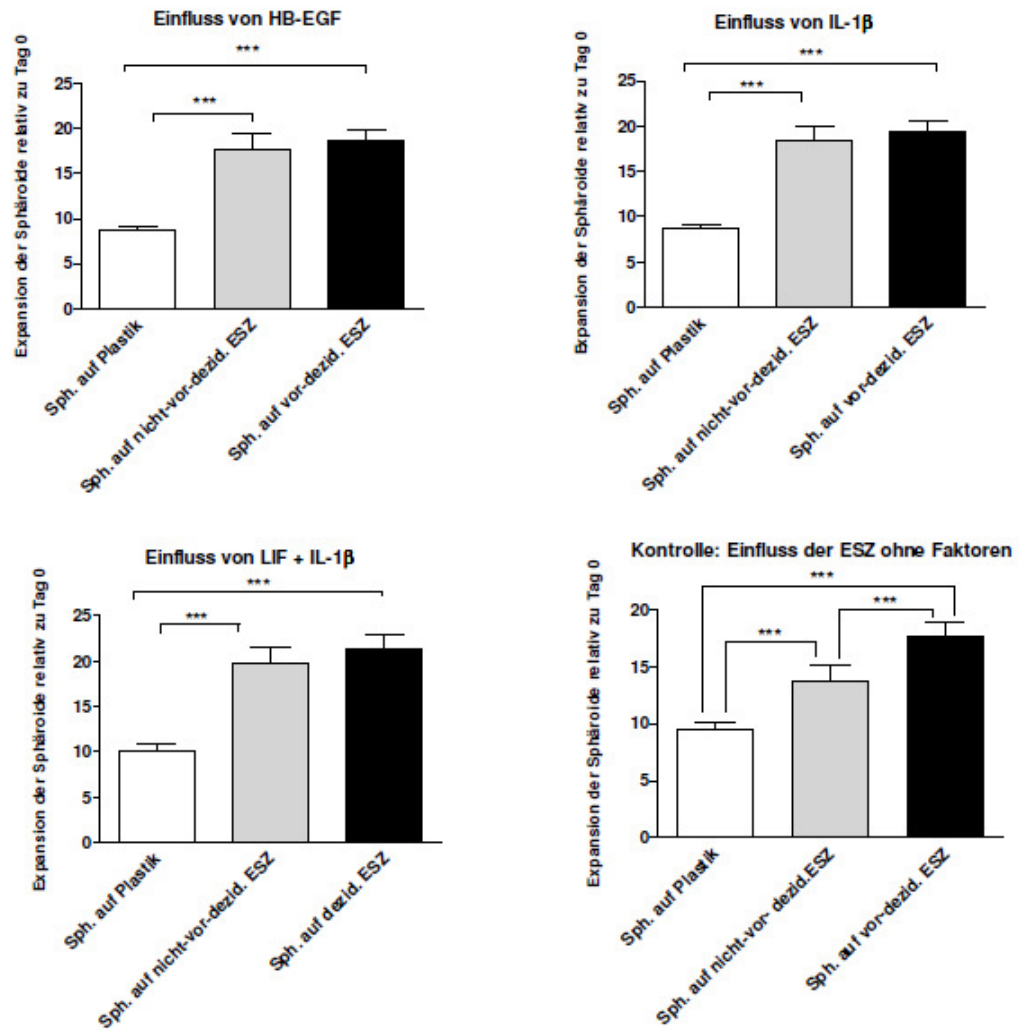


Abb. 31: Sphäroide Expansion Assay: Effekt der Faktoren HB-EGF, IL-1 $\beta$  und die Kombination IL-1 $\beta$  + LIF auf die AC-1M88 Sphäroide

Statistische Darstellung: n= 3 unabhängige Versuche, Mittelwerte  $\pm$  SEM, \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung unserer Fragestellungen wurde ein Kokulturmodell von Trophoblast- und ESZ entwickelt. Dazu wurden AC-1M88 Sphäroide und primäre ESZ konfrontiert. Der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die Ausbreitung der Sphäroide wurde in diesem Modell getestet.

Nach zwei Tagen Kokultur wurde eine duale Immunzytochemie durchgeführt um die beiden Zelltypen zu unterscheiden und die Ausbreitung der Sphäroide zu quantifizieren.

Die Anwesenheit von ESZ stimulierte die Expansion der Sphäroide. Die Ausbreitung wurde weiter gesteigert, wenn die ESZ vor-dezidualisiert worden waren.

Die Faktoren HB-EGF, IL-1 $\beta$  und die Kombination IL-1 $\beta$  + LIF übten einen stimulierenden Effekt auf die Expansion der Sphäroide aus, wenn diese auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ ausplattiert worden waren. Die Kombination IL-1 $\beta$  + LIF hatte auch einen signifikanten Effekt auf die Sphäroide auf vor-dezidualisierten ESZ. Die Faktoren EGF, HGF und die Hormone E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> hatten keinen Einfluss.

## 5 Diskussion

---

Die Trophoblast-Invasion durch die mütterliche Dezidua verwendet ähnliche Mechanismen wie ein bösartiger Tumor, wobei jedoch die Invasion des Trophoblasten strengster Kontrolle unterliegt (Ferretti *et al.* 2007). Um eine erfolgreiche Plazentation zu ermöglichen müssen die EVT-Zellen hoch invasiv werden. Störungen in der Differenzierung dieses invasiven Phänotyps führen zu schwerwiegenden Pathologien in der Schwangerschaft wie Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsretardierung (Chaddha *et al.* 2004; Gellersen *et al.* 2007a; Kaufmann *et al.* 2003).

Jedoch kann unkontrollierte Invasion potentiell auch schädlich sein, weswegen der Körper intelligente Mechanismen zur Kontrolle dieser Invasion entwickelt hat. So erhalten die EVT-Zellen diese einmalige Fähigkeit invasiv zu werden nur für einen bestimmten Zeitabschnitt.

Auch der Trophoblast selbst kontrolliert seine eigene Invasivität durch verschiedene Mechanismen. Er produziert ebenso wie die Deziduaellen TIMPs um die Aktivität seiner MMPs zu regulieren. Des Weiteren verlieren tief invadierende EVT die Fähigkeit koordinierter Integrin- Expression um zu den EZM-Liganden des umgebenden Gewebes Kontakt zu halten. Schließlich fusionieren diese Zellen und bilden multinukleäre Riesentrophoblast-Zellen, die nicht mehr invasiv sind (Bamberger *et al.* 2006; Makrigiannakis *et al.* 2006).

Die komplexen Mechanismen, die für diese erstaunliche und koordinierte, sowohl zeitliche als auch räumliche Kontrolle der Invasion verantwortlich sind, sind noch nicht genau verstanden. Autokrine und parakrine Signale scheinen hierbei eine bedeutende Rolle zu spielen (Staub-Ram und Shalev 2005). Die Kenntnis der Faktoren, die verantwortlich für diese Regulation sind, sind essentiell für das Verständnis und eventuelle Kontrolle der pathologischen Invasion während der Implantation wie auch bei einem malignen Tumor.

Die ESZ scheinen mit dieser Kontrolle eng verbunden zu sein. Diese Zellen produzieren den Hauptteil der EZM, von der man glaubt, dass sie die Invasion des Trophoblasten limitiert. Dadurch spielen diese Zellen auch eine Hauptrolle in der Regulation der Mikroumgebung der Dezidua-Trophoblast-Interaktion (Fazolebas *et al.* 2004). Der Dezidualisierungsprozess der Stromazellen spielt hierbei auch eine wichtige Rolle. Diese Zellen erfahren morphologische wie auch funktionale Veränderungen, die mit der Produktion von verschiedenen Faktoren wie auch Komponenten der EZM zu tun haben (Gellersen *et al.* 2007b). Zu den Faktoren, die man in dieser Mikroumgebung finden kann und die bei der Kontrolle der Invasion von Bedeutung sind, zählen verschiedene Cytokine, Wachstumsfaktoren und die Steroidhormone Östrogen und Progesteron (Staub-Ram und Shalev 2005).

Dies macht aus der Dezidua-Trophoblast-Interaktion ein sehr interessantes Modell der Invasion, wobei die größte Schwierigkeit dieses Modells in der komplizierten Reproduzierbarkeit der *in vivo*-Bedingungen besteht (Mardon *et al.* 2007).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der EZM so wie des Dezidualisierungsprozesses der ESZ und die Aktivität verschiedener Faktoren in einem Kokultur-Modell untersucht.

Ein Sphäroide-Wachstumsmodell wurde hierfür bearbeitet. Bei diesem Modell handelt es sich um eine praktische und übersichtliche Technik, die gezeigt hat, dass Trophoblastzellen, die als Sphäroide kultiviert werden, ihr *in vivo*-Verhalten präziser widerspiegeln als Zellen, die als Monolayer kultiviert werden (Korff *et al.* 2004).

Durch diesen Sphäroide-Expansion-Assay wurden Trophoblastzellen in Kontakt mit dezidualisierten und nicht-dezidualisierten-ESZ kultiviert. Das Kulturmedium dieses Modells wurde außerdem mit verschiedenen Faktoren angereichert. Nach zwei Tagen wurde der Einfluss der Dezidualisierung wie auch der Faktoren bestimmt und objektiviert. Die Ergebnisse wurden statistisch getestet um die Signifikanz der Resultate zu berechnen.

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die EZM, die *in vivo* durch die ESZ produziert wird durch eine artifizielle Matrigelschicht zu ersetzen.

Die Anwesenheit von artifiziellm Matrigel inhibierte jedoch deutlich die Migration der ESZ und der Trophoblastzellen. Die artifizielle Matrigelschicht wurde danach durch eine EZM produzierende Schicht von ESZ ersetzt. Interessanterweise zeigten die Trophoblastzellen unter diesen neuen Bedingungen ein vollkommen anderes Verhalten, bei dem die Zellen auf die EZM wanderten, wodurch es zu einer Ausbreitung der Sphäroide kam.

Daher schließen wir, dass die Anwesenheit einer externen Matrigelschicht (ohne ESZ) als eine mechanische Barriere, die die Migration der Zellen begrenzt, gewirkt hat.

Bei der Wiederholung des Experiments auf einem ESZ-Monolayer, dessen Zellen EZM produzieren, wurde die geeignete Mikroumgebung für autokrine und parakrine Signalen zwischen diesen zwei Zelltypen geschaffen.

Anhand dieser Ergebnisse können wir sagen, dass die EZM die Trophoblast-Invasion moduliert. Diese Matrix wirkt nicht nur als eine Barriere gegen die hohe Invasivität der EVT, sondern auch gleichzeitig als optimale Grundlage der Mikroumgebung, durch welche sich Dezidua und Trophoblast verbinden. Auf diese Art und Weise kann die EZM die Migration der Trophoblastzellen auch stimulieren. Diese Ergebnisse zeigen die große Bedeutung, die die EZM-Komponenten in der Dezidua-Trophoblast-Interaktion haben.

In unserem Kulturmodell wurde des Weiteren gezeigt, dass sich das invasive Verhalten der Trophoblastzellen signifikant verändert in Abhängigkeit von der Dezidualisierung der ESZ. Alleine die Anwesenheit der ESZ und eine EZM stimulierte die Trophoblast-Migration und dieser Stimulus verstärkte sich, wenn die ESZ vor-dezidualisiert worden waren.

Daher unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass als Folge der Dezidualisierung der ESZ bestimmte Faktoren produziert werden, die durch die Interaktion mit der EZM die Migration der Trophoblastzellen stimulieren.

Aus diesen Gründen, wurde in dieser Arbeit daher auch der Einfluss verschiedener Faktoren untersucht, die mit diesen autokrinen und parakrinen Signalen in Zusammenhang stehen könnten. Die Faktoren wurden auf Sphäroide auf Plastik, auf nicht-vor-dezidualisierten und

auf vor-dezidualisierten Zellen getestet. Die untersuchten Faktoren waren die Wachstumsfaktoren HB-EGF, EGF, und HGF; des Weiteren die Cytokine IL-1 $\beta$ , LIF und die Kombination IL-1 $\beta$  plus LIF, außerdem die Steroidhormone Östrogen, Progesteron und die Kombination von Östrogen plus Progesteron.

Bei der Ausplattierung der Sphäroide auf Plastik war der Einfluss der Faktoren auf die Invasion der Sphäroide nicht statistisch signifikant. Überraschenderweise wenn die Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ ausplattiert worden waren, haben die Faktoren HB-EGF, IL-1 $\beta$  und die Kombination LIF plus IL-1 $\beta$  die Invasion dieser Zellen stimuliert. Bei den Sphäroiden die in Kontakt mit vor-dezidualisierten Zellen ausplattiert worden waren, war nur die Kombination aus LIF und IL-1 $\beta$  positiv.

Theoretisch wäre auch möglich gewesen, dass die verstärkte Ausbreitung der Sphäroide in Gegenwart bestimmter Faktoren die Folge einer erhöhten Zellproliferation der AC-1M88 Zellen war. Dagegen sprach die Tatsache, dass diese Faktoren keinen Effekt auf die Sphäroide auf Plastik hatten, weswegen diese Option als unwahrscheinlich bewertet wurde. Spätere Versuche anderer Mitarbeiter unseres Labores bestätigten unsere Vermutungen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese über die Produktion von Faktoren durch die Dezidualisierung der ESZ. Diese Faktoren könnten u. a. HB-EGF, IL-1 $\beta$  oder LIF sein.

Unsere Vermutungen beruhen auf folgender Interpretation der Ergebnisse, nämlich, dass die Zugabe der oben genannten Faktoren zu den Sphäroiden auf vor-dezidualisierten ESZ keine signifikante Stimulation zeigt. Nach unserer Schlussfolgerung ist dies am ehesten darauf zurückzuführen, dass diese oder andere potente Faktoren im Rahmen des Dezidualisierungsprozesses bereits produziert werden und die Zugabe äußerer Faktoren auf die Trophoblastzellen keinen zusätzlichen Effekt ausübt.

Die Stimulation der Sphäroide auf Plastik (Kontrolle) mit den genannten Faktoren verursachte keine erhöhte Expansion, wogegen sich bei Ausplattierung der Sphäroide auf nicht-vor-dezidualisierten ESZ ein signifikanter Effekt ergab. Letzteres schreiben wir dem Fehlen einer EZM bei den Sphäroiden auf Plastik zu, die die Wirkung der Faktoren erst ermöglicht. Bei der nicht-vor-dezidualisierten ESZ sind optimale Voraussetzungen für die Wirkung unserer Faktoren gegeben, da in diesem Fall diese Zellen eine EZM produziert haben und noch nicht dezidualisiert worden sind. Das heißt, nach unseren Vermutungen haben diese noch keine eigenen Faktoren gebildet, weswegen äußere Faktoren den signifikantesten Effekt ausüben.

Das bedeutet, dass nicht nur die Anwesenheit der genannten Faktoren die Expansion bestimmt, sondern auch die simultane Anwesenheit der durch die ESZ produzierten EZM als Grundlage für eine erfolgreiche Stimulation. Wir vermuten hier, dass die genannten Faktoren Veränderungen in der Integrinproduktion der Trophoblastzellen induzieren. Diese Änderungen werden nur offensichtlich bei der Anwesenheit einer EZM, in der die Integrine ihre Aktivität entfalten.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Lessey *et al.* überein, die gezeigt haben, dass ESZ nach der Stimulation mit  $E_2$  und  $P_4$  für ein bis vier Tage (ähnliche Behandlung wie die *in vitro*-Dezidualisierung) HB-EGF produzieren. So gebildetes HB-EGF stimuliert wiederum die Produktion von Integrinen, Moleküle, die eine sehr wichtige Rolle bei der Invasion der Trophoblastzellen spielen (Lessey *et al.* 2002).

Später bestätigte eine andere Studie, dass die Zugabe von HB-EGF während Trophoblast-Zotte-Explantat-Kultur auf einer Matrigelschicht zu einer extravillösen Differenzierung und zu einer verstärkten Invasions-Aktivität führt (Leach *et al.* 2004).

Weitere Studien haben gezeigt, dass die Stimulation von ESZ mit IL-1 $\beta$  die Expression von verschiedenen Chemokinen stimuliert, deren Rezeptoren man in Trophoblast-Säulen zu Beginn der Gestation findet (Red-Horse *et al.* 2004).

Andere Studien haben bestätigt, dass die *in vitro*-dezidualisierten ESZ nach der Inkubation mit konditioniertem Medium menschlicher Trophoblastzellen verschiedene Gene hochregulieren, zu denen verschiedene Chemokine und Cytokine gehören, und andere Gene herunterregulieren, die mit einigen Wachstumsfaktoren, stromaler Mitose und mit dem Dezidua-Phänotyp verbunden sind (Hess *et al.* 2007).

Als Schlussfolgerung bestätigen unsere Ergebnisse, dass die Dezidualisierung der ESZ ein entscheidendes Ereignis in der Kontrolle der Invasion des Trophoblasten darstellt, da durch diesen Differenzierungsprozess diese Stromazellen, und dadurch die EZM die Fähigkeit verschiedene parakrine Signale zu produzieren erlangen, die wiederum die Invasion der Trophoblastzellen modulieren.

Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig um die direkten Protagonisten und die genauen Mechanismen dieser Kontrolle zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

---

Wesentliche Prozesse für die Entwicklung einer erfolgreichen Schwangerschaft sind die Verankerung des Embryos in der uterinen Wand, außerdem die Herstellung der vaskulären Versorgung um eine optimale Entwicklung des Embryos zu ermöglichen und ihn gegen eine potentielle Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem zu schützen. Um dieses Ziel erreichen zu können, sind genau abgestimmte molekulare Kommunikationssysteme zwischen mütterlichem Endometrium (Dezidua) und dem Trophoblast erforderlich.

Die Entwicklung des Zusammenspiels zwischen Plazenta und Uterus ist ein komplexes System interessanter Eigenschaften und ein reiches experimentelles Modell nicht nur im Bereich der Geburtshilfe. Zu Beginn der Schwangerschaft erlangen die Zellen des Trophoblasten invasive Fähigkeiten, die für eine adäquate Weiterentwicklung derselben von enormer Bedeutung sind. Eine Veränderung dieser Eigenschaften kann zur Konsequenz die Entwicklung schwerwiegender Schwangerschaftspathologien haben, wie zum Beispiel die Präeklampsie und die intrauterine Wachstumsrestriktion. Nichtsdestoweniger kann eine Störung dieses Zusammenspiels auch die Unmöglichkeit einer Schwangerschaft bedingen.

Die Trophoblast-Invasion durch die mütterliche Dezidua verwendet ähnliche Mechanismen wie ein bösartiger Tumor, wobei jedoch die Invasivität der Trophoblasten physiologischerweise zahlreichen Kontrollmechanismen unterliegt um eine adäquate Versorgung für den Embryo zu schaffen und um die Gesundheit der Mutter nicht zu gefährden.

Zur Untersuchung dieser komplexen Mechanismen wurde in dieser Arbeit ein Sphäroide Expansion Assay verwendet, bei dem die Hauptkomponenten der Dezidua-Trophoblast-Interaktion miteinander konfrontiert wurden. Hauptereignisse, wie die Dezidualisierung der ESZ und die Anwesenheit von verschiedenen Faktoren im Medium, von denen vermutet wird, dass sie eine Rolle bei dieser Interaktion spielen, wurden hierbei untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Dezidualisierungsprozess der ESZ die Ausbreitung der Trophoblastzellen stimuliert. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Anwesenheit von HB-EGF, LIF oder IL-1 $\beta$  im Medium in Zusammenhang mit der Anwesenheit einer EZM die Expansion von Trophoblastzellen positiv beeinflusst. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es als Folge der Dezidualisierung der ESZ zur Produktion von Faktoren kommt, die einen positiven Effekt auf die Migration der Trophoblastzellen ausüben.

Weiterführende Untersuchungen sind allerdings notwendig um die direkten Protagonisten und die genauen Mechanismen dieser Interaktion zu verstehen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

8-Br-cAMP	8-Brom zyklisches Adenosinmonophosphat
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Enzym-Komplex ( <i>A B Ezyme Complex</i> )
ATP	Adenosintriphosphat
b. E.	beliebige Einheiten
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
E <sub>2</sub>	Östrogen
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> )
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ESZ	Endometriale Stromazellen
EVT	Extravillöser Trophoblast
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS dial.	Fetales dialysiertes Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HB-EGF	<i>Heparin binding epidermal growth factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSPGs	Heparansulfat-Proteoglycane
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IGFBP-1	<i>Insulin like growth factor binding protein 1</i>
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1β	Interleukin-1β
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MC	Methylcellulose
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MUC-1	Mucin-1
NO	Stickoxid
P <sub>4</sub>	Progesteron
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PG	Prostaglandin
Pkt	Postkonzeptionstag
RT	Raumtemperatur
SD	<i>Standard deviation</i>



## Abkürzungsverzeichnis

---

SEK	Sekundärantikörper
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SSW	Schwangerschaftswochen
ST	Synzytiotrophoblast
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
uNK	<i>Uterine natural killer cells</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
ZT	Zytotrophoblast

---

**8 Literaturverzeichnis**

---

- Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW, Pepe GJ (2006) Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta* 27:483-490
- Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Khudyak V, Ariel I, Yagel S (2004) Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol Hum Reprod* 10:229-235
- Bamberger AM, Minas V, Kalantaridou SN, Radde J, Sadeghian H, Loning T, Charalampopoulos I, Brummer J, Wagener C, Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, Makriganakis A (2006) Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol* 168:141-150
- Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ (1994) Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 164:550-561
- Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z (1992) Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114:447-456
- Bischof P, Campana A (2000) Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14:801-814
- Bonagura TW, Pepe GJ, Enders AC, Albrecht ED (2008) Suppression of extravillous trophoblast vascular endothelial growth factor expression and uterine spiral artery invasion by estrogen during early baboon pregnancy. *Endocrinology* 149:5078-5087
- Brosens JJ, Hayashi N, White JO (1999) Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 140:4809-4820
- Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW (2002) Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs* 172:202-217
- Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL (1999) Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 181:718-724
- Cartwright JE, Holden DP, Whitley GS (1999) Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 128:181-189
- Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J (2004) Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med* 9:357-369
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1508-1518
- Dey SK (2005) Reproductive biology: fatty link to fertility. *Nature* 435:34-35
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25:341-373
- Dockery P, Burke MJ (2008) The fine structure of the mature human endometrium. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. 2nd ed. London: Informa UK Ltd.; 46-65
- Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z (2004) Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review. *Placenta* 25 Suppl A:S26-31
- Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D (2007) Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 13:121-141
- Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B (1999) Localization and significance of urokinase plasminogen activator and its receptor in placental tissue from intrauterine, ectopic and molar pregnancies. *Placenta* 20:711-721

- Funayama H, Gaus G, Ebelin I, Takayama M, Füzési L, Huppertz B, Kaufmann P, Frank H-G (1997) Parent cells for trophoblast hybridization II: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPRT-negative mutants of the coriocarcinoma cell line JEG-3. *Placenta Folium* 18, suppl. 2: *Trophoblast Res.* 10:191-201
- Gaus G, Funayama H, Huppertz B, Kaufmann P, Frank H-G (1997) Parent cells for trophoblast hybridization I: isolation of extravillous trophoblast cells from human term chorion leave *Placenta Folium* 18, suppl. 2: *Trophoblast Res.* 10:181-190
- Gellersen B, Briese J, Oberndorfer M, Redlin K, Samalecos A, Richter DU, Loning T, Schulte HM, Bamberger AM (2007a) Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface: regulation and functional implications. *Am J Pathol* 170:126-139
- Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ (2007b) Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 25:445-453
- Gellersen B, Brosens J (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 178:357-372
- Gellersen B, Brosens JJ (2008) Signaling and transcription factor networks in the human endometrial stroma. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. 2nd ed. London: Informa UK Ltd.; 379-396
- Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 8:356-373
- Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ (2003) Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 299:405-408
- Goldman S, Shalev E (2006) Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol Reprod* 74:13-22
- Graham JD, Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519
- Grümmer R, Donner A, Winterhager E (1999) Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta* 20:547-553
- Hannan NJ, Jones RL, White CA, Salamonsen LA (2006) The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biol Reprod* 74:896-904
- Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, Genbacev-Krtolica O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J, Fazleabas AT, Fisher SJ, Giudice LC (2007) Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* 76:102-117
- Hofmann GE, Scott RT, Jr., Bergh PA, Deligdisch L (1991) Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73:882-887
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML (1998) Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1721-1729
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69:1-7
- Kimber S (2008) Blastocyst implantation: the adhesion cascade. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. *The Endometrium: Molekular, Cellular, and Clinical Perspectives*. 2 nd ed. London: Informa UK Ltd.; 331-351
- Kliman HJ (2000) Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am J Pathol* 157:1759-1768
- Kohler PO, Bridson WE (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 32:683-687

- Korff T, Krauss T, Augustin HG (2004) Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. *Exp Cell Res* 297:415-423
- Kudo Y, Boyd CA, Spyropoulou I, Redman CW, Takikawa O, Katsuki T, Hara T, Ohama K, Sargent IL (2004a) Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *J Reprod Immunol* 61:87-98
- Kudo Y, Hara T, Katsuki T, Toyofuku A, Katsura Y, Takikawa O, Fujii T, Ohama K (2004b) Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human endometrium. *Hum Reprod* 19:1222-1230
- Leach RE, Kilburn B, Wang J, Liu Z, Romero R, Armant DR (2004) Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype. *Dev Biol* 266:223-237
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL (2002) Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107:452-460
- Leidenberger FA (1998) Funktionen von Tuben und Uterus und ihre endokrine Steuerung. In: *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag; 43-58
- Lessey BA, Glasser S (2008) Endometrial receptivity. In: *Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. The Endometrium*. 2nd ed. London: Informa UK Ltd; 305-318
- Lessey BA, Gui Y, Apparao KB, Young SL, Mulholland J (2002) Regulated expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in the human endometrium: a potential paracrine role during implantation. *Mol Reprod Dev* 62:446-455
- Li RH, Zhuang LZ (1997) The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Hum Reprod* 12:830-834
- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ (1991) 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 113:437-449
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91:197-208
- Lim HJ, Dey SK (2009) HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* 315:619-626
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP (2006) Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 17:178-185
- Mardon H, Grewal S, Mills K (2007) Experimental models for investigating implantation of the human embryo. *Semin Reprod Med* 25:410-417
- Meisser A, Chardonens D, Campana A, Bischof P (1999) Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\alpha$ , macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor  $\beta$  on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 5:252-260
- Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A, Simon C (2001) Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 64:590-601
- Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S (2000) Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 66:1127-1137
- Pfleiderer A, Kaufmann M (2008) Anatomie, Topographie und Funktion der weiblichen Genitalorgane. In: *Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfleiderer A eds. Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 14-25
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A (2004) EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction* 128:355-363
- Red-Horse K, Drake PM, Fisher SJ (2004) Human pregnancy: the role of chemokine networks at the fetal-maternal interface. *Expert Rev Mol Med* 6:1-14
- Red-Horse K, Drake PM, Gunn MD, Fisher SJ (2001) Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *Am J Pathol* 159:2199-2213

- Red-Horse K, Kapidzic M, Zhou Y, Feng KT, Singh H, Fisher SJ (2005) EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. *Development* 132:4097-4106
- Salamonsen LA (1999) Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 4:11-22
- Salamonsen LA (2008) Menstrual and estrous cycles. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC eds. *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives* 2nd ed. London: Informa UK Ltd.; 25-45
- Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E (2007) Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med* 25:437-444
- Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S (1998) Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 178:457-461
- Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML (1994) Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 134:521-528
- Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML (1993) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77:549-555
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2:59
- Staun-Ram E, Shalev E (2005) Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 3:56
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76-79
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D (1991) The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88:1067-1072
- Wang H, Dey SK (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 7:185-199

### 9 Danksagung

---

Ich möchte mich herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Birgit Gellersen, ENDOKRINOLOGIKUM HAMBURG, für die Überlassung des Themas bedanken, aber auch für ihre engagierte, zuverlässige und einfühlsame Betreuung, für ihre konstruktive Kritik, für Ermutigung und hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Durchführung meines Forschungsaufenthaltes in Deutschland.

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Bamberger und seiner Frau PD Dr. med. Ana-Maria Bamberger, aus dem Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung und die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Herrn Prof. Dr. med. H. M. Schulte danke ich für die freundliche Aufnahme in der Forschungsabteilung des ENDOKRINOLOGIKUM HAMBURG und der Deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte meinen Auslandsaufenthalt in Deutschland zu realisieren.

Mein besonderer Dank gilt einer Person, ohne die diese Arbeit nicht verwirklicht worden wäre: meinem Mann Sebastian Zimmermann sowie seiner Familie.

Er hat es mir ermöglicht meinen Weg zu gehen und damit den Grundstein für diese Arbeit und Vieles mehr gelegt. Seiner moralischen Unterstützung konnte ich mir in guten wie in schlechten Zeiten immer sicher sein.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Annemarie Samalecos für die Einweisung in die verschiedenen Techniken, die gute Zusammenarbeit, die große Geduld und die Motivationshilfen bedanken.

Auch den anderen Mitarbeitern des Labors danke ich für die nette Atmosphäre und den Kameradschaftsgeist.

Vor allem möchte ich aber auch meinen Eltern und Geschwistern danken, die mich aus der Ferne jeden Tag und in jeder Entscheidung unterstützt haben.

## 10 Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Familienstand: verheiratet  
Konfession: römisch-katholisch  
Staatsangehörigkeit: argentinisch  
Geburtsdatum, -ort: 21. November 1983, Mendoza, Argentinien

### Curriculum vitae

#### Schulbildung

03/1990 – 12/1996 Grundschule „Hipólito Yrigoyen“, Mendoza  
03/1997 – 12/2001 „Liceo Agrícola y Enológico Domingo F. Sarmiento“  
(Gymnasium der “Universidad Nacional de Cuyo”) (UNC)  
03/1995 – 12/2001 Englischkurs am “Colegio de Lenguas Extranjeras”, UNC  
12/2004 „First certificate of English“ (Cambridge University Oxford)  
03/2005 – 12/2006 Deutschkurs bei Frau I. Bujaldón (vereidigte Übersetzerin,  
Universidad Nacional de Córdoba, Argentinien)  
03/2007 – 08/2007 Deutschkurs für Mediziner, Mendoza  
09/2008 Deutschzertifikat B2, Goethe Institut Hamburg

#### Studium

02/2002 – 03/2008 Medizinstudium an der UNC, Mendoza

#### Studienbegleitende Tätigkeiten und Famulaturen

01/2006 Famulatur in der dermatologischen Klinik des UKE, Hamburg  
03/2005 – 08/2007 Praktika in der Notaufnahme des „Hospital Central“, Mendoza  
03/2006 – 12/2007 Mitarbeit an verschiedenen tierexperimentellen  
Forschungsprojekten der UNC, Mendoza

#### Praktisches Jahr

02/2007 – 05/2007 Quartal in der Abteilung für Innere Medizin „Hospital  
L.Laggomaggiore“, UNC, Mendoza  
05/2007 – 08/2007 Quartal in der chirurgischen Abteilung des „Hospital Scarabelli“,  
UNC, Mendoza

## Lebenslauf

---

08/2007 – 11/2007 Quartal in der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie des  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

11/2007 – 01/2008 Quartal in der Abteilung für Kinderheilkunde des  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### **Beruflicher Werdegang**

Seit 09/2009 Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und  
Geburtshilfe des Krankenhaus St. Joseph Stift Bremen

### **Promotion**

04/2008– 08/2009 Experimentelle Doktorarbeit am Zentrum für Innere Medizin des  
UKE und dem Endokrinologikum Hamburg (Arbeitsgruppe von  
Herrn Professor Dr. med. Ch. Bamberger unter Betreuung von  
Frau Dr. rer. nat. Birgit Gellersen)

**Thema:** Untersuchungen zur Rolle dezidualisierter Endometriumzellen  
in der Invasivität von extravillösen Trophoblastzellen in einem  
Zellkulturmodell (angestrebter Abschluss September 2009)

### **Sprachen**

Spanisch (Muttersprache)  
Deutsch („Deutschzertifikat B2“, Goethe Institut Hamburg)  
Englisch („First certificate of English“, Cambridge University  
Oxford)



**11 Eidesstattliche Versicherung**

---

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift \_\_\_\_\_