

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

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

**Untersuchung der Invasion des Trophoblasten
anhand eines Ko-Kultur-Modells mit endometrialen Stromazellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Neufeld

geboren in Barnaul, Russische Föderation

Hamburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am : 06.09.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. F. Jänicke

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. K. Hecher

Datum der mündlichen Prüfung: 06.09.2012

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Der menschliche Uterus | 1 |
| 1.2 | Menstruationszyklus | 2 |
| 1.2.1 | Hormonelle Regelkreise | 3 |
| 1.2.1.1 | Proliferative Phase (Follikelphase) | 4 |
| 1.2.1.2 | Sekretorische Phase (Lutealphase) | 5 |
| 1.2.2 | Dezidualisierung und das Implantationsfenster | 6 |
| 1.3 | Konzeption und Teilung der Blastozyste | 7 |
| 1.4 | Implantation | 8 |
| 1.5 | Differenzierung des Trophoblasten | 12 |
| 1.6 | Experimentelle Modelle zur Untersuchung der Implantation | 16 |
| 1.6.1 | Modelle zur Untersuchung der Anhaftung der Blastozyste | 17 |
| 1.6.1.1 | Solid-Phase Assays | 17 |
| 1.6.1.2 | Ko-Kulturen von Embryonen mit endometrialen epithelialen Zellen | 17 |
| 1.6.2 | Modelle zur Untersuchung der Invasion des Trophoblasten | 18 |
| 1.6.2.1 | Assays mit Extrazellulärer Matrix | 18 |
| 1.6.2.2 | Invasions-Assay mit Stromazellen | 18 |
| 1.6.3 | Dreidimensionale Ko-Kulturen: Endometriale Zellen und Blastozyste | 19 |
| 1.7 | Faktoren im fetomaternalen Dialog | 20 |
| 1.7.1 | Östrogen | 21 |
| 1.7.2 | Progesteron | 21 |
| 1.7.3 | HB-EGF | 23 |
| 1.7.4 | LIF | 24 |
| 1.7.5 | IL-1 β | 26 |
| 1.7.6 | Osteopontin | 28 |
| 1.8 | Zelllinien: AC-1M88, St-T1b, T-HESC | 30 |
| 1.8.1 | AC-1M88 | 30 |
| 1.8.2 | St-T1b | 31 |
| 1.8.3 | T-HESC | 31 |
| 1.9 | Klinische Perspektive | 32 |
| 1.10 | Ziel der Arbeit | 34 |
| 2 | Material und Methoden | 35 |
| 2.1 | Zellkultur | 35 |
| 2.1.1 | Kultivierung der Zelllinien | 35 |
| 2.1.1.1 | AC-1M88 | 35 |
| 2.1.1.2 | St-T1b | 35 |
| 2.1.1.3 | T-HESC | 35 |
| 2.1.2 | Stimulation der Zelllinien | 35 |
| 2.1.3 | Trophoblast-Sphäroid-Expansionsassay | 36 |
| 2.1.3.1 | Vorbereitung der ESZ Linien | 36 |
| 2.1.3.2 | Sphäroidbildung | 37 |
| 2.1.3.3 | Ko-Kultur | 37 |
| 2.1.4 | Fixierung der Zellen | 39 |
| 2.1.5 | Immunzytochemie | 39 |
| 2.2 | Statistische Auswertung | 40 |
| 2.3 | Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Medien | 42 |
| 2.3.1 | Medien für die Zelllinien | 42 |
| 2.3.2 | Pufferlösungen | 42 |
| 2.3.3 | Sonstige Chemikalien | 43 |
| 2.4 | Abkürzungsverzeichnis | 44 |
| 3 | Ergebnisse | 46 |
| 3.1 | Kultivierung der endometrialen Stroma- und Trophoblastzelllinien | 46 |
| 3.2 | Sphäroid-Expansionsassay | 46 |
| 3.2.1 | Sphäroide auf nicht vordezidualisierten St-T1b ohne Zugabe von Faktoren | 46 |
| 3.2.2 | Sphäroide auf St-T1b: Einfluss der Faktoren | 48 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3 | Sphäroide auf St-T1b. Einfluss der Dezidualisierung | 50 |
| 3.2.4 | Sphäroide auf T-HESC. Einfluss der Dezidualisierung | 53 |
| 3.2.5 | Sphäroide auf T-HESC. Einfluss von Faktoren | 56 |
| 3.3 | Apoptose-Nachweis mit dem <i>cleaved</i> PARP Antikörper | 57 |
| 3.4 | Nachweis von Ki67 | 59 |
| 4 | Diskussion | 61 |
| 5 | Zusammenfassung | 70 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 71 |
| 7 | Danksagung | 84 |
| 8 | Eidesstattliche Versicherung | 85 |

1 Einleitung

1.1 Der menschliche Uterus

Der menschliche Uterus ist ein etwa 8 cm langes, 5 cm breites, 2,5 cm tiefes birnenförmiges Organ (Thomas 2007). Die oberen zwei Drittel werden dem Körper (Corpus uteri), das untere Drittel dem verengten Gebärmutterhals (Cervix uteri), zugerechnet. Der oberste Teil des Corpus uteri bildet eine imaginäre Linie zwischen den beiden Tubenmündungen und wird als Fundus uteri bezeichnet. Der Corpus umschließt den dreieckigen Spalt der Gebärmutterhöhle (Cavum uteri) (Katz 2007). Das geschmälerte Areal zwischen Cervix und Korpus wird Isthmus genannt und entspricht der Ebene des inneren Muttermundes, der Öffnung zwischen dem Zervikalkanal und Cavum uteri (Feige *et al.* 2006) (Abbildung 1.1).

Aus histologischer Sicht wird der Uterus aus dem Endometrium (Tunica mucosa), Myometrium (Tunica muscularis) und Perimetrium (Tunica serosa) aufgebaut. Die Serosa stellt das viszerale Peritoneum dar. Mit Ausnahme eines kleinen Bereichs des inneren Muttermundes, haftet das Peritoneum am gesamten Uterus (Katz 2007).

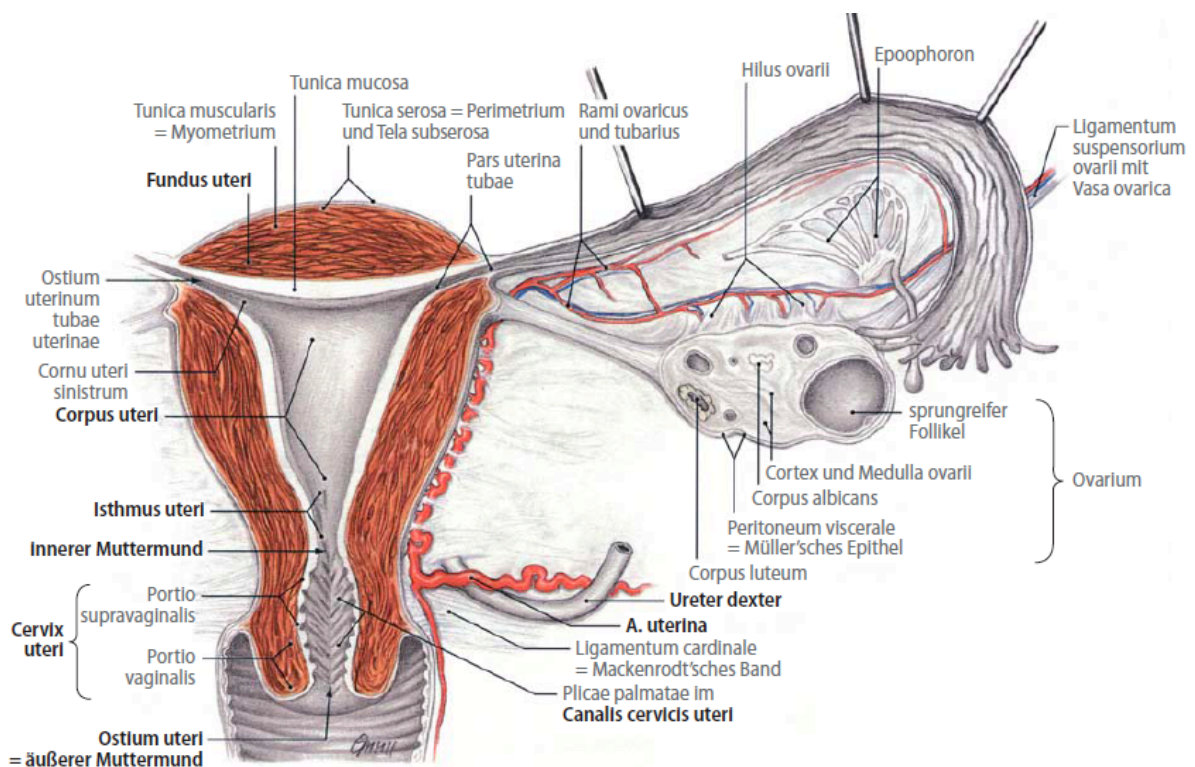


Abb. 1.1: Frontalschnitt durch Uterus, Tube und Ovar (Feige 2006).

Die Schleimhaut des Uterus wird als Endometrium bezeichnet und von einer Schicht aus Zylinderepithel bedeckt. Die Dicke des Endometriums beträgt 1 bis 6 mm in Abhängigkeit von hormoneller Stimulation bzw. vom Zyklusstadium (Katz 2007).

Man unterscheidet

- das Stratum basale, bestehend aus faserreichem Bindegewebe, Gefäßen und den basalen Anteilen der Drüsen, das während des Zyklus fast keinen Veränderungen unterliegt und bei der Menstruation nicht abgestoßen wird. Diese Schicht gewährleistet die Regeneration des Endometriums (Baggish 2007),

- und das Stratum functionale, das faserarmes Bindegewebe, Gefäße und den kranialen Anteil der Drüsen enthält und das während der Menstruation abgestoßen und wieder neu aufgebaut wird (Baggish 2007, Stauber and Weyerstahl 2007).

Eine Lamina propria existiert nicht. Dafür besteht ein enger Kontakt mit dem Myometrium. Eine regelrechte Verzahnung zwischen Endometrium und Myometrium gewährleistet, dass auch bei einer Ausschabung stets Reste von Endometrium zurückbleiben (Feige *et al.* 2006).

Während eines Zyklus in einem Zeitraum von 28 \pm 3 Tagen, verändert sich der Aufbau des Endometriums hormonabhängig, was die Aufnahme und Ernährung einer befruchteten Eizelle sicherstellen soll (Stauber and Weyerstahl 2007).

Das Myometrium besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von glatten Muskelfasern. Die äußere longitudinale Schicht grenzt an die muskuläre Schicht der Tube und Vagina. Die mittlere Schicht besteht aus einer Vernetzung von schrägen, spiralförmig gerichteten Bündeln der glatten Muskulatur und großem venösen Plexus. Die innere muskuläre Schicht ist wiederum longitudinal (Katz 2007). Diese Struktur gewährleistet die suffiziente Blutstillung nach einer Geburt, indem durch die Kontraktion des Uterus die in diesem Netzwerk verlaufenden Gefäße unterbunden werden. Im Bereich des Isthmus verlaufen die Fasern vorwiegend in flach ansteigenden zirkulären Zügen, so dass sie bei einem Kaiserschnitt nach Inzision in diesem Bereich leicht nach oben und unten auseinander gedrängt werden können (Feige *et al.* 2006).

1.2 Menstruationszyklus

Ausdruck einer normalen Fortpflanzungsfähigkeit der Frau ist der regelmäßige menstruelle Zyklus. Ein Zyklus beginnt mit dem 1. Tag der Menstruationsblutung und endet mit dem Tag vor Einsetzen der nächsten Regelblutung (Stauber and Weyerstahl 2007).

Histologische zyklische Veränderungen des Endometriums können sich sowohl in den endometrialen Drüsen als auch im Stroma widerspiegeln. Die oberflächlichen zwei Drittel des Endometriums unterliegen einer Proliferation und werden ultimativ mit jedem Zyklus

abgestoßen, wenn es nicht zum Eintreten der Schwangerschaft kommt. Die zyklische Portion des Endometriums wird als Functional is bezeichnet und besteht aus der tiefer liegenden intermediären Zone (Stratum spongiosum) und der oberflächlich gelegenen kompakten Zone (Stratum compactum). Die Basalis gehört zur tiefen Region des Endometriums und unterliegt nicht der signifikanten monatlichen Proliferation, ist aber ein Ausgangspunkt der endometrialen Regeneration nach jeder menstruellen Blutung (Berek 2007).

Als Geschlechtsreife bezeichnet man bei der Frau die Phase von der ersten (Menarche, meist zwischen dem 12. und 16. Lebensjahr) bis zur letzten Periodenblutung (Menopause, etwa 45. bis 55. Lebensjahr). Gleichzeitig ist dies die fruchtbare oder reproduktive Phase im Leben einer Frau (Stauber and Weyerstahl 2007).

Im Idealfall dauert der menstruelle Zyklus 28 Tage, wobei Schwankungen von +/- 3 Tagen als normal anzusehen sind. Diese Schwankungen sind auf eine unterschiedlich dauernde erste Zyklusphase zurückzuführen, d. h. die Reifung der Follikel variiert individuell. Die Dauer der sich anschließenden Gelbkörperphase beträgt relativ konstant 14 Tage. Der Eisprung erfolgt somit ungefähr am 14.-15. Tag vor Einsetzen der Menstruationsblutung (Stauber and Weyerstahl 2007).

1.2.1 Hormonelle Regelkreise

Die zyklische Funktion des Ovars ist in den Regelkreis der Organsysteme von Hypothalamus, Hypophyse und Ovar eingeschlossen.

Der Hypothalamus fungiert als Initiator der folliculären Phase. Gonadotropin-freisetzendes Hormon (GnRH) wird von dem Hypothalamus in einer pulsatilen Frequenz über das hypophysäre Pfortadersystem in den Vorderlappen der Hypophyse weitergeleitet. GnRH stimuliert die Synthese und Freisetzung von follicelstimulierendem (FSH) und luteinisierendem (LH) Hormon. FSH interagiert mit den Granulosazellen, die die Oozyten umschließen. FSH fördert die Entwicklung der 15 bis 20 Follikel jeden Monat und interagiert mit den Granulosazellen indem es die Aromatisierung der Androgene in Östrogen und Östradiol erhöht. Die folliculäre Östrogen-Synthese ist einerseits essentiell für die Vorbereitung des Endometriums zur Implantation, andererseits führt sie als Teil des positiven Feedbacks zu dem präovulatorischen LH-Peak. Der Haupteffekt des LH-Anstiegs ist die Ovulations-Auslösung und Stimulation der Androgensynthese in den Thekazellen und Progesteronsynthese durch das Corpus luteum im Ovar (Katz 2007). Hohe Progesteronspiegel rufen ein negatives Feedback hervor, was wiederum die FSH und LH-Ausschüttung vermindert (Berek 2007).

Die zyklisch auftretenden hormonellen Veränderungen bei der Frau spiegeln sich in den gleichfalls zyklischen Veränderungen am Endometrium wider (Abbildung 1.2).

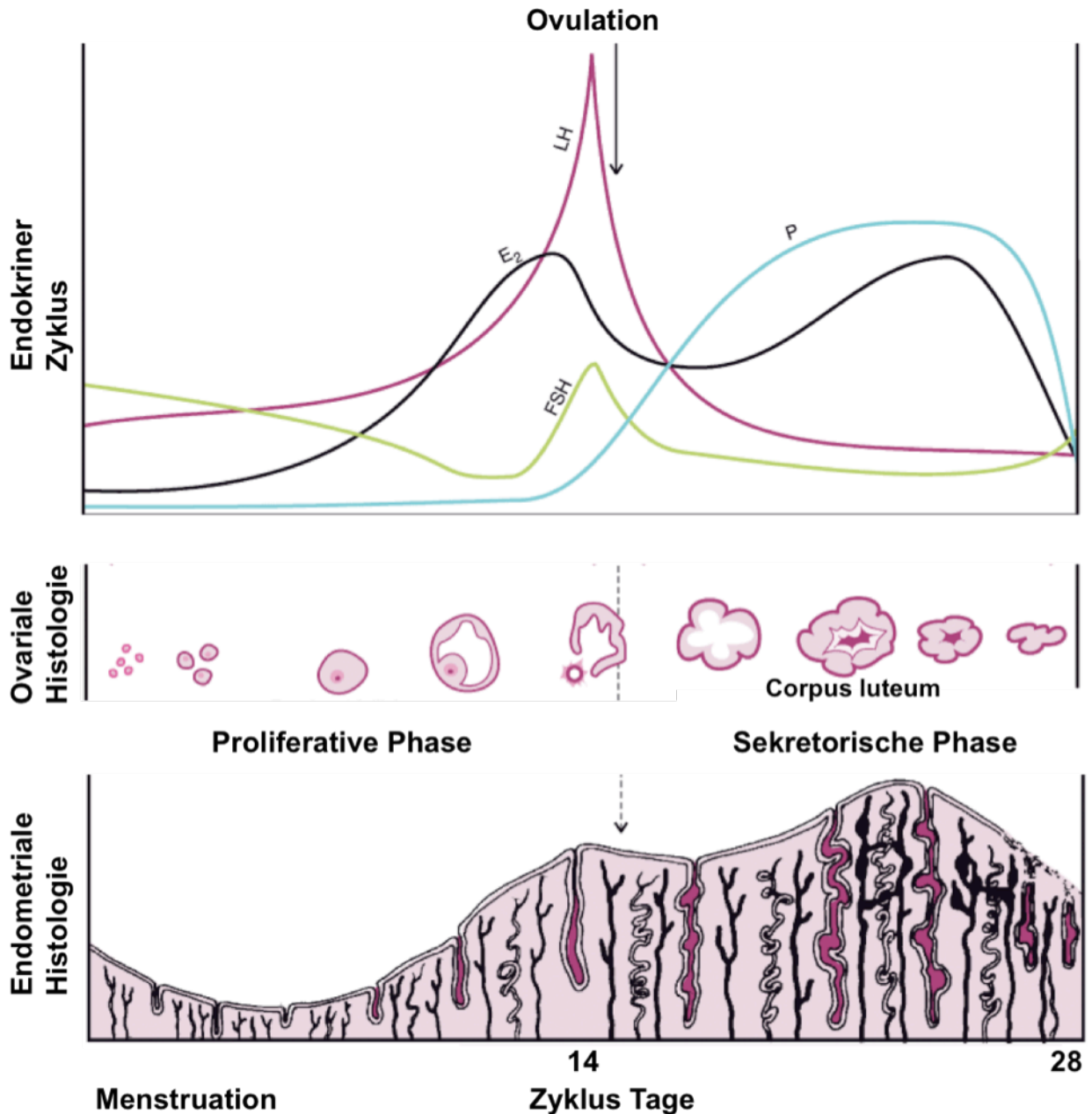


Abb. 1.2: Menstrueller Zyklus. Das obere Panel zeigt die zyklischen Veränderungen von FSH, LH, Östradiol (E₂) und Progesteron (P) in Relation zum Zeitpunkt der Ovulation. Das mittlere und das untere Panel repräsentiert die Korrelation des ovariellen Zyklus in der folliculären und lutealen Phase zum endometrialen Zyklus in der proliferativen und sekretorischen Phase (Berek 2007).

1.2.1.1 Proliferative Phase (Follikelphase)

Der erste Tag der menstruellen Blutung wird als erster Tag des menstruellen Zyklus bezeichnet. Nach der Menstruation besteht die Zona basalis aus primordiales Drüsen und dichtem Stroma nah an das Myometrium angrenzend. Die proliferative Phase ist durch progressives mitotisches Wachstum der Zona functionalis charakterisiert. Diese Veränderungen geschehen als Antwort auf den steigenden Östrogenspiegel. Am Anfang der Proliferationsphase ist das Endometrium mit 1-2 mm relativ dünn. Die vorwiegenden Veränderungen, die in dieser Phase zu sehen sind, zeigen sich in dem Wachstum der initial

geraden, schmalen und kurzen endometrialen Drüsen in lange gewundene Strukturen. Histologisch gesehen, enthalten die proliferativen Drüsen multiple mitotische Zellen. Die Organisation dieser Zellen wechselt von dem niedrigen Kolumnenmuster in der frühen proliferativen Periode zum pseudogeschichteten Bild vor der Ovulation. Während dieser ganzen Periode repräsentiert das Stroma eine dichte, kompakte Schicht und die vaskulären Strukturen sind nur selten zu sehen (Berek 2007). Die massive LH-Freisetzung in der Mitte des Zyklus ist für den Anstieg der Konzentration von lokalen Prostaglandinen und proteolytischen Enzymen in der folliculären Wand verantwortlich. Dies führt zur Perforation der Follikelwand und langsamen Extrusion der Eizelle durch die Wandöffnung (Ovulation) (Feige *et al.* 2006).

1.2.1.2 Sekretorische Phase (Lutealphase)

In dem idealen menstruellen Zyklus, der 28 Tagen andauert, erfolgt die Ovulation 14-15 Tage vor dem Einsetzen der Menstruationsblutung. Innerhalb der nächsten 48 bis 72 Stunden nach der Ovulation induziert der Anfang der Progesteronsekretion eine Verschiebung im histologischen Erscheinungsbild des Endometriums. Die sekretorische Phase wird größtenteils wegen der Anwesenheit der eosinophilen proteinreichen Sekretionsprodukte im glandulären Lumen als solche benannt. Im Gegensatz zur Proliferationsphase, ist die Lutealphase des menstruellen Zyklus durch zelluläre Effekte des Progesterons neben denen des Östrogens charakterisiert. Allgemein ist der Einfluss des Progesterons dem Östrogeneffekt antagonistisch und zeigt sich in der progressiven Abnahme der Konzentration der Östrogenrezeptoren in den endometrialen Zellen. Als Resultat kommt es in der späten Phase des Zyklus zur Antagonisierung der östrogeninduzierten DNA-Synthese und zellulären Mitose. Die endometrialen Drüsen formieren charakteristische periodische glykogenhaltige Vakuolen, die sich mit fuchsin-schwefeliger Säure (Schiff-Reagenz) anfärben lassen. Diese Vakuolen erscheinen zuerst subnukleär und wandern im Laufe der Phase in das glanduläre Lumen. Am 6.-7. Tag nach der Ovulation ist die sekretorische Aktivität der Drüsen am stärksten ausgeprägt und das Endometrium ist optimal für die Implantation der Blastozyste vorbereitet.

Die ödematösen Veränderungen im Stroma zeigen sich erst ab dem 7. postovulatorischen Tag. Zusammentreffend mit dem maximalen Ödem des Stromas in der späten sekretorischen Phase, werden die Spiralarterien deutlich sichtbar, länger und gewendelter. Etwa 2 Tage vor der Menstruation kommt es zum dramatischen Anstieg der Lymphozyten, die aus dem vaskulären System in das Stroma migrieren. Die leukozytäre Infiltration kündigt den Kollaps des endometrialen Stroma und den Anfang der menstruellen Blutung an (Berek 2007). Bei einem Ausbleiben der Schwangerschaft sistiert die glanduläre Sekretion. Der Abfall von Östrogen und Progesteron führen zum Umbau des Corpus luteum zum Corpus

albicans. Hormonentzug führt zur Regression des Endometriums durch Spasmus der Spiralarterien. Die resultierende Ischämie führt zur Auflösung der Lysosomen und Freisetzung der proteolytischen Enzyme, die ihrerseits die Gewebedestruktion oberhalb der Basalis begünstigen. Es kommt zur Abstoßung der Funktionalis (Desquamationsphase 1.-4. Zyklustag).

Die Produktion der Prostaglandine ist zum Zeitpunkt der Menstruation am stärksten. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ist ein potenter Vasokonstriktor, der den arteriellen Vasospasmus und endometriale Ischämie einleitet. $PGF_{2\alpha}$ befördert auch die myometrale Kontraktion, was den lokalen Blutfluss in der Uteruswand vermindert und dem Abstoßen des endometrialen Gewebes dienen könnte (Berek 2007).

1.2.2 Dezidualisierung und das Implantationsfenster

Dezidualisierung ist ein Prozess der Differenzierung des Endometriums, der beim Menschen in der 2. Zyklushälfte unabhängig von dem Vorhandensein eines Konzeptus stattfindet. Dieser Prozess wird von Progesteron und dem sekundären Botenstoff cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) kontrolliert. Die Veränderungen sind zunächst rund um die Spiralarterien lokalisiert und führen zur Remodelierung (Gellersen and Brosens 2003, Dimitriadis *et al.* 2005, Gellersen *et al.* 2007b, Brosens *et al.* 2009). Bei der Dezidualisierung kommt es zur Transformation der fibroblastförmigen endometrialen Stromazellen in sekretorische epithelioidförmige rundliche bzw. polygonale deziduale Zellen in der Vorbereitung zur Implantation der Blastozyste. Zu den Markern der Dezidualisierung gehören das deziduale Prolaktin (dPRL) und *Insulin-like growth factor-binding protein 1* (IGFBP-1) (Giudice and Irwin 1999). Auch die Produktion von solchen Faktoren, wie *Plasminogen-Activator-Inhibitor 1* (PAI1) (Lockwood *et al.* 1999), Komponenten der Basalmembran, wie Laminin, Kollagen Typ IV und Fibronectin (FN), wird erhöht (Tseng and Mazella 2002, Salamonsen *et al.* 2003). Deziduale Zellen exprimieren auch Tetraspanin CD82 (KAI-1), ein Zellenoberflächenprotein, das als Suppressor der Metastasierung in Tumorzellen fungiert (Jackson *et al.* 2005, Gellersen *et al.* 2007a). Die Umwandlung der Stromazellen geht mit einem massiven Influx immunkompetenter Zellen einher. In der späten sekretorischen Phase des Zyklus beträgt der Anteil der Leukozyten 30-40% aller Zellen im stromalen Kompartiment (Dosiou and Giudice 2005, King 2000). Die größte Leukozyten-Population im Endometrium stellen die uNK-Zellen (uterine natürliche Killerzellen) dar, die in der Nähe der Spiralarterien ruhen (Trundley and Moffett 2004). Die uNK sezernieren Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der vaskulären Remodelierung spielen (Anne Croy *et al.* 2006, Hanna *et al.* 2006, Gellersen *et al.* 2007b).

Beim Ausbleiben der Schwangerschaft fällt der Progesteronspiegel im Blut und die dezidualisierten Stromazellen erlangen ihren Ausgangsphänotyp wieder. Es kommt zur

Induktion der Aktivität der inflammatorischen Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und der Auslösung der menstruellen Schädigung, was das Wiedereinsetzen (Reinitiierung) des menstruellen Zyklus erlaubt. Kommt es aber zur Befruchtung, steigt der Progesteronspiegel im Blut, was die Aufrechterhaltung der Dezidualisierung für die erfolgreiche interstitielle und vaskuläre Invasion des Trophoblasten begünstigt.

Die Dezidua formiert eine dichte extrazelluläre Matrix (EZM), die, wie es vermutet wird, ein bestimmtes zytokinhaltiges Milieu darstellt, das einerseits die Anhaftung des Trophoblasten erleichtert und andererseits wie eine physiologische Barriere agiert, die die Invasion des Trophoblasten limitiert (Kliman 2000, Fazleabas *et al.* 2004). Einer der wesentlichen Bestandteilen des dezidualisierten EZM ist Kollagen Typ IV (Iwahashi *et al.* 1996), welcher als Substrat der Matrix Metalloproteinasen (MMP)-2 und -9 fungiert (Sternlicht and Werb 2001). Diese Proteasen werden von den Trophoblastzellen exprimiert (Cohen *et al.* 2006, Ferretti *et al.* 2007), wohingegen produzieren die Deziduazellen Tissue Inhibitoren der MMPs (TIMPs), die die Wirkung der proteolytischen Aktivität des EVT neutralisieren und damit unter anderem seine Invasion einschränken (Lockwood *et al.* 1998, Irwin *et al.* 2001, Dimitriadis *et al.* 2005).

Durch die Formierung der Pinopodien (große ektoplasmatische Ausstülpungen) (Murphy 2000) auf der apikalen Seite des luminalen Epithels wird die Eröffnung des Implantationsfensters gekennzeichnet. Die Komposition des Uterussekrets zum Zeitpunkt der Implantation hat zum Begriff „Implantationsfenster“ geführt, dem Zeitraum, in dem die Uteruswand rezeptiv ist. Der Zeitpunkt des Implantationsfensters beginnt am 6. Tag der Progesteronproduktion und endet 3 - 4 Tage später (Nikas *et al.* 2000). Beim Menschen ist das rezeptive Fenster somit auf den 20. - 24. Zyklustag begrenzt.

Die Dezidualisierung stellt also ein komplexes Zusammenspiel der endokrinen, parakrinen und autokrinen Signale dar.

1.3 Konzeption und Teilung der Blastozyste

Nach der Ovulation wird die Eizelle vom Fimbrientrichter der Tuba uterina aufgenommen und in den ampullären Abschnitt befördert, dem Ort der Befruchtung (Diedrich *et al.* 2007). Die Konzeption findet 24 - 48 Stunden nach der Ovulation statt. Die initialen Stadien der Entwicklung, von der befruchteten Eizelle (Zygote) bis zur soliden Masse an Zellen (Morula), geschehen während der Passage durch die Fallop'sche Tube in einem nicht adhäsiven protektiven „Mantel“, der Zona pellucida (Red-Horse *et al.* 2004). Die Morulazellen sind bis zum 8-Zell-Stadium totipotent, d. h. dass sie sowohl zu Vorläufern des sich entwickelnden Embryos als auch des extraembryonalen Gewebes differenzieren können. Die Morula erreicht die Gebärmutterhöhle etwa um den 3. Tag nach der Konzeption.

Das Erscheinen einer flüssigkeitsgefüllten Höhle markiert die Umwandlung der Morula in die Blastozyste und ist begleitet von zellulärer Differenzierung. Die äußere Zellschicht (der Zellmantel), die die Blastozystenöhle umrahmt, wird als Trophektoblast bezeichnet. Daraus werden die extraembryonalen Strukturen inklusive Plazenta entwickelt (Abbildung 1.3).

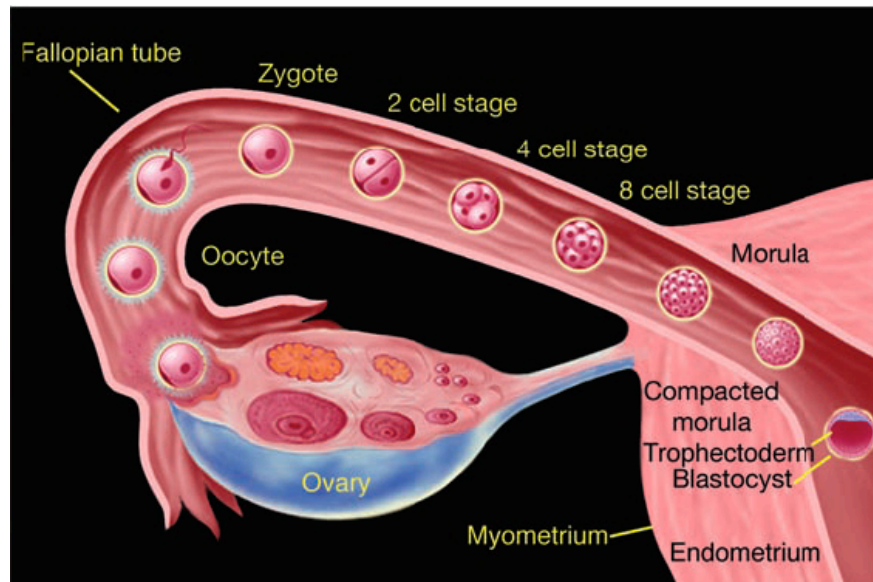


Abb. 1.3: Frühe Stadien der menschlichen Entwicklung von der Befruchtung bis zu Formierung einer Blastozyste (Red-Horse *et al.* 2004).

Aus der Zusammenlagerung der inneren Zellmassen entsteht der Embryo. Innerhalb der 72 Stunden nach dem Erreichen der Gebärmutterhöhle schlüpft („*Hatching*“) der Embryo aus der Zona. Das Trophektoderm wird frei und ist für die Anhaftung bereit (Red-Horse *et al.* 2004). Die Wahrscheinlichkeit zur Entstehung einer Schwangerschaft während eines menstruellen Zyklus beträgt nur etwa 30 Prozent. Nur 50 bis 60 Prozent aller Konzepte erreichen die 20. Gestationswoche. Von den Frühaborten bilden 75 Prozent eine fehlerhafte Implantation ab und werden dementsprechend klinisch nicht als Schwangerschaft identifiziert. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen des Implantationsvorganges und der Plazentation könnte die Therapieoptionen auf dem Gebiet der Infertilität und des frühzeitigen Schwangerschaftsabbruches verbessern (Norwitz *et al.* 2001).

1.4 Implantation

Beim Menschen findet die Implantation zwischen dem 20. und dem 24. Zyklustag (Implantationsfenster) statt. Die Fortschritte in den Assistierten Reproduktiven Technologien (ART) mit dem Transfer des Embryos in das Uteruslumen führten zu der Erkenntnis, dass

der Zeitpunkt zwischen dem 20. und 24. Tag des regulären 28 Tage dauernden menstruellen Zyklus für die Implantation optimal ist (Bergh and Navot 1992). Während des Implantationsfensters erreicht der Embryo eine „Anhaftungskompetenz“ (Watson *et al.* 2004), und das Endometrium wird rezeptiv (Achache and Revel 2006). Charakteristiken der uterinen Empfänglichkeit umfassen folgende histologische Veränderungen: das Endometrium wird ausgiebiger durchblutet, ödematös, die endometrialen Drüsen entfalten erhöhte sekretorische Aktivität. Auf der luminalen Seite des uterinen Epithels kommt es zur Entwicklung von Pinopodien. Diese Veränderungen sind wertvolle Prädiktoren eines Schwangerschaftserfolges (Norwitz *et al.* 2001). Der darauf folgende molekulare Dialog zwischen der implantierenden Blastozyste und dem rezeptiven Endometrium ist ein Schlüssel zu einer erfolgreicher Implantation (Paria *et al.* 2002). Störungen in der Synchronisierung der Interaktion zwischen den Komponenten dieses Prozesses resultieren in Implantationsfehlern.

Der Prozess der Implantation kann in drei Phasen unterteilt werden: Apposition, Adhäsion und Invasion (Hannan and Salamonsen 2007), und beginnt mit dem „hatching“ (Schlüpfen des Embryos aus der umgebenden Zona pellucida) (Red-Horse *et al.* 2004).

Während der Apposition befindet sich die Blastozyste in der unmittelbaren Nähe des rezeptiven Endometriums. Mikrovilli der apikalen Oberfläche des Trophektoderm interdigitieren mit den Mikroprotrusionen auf der Oberfläche des uterinen Epithels (Pinopodien) (Hertig *et al.* 1959) (Abbildung 1.4).

Es erfolgt ein Signalaustausch via sekretorische Moleküle, wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle der Integrin-Familie, Rezeptoren, die auf beiden Oberflächen lokalisiert sind (Lessey 2002). Unter vielen ist das L-Selektin System in die Appositionsphase involviert (Genbacev *et al.* 2003). Karbohydrat-Liganden, die das L-Selektin binden, sind auf dem luminalen Epithel zum Zeitpunkt der Implantation lokalisiert. Das Trophektoderm dahingegen exprimiert L-Selektin sehr stark nach dem „*Hatching*“ und bindet an die epithelialen Oligosaccharid-Liganden (Genbacev *et al.* 2003). Die Kommunikation durch die Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der fetalen und maternalen Zellen ermöglicht die Anhaftung der oberen Schichten der Blastozyste (Trophektoderm) an die Gebärmutterschleimhaut (Adhäsionsphase) (Hannan and Salamonsen 2007).

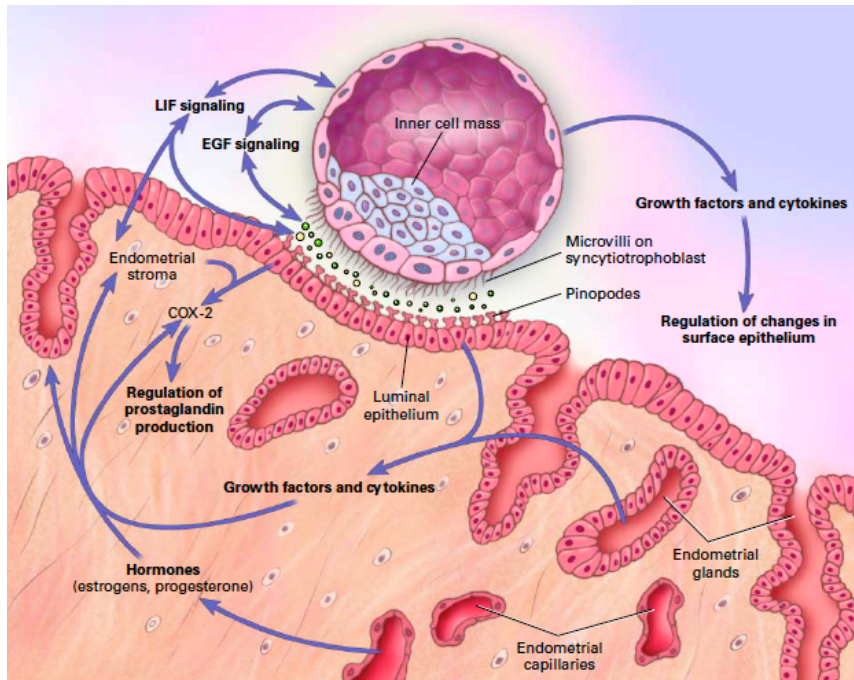


Abb. 1.4: Apposition und Adhäsion der Blastozyste. Die Abbildung demonstriert das Präimplantationsstadium der Blastozyste (ca. Tag 6 - 7 post conceptionem) und höchstwahrscheinlich wichtige Prozesse für die optimale Rezeptivität des Uterus, Apposition und Adhäsion der Blastozyste (Norwitz *et al.* 2001).

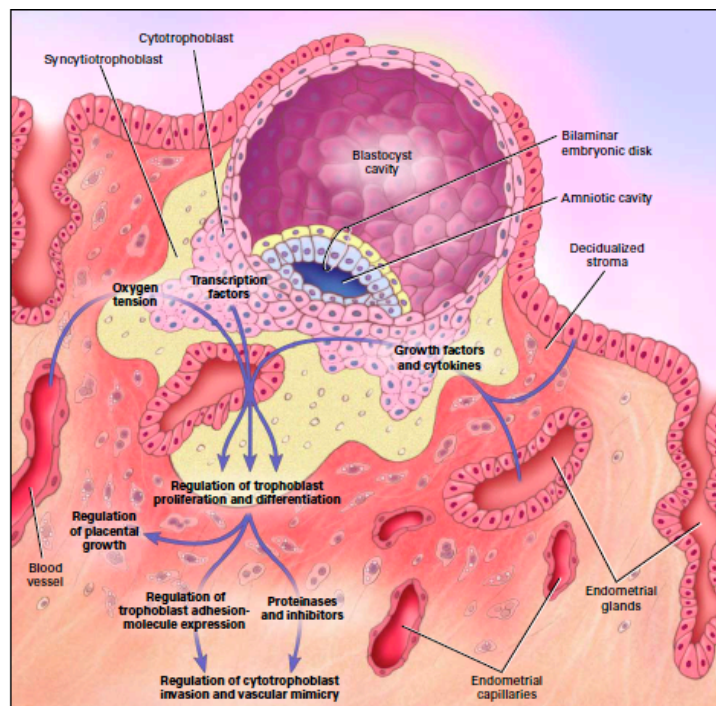


Abb. 1.5: Implantation der Blastozyste. Das Diagramm zeigt eine invadierende Blastozyste (ca. 9 - 10 Tag post conceptionem) und Prozesse, die für die Invasion des Trophoblasten erforderlich sind (Norwitz *et al.* 2001).

(LIF) (Schofield and Kimber 2005), *Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor like Growth Factor* (HB-EGF) (Xie *et al.* 2007) eine Funktion bei der embryonalen Implantation ausüben. Außerdem zeigen *in vitro* Studien, dass HB-EGF die Anhaftung der Blastozyste unterstützt (Mardon *et al.* 2007). Verminderte Expression von EGF und EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren, wie HB-EGF, könnte in der Einschränkung der adäquaten Invasion des Zytotrophoblasten resultieren (Leach *et al.* 2002). Interleukin-1 β (IL-1 β) wurde als parakriner Faktor in der Vermittlung der Kommunikation zwischen maternalem Endometrium und Embryo identifiziert (Fazleabas *et al.* 2004).

Der Spiegel von LIF im luminalen und glandulären uterinen Epithel steigt in der mittleren sekretorischen Phase des menstruellen Zyklus an (Cullinan *et al.* 1996). Die verminderte Sekretion des Zytokins ist mit Infertilität assoziiert (Chaouat *et al.* 1995). LIF wird auch in dem die implantierte Blastozyste umgebenden Stroma produziert (Song *et al.* 2000).

Unter vielen Aspekten der Synchronisierung des Prozesses der Implantation ist die Rolle der Steroidhormone am besten untersucht und verstanden. Die Implantation benötigt den präovulatorischen Anstieg der Sekretion des 17 β -Östradiols, der die Proliferation und die Differenzierung der uterinen Epithelzellen stimuliert. Die kontinuierliche Produktion des Progesterons vom Corpus luteum stimuliert die Differenzierung der uterinen Stromazellen zu Deziduazellen. Effektoren der Steroidhormonaktivität beinhalten Peptidhormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Norwitz *et al.* 2001).

Um den zehnten Tag nach der Konzeption ist die Blastozyste vollständig in das stromale Gewebe des Uterus eingebettet. Das uterine Epithel ist wieder über die „Implantationsstelle“ gewachsen und bedeckt sie. Es erfolgt die Differenzierung des Trophoblasten entlang den unterschiedlichen Wegen (Abbildung 1.6).

1.5 Differenzierung des Trophoblasten

Sobald der Embryo mit der Uteruswand verankert wird (6. - 7. Tag nach der Ovulation), ist der nächste Schritt die Ausbildung der fetomaternalen Einheit. Die Differenzierung des Trophoblasten in den invasiven Phänotyp beginnt sehr früh während der ersten Implantationsschritte der Blastozyste. Die Trophoblastzellen befinden sich auf der Frontlinie der Blastozyste und entwickeln invasive Eigenschaften während der Differenzierung (Loke *et al.* 1995). Die epithelialen trophektodermalen Zellen haften sich mit ihrer apikalen Seite an das uterine Epithel an und invadieren anschließend das dezidualisierte endometriale Stroma und transformieren sich in nicht polarisierte Zellen (Carson *et al.* 2000). Ungefähr um die 8. Schwangerschaftswoche ist die Gebärmutter Schleimhaut vollständig von dem interstitiellen EVT kolonisiert und die Zellen erreichen die dezidua-myometriale Grenze. Bei der Migration in die tieferen Schichten der Dezidua verwandelt sich der interstitielle EVT in

multinukleäre rundliche gigantische Plazenta-Bett-Zellen. Das ist besonders im zweiten Trimester der Schwangerschaft bei der Invasion in das innere Myometrium zu beobachten. (Ferretti *et al.* 2007).

Trophoblast besteht aus verschiedenen Zellpopulationen, mit unterschiedlicher Zellmorphologie. In den frühen Stadien befinden sich die Zytotrophoblast-Stammzellen auf der trophoblastären Basalmembran und proliferieren aktiv. Diese Zellen folgen zwei unterschiedlichen Differenzierungswegen, einer villösen und extravillösen Population. In dem villösen Weg verbleibt der villöse Zytotrophoblast (vZTB) beim fetalen Kompartiment mit der Fusion der Zellen zu einem multinukleären, schwach proliferierenden Synzytiotrophoblasten (ST), der die flottierenden Zotten ummantelt. Diese Villi, die in einem direkten Kontakt zu maternalem Blut im intervillösen Raum stehen, gewährleisten den Nährstoff- und Gasaustausch für den Embryo (Genbacev *et al.* 1996).

Die Zellpopulation des proliferativen Trophoblasten, die einen anderen Entwicklungsweg geht, differenziert in extravillösen (intermediären) Zytotrophoblast (EVT). Diese Zellen verlassen die trophoblastäre Basalmembran und bilden Kolonnen, bestehend aus nicht polarisierten Zellen, die Haftzotte, die an die Uteruswand haftet und später einige Schichten derselben penetriert. An der Basis der Haftzotte werden Anhäufungen aus dem proliferativen ZTB formiert (Lacroix *et al.* 2005) (Abbildung 1.7). Nach dem Ausdifferenzieren verliert der EVT der Zellkolonne die Eigenschaft der Zellteilung. Diese Zellen werden mobiler und hoch invasiv (invadierender EVT). Darüber hinaus breitet sich der EVT der Zellsäule auch lateral aus und fusioniert mit den benachbarten Kolonnen. Somit wird die Außenhaut des embryonalen Sackes formiert. Der interstitielle EVT invadiert das dezidualisierte Endometrium und das proximale Drittel des Myometriums (interstitielle Invasion). Eine Subpopulation, der endovaskuläre EVT, invadiert die uterinen Spiralarterien (endovaskuläre Invasion). Durch die tiefe Invasion der maternalen Dezidua im ersten Trimester der Schwangerschaft kommen die Zellen des EVT in engen Kontakt mit den zahlreichen maternalen Leukozyten, die sich in der Mukosa befinden (Trundley and Moffett 2004). Die trophoblastären Zellen werden aber weder von den uNK, noch von den mütterlichen T-Lymphozyten attackiert. Um der mütterlichen Immunabwehr zu entgehen, besitzt der EVT verschiedene Moleküle, die diese Toleranz ermöglichen (Feige *et al.* 2006, Helige *et al.* 2008, Apps *et al.* 2009). Eine große Rolle wird dem HLA-G und HLA-E zugeschrieben, die zu den nicht klassischen Histokompatibilitätskomplexen gehören und damit von den mütterlichen Leukozyten nicht erkannt werden (Apps *et al.* 2009) (Abbildung 1.7). HLA-G interagiert direkt oder indirekt durch HLA-E mit den spezifischen *Killer Inhibitory Receptors* (KIR), die sich auf der Leukozytenoberfläche befinden und damit die Funktion der uNK Zellen herunterregulieren könnten. So übt HLA-G einen protektiven Effekt auf die fetale Zellen vor den Attacken des mütterlichen Immunsystems aus (Helige *et al.* 2008). Zu den anderen protektiven Systemen gehört das Apoptose induzierende Fas/Fas Liganden System.

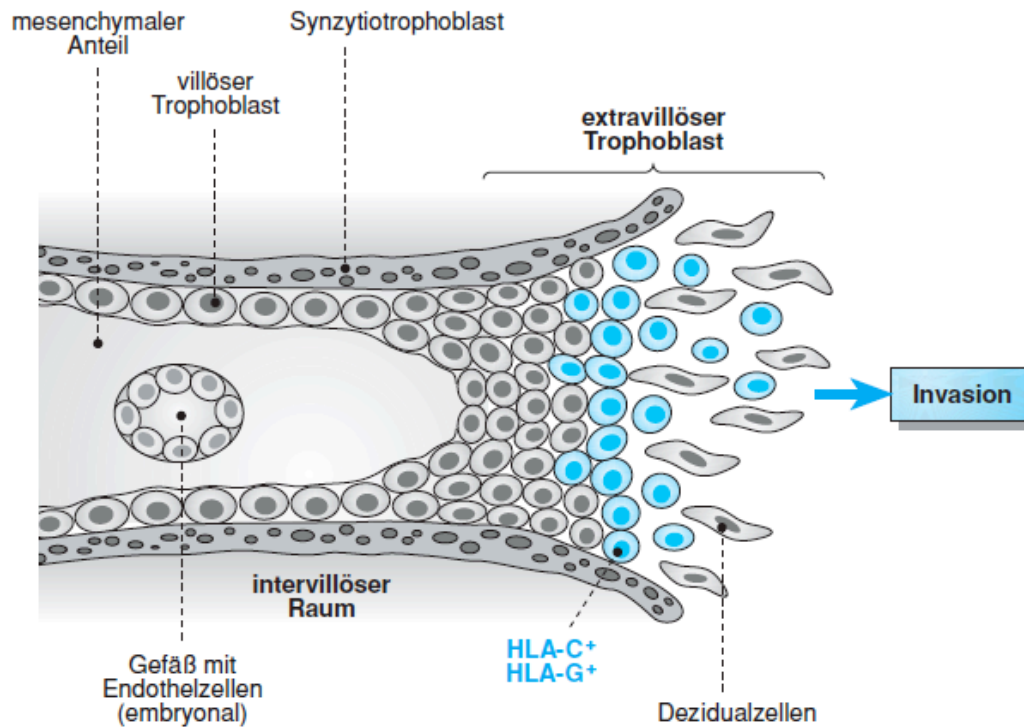


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Invasion des Trophoblasten aus einer Haftzotte. In dem dezidualisierten Stroma kommt es zu direkten Zell-Zell-Kontakten (embryonal-maternal). Im Vordergrund stehen zelluläre Immunvorgänge (Feige *et al.* 2006).

Maternale Immunzellen, die das Fas exprimieren untergehen einer Apoptose an der Plazenta/Dezidua-Grenzfläche (Ferretti *et al.* 2007). Die Sauerstoffsättigung spielt eine wichtige Rolle in dem Differenzierungsprozess und der trophoblastären Invasion (Kaufmann *et al.* 2003). Die frühen Stadien der Plazentaentwicklung verlaufen in einer relativen Hypoxie. Dieser Zustand begünstigt die Proliferation und Differenzierung des Trophoblasten entlang des invasiven Weges. Im Laufe der Entwicklung invadiert der EVT die maternale Spiralarterien und führt zu deren Okklusion, ein Prozess, der eine vorübergehende Hypoxie gewährleistet. Um die 10. - 12. SSW (Schwangerschaftswoche) beginnt der Blutfluß im intervillösen Raum. Die EVT migrieren weiterhin entlang des Lumens der Spiralarterien und ersetzen die maternalen Endothelzellen. Sekundäre Selektine, wie E- und P-Selektin, die sich in den vaskulären Endothelzellen der menschlichen Dezidua befinden, spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion des endovaskulären EVT und dezidualen Endothelzellen (Milstone *et al.* 2000). Die Remodellierung findet bis zum inneren Drittel des myometralen Teils der Spiralarterien statt. Es kommt zu Erweiterung des Gefäßdurchmessers und zur Senkung des Gefäßwiderstandes. Die Anpassungsprozesse gewährleisten den normalen Blutfluß in der fetomaternalen Einheit (Red-Horse *et al.* 2004).

Die präzise Migration des Trophoblasten wird durch den Dialog zwischen den unterschiedlichen Zellen, wie Zellen des glandulären und luminalen Epithels, dezidualen

Zellen, angesiedelten Leukozyten, Makrophagen und uNK (uterine natürliche Killerzellen) gewährleistet (Hannan and Salamonsen 2007).

Die Plazenta gehört zu den normalen menschlichen Geweben, dennoch sind die Eigenschaften der plazentaren Zellen mit denen maligner Zellen vergleichbar. Die hohe Proliferationsrate, Mangel an Inhibition des Zell-Zell-Kontaktes, das Migrations- und Invasivitätsvermögen, als auch die Möglichkeit der Entgehung der Effektoren des Immunsystems, besonders im ersten Trimester der Schwangerschaft, lassen den Trophoblast als „pseudomalignes“ Gewebe oder „physiologische Metastase“ betrachten (Genbacev *et al.* 1997, Redman 1997, Mullen 1998).

Beide, der EVT und die Tumorzellen (nicht metastasierte Tumorzellen) sind hoch proliferativ und weisen einen Mangel an Zellkontakt-Inhibierung auf, zwei Hauptcharakteristiken aller Typen von malignen Zellen. Allerdings, im Gegensatz zu den Tumorzellen, wird die Proliferation bei dem EVT strikt reguliert und diese Zellen beenden das Zellwachstum während der invasiven Differenzierung (Pollheimer and Knofler 2005). Sowohl bei dem migrierenden und invadierenden EVT, als auch bei den malignen metastasierenden Zellen, ist Invasion ein aktiver Prozess der Anhaftung an die Basalmembran, gefolgt von der Ablösung und Proteolyse der Basalmembran nach dem sie durchdrungen wird (Bischof and Campana 2000). Dennoch werden die Migration und die Invasion bei dem EVT zeitlich und räumlich begrenzt. Die ähnliche Verhaltensweise des normalen Trophoblasten und Tumorzellen entstammen deren individuellen genetischen Programmen. Unter gemeinsam exprimierten Genen, Proteinen und anderen Substanzen befinden sich zahlreiche Protoonkogene, Wachstumsfaktoren, Zell-Oberflächen-Rezeptoren, Enzyme, Enzym-Inhibitoren, ebenso wie Hormone und Peptide (Ferretti *et al.* 2007).

Dennoch sind die Grundlagen der Invasion des Trophoblasten noch nicht komplett verstanden worden. Das kann nicht zuletzt an dem Mangel der vorhandenen *in vitro* Modelle und an der Schwierigkeit der Kultivierung menschlicher Trophoblastzellen liegen.

1.6 Experimentelle Modelle zur Untersuchung der Implantation

Der Großteil der Erkenntnisse zum Verständnis der embryonalen Implantation wurde anhand von Tiermodellen, besonders Mäuse und Primaten, gewonnen. Allerdings ist die Bestimmung der molekularen und zellulären Ereignisse, die die früheren Stadien der menschlichen Implantation untermauern würden, immer noch nicht gelöst worden, zum Teil wegen der Unzugänglichkeit der frühen Implantationsstadien. Mangels der *in vivo* Implantationsmodelle, sind mehrere *in vitro* Untersuchungssysteme, die die unterschiedliche Stadien der menschlichen embryonalen Implantation nachahmen, entwickelt worden. Aus ethischen Gründen sind die Untersuchungen an menschlichen Embryonen in Deutschland untersagt. Es gibt nur wenige Modelle, die Daten zu diesem Thema liefern. Dementsprechend ist auch der Progress bei Therapieoptionen im Falle einer fehlgeschlagenen Implantation sehr langsam.

Folgende Implantationsmodelle werden in diesem Abschnitt dargestellt: Solid-Phase Assays der Anhaftung der Blastozyste und Invasion des Trophoblasten; zwei- oder dreidimensionale Ko-Kulturen von Blastozyste und endometrialen Zellen, dreidimensionale Ko-Kulturen von Trophoblast-Sphäroiden und endometrialen Zellen.

Eine wichtige Charakteristik dieser Modelle ist die Möglichkeit einer funktionellen Untersuchung ohne Einschränkung in der Sammlung von deskriptiven Daten. Diese Modelle haben ein großes Potential in dem Beitragen zur Entwicklung von neuen therapeutischen und diagnostischen Strategien auf dem Gebiet der Medikamententoxizität und Fehlern in der Implantationsperiode.

In den folgenden Modellen werden die Untersuchungen der frühen Stadien der Implantation beschrieben. Es wird hier als ein Zeitraum definiert, der die ersten 2 Wochen der Schwangerschaft umspannt, nämlich die Vorbereitung von Embryo und Endometrium, Anhaftung und Interaktion mit dem Epithel, Invasion der epithelialen Basalmembran und stromalen endometrialen Zellen und Matrix (Mardon *et al.* 2007, Teklenburg and Macklon 2009).

1.6.1 Modelle zur Untersuchung der Anhaftung der Blastozyste

1.6.1.1 Solid-Phase Assays

Solid-Phase Assays können zur Erforschung der Eigenschaften der spezifischen Proteine, die zur Unterstützung der Adhäsion und des Auswuchses des Trophoblasten dienen, herangezogen werden. Es erfolgt eine Beschichtung der Kultursysteme oder Beimischung der Proteine zu einer Festphase, auf die die Zellen platziert werden. Anhand dieser Testsysteme ist es möglich, die Funktion der einzelnen spezifischen rekombinanten oder gereinigten Proteine, die besonders für die Stadien der Anhaftung der Blastozyste und Interaktion des Trophoblasten mit der extrazellulären Matrix relevant sind, zu untersuchen. So wurde z.B. die Wichtigkeit des HB-EGF für die Anhaftung des menschlichen Embryos *in vitro* demonstriert. Die Expression von HB-EGF auf der luminalen Oberfläche des Endometriums, das sich im rezeptiven Stadium befindet, und seines Rezeptors ErbB4 auf dem polaren Trophektoderm der humanen Periimplantationsblastozyste lassen HB-EGF eine wichtige Rolle in der Anhaftung der Blastozyste zuzuschreiben. Chobotova et al. vermuten den Einfluss von HB-EGF in den frühen Implantationsstadien (Chobotova *et al.* 2002). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass heterologe Zellen, die eine Überexpression von HB-EGF aufweisen, an die Blastozyste anhaften (Raab *et al.* 1996).

Allerdings verhindert die Abwesenheit der endometrialen Zellen in den Solid-Phase Assays die Untersuchung komplexerer Prozesse der Interaktion zwischen maternalen endometrialen Zellen und Blastozyste.

1.6.1.2 Ko-Kulturen von Embryonen mit endometrialen epithelialen Zellen

Das Endometrium ist ein komplexes Gewebe, das aus unterschiedlichen zellulären Kompartimenten besteht. Das luminale Epithel bietet eine defensive Barriere, die ausschlaggebend für die Anhaftung der Blastozyste ist. Das glanduläre Epithel sekretiert zahlreiche für die Implantation wichtige parakrine und autokrine Faktoren (Cavagna and Mantese 2003).

Ko-Kulturen von menschlichen Embryonen und menschlichen endometrialen epithelialen Zellen (EEZ) sind entwickelt worden um die wichtigen embryonalgesteuerten Signale zur Regulation der von EEZ exprimierten Proteine zu zeigen (Simon *et al.* 1999). Die Anwendung der Ko-Kulturen aus humanen Embryonen und EEZ stellen ein wertvolles experimentelles System dar, in dem man die Prozesse während der Apposition und Adhäsion darstellen kann (Mardon *et al.* 2007).

Als eine Alternative zu diesen Modellen, ohne Einsatz der humanen Blastozyste, werden Ko-Kulturen aus Sphäroiden (dreidimensionale Konglomerate aus transformierten humanen

Trophoblastzellen) mit einem Monolayer aus humaner EEZ-Linie verwendet (Heneweer *et al.* 2002, Tinel *et al.* 2000). Diese Modelle sind von Vorteil bezüglich der Einfachheit in der Etablierung und Manipulation und der Verfügbarkeit des Zellmaterials.

1.6.2 Modelle zur Untersuchung der Invasion des Trophoblasten

1.6.2.1 Assays mit Extrazellulärer Matrix

Bei den Transwell-Invasionsassays invadieren die Trophoblastzellen aus der oberen Vertiefung durch eine poröse Membran, die mit Matrigel beschichtet ist, in die untere Vertiefung. Dafür können sowohl primäre Trophoblastzellen aus dem ersten Trimenon als auch humane trophoblastäre Zelllinien verwendet werden. Diese Assays ermöglichen sowohl die Untersuchung der Anhaftung des Trophoblasten und seine Invasion durch die epitheliale Basalmembran und die extrazelluläre Matrix, als auch die invasive Antwort auf endometriale Stimuli (Mardon *et al.* 2007). So wurde z.B. Osteopontin in diesen Versuchen eingesetzt, das die Invasion des Trophoblasten zu verstärken schien (Briese *et al.* 2005a).

1.6.2.2 Invasions-Assay mit Stromazellen

Interaktionen des Embryos mit endometrialen Stromazellen (ESZ) wurde schon mehrfach anhand des Invasionsassays untersucht (Carver *et al.* 2003). In diesen experimentellen Modellen wird die humane Blastozyste (Tag 6) auf eine Monoschicht aus primären humanen ESZ aufplattiert und weiterhin für 48 Stunden ko-kultiviert (Carver *et al.* 2003). Die Blastozyste haftet sich innerhalb von 24 Stunden an die ESZ an. Der Trophoblast invadiert anschließend den Monolayer aus den ESZ, interagiert mit der darunter liegenden stromalen extrazellulären Matrix und formiert Auswachsungen während der nächsten 24 Stunden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die in die ESZ implantierende Blastozyste ein viel höheres Niveau an hCG sezerniert, als wenn sie nur auf Plastik oder Matrigel platziert wurde (Carver *et al.* 2003, Martin *et al.* 1998). Dies deutet darauf hin, dass die ESZ eine Anzahl an Faktoren sekretieren, die die Funktion des Trophoblasten fördern (Mardon *et al.* 2007). Die Effizienz und das Ausmaß der Anhaftung und der Invasion können mittels Zeitraster-Video-Mikroskopie beobachtet werden (Carver *et al.* 2003). Die Lokalisation einzelner Proteine kann mittels Immunhistochemie ermittelt werden (Mardon *et al.* 2007).

Dieses robuste und hoch reproduzierbare Modell gestattet unterschiedliche Interventionsmöglichkeiten an den beiden Beteiligten in dem Prozess der Implantation, sowohl an den ESZ als auch an der Blastozyste, sogar noch vor der Anhaftung. So können unter anderem unterschiedliche Induktoren, Inhibitoren des Zellwachstums oder Zelldifferenzierung separat zu den ESZ, zu der Blastozyste oder auch zu der Ko-Kultur zu

jedem Zeitpunkt hinzugefügt werden (Mardon *et al.* 2007). Darüber hinaus kann die Funktion der einzelnen endometrialen Gene mittels der RNA-Interferenz Technik, durch selektive Hoch- oder Runterregulierung, untersucht werden (Jones *et al.* 2006). Anstelle von menschlichen können auch Maus-Blastozysten (Cervero *et al.* 2007) verwendet werden. Weiterhin können primäre EVT aus der Plazenta nach der Geburt oder Trophoblastzelllinien eingesetzt werden (Korff *et al.* 2004).

1.6.3 Dreidimensionale Ko-Kulturen: Endometriale Zellen und Blastozyste

Dreidimensionale Zellkultur-Modelle sind hilfreich in der Untersuchung der Interaktion zwischen ESZ und EEZ. Es wurde bemerkt, dass die Signale zwischen unterschiedlichen Zelltypen im Endometrium essenziell für seine angemessene Funktion sind (Bigby 2002). Proliferation und Differenzierung der epithelialen Zellen im Uterus sind parakrine Ereignisse, die durch ESZ angeregt werden und umgekehrt, was wiederum die Implantation beeinflusst (Mardon *et al.* 2007). Das ultimative Implantationsmodell sollte dementsprechend alle Zelltypen des Endometriums beinhalten, so dass die komplexe Interaktion zwischen dem maternalen Gewebe und der Blastozyste charakterisiert werden könnte (Mardon *et al.* 2007). Rekonstruktion der physiologischen Struktur des Endometriums *in vitro* ist eine große Herausforderung. Es sind verschiedene Modelle entwickelt worden, die Schichten aus epithelialen, stromalen Zellen und darauf platzierter Trophoblastzellen/Blastozyste beinhalten. Zum Beispiel, im Modell von Kim *et al.* wurden die ESZ in ein Gel mit Kollagen Typ I ausgesät. Darüber wurde eine dünne Schicht aus Matrigel aufgetragen und darauf wurden die EEZ platziert (Kim *et al.* 2005). In einem anderen Modell wurden die ESZ in einer Vertiefung unter dem Insert platziert. Die EEZ wurden entweder mit dem Matrigel (Insert) oder auf das Matrigel aufplattiert (Blauer *et al.* 2005). Ein drittes Modell besteht aus einem Mix aus Kollagen Typ I und Matrigel. Die ESZ wurden in diese Mischung eingeführt. EEZ-Inseln wurden auf die Oberfläche gesetzt (Park *et al.* 2003).

Helige *et al.* konstruierten ein dreidimensionales Modell aus runden Fragmenten der menschlichen Dezidua parietalis aus dem ersten Trimenon und multizellulären Sphäroiden (Haufen von Trophoblastzellen, die sich unter bestimmten Bedingungen auf nicht adhärenen Platten zur sphärischen Strukturen formieren). Es wurden AC-1M59 Zellen verwendet, die Chorionkarzinom/Trophoblastzellen-Hybridome darstellen (Funayama *et al.* 1997). Anhand dieses Modells wurden HLA-G-Expression und Apoptose an der fetomaternalen Grenzfläche untersucht (Helige *et al.* 2008). Bei diesem System wurde ein rundes Fragment aus dem dezidualen Gewebe von 800 µm Durchmesser und ein multizellulärer Sphäroid von 300 µm Durchmesser in einen Tunnel im Silikon-Pad überführt. Nach 24 Stunden Inkubation und Ausbildung eines festen Kontaktes zwischen den Beteiligten wurde die Ko-Kultur in eine Spinner-Flasche überführt und bei 130 rpm mit einem Rühr-System über 5 Tage kultiviert.

Anschließend wurde das Gewebe mittels Immunhistochemie an Kryoschnitten untersucht (Helige *et al.* 2008).

Ein entscheidender Punkt in diesen Modellen ist der Nachweis der Reinheit der primären Zellen als auch die Detektion der Lokalisation der verschiedenen Zelltypen in der Ko-Kultur, was anhand der Immunhistochemie erreicht werden kann.

Ein kritischer Faktor in diesen Ko-Kultur Studien ist das Problem der Verfügbarkeit des endometrialen Gewebes in dem „korrekten“ Stadium des menstruellen Zyklus und zur selben Zeit das Vorhandensein einer adäquaten Blastozyste oder primärer Trophoblastzellen. EEZ können außerdem nicht für längere Zeit passagiert werden (Mardon *et al.* 2007).

Die unterschiedlichen Beobachtungen, von den Solid-Phase Assays bis zu den komplexen dreidimensionalen Kultursystemen, liefern Erkenntnisse über den Prozess der Implantation. Anhand dieser Modelle können die molekularen und zellulären Ereignisse an fetomaternalen Grenzfläche in einer relativ „grobe“ Darstellung untersucht werden. Ein anderer Aspekt bietet die Möglichkeit der Medikamententestung, bzw. Überprüfung von deren Toxizität oder Entwicklung neuer therapeutischer Substanzen (Mardon *et al.* 2007).

Das in dieser Arbeit von uns präsentierte Modell der Ko-Kultur der Trophoblast-Sphäroiden auf nicht vor- oder vordezidualisierten ESZ entspricht der dritten Phase der Implantation, d.h. der Invasion des Trophoblasten in die Dezidua.

1.7 Faktoren im fetomaternalen Dialog

Die Implantation erfordert eine komplexe Interaktion zwischen dem sich entwickelnden Embryo, dem dezidualisiertem Endometrium, der sich ausbildender Immuntoleranz und/oder den Veränderungen der zellulären und humoralen Antwort. Das Endometrium als auch die Blastozyste sollten sich synchron entwickeln um zum Zeitpunkt des Implantationsfensters in einer „positiven“ Art und Weise aufeinanderzutreffen (Minas *et al.* 2005). Zahlreiche Untersuchungen geben Anlass zur Vermutung einer Kommunikation zwischen fetalem und maternalem Gewebe, noch vor der Anhaftung der Blastozyste an das Endometrium. Diese Ereignisse werden durch Steroidhormone, hCG und weitere parakrine Faktoren kontrolliert. Mehrere Signalmoleküle, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine werden vom endometrialen Epithel, dezidualisierten Stromazellen, Immunzellen und der Blastozyste selbst produziert und ins Uteruslumen in der Region der Dezidualisierung und Implantation sekretiert. Sie beeinflussen nicht nur die Entwicklung, Anhaftung und Invasion der Blastozyste, sondern auch unter anderem die Transformation der extrazellulären Matrix des dezidualisierten Endometriums (Dey *et al.* 2004, Makrigiannakis and Minas 2007).

1.7.1 Östrogen

Drei Östrogenvarianten sind das Östradiol (E_2), Östron und Östriol. Östradiol ist ein Abkömmling von Östron und wird auch über die Testosteronstufe im Organismus produziert. Bestimmte Wachstumsfaktoren können die Synthese von Östrogen steuern. IGF-I und IGF-II steigern die Aromatase-Aktivität in den Stromazellen des Ovars und somit die Konversion von Östron in die aktivere Form Östradiol. Östrogene binden an die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) des Östrogen-Rezeptors (ER) (Lebowitz 2006). Es gibt zwei Formen des ER: ER α und ER β . Diese zwei Subtypen sind Produkte von zwei unterschiedlichen Genen (Edwards 2005). Östrogene üben folgende physiologischen Effekte im Organismus aus: Entwicklung der weiblichen Geschlechtorgane; Expression der weiblichen sekundären sexuellen Merkmale in der Pubertät; Vergrößerung der Brust; Vergrößerung und Pigmentierung der Brustwarzen; Formierung der Körperkontur und Umverteilung des subkutanen Fettgewebes; Umänderung der Hautstruktur; Aufrechterhaltung der Schwangerschaft (gemeinsam mit Progesteron); Natriumretention (Lebowitz 2006). Das kardiovaskuläre System ist ein wichtiges Zielgewebe des Östrogens. Die Endothel- und glatten Muskelzellen exprimieren ER α und ER β . Östrogen übt einen kurz- und langfristigen protektiven Effekt auf die Blutgefäße gegen Beschädigung und Atherosklerose aus (Edwards 2005). Östrogen ist neuroprotektiv in der Entwicklung und Differenzierung des Gehirns und ist wichtig für die Widerstandsfähigkeit der Neurone gegenüber Schädigung, wie oxidativer Stress, Ischämie, Exozytotoxizität und Folgen des Insults und neurodegenerativer Erkrankungen (McEwen and Alves 1999, Wise *et al.* 2001).

1.7.2 Progesteron

Progesteron (P_4) ist ein pleiotropes Hormon, das mehrere Aspekte der normalen weiblichen reproduktiven Funktion reguliert. P_4 wird aus Cholesterin und Pregnenolon in allen steroidproduzierenden Geweben, wie Ovar, Testis, Zona reticularis der Nebennierenrinde und Plazenta synthetisiert. Die Effekte des Progesterons auf Zielgewebe werden überwiegend durch nukleäre Rezeptoren ausgeübt. P_4 Rezeptoren PR-A und PR-B sind Mitglieder der Ligand-abhängigen Transkriptionsfaktoren, deren Expression von der Aktivität zweier Promotoren auf einem gemeinsamen Gen abhängt (Cloke *et al.* 2008). PR-A und PR-B haben bemerkenswerterweise eine unterschiedliche Transkriptionsaktivität. Generell wird angenommen, dass PR-A eine geringere transkriptionelle Aktivität aufweist und als ein dominanter Inhibitor des PR-B fungiert (Tung *et al.* 1993)

Während des menstruellen Zyklus wird P_4 vom Corpus luteum im Ovar in der zweiten Zyklushälfte produziert. Das Haupt-Zielorgan für Progesteron ist das Endometrium, wo es die sekretorische Aktivität stimuliert (Tuckey 2005). Beim Menschen ist LH der primäre Stimulus zur Progesteronsynthese. Die Sekretion von P_4 beginnt kurz vor der Ovulation,

zusammentreffend mit dem LH-Peak (Lebowitz 2006). Nach Konzeption und Implantation wird die Progesteronsynthese durch das Corpus luteum weiterhin unter tropischer Stimulation durch hCG, das vom Synzytiotrophoblasten produziert wird, aufrechterhalten. Dadurch wird die menstruelle Blutung unterdrückt und die Entwicklung einer geeigneten Umgebung zur Entwicklung des Embryos unterstützt (Miller 1998, Pepe and Albrecht 1995). Um die sechste bis achte SSW kommt es zur Abnahme der Progesteronsynthese durch das Corpus luteum als Resultat der verminderten hCG-Produktion von der Plazenta. Der Trophoblast übernimmt die Funktion zur Hauptproduktion des Progesterons (Aspillaga *et al.* 1983). Die Konzentration des plazentaren Progesterons steigt bis zu dem Zeitpunkt wenn die Plazenta nach der Geburt abgestoßen wird. P₄ ist zur Ruhigstellung des Myometriums wichtig, entgegenwirkend den Induzierungseffekten von Östrogen, Prostaglandinen und Oxytocin. Eine supprimierende Wirkung auf das maternale Immunsystem gegen fetale Antigene wird ebenso ausgeübt (Pepe and Albrecht 1995). In der Brustdrüse induziert P₄ eine lobulär-alveolären Entwicklung in der Vorbereitung zur Milchsekretion und bewirkt die Suppression der Milchsekretion vor der Entbindung. Es wird beschrieben, dass P₄ im Gehirn für die Mediation der Signale, die für das Sexualverhalten verantwortlich sind, zuständig ist (Lydon *et al.* 1995).

MPA (Medroxyprogesteronazetat)

MPA ist ein 17-azetoxy-6-methylprogestin, das progestagene Eigenschaften bei Verabreichung beim Menschen erzielen kann. MPA supprimiert das Eintreten einer Ovulation. Die histologischen Veränderungen im Endometrium unter MPA-Einnahme weisen folgendes Muster auf: Proliferation, Ruhezustand und Atrophie. Die histologische Untersuchungen von endometrialen Biopsaten unter MPA-Einnahme zeigten ein Endometrium, das durch schmale oder erweiterte Drüsengänge und die Dezidualisierung der Stromazellen charakterisiert wurde. Die Proliferation im Endometrium erzielt ihr Maximum sechs Wochen nach der Applikation, wobei nach einem Jahr das Endometrium atrophisch erscheint (Katz 2007). MPA wird in der klinischen Praxis als Kontrazeptivum unter dem Namen „Depo-Provera“ als intramuskuläre Injektion von 150 mg DMPA oder subkutan („Depo-subQProvera104“) jeweils für 3 Monate eingesetzt. Es werden auch Kombinationspräparate mit Östrogen zur Zeit verwendet (Berek 2007).

Die Kombinationspräparate werden bei den Frauen in der Prä- und Postmenopause angewendet. Die Präparate finden Anwendung bei dysfunktionalen vaginalen Blutungen. Hochdosiertes MPA wird in der Therapie des hormonrezeptorpositiven, als auch des hormonrezeptornegativen metastasierten Mammakarzinoms angewendet (Göretzlehner *et al.* 2007).

In Zellkulturen wird häufig MPA anstelle des natürlichen P₄ eingesetzt, da es wesentlich stabiler ist.

1.7.3 HB-EGF

Heparin-binding-EGF like growth factor (HB-EGF) ist ein Mitglied der EGF-Wachstumsfaktor-Superfamilie (Raab and Klagsbrun 1997), die Proteine beinhaltet, die an die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, EGFR oder HER1/erbB1; HER2/erbB2, der auch als p185/neu bezeichnet wird; HER3/erbB3 und HER4/erbB4 binden (Riese and Stern 1998). HB-EGF geht eine spezifische Bindung mit HER1 und HER4 ein und aktiviert Homodimere oder Heterodimere dieser Rezeptoren mit HER2. Durch Rezeptor-Transaktivierung ist eine Bindung an HER2 möglich (Iwamoto and Mekada 2000, Thomas 1990, Marikovsky *et al.* 1993). HB-EGF existiert in transmembraner und sekretorischer Form (Raab and Klagsbrun 1997). HB-EGF fungiert als ein potenter Induktor der mitogenen Aktivität in glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten, als chemotaktischer Faktor und zytoprotektiver Agent, und als Vorbote bei der juxtakrinen Signaltransduktion (Iwamoto and Mekada 2000, Raab and Klagsbrun 1997). Im Gegensatz zum Endometrium der Nagetiere, geht die Expression des HB-EGF im menschlichen Endometrium dem Erscheinen der Blastozyste voraus und erreicht das Maximum während des Implantationsfensters (Leach *et al.* 1999, Yoo *et al.* 1997), und wird durch den Spiegel der Sexualhormone reguliert. Die Progesteron-Gabe stimuliert HB-EGF-Gen-Expression in den uterinen Stromazellen und im luminalen und glandulären Epithel. Andererseits wird durch Östrogen die HB-EGF-Expression nur in den epithelialen Zellen hoch reguliert, was mit den Periimplantationssignalen zum Uterus oder Embryo in Zusammenhang gebracht wird (Leach *et al.* 2004, Leach *et al.* 1999, Leach *et al.* 2001, Das *et al.* 1994, Yoo *et al.* 1997, Zhang *et al.* 1994, Lessey 2002). In der humanen Plazenta wird HB-EGF im ersten Trimenon primär vom villösen, aber auch vom extravillösen Trophoblasten exprimiert (Leach *et al.* 1999). Die Ergänzung des Kulturmediums mit HB-EGF beschleunigt die embryonale Entwicklung *in vitro* (Martin *et al.* 1998). Experimente zeigen, dass HB-EGF-mRNA auf der luminalen Seite des rezeptiven Endometriums etwa sechs Stunden vor der Implantation der Blastozyste exprimiert wird. Die Expression findet ausschließlich auf der Seite der Apposition der Blastozyste, der zukünftigen Seite der Invasion des Trophoblasten in die Uteruswand, statt (Das *et al.* 1994, Raab *et al.* 1996). Zusätzlich, wurde der HB-EGF-Rezeptor, ErbB4, auf dem polaren Trophektoderm der murinen Periimplantationsblastozyste detektiert (Paria *et al.* 1999). Die HB-EGF-Expression auf der luminalen Oberfläche des rezeptiven Endometriums und seines Rezeptors, ErbB4, auf den polarisierten Zellen der Trophektoderm des humanen Embryos, deuten auf eine aktive Rolle des HB-EGF in der Anhaftung der Blastozyste hin (Chobotova *et al.* 2002b, Chobotova *et al.* 2002a, (Chobotova *et al.* 2005) (Jessmon *et al.* 2009).

Die HB-EGF-Expression ist drastisch vermindert in der Plazenta von Patientinnen mit Präeklampsie (Leach *et al.* 2002), einer Erkrankung, die mit inkompletter Transformation der Spiralarterien assoziiert wird (Brosens *et al.* 1972), was mit einer insuffizienten Invasion des Trophoblasten einhergeht (DiFederico *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass HB-EGF ein Stimulus zu normal verlaufender Invasion des Trophoblasten darstellt (Jessmon *et al.* 2009). Es wird vermutet, dass die bei der Präeklampsie vorhandene oberflächliche Invasion des Trophoblasten mit mangelnder HB-EGF-induzierter Zellmigration und dem Anstieg der Apoptose als Exazerbation infolge reduzierter Zytoprotektion, vergesellschaftet ist (Jessmon *et al.* 2009). HB-EGF induziert unter anderem die Permeabilisierung der lokalen uterinen Gefäße, die Dezidualisierung und die uterine Expression der Signaltransduktionsmoleküle, die mit dem Prozess der Implantation assoziiert sind (Paria *et al.* 2001).

Xie *et al.* führten eine Reihe an Untersuchungen an HB-EGF *knock-out* Mäusen durch und stellten fest, dass HB-EGF ein entscheidendes Signalmolekül für die erfolgreiche Entwicklung der Schwangerschaft in den frühen Stadien, besonders beim Implantationsvorgang, ist. Der maternale HB-EGF ist ein grundlegender Beteiligter in der zeitgenauen Initiation der Implantation der Blastozyste. Amphiregulin, ein anderer heparinbindender Wachstumsfaktor, kompensiert partiell die Initiation der Implantation bei HB-EGF defizienten Mäusen (Xie *et al.* 2007).

1.7.4 LIF

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) ist ein polyfunktionelles Glykoprotein und ein pleiotropes Zytokin. LIF ist ein Mitglied der IL6-Ligandfamilie, zu der auch Interleukin 6 (IL-6), *Oncostatin M* (OSM), *Ciliar Neurotrophic Factor* (CTNF) und *Cardiotrophin-1* gehören. Diese Faktoren vereint eine gemeinsame Signal-Transduktion-Rezeptor-Komponente, Glykoprotein gp130 (Gearing 1993, Pennica *et al.* 1995). LIF interagiert spezifisch mit LIF-Rezeptor β (LIFR β), einem Transmembranprotein (Kishimoto *et al.* 1994). Beide Rezeptoren LIFR β und gp130 werden während des gesamten Zyklus exprimiert, mit folgender Lokalisation von LIFR β im luminalen und gp130 sowohl im luminalen als auch im glandulären Epithel mit maximalem Anstieg der Synthese während der sekretorischen Phase des menstruellen Zyklus (um den 18.-21. Tag), zum Implantationsfenster hin (Cullinan *et al.* 1996, Aghajanova *et al.* 2003, Chen *et al.* 2000, Laird *et al.* 1997, Ledee-Bataille *et al.* 2002). Im Endometrium von Frauen mit bestätigter Fertilität wird LIF-mRNA und Protein zwischen dem 18. - 28. Tag des menstruellen Zyklus exprimiert mit maximaler Aktivität in der mittleren sekretorischen Phase (Kojima *et al.* 1994, Arici *et al.* 1995, Sharkey *et al.* 1995, Vogliagis *et al.* 1996, Dimitriadis *et al.* 2000). Interessant ist die Korrelation zwischen der Expression von LIF und LIFR und der Formierung der Pinopodien auf dem luminalen Uterusepithel mit der Koinkidenz der endometrialen Rezeptivität (Aghajanova *et al.* 2003). LIF-Protein ist auch im endometrialen

Stroma während des menstruellen Zyklus beobachtet worden (Baird *et al.* 1996, Vogiagis *et al.* 1996, Danielsson *et al.* 1997, Aghajanova *et al.* 2003).

Zu den Regulatoren der LIF-Expression im Uterus gehören unter anderem Progesteron (Danielsson *et al.* 1997), lokal produzierte Faktoren, wie HB-EGF (Arici *et al.* 1995, Lessey 2002) und hCG (Licht *et al.* 2007, Perrier d'Hauterive *et al.* 2004). Auch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF α sind an der Regulation der LIF-Expression beteiligt (Perrier d'Hauterive *et al.* 2004). Die endometriale LIF-Expression wird auch durch Seminalplasma gefördert (Gutsche *et al.* 2003).

LIF befindet sich auf der obersten Stufe der Pyramide des Implantationsprozesses und verfügt über mehrere Funktionen, wie Induktion der Proliferation, Differenzierung, das Überleben der Zellen, all das, was so unabdingbar für die Entwicklung und Implantation der Blastozyste ist (Dimitriadis *et al.* 2005).

LIF ist das erste Zytokin, dessen kritische Rolle bei der Implantation an Mäusen untersucht und bestätigt wurde. Bei Mäusen wird LIF in den endometrialen Drüsen des Uterus exprimiert. Diese Expression ist zeitlich auf den Zeitpunkt der Ovulation unmittelbar vor der Implantation der Blastozyste begrenzt. Die LIF-Expression bei den Mäusen unterliegt maternaler Kontrolle und ist von der Anwesenheit eines Embryos im Uterus unabhängig (Bhatt *et al.* 1991, Shen and Leder 1992). Die maternale LIF-Expression ist erforderlich für die Initiation der Implantation (Red-Horse *et al.* 2004).

Einen direkten Hinweis auf ein absolutes Erfordernis von LIF für die Implantation liefern die Beobachtungen bei Mäusen mit Abwesenheit des funktionellen LIF-Genes. LIF-defiziente Männchen sind fertil, die Weibchen haben eine Ovulation und deren befruchtete Eizellen können sich zur Blastozyste entwickeln. Bei den weiblichen Mäusen ohne funktionell aktiven LIF-Gen (-/-), gepaart mit Wildtyp oder LIF(-/-) Männchen wurde eine normale Blastozyste beobachtet, die allerdings unfähig war zu implantieren (Stewart *et al.* 1992). Implantation und normale Entwicklung dieser Embryonen findet nur statt, wenn die Blastozyste von der LIF-defizienten Mutter in eine Wildtyp pseudoschwangere Rezipientin transferiert wurde (Stewart *et al.* 1992), oder wenn eine exogene LIF-Zufuhr vorgenommen wurde (Chen *et al.* 2000).

Schofield und Kimber gehen auf die Rolle von LIF in der Dynamik und Verteilung der Leukozytenpopulationen, wie uNK, Makrophagen und Eosinophilen, in der Uteruswand vor der Implantation und in der frühen Schwangerschaft ein. So zeigten die Untersuchungen an Wildtyp und LIF-*knock-out* Mäusen, dass LIF für Makrophagen wie ein Chemokin fungiert und sie zum Ort der Implantation anlockt. Dabei kommt es zur bevorzugten Ansammlung von Makrophagen im luminalen Bereich und im Myometrium am Tag 3 der Schwangerschaft bei Wildtyp Mäusen. Das ist aber bei *knock-out* Mäusen nicht der Fall. Demgegenüber wird Migration von uNK und Eosinophilen unter LIF-Einfluss eingeschränkt (Schofield and Kimber 2005).

Im Gegensatz zur spezifischen Expression und der bestätigten Wichtigkeit bei der Implantation bei der Maus, ist die genaue Rolle von LIF in der Förderung der Implantation beim Menschen noch nicht exakt bekannt. Allerdings wird beschrieben, dass LIF die Entwicklung der Blastozyste begünstigt (Dunlison *et al.* 1996) und die Differenzierung des Trophoblasten fördert (Nachtigall *et al.* 1996). Es ist bekannt, dass LIF und seine beiden Rezeptoren von den menschlichen Embryonen vor der Implantation exprimiert werden (Aghajanova 2004, Wanggren *et al.* 2007). Ein Defizit von LIF im reproduktivem System bei der Frau resultiert in Infertilität und Abortneigung (Paiva *et al.* 2009).

LIF wird auch von der Plazenta synthetisiert und der LIF-Rezeptor ist auf den Trophoblastzellen, bzw. Zytotrophoblasten (Gearing 1993, Kojima *et al.* 1995) als auch auf Chorionkarzinomzellen gefunden worden (Bamberger *et al.* 2000a). Über die auf den Trophoblastzellen repräsentierten Rezeptoren, könnte LIF die Implantation *in vivo* fördern (Bamberger *et al.* 2000a). LIF spielt sowohl eine Rolle bei der adhäsiven als auch bei der invasiven Phase der Implantation aufgrund von seinem verankernden Effekt und Regulation der Differenzierung des Trophoblasten (Dimitriadis *et al.* 2010).

LIF wird auch während der Schwangerschaft produziert. So findet man eine LIF-mRNA-Expression von der Dezidua aus dem ersten Trimenon, in den Chorionvilli und dezidualen Leukozyten (Kojima *et al.* 1994, Sharkey *et al.* 1999). Dahingegen wird LIFR-mRNA und -Protein sowohl in den villösen, als auch extravillösen Trophoblasten und in den endothelialen Zellen der fetalen Villi exprimiert (Kojima *et al.* 1995, Sharkey *et al.* 1999). LIF wird zusätzlich in den Fallop'schen Tuben exprimiert, was eine Rolle bei der Entwicklung der Blastozyste vermuten lässt (Keltz *et al.* 1996).

Eine der wichtigsten regulatorischen Funktionen von LIF ist die Regulation des trophoblastspezifischen MHC Klasse-I Proteins HLA-G. So wurde gezeigt, dass LIF die Transkription des humanen HLA-G Promotors in JEG3 Chorionkarzinomzellen induziert. Somit könnte LIF eine Rolle bei der Modulierung der HLA-G-Produktion und immunologischer Toleranz an der feto-maternalen Grenzfläche spielen (Bamberger *et al.* 2000a) (Moreau *et al.* 1998, Apps *et al.* 2009).

1.7.5 IL-1 β

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein parakriner Faktor, der die Kommunikation zwischen dem Endometrium und Embryo zu modulieren scheint (Simon *et al.* 1997). IL-1 β ist ein Schlüsselregulator der inflammatorischen Antwort, und ist als ein Zytokin erkannt worden, das seine Funktion auf mehrere Zelltypen ausübt (Bankers-Fulbright *et al.* 1996).

Das IL-1 System besteht aus mehreren Proteinen: den Agonisten und Liganden IL-1 α und IL-1 β ; den Zelloberflächen-Rezeptoren, IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) und IL-1R2; dem nicht

bindenden akzessorischen Rezeptor-Protein (IL1RAcP); und dem natürlich vorkommenden Inhibitor IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra), der für die Rezeptor-Bindung mit dem IL-1 in Konkurrenz tritt (Svenson *et al.* 1993, De los Santos *et al.* 1996, Martin and Wesche 2002). Alle Komponenten des IL-1-Systems sind im menschlichen Endometrium und an der fetal-maternalen Grenzfläche während der Implantation untersucht worden (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2009).

IL-1 α und IL-1 β werden durch unterschiedliche Gene kodiert, zeigen aber ähnliche biologische Aktivität (Svenson *et al.* 1993, Arend *et al.* 1998). Im menschlichen Endometrium sind beide Liganden ubiquitär präsent: im Epithel, endometrialen Stromazellen und in den endothelialen Zellen (Tabibzadeh and Sun 1992). Das IL-1 β -Gen wird u.a. durch IL-11 während der Dezidualisierung induziert (White *et al.* 2004). IL-1 β -mRNA wird am höchsten in der späten sekretorischen Phase des Zyklus exprimiert (Kauma *et al.* 1990), wobei das Protein in den ESZ, Makrophagen und Endothelzellen lokalisiert ist (Kauma *et al.* 1990, Simon *et al.* 1993). IL-1R1-mRNA wird in den ESZ während der Dezidualisierung *in vitro* hochreguliert (Tierney *et al.* 2003). In der Kultur wird eine verminderte Ansprechbarkeit des dezidualisierten Endometriums gegenüber IL-1 β beobachtet (Yoshino *et al.* 2003). Andere Komponenten der Dezidua können ebenfalls von IL-1 β beeinflusst werden. Zum Beispiel wird die Produktion des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierenden Faktors (GM-CSF) durch uNK-Zellen als Antwort auf Wirkung des IL-1 in der mittleren sekretorischen Phase des Zyklus gesteigert (Jokhi *et al.* 1994). So wird unter IL-1 β -Einfluss die Präsenz von IL-15 in dezidualisierten ESZ in der Kultur vermindert. IL-15 rekrutiert die uNK in das dezidualisierte Endometrium (Okada *et al.* 2004). IL-1 β stimuliert die Produktion von Endothelin in den kultivierten ESZ, was lokal den Tonus der Gefäße oder zelluläre Proliferation regulieren könnte (Lin *et al.* 1998). Es wurde gezeigt, dass IL-1 verschiedene Zytokine, wie IL-6, IL-8, LIF, TNF α , als auch Prostaglandine PGE $_2$, PGE $_{2\alpha}$ und deren Rezeptor EP1, im Endometrium stimuliert (Jacobs *et al.* 1994, Tseng *et al.* 1996, Kniss *et al.* 1997, Knight *et al.* 1999). *In vitro* Experimente zeigen, dass IL-1 β die Expression des Cyclo-Oxygenase-2 (COX-2)-Gens in den kultivierten ESZ induzieren kann. Demzufolge wird die Rolle des IL-1 in der Vermittlung der parakrinen Effekte in der Kontrolle der Prostaglandin-Synthese während des Periimplantationszeitraumes vermutet (Pellicer *et al.* 2002). Auch die Expression von IGFBP-1 wird bei der Anwesenheit von Steroidhormonen durch IL-1 β in den ESZ von Primaten stimuliert (Strakova *et al.* 2000). IL-1 beeinflusst die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und Integrinen. So steigert IL-1 β MMP-9 und reduziert die Expression der MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3 im Endometrium (Huang *et al.* 1998).

In der Schwangerschaft wird IL-1 β , unter anderem in der Dezidua und aktivierten Makrophagen, in einer viel größeren Menge als in dem „nicht-schwangeren“ Endometrium exprimiert (Simon *et al.* 1994). Das IL-1R1 ist in den endometrialen Drüsen der frühen Schwangerschaft detektiert worden (Tierney *et al.* 2003).

Die embryonale Sekretion von IL-1 β wird durch endometriale Faktoren stimuliert (De los Santos *et al.* 1996, Simon *et al.* 1997), was damit eine klare Interaktion zwischen maternalem Endometrium und dem Embryo vor der Implantation darstellt. Es wird vermutet, dass *in vivo* das deziduale IL-1 β über die Bindung an das IL-1Ra, was vom Trophoblasten produziert wird, in der parakriner Regulation der MMP-vermittelten Invasion des Trophoblasten und der Sekretion von hCG teilnimmt (Dimitriadis *et al.* 2005). Es wurde beschrieben, dass Produktion von MMP-2 und -9, und uPA (*Urokinase Type Plasminogen Activator*) in den JEG3 Trophoblastzellen durch IL-1 β hochreguliert wird (Karmakar and Das 2002).

Alle Hauptkomponenten des IL-1 Systems wurden auf der Proteinebene in Präimplantationsembryonen identifiziert (Austgulen *et al.* 1995, De los Santos *et al.* 1996, Baranao *et al.* 1997). IL-1 β wird unter anderem im villösen Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten (überwiegend IL-1R1) exprimiert (Simon *et al.* 1994, Tierney *et al.* 2003). Die IL-1 β -Produktion vom Zytotrophoblasten, isoliert aus dem ersten Trimenon, ist 2,4-fach bis 3,8-fach höher, als aus dem zweiten oder dritten Trimenon der Schwangerschaft, was dafür spricht, dass die IL-1 β -Ausschüttung dem invasiven Potenzial des Zytotrophoblasten direkt proportional ist (Librach *et al.* 1994, Fazleabas *et al.* 2004).

Zum heutigen Zeitpunkt gibt es noch keinen direkten Hinweis auf die Korrelation zwischen den Abweichungen im IL-1-System und der Beeinträchtigung der Implantation beim Menschen (Makrigiannakis *et al.* 2006).

1.7.6 Osteopontin

Ein wesentliches Adhäsionsmolekül auf der luminalen Oberfläche des Endometriums ist das Integrin $\alpha\beta 3$. Sein Ligand Osteopontin (OPN) ist mit dem $\alpha\beta 3$ ko-lokalisiert (Apparao *et al.* 2001) und könnte eine Rolle bei der Signaltransduktion vom Embryo auf das Endometrium und umgekehrt spielen.

Osteopontin ist ein säurehaltiges Mitglied der kleinen integrin-bindenden Ligand N-gekoppelten Glykoprotein (SIBLING) Proteinfamilie. Die Familie beinhaltet das Knochen-Sialoprotein, Dentin-Matrix-Protein I, Dentin-Sialophosphoprotein und extrazellulären Matrix Phosphoglykoprotein, die alle ein Produkt von fünf Genen sind, die entlang des menschlichen Chromosoms 4 dicht zusammengedrängt liegen (Fisher *et al.* 1987). Ursprünglich isoliert aus dem Knochen (Franzen and Heinegard 1985), wurde OPN auf den epithelialen Zellen, im Sekret aus dem gastrointestinalen Trakt, Nieren, Schilddrüse, Brustdrüse, Uterus (Johnson *et al.* 1999b), Endometrium, Plazenta und Hoden gefunden (Brown *et al.* 1992, Johnson *et al.* 1999a, Luedtke *et al.* 2002). OPN wird auch in den Leukozyten, glatten Muskelzellen, und hoch invasiven metastasierten Tumorzellen exprimiert (Ashkar *et al.* 2000, Malyankar *et al.* 2000). Zahlreiche Funktionen, unter anderem

Stimulation der Zell-Zell Adhäsion, Zellteilung, Invasion und Metastasierung; Erhöhung der Zell-EZM Kommunikation im normalen und im Tumorgewebe; Beförderung der Migration von Immunzellen, Osteozyten, Tumorzellen (Johnson *et al.* 2003); Verminderung des Absterbens der Zellen durch die Reduktion des reaktiven Sauerstoffs und Nitritoxids in dem geschädigten Gewebe, werden dem OPN zugeschrieben (Jacobs *et al.* 1994). Das Zytokin nimmt Teil in der Modulierung des Immunsystems indem er für die zellvermittelte Immunität und für die zytokinvermittelten TH1-Antwort, über Rekrutierung und Stimulation der Migration der Makrophagen zum Ort der Infektion und Entzündung, zuständig ist (Uede *et al.* 1997, Denhardt *et al.* 2001) und die Immunglobulin-Produktion von B-Zellen stimuliert. Osteopontin wird von den aktivierten Makrophagen und den T1-Lymphozyten sekretiert. Außerdem gestaltet OPN den Kalziumspiegel in den Zellen um; bestimmt die Knochenmineralisation und befördert die Ablagerung des Kalziums in den Knochen (Butler 1989, Weber *et al.* 1996). Die OPN-Gen-Transkription wird durch IL-1 α und IL-1 β , TGF β -1, FGF, TNF α , IFN γ , Östrogen, Progesteron (Omigbodun *et al.* 1997), Glukokortikoide (Singh *et al.* 1995) und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 stimuliert (Safran *et al.* 1998).

In verschiedenen Studien wird OPN als ein wichtiges multifunktionelles Glykoprotein definiert, mit einer besonderen Rolle in fundamentalen Prozessen, wie Neovaskularisation und Geweberemodellierung, die auch für die Implantation und Morphogenese der Plazenta essentiell sind (Denhardt and Guo 1993, Sodek *et al.* 2000). Dem Molekül wird eine fördernde Rolle bei der Anhaftung des Embryos an die apikale Oberfläche der endometrialen Zellen zugeschrieben (Lessey *et al.* 1992). Beim Menschen wurde die endometriale Expression von Osteopontin zum ersten Mal in den glandulären Zellen des Endometriums beschrieben (Nomura *et al.* 1988, Young *et al.* 1990, Brown *et al.* 1992). Das Maximum an OPN-Konzentration wurde beim Menschen in der mittleren und späten sekretorischen Phase in den endometrialen Drüsen, besonders in den dezidualen Zellen, als auch in den Immunzellen und im uterinen Sekret im Uteruslumen beobachtet. Seine Expression in den ESZ wird durch langfristige Stimulation mit 17 β -Östradiol und Progesteron *in vitro* stimuliert. Das Expressionsmuster korreliert mit der endometrialen epithelialen Expression einer seiner Rezeptoren, Integrin $\alpha_v\beta_3$, was seine Beteiligung in den frühen Stadien der Implantation annehmen lässt (Apparao *et al.* 2001, Lessey *et al.* 1992, von Wolff *et al.* 2001, von Wolff *et al.* 2004). Die Beobachtung der Verschiebung des OPN-Expressionsmusters von den endometrialen epithelialen Zellen in das stromale Kompartiment lässt über seine Rolle in den späten Stadien der Implantation, bzw. der Invasion des Trophoblasten nachdenken (von Wolff *et al.* 2004). Außer dem primären Rezeptor $\alpha_v\beta_3$, gibt es noch andere Rezeptoren für das OPN, wie CD44 (Weber *et al.* 1996, Denhardt *et al.* 2001) und CEACAM1. Das Adhäsionsmolekül CEACAM1 kolokalisiert mit OPN an der trophoblastären Invasionsfläche (Briese *et al.* 2005b, Briese *et al.* 2005a). Ein starkes Expressionsmuster von OPN wurde in der normalen Plazenta im EVT und vZTB beobachtet, wohingegen der ST nur schwach

positiv für OPN zu sein scheint (Briese *et al.* 2005b). Klinische Untersuchungen demonstrierten ein gestörtes OPN-Expressionsmuster in den Trophoblastzellen der Plazenta aus Schwangerschaften mit aufgetretenen Präeklampsie, Präeklampsie und fetaler Wachstumsretardierung (Gabinskaya *et al.* 1998). Briese *et al.* fanden eine vermehrte Expression von OPN in hydatiformen Blasenmolen (Briese *et al.* 2005b).

1.8 Zelllinien: AC-1M88, St-T1b, T-HESC

1.8.1 AC-1M88

Als Modell für den invasiven extravillösen Trophoblasten wurde die Zelllinie AC-1M88 verwendet. Dies ist eine humane, adhärent wachsende Zelllinie, die ein Hybridom darstellt, das durch die Fusion von HGPRT-negativen Mutanten, bei denen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) ausgeschaltet ist von JEG-3 Chorionkarzinomzellen mit primären extravillösen Trophoblastzellen aus dem Chorion laeve entstanden ist (Funayama *et al.* 1997, Gaus *et al.* 1997). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von H.G. Frank und P. Kaufmann (Universitätsklinik Aachen) zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu normalen Trophoblastzellen weist die verwendete Zelllinie die Eigenschaft des permanenten Wachstums auf. Das ist von großer Bedeutung, da die nativen Trophoblastzellen eine „begrenzte“ Lebenszeit haben und *in vitro* nicht proliferieren (Helige *et al.* 2008). Diese Hybrid Zelllinie besitzt viele Charakteristiken des normalen extravillösen Trophoblasten, wie die Cytokeratin-7-Expression (Helige *et al.* 2008), eine ausgeprägte Expression des Chemokin-Rezeptors und eine Migration als Antwort auf rekombinante humane Chemokine, z.B. CXCL3 und CCL14 (Hannan *et al.* 2006). Die AC-1M88 Linie ist invasiv *in vitro* und exprimiert CEACAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*), eine Charakteristik des invasiven EVT an der fetal-maternalen Grenzfläche (Bamberger *et al.* 2000b, Briese *et al.* 2005a). AC-1M88 Zellen produzieren ein dem Trophoblasten entsprechendes Repertoire an Proteasen, wie MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, MMP14 und deren Inhibitoren (TIMP1, TIMP2, TIMP3) und Adhäsionsmolekülen. Die AC-1M88 Linie ist HLA-G positiv (Blaschitz *et al.* 2000, Bamberger *et al.* 2006, Hannan *et al.* 2006, Hannan and Salamonsen 2008, Tapia *et al.* 2008, Hannan *et al.* 2010). Von unserer Arbeitsgruppe wurde bestätigt, dass die AC-1M88 Linie für Cytokeratin-7 positiv und für Fibroblastenmarker wie Vimentin und CD90 negativ ist (Samalecos *et al.* 2009).

Somit weist die AC-1M88 Trophoblast-Chorionkarzinom-Hybridzelllinie dem primären extravillösen Trophoblasten sehr ähnliche Eigenschaften auf. Ein großer Unterschied zum normalen invasiven EVT besteht jedoch in der fortwährenden Koexistenz von Proliferation und Invasion in der AC-1M88 Zelllinie. In dieser Hinsicht zeigt die AC-1M88 Linie ein ähnliches Verhalten wie Chorionkarzinomzellen. Im Gegensatz dazu besteht bei EVT *in vivo*

eine Trennung zwischen Proliferation und Invasion. Der interstitielle EVT entwickelt seine invasiven Eigenschaften *in vivo* nach dem Einstellen der Proliferation (Helige *et al.* 2008).

1.8.2 St-T1b

Als ein Modell der endometrialen Stromazellen wurde unter anderem die St-T1b Zelllinie verwendet. Die St-T1b sind mittels Telomerase immortalisierte humane endometriale Stromazellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gordon Peters, Cancer Research UK London Research Institute, und Jan J. Brosens, Hammersmith Hospital, London, UK). Die St-T1b Zelllinie wie auch primären ESZ, ist für die fibroblastären Marker Vimentin und CD90 positiv und Cytokeratin-7 (Marker für epitheliale Zellen) negativ. St-T1b können zur Dezidualisierung induziert werden, wobei der Phänotyp nicht von demjenigen dezidualisierter primärer ESZ unterscheidbar ist. Genau wie primäre ESZ exprimieren St-T1b die Dezidualisierungsmarker *PRL* (*Prolactin*), *IGFBP-1* (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1*) und *FOXO-1* (*Forkhead box protein O1*). Die Dezidualisierung wird effizient durch 8-Br-cAMP induziert und durch MPA gesteigert. Eine schwache Antwort wird aber auf natürliches Progesteron beobachtet. Die St-T1b sind sehr stabil in der Zellkultur und lassen sich 150 mal passagieren (Samalecos *et al.* 2009).

1.8.3 T-HESC

Die T-HESC Zelllinie ist ebenfalls durch Telomerase-Immortalisierung primärer humaner ESZ entstanden (Krikun *et al.* 2004). Genau wie primäre ESZ, lassen sich T-HESC der Dezidualisierung unterziehen und exprimieren Marker der Dezidualisierung: *PRL*, *IGFBP-1*, *FN* (Fibronektin), *TF* (Tissue Factor), *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) nach der Behandlung mit MPA+E₂ (Krikun *et al.* 2004). Obwohl T-HESC karyotypisch, morphologisch und phänotypisch mit primären ESZ vergleichbar sind, zeigten sie jedoch ebenso wie St-T1b Zelllinie eine mangelnde Ansprechbarkeit auf natürliches P₄ (unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe), während sie sehr gut auf MPA reagieren.

Abgesehen von dieser Einschränkung stellen beide Zelllinien ein gutes Modell für primäre ESZ dar.

1.9 Klinische Perspektive

Die Etablierung der regelrechten fetal-maternalen Interaktionen während der Entwicklung der Plazenta ist kritisch für die erfolgreiche Schwangerschaft (Caniggia *et al.* 1997). So werden Schwangerschaftserkrankungen, wie rezidivierende Abortneigung, fetale Wachstumsretardierung, frühzeitige Plazentalösung und Präeklampsie durch die uteroplazentare Dysfunktion verursacht. Uteroplazentare Insuffizienz entsteht unter anderem infolge einer geminderten Dezidualisierung, anomaler Immunreaktionen zwischen Uterus-Plazenta-Fetus, Vaskulopathie der Spiralarterien (Brosens *et al.* 2002), zu oberflächlicher Invasion des Trophoblasten (Zhou *et al.* 1993). Remodellierungsprozesse, die im Uterus vor der Schwangerschaft statt finden, sind für die regelrechte Invasion des Trophoblasten von besonderer Bedeutung. Die oben beschriebenen Schwangerschaftserkrankungen sowie Infertilität, Frühgeburt, Erhöhung der Häufigkeit der Sectio Cesarea und perinatalen Morbidität werden in Zusammenhang mit der verminderten Remodelierung des uterinen Gewebes vor dem Eintreten der Schwangerschaft gebracht (Brosens *et al.* 1972, Zhou *et al.* 1993, Gellersen *et al.* 2007b, Carrington *et al.* 2005, Toth *et al.* 2010). Es wurde vorgeschlagen, die zyklische endometriale Dezidualisierung und menstruelle Blutung als physiologische Vorbereitung des Uterusgewebes auf die dramatischen vaskulären Veränderungen, reaktive Hypoxie und Hyperinflammation, die bei der tiefen hämochorialen Plazentation entstehen, anzusehen (Brosens *et al.* 2009). Dezidualisiertes Endometrium spielt eine Schlüsselrolle in der Implantation und der Schwangerschaft, indem es die Invasion des Trophoblasten kontrolliert und für die adäquate Hämostase sorgt (Lockwood *et al.* 1999, Lockwood *et al.* 2001). Es ist bekannt, dass die Formierung einer normalen Plazenta eine extensive, aber auch streng kontrollierte Invasion des Trophoblasten in die Dezidua erfordert (van den Brule *et al.* 2005). Die Balance zwischen den proinvasiven und die Invasion selbstlimitierenden Eigenschaften der Trophoblastzellen könnte kritisch für die Koordination der Formierung der funktionsfähigen Plazenta sein (Zhou *et al.* 2003). Erkenntnisse über die Faktoren, die diese Prozesse regulieren, sind von einer hohen Wichtigkeit in dem Verständnis sowohl physiologischer (embryonale Implantation), als auch pathologischer (maligner Tumor) Invasion.

Die Verwendung der *in vitro* Modelle zur Untersuchung der menschlichen Implantation erweitern die Möglichkeiten der Forschung auf diesem Gebiet.

Zusammenfassend würde man sagen, dass Trophoblast-Invasions-Modelle die Entwicklung von neuen Medikamenten, die zu einer erfolgreichen Implantation einen Beitrag leisten könnten, befördern und ermöglichen, die Toxizität neuer Substanzen zu überprüfen. Kultursysteme erlauben eine Identifizierung von neuen diagnostischen Merkmalen der fehlerhaften Implantation. Die physiologischen Prozesse der Entstehung der

Schwangerschaft können weiterhin beobachtet und untersucht werden. Neue Schlüsselmoleküle, die am Prozess der Invasion des Trophoblasten und normalen Plazentation beteiligt sind können festgestellt werden.

Wenn man aber den oben beschriebenen Systemen Grenzen setzen würde, ist es offensichtlich, dass Zellkulturmodelle, nur robusteste Hilfsmittel in der Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen der Implantation darstellen. Andererseits repräsentieren diese Modelle eine ethisch vertretbare Annäherung an die physiologischen Prozesse der menschlichen Implantation.

1.10 Ziel der Arbeit

Zur Nachahmung der Trophoblastinvasion *in vitro* ist in unserer Arbeitsgruppe ein Ko-Kultur Modell von Trophoblastzellen mit ESZ entwickelt worden. Dabei werden Sphäroide aus einer Trophoblastzelllinie auf einen Rasen aus primären ESZ (endometrialen Stromazellen) aufgesetzt und ko-kultiviert. In einem so genannten Sphäroid-Expansionsassay wird die Ausbreitung der Sphäroide auf den primären ESZ unter Einfluss von Faktoren beobachtet. Dabei hatte sich ein stimulierender Effekt von HB-EGF und IL-1 β alleine oder in Kombination mit LIF auf die Expansion der Sphäroide gezeigt. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Dezidualisierung der ESZ die Ausbreitung der Sphäroide beförderte (Gonzalez *et al.* 2011).

In dieser Arbeit sollten diese Untersuchungen vertieft werden, wobei statt primärer ESZ immortalisierte ESZ Linien zum Einsatz kommen sollten.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Welchen Einfluss hat die Dezidualisierung der ESZ Linien auf die Sphäroid-Expansion?
- Wie verhalten sich die Trophoblastzellen auf nicht vor- und vordezidualisierten ESZ Linien unter Zugabe von HB-EGF, IL-1 β , LIF, OPN, E₂ und P₄?
- Welche Rolle spielen Apoptose und Proliferation in der Ko-Kultur?

Wir erhofften uns anhand des Ko-Kultur-Modells, die vorher beobachteten Ergebnisse an primären ESZ auf den ESZ Linien reproduzieren zu können und einen Aufschluss zu erhalten, ob die ESZ Linien für Experimente zur Untersuchung der Invasion des Trophoblasten geeignet sind.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel von den Firmen NUNC, Greiner, Falcon BD und Sarstedt bezogen, sowie sterile Lösungen und Medien verwendet. Alle Zelllinien wurden im Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

2.1.1.1 AC-1M88

Die AC-1M88 Linie wurde im SKUT-Medium (siehe Abschnitt 2.3.1) kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die Zellen wurden alle 5-7 Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

2.1.1.2 St-T1b

Die St-T1b Linie wurde im Kulturmedium für endometriale Stromazellen (ESZ-Medium, siehe Abschnitt 2.3.1) erhalten. Die Zellen wachsen adhärent. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 subkultiviert (Samalecos *et al.* 2009).

2.1.1.3 T-HESC

Die T-HESC Linie wurde in ESZ-Medium (siehe Abschnitt 2.3.1) kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4 subkultiviert.

2.1.2 Stimulation der Zelllinien

Die St-T1b oder die T-HESC Linie wurden vor dem Sphäroid-Expansionsassay vorbehandelt (prädezidualisiert), sobald die Zellen konfluent waren. Die Prädezidualisierung erfolgte mit 0,5 mM 8-Br-cAMP in steroidfreiem Minimalmedium 1 (MM1, siehe Abschnitt 2.3.1) über 5 Tage. Für die Stimulation der Ko-Kultur wurden verschiedene Substanzen, die im MM1 zu einer gewünschten Konzentration verdünnt wurden, verwendet.

Im Folgenden werden die Substanzen unter Angabe der Endkonzentration aufgelistet:

| | Endkonzentration |
|------------------------------------------|------------------|
| 8-Br-cAMP (BioLog) | 0,5 mM |
| Medroxyprogesteronazetat (MPA) (Sigma) | 10^{-6} M |
| 17- β -Estradiol (E_2) (Sigma) | 10^{-9} M |
| Progesteron (P_4) (Sigma) | 10^{-6} M |
| HB-EGF (Sigma) | 20 ng/ml |
| IL-1 β (Miltenyi Biotec) | 10 ng/ml |
| LIF (Sigma) | 10 ng/ml |
| Osteopontin (OPN) (Sigma) | 5 μ g/ml |

Abweichungen von diesen Endkonzentrationen werden in den Kapiteln gesondert vermerkt.

2.1.3 Trophoblast-Sphäroid-Expansionsassay

2.1.3.1 Vorbereitung der ESZ Linien

St-T1b oder T-HESC wurden für den Sphäroid-Expansionsassay in zwei T180-Flaschen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend entweder vorbehandelt (prädezipualisiert) oder unbehandelt weiter erhalten. Die Vorbehandlung erfolgte mit 0,5 mM 8-Br-cAMP in MM1 über 5 Tage. Das Medium wurde nach 2 Tagen gewechselt.

Am Tag 5 wurden die Zellen trypsiniert. Das alte Medium aus der T180-Flasche wurde abpipettiert und ein Waschschrift mit 15 ml PBS erfolgte darauf. Der Boden wurde mit 4 ml Trypsin/EDTA benetzt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde eine Inaktivierung des Enzyms mit 12 ml MM1 oder ESZ-Medium erreicht. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten bei 195 x g durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Objektträger-Kammer ermittelt.

Die unbehandelten St-T1b oder T-HESC Stromazelllinien wurden in einer Zelldichte von $4,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer in 500 μ l MM1 in den 8-Kammer-Objektträger (NUNC oder Falcon BD) überführt. Die vorbehandelten ESZ wurden in einer Zelldichte von 8×10^4 Zellen

pro Kammer in 500µl MM1 in den 8-Kammer-Objektträger (NUNC oder Falcon BD) ausgesät.

Es wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension keine Zellkonglomerate enthält, da ein gleichmäßiger Zellrasen für die weitere Durchführung des Experimentes Voraussetzung war.

Die Stromazelllinien wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.1.3.2 Sphäroidbildung

Die AC-1M88 Trophoblastzellen wurden in SKUT-Medium bis zu einer konfluenten Zelldichte kultiviert. Am Tag der Stromazellen-Plattierung in die 8-Kammer-Objektträger wurden die AC-1M88 Zellen ebenfalls für den Sphäroid-Expansionsassay vorbereitet. Das alte Medium wurde abpipettiert. Darauf erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Der AC-1M88-Zellrasen wurde vom Boden der T75-Kulturflasche durch Benetzung mit 2 ml Trypsin/EDTA und einer Inkubationszeit über 5 Minuten bei 37°C abgelöst. Dann wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 8 ml FCS-haltigem Kulturmedium neutralisiert. Während der anschließenden Zentrifugation bei 195 x g wurden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer ermittelt. Die Zellen wurden in SKUT-Medium in Gegenwart von 0,25% Methylcellulose suspendiert und in einem Volumen von 100 µl in einer Zelldichte von 3000 Zellen pro Vertiefung in nicht adhärenente 96-Kammer-Rundboden-Kulturplatte ausgesät. Die Kulturplatte wurde bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden in den Inkubator gestellt. Unter diesen Bedingungen formieren sich alle suspendierten Zellen in einer Vertiefung zu einem einzelnen Sphäroid. Die Methode wurde in Anlehnung an Korff et al. (Korff *et al.* 2004) verwendet.

2.1.3.3 Ko-Kultur

24 Stunden nach der Plattierung der Stromazelllinien (St-T1b oder T-HESC) in die 8-Kammer-Objektträger und Sphäroidformierung aus den AC-1M88 wurden die Zellen unter dem Mikroskop angeschaut. Die Stromazellen wurden auf einen gleichmäßigen Zellrasen geprüft. Sämtliche Sphäroide wurden durchgemustert und nur ebenmäßig runde Varianten ausgewählt. Die stimulierenden Substanzen wurden mit MM1 in die jeweilige Endkonzentration verdünnt und auf St-T1b bzw. T-HESC Zellrasen pipettiert (500 µl pro Kammer). Für jede Behandlung gab es 3-4 Replikate.

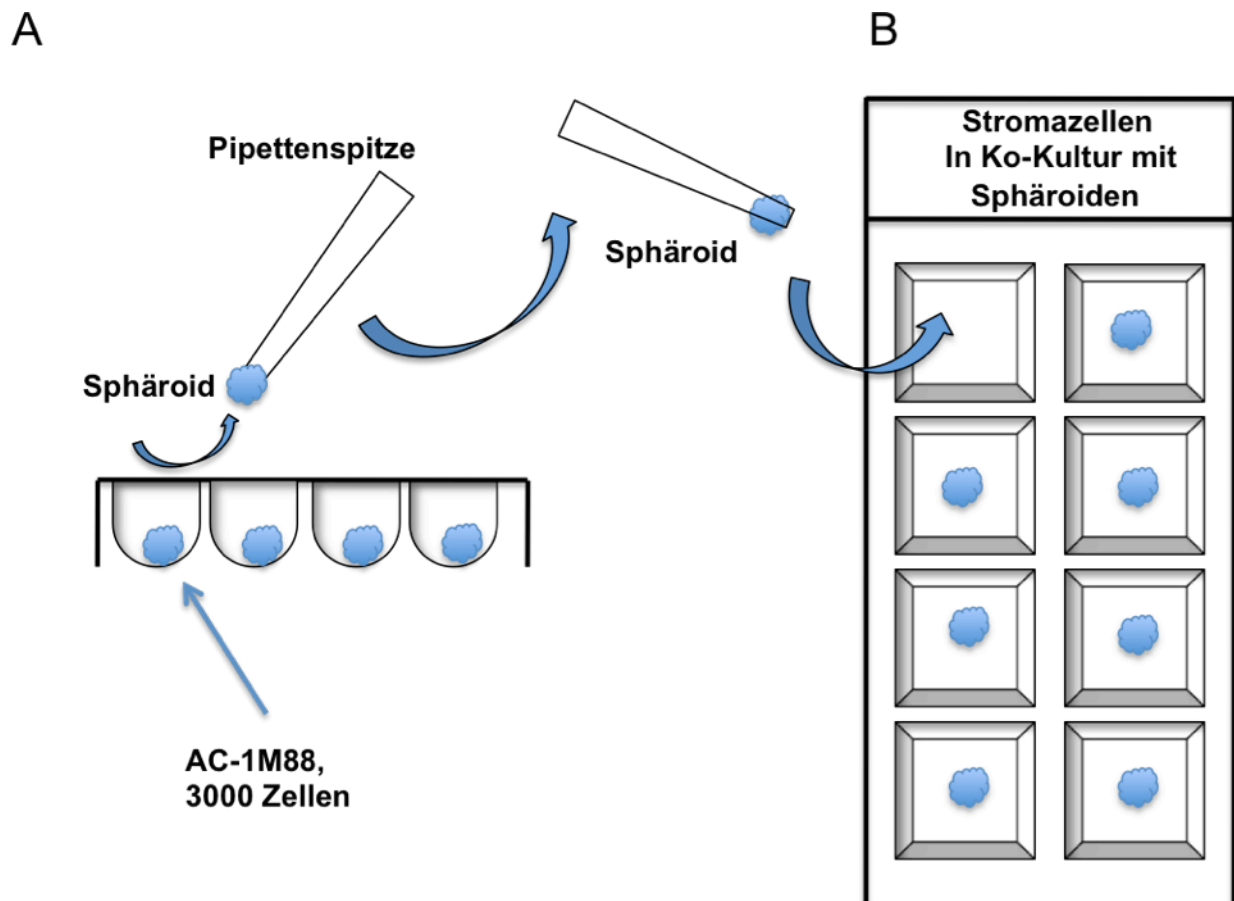


Abb. 2.1: Sphäroid-Expansionsassay. (A) 96-Kammer-Rundbodenplatte für die Sphäroid-Bildung. Das Sphäroid wird über 24 Stunden aus 3000 AC-1M88 Zellen gebildet. (B) 8-Kammer-Objektträger mit Ko-Kultur aus ESZ ($4,5 \times 10^4$ nicht vor- bzw. 8×10^4 vordezidualisierte ESZ) und Sphäroiden (AC-1M88). Die Sphäroide werden mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf einen konfluenten Rasen aus Stromazellen überführt.

Nach dem Mediumwechsel wurden einzelne Sphäroide mit einer abgeschnittenen sterilen 200 μ l Pipettenspitze aus der 96-Kammer-Rundboden-Kulturplatte in etwa 25 μ l Volumen ausgenommen und auf den Stromazellrasen in die 8-Kammer-Objektträger vorsichtig überführt. Es wurde besonders darauf geachtet, dass das Sphäroid zentriert auf den Zellrasen plattiert wird, da bedingt durch das Wachstum bei Randlage die Beurteilung und Auswertung der Ko-Kultur erschwert oder unmöglich werden kann (Abbildung 2.1).

Nach dem Aufplattieren der Sphäroide auf den Stromazellrasen wurde die Ko-Kultur in den Kammern sofort mit einem 4x und 10x Objektiv unter dem Mikroskop photographiert (Phasenkontrast). Dieser Tag des Experimentes wird als Tag 0 bezeichnet. Die weitere Inkubation erfolgte über 2, 3 oder 4 Tage mit anschließender Fixierung und immunzytochemischer Färbung der Zellen.

2.1.4 Fixierung der Zellen

Das Zellkulturmodell wurde am Tag 2, 3 oder 4 fixiert. Das Medium aus den 8-Kammer-Objektträgern wurde abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS pro Kammer kurz gewaschen. Die Objektträger wurden mit 300 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) über 10 Minuten fixiert. Darauf erfolgten 3 Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 Minuten.

2.1.5 Immunzytochemie

Um die Trophoblastzell- (AC-1M88) und Stromazelllinien (St-T1b oder T-HESC) bei der Anfärbung unterscheiden zu können wurden Antikörper gegen zellspezifische Antigene verwendet. Da Trophoblastzellen zu den epithelialen Zellen gehören, bei denen die Cytokeratine die grundlegendsten Marker der Epitheldifferenzierung darstellen, wurde Cytokeratin-7 (CK-7) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers detektiert. Stromazellen sind dagegen mesenchymalen Ursprungs und weisen als Marker das Vimentin (Intermediärfilament-Protein, Teil des Zellgerüsts) auf. Das Protein wurde mit monoklonalem Anti-Vimentin Antikörper detektiert.

Die Darstellung der Antikörper durch duale Immunzytochemie erfolgte mit dem *Vectastain Universal Elite ABC KIT* unter Verwendung der Substrate *DAB* und *VectorSG*. Nach der Fixierung der Zellen wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase mit 0,75% H₂O₂ in Methanol in einem 250 µl Volumen pro Kammer blockiert. Um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, erfolgte eine jeweils 15-minütige Avidin- und Biotin-Blockade mit anschließender Inkubation über 20 Minuten mit normalem Pferdeserum (NHS) (250 µl pro Kammer; in Verdünnung NHS 1:100 in PBS). Das überschüssige Serum wurde entfernt. Zur Verdünnung der Antikörper wurde 1% NHS in PBS verwendet. Die Objektträger wurden mit CK7-Antikörper, 150 µl pro Kammer, über 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit dem universellen sekundären biotinylierten Antikörper über 30 Minuten bei RT inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von *Avidin/Biotin Peroxidase Complex* für 45 Minuten. Als Substrat fungierte *VectorSG*, welches eine blaugraue Färbung produziert, die das Sphäroid sichtbar macht. Die Objektträger wurden mit H₂O 5 Minuten gewaschen mit anschließender Peroxydaseblockade der ersten Färbung. Darauf folgte das oben genannte Prozedere für die Detektion des Vimentins und Färbung der Stromazelllinien. Als Substrat für die Lokalisation des Vimentins wurde 3,3'-Diaminobenzidin Tetrachydrochlorid (DAB) verwendet. DAB produziert eine braun-rote Färbung. Nach dem Färben wurden die Objektträger getrocknet und mit *Faramount Mounting Medium* (Dako) eingedeckt. Die Präparate wurden mikroskopiert und Photographien mit dem x2, x4 und x10 Objektiv angefertigt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

| Antikörper | Hersteller | Klon | Artikelnummer | Spezies | Verdünnung |
|---------------------------------|------------|----------------|---------------|-----------|------------|
| Vimentin (monoklonal) | Dako | V9 | M0725 | Maus | 1:1000 |
| Cytokeratin 7 (monoklonal) | Dako | OV-TL 12/30 | M7018 | Maus | 1:200 |
| Ki67 (polyklonal) | NeoMarkers | | RB-1510-P0 | Kaninchen | 1:100 |
| Cleaved PARP (polyklonal) | Abcam | | 4842 | Kaninchen | 1:200 |

Zur Detektion der apoptotischen Zellen wurde der *cleaved* PARP-Antikörper in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Die Ko-Kultur wurde am Tag 3 mit 4% PFA über 10 Minuten fixiert und anschließend mit 0,2% Triton (10 Minuten Inkubationszeit) permeabilisiert.

Für die Bestimmung der Proliferation in der Ko-Kultur wurde der Ki67-Antikörper in Verdünnung 1:100 verwendet. Die Ko-Kultur wurde am Tag 3 mit 4% PFA und Methanol über 10 Minuten fixiert und permeabilisiert.

2.2 Statistische Auswertung

Anhand der Photographien erfolgte eine Ausmessung der Sphäroidfläche jeder einzelnen Kultur am Tag 0 und an den Tagen 2, 3 oder 4. Jede Sphäroid-Kontur wurde im *ImageJ*-Programm mit dem „Freihand-Kursor“ nachgezeichnet und die Sphäroidfläche automatisch berechnet.

Die ausgemessene Fläche des angefärbten Sphäroids am Tag der Fixierung der Ko-Kultur wurde in Relation zur ausgemessenen Fläche des Sphäroids am Tag 0 gesetzt. Da die Ko-Kultur am Tag 0 mit dem 10x Objektiv und am Tag 2, 3, 4 mit dem 2x Objektiv photographiert wurde, musste der ausgemessene Wert der Sphäroidfläche vom Tag 0 auf den Wert am Tag der Fixierung angepasst werden. Die Umrechnung des 10x Objektivs auf das 2x Objektiv benötigt einen Faktor 25 ($10/2=5$, daraus folgt 5^2 für die Fläche).

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das *GraphpadPrism* und *Microsoft Excel* Programm zugezogen. Die Sphäroidflächenzunahme wurde berechnet.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | J | K | L | M | N | O | P | Q | | | | | |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|---|-------------------------------------------------|---|---|---|----|---|---|-----------------|--|--|--|--|--|
| 1 | Sphäroid-Expansionsassay, 03.09.09 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Sphäroide (AC-1M88, P ₂₃₋₁₆) auf T-HESC (P ₂₃₋₁₆) in Glas-Kammer (Falcon BD). Flächenmessung mit ImageJ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | JN 03.09.09. Immunzytochemie Tag 3. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | Nicht vordezidualisierte T-HESC. Tag 0, x10 Objektiv. | | | | | | | | Vordezidualisierte T-HESC. Tag 0, x10 Objektiv. | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | Without Factor | | | | | | Mit | | | | | | SD | | | | | | | | |
| 13 | Sphäroid 1 | 249679 | 253441,25 | 9426,52 | 244043 | 251105,75 | 7933,11 | | | | | | | | | Without Factors | | | | | |
| 14 | Sphäroid 2 | 266734 | | | 244944 | | | | | | | | | | | Mit | | | | | |
| 15 | Sphäroid 3 | 252569 | | | 260317 | | | | | | | | | | | SD | | | | | |
| 16 | Sphäroid 4 | 244783 | | | 255119 | | | | | | | | | | | HB-EGF | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | Nicht vordezidualisierte T-HESC. Tag 0, mit Umrechnungsfaktor 25. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | Without Factor | | | | | | Mit | | | | | | SD | | | | | | | | |
| 20 | Sphäroid 1 | 9987,16 | 10137,65 | 377,06 | 9761,72 | 10044,23 | 317,32 | | | | | | | | | Without Factors | | | | | |
| 21 | Sphäroid 2 | 10669,36 | | | 9797,76 | | | | | | | | | | | Mit | | | | | |
| 22 | Sphäroid 3 | 10102,76 | | | 10412,68 | | | | | | | | | | | SD | | | | | |
| 23 | Sphäroid 4 | 9791,32 | | | 10204,76 | | | | | | | | | | | HB-EGF | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 31 | Nicht vordezidualisierte T-HESC. Tag 3, 2x Objektiv. | | | | | | | | Vordezidualisierte T-HESC. Tag 3, 2x Objektiv. | | | | | | | | | | | | |
| 32 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 33 | Without Factor | | | | | | Mit | | | | | | SD | | | | | | | | |
| 34 | Sphäroid 1 | 392777 | 422022 | 35331,03 | 518856 | 506503 | 10941,46 | | | | | | | | | Without Factors | | | | | |
| 35 | Sphäroid 2 | 464903 | | | 508147 | | | | | | | | | | | Mit | | | | | |
| 36 | Sphäroid 3 | 438053 | | | 508703 | | | | | | | | | | | SD | | | | | |
| 37 | Sphäroid 4 | 392755 | | | 492305 | | | | | | | | | | | HB-EGF | | | | | |
| 38 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 39 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 41 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 42 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 43 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 44 | Nicht vordezidualisierte T-HESC. Flächenzunahme über 3 Tage | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | Without Factor | | | | | | Mit | | | | | | SD | | | | | | | | |
| 46 | Sphäroid 1 | 39,34822 | 41,58 | 2,16 | 53,15211 | 50,48 | 2,32 | | | | | | | | | Without Factors | | | | | |
| 47 | Sphäroid 2 | 43,51742 | | | 51,65946 | | | | | | | | | | | Mit | | | | | |
| 48 | Sphäroid 3 | 43,35974 | | | 48,85419 | | | | | | | | | | | SD | | | | | |
| 49 | Sphäroid 4 | 40,11257 | | | 48,24268 | | | | | | | | | | | HB-EGF | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 51 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 52 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Abb. 2.2: Sphäroid-Expansionsassay. Sphäroide auf nicht vordezidualisierten und vordezidualisierten T-HESC. Excel-Datei. Beispiel zur Berechnung der Sphäroidfläche.

Die am Tag 0 ausgemessene Sphäroidfläche wurde durch den berechneten Faktor (in unserem Fall - 25) dividiert. Der Expansionswert ergab sich durch die Division der am Tag 3 gemessenen Fläche mit der neu berechneten Fläche von Tag 0.

Zum Beispiel: die Sphäroidfläche am Tag 0 unter HB-EGF Einfluss beträgt 244043. Die Sphäroidfläche ist am Tag 3 auf 518856 expandiert. Nach dem Einbeziehen des Umrechnungsfaktors (25) ergibt sich: Fläche Tag 0 durch 25 ($244043/25 \approx 9761$). Die Flächenzunahme in 3 Tagen beträgt: Sphäroidfläche Tag 3 durch Sphäroidfläche Tag 0, 53 ($518856/9761 \approx 53$) (Abbildung 2.2).

Nach dem Erstellen einer Excel-Datei wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in eine *GraphpadPrism*-Datei eingetragen. Eine entsprechende Grafik wurde erstellt und mittels *One-Way-ANOVA* und post-hoc Test nach Signifikanz analysiert.

2.3 Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Medien

2.3.1 Medien für die Zelllinien

SKUT-Medium für AC-1M88

DMEM/HF12 ohne Phenolrot (Sigma)

10% FCS (PAA)

1% Penicillin (PAA) (Stammkonzentration: 10000 Units/ml)

1% Streptomycin (PAA) (Stammkonzentration: 10 mg/ml)

1% L-Glutamin (PAA) (Stammkonzentration: 200 mM)

Kulturmedium für Endometriale Stromazellen (ESZ-Medium)

DMEM/HF12 ohne Phenolrot (Sigma)

10% dialysiertes FCS (PAA)

1% Penicillin (PAA) (Stammkonzentration: 10000 Units/ml)

1% Streptomycin (PAA) (Stammkonzentration: 10 mg/ml)

1µg/ml Insulin (Sigma)

10⁻⁹ M 17β-Östradiol (Sigma)

Minimalmedium 1 (MM1) für Endometriale Stromazellen

DMEM/HF12 ohne Phenolrot (Sigma)

10% dialysiertes FCS (Fetal Calf Serum) (PAA)

1% L-Glutamin (PAA) (Stammkonzentration: 200 mM)

1% Penicillin (PAA) (Stammkonzentration: 10000 Units/ml)

1% Streptomycin (PAA) (Stammkonzentration: 10 mg/ml)

2.3.2 Pufferlösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAA)

2.3.3 Sonstige Chemikalien

- Trypsin/EDTA (PAA): gebrauchsfertig
Trypsin 0,5 mg/ml
EDTA 0,22 mg/ml

- Methylcellulose Stammlösung 2,8% (R&D Systems):

Pro Sphäroid: 8,9 µl 2,8% Methylcellulose auf 100 µl Zellsuspension in SKUT-Medium, (0,25% Methylcellulose Endkonzentration).

- Paraformaldehyd 4 % (PFA) (Fluka):

4 g PFA in 80 ml ddH₂O bei 60°C unter dem Abzug auf der Wärmeplatte lösen. Mit 1 N NaOH den pH-Wert auf 7,4 einstellen bis die Suspension klar wird. Aliquots bei -80°C lagern.

- Methanol (Merck)

- Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂) (Merck)

KIT für duale Immunzytochemie

- Vectastain Universal Elite ABC KIT (Linaris):

- Universeller sekundärer Biotinylierter Antikörper
- Vectastain Elite ABC Reagent A und Reagent B
- Blocking Normal Horse Serum (NHS)

- DAB Substrate KIT für Peroxidase (Linaris):

- Buffer Stock Solution
- DAB Stock Solution
- Hydrogen Peroxide

- VectorSG Substrate KIT für Peroxidase (Linaris):
 - Chromogen
 - Hydrogen Peroxide

- Avidin/Biotin Blocking KIT (Linaris)

Zellkulturgefäße:

- T25; T75; T180 – Kulturflaschen (NUNC)
- 8-Kammer-Permanox-Objektträger (NUNC)
- 8-Kammer-Glas-Objektträger (Falcon BD)

Zentrifuge:

Heraeus Biofuge Stratos 5282, Rotor 3047.

2.4 Abkürzungsverzeichnis

β -hCG – humanes Chorionisches Gonadotropin

8-Br-cAMP – 8-Bromoadenosin-3', 5' zyklisches Monophosphat

CEACAM1 – *Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1*

CD – *Cluster of Differentiation*

COX – Cyclooxygenase

dPRL – deziduales Prolaktin

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure

E₂ – 17 β -Östradiol

EEZ – Epitheliale Endometriale Zellen

EGF – *Epidermal Growth Factor*

ER – Östrogen-Rezeptor

ESZ – Endometriale Stromazellen

EVT – Extravillöser Trophoblast

EZM – extrazelluläre Matrix

FSH – Follikelstimulierendes Hormon

GnRH – Gonadotropin-freisetzendes Hormon

HB-EGF – *Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor*

HER – humaner EGF Rezeptor

HGPRT – Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

HLA – Humanes Leukozyten Antigen

IFN γ – Interferon γ

IGF – *Insulin-like Growth Factor*

IGFBP-1 – *IGF Binding Protein 1*

IL-1 β – Interleukin-1 β

IL-1R1 und IL-1R2 – IL-1 Rezeptor Typ 1 und Typ 2

IL1RAcP – IL-1 akzessorisches Rezeptor-Protein

IL-1Ra – Inhibitor IL-1 Rezeptor Antagonist

LBD – Ligand-Bindungs-Domäne

LIF – *Leukemia Inhibitory Factor*

LH – Luteinisierendes Hormon

MHC – Haupthistokompatibilitätskomplex

MMP – Matrix Metalloproteinasen

MPA – Medroxyprogesteronazetat

OPN – Osteopontin

Ø – keine Behandlung mit stimulierenden Substanzen

P₄ – Progesteron

PR – Progesteron-Rezeptor

PFA – Paraformaldehyd

PGF_{2 α} – Prostaglandin F_{2 α}

ST – Synzytiotrophoblast

TF – *Tissue Factor*

TGF β – *Transforming Growth Factor β*

TIMP – *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase*

TNF α – *Tumor Necrosis Factor α*

uNK – uterine Natürliche Killerzellen

vZTB – villöser Zytotrophoblast

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung der endometrialen Stroma- und Trophoblastzelllinien

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Vorganges der Implantation und als unabdingbarer Teil davon der Invasion des Trophoblasten. Hierfür wurde ein Ko-Kultur-Modell verwendet, das die Kontaktzone zwischen dem invasiven Trophoblasten und der Dezidua imitieren sollte. Anstatt primären Zellen wurden folgende Zelllinien verwendet: St-T1b oder T-HESC ESZ Linien, AC-1M88 Trophoblastzelllinie.

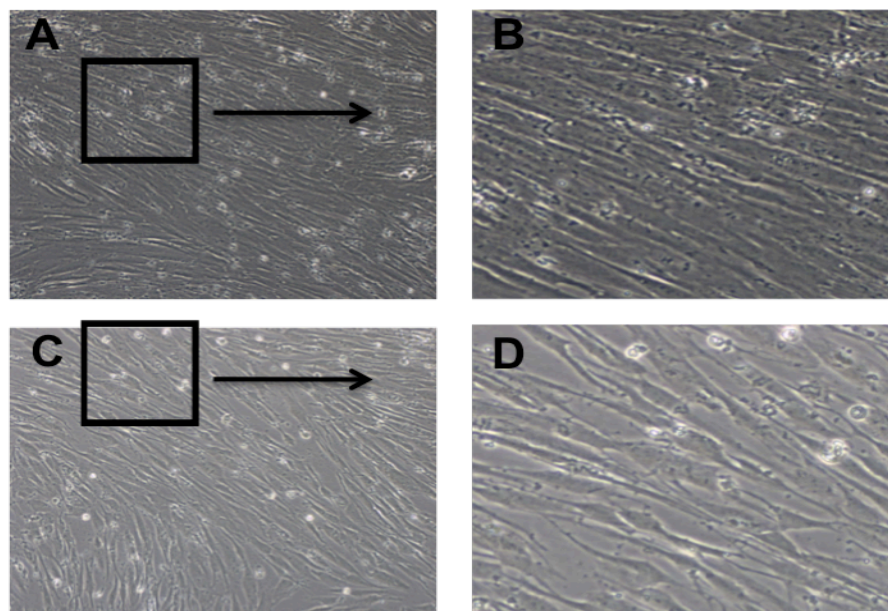


Abb. 3.1: Phasenkontrastaufnahmen von T-HESC. (A-B) nicht vordezidualisierte T-HESC. Die Abb. B zeigt einen Abschnitt aus dem Bereich A. (C-D) Mit 8-Br-cAMP (0,5 mM 8-Br-cAMP über 5 Tage mit Mediumwechsel am Tag 2) vordezidualisierte T-HESC. Die Abb. D zeigt einen Abschnitt aus dem Bereich C. Phasenkontrastmikroskopie, 4x Objektiv.

Die Stromazellen wurden mit 0,5 mM 8-Br-cAMP behandelt. Die Stimulationsdauer betrug für alle Versuche 5 Tage, mit Medium-Wechsel am Tag 2. Vordezidualisierte T-HESC wurden mit nicht vordezidualisierten T-HESC verglichen. Im Gegensatz zu den nicht vorbehandelten Zellen, erlangen die stimulierten einen dezidualisierten Phänotyp (Abbildung 3.1).

3.2 Sphäroid-Expansionsassay

3.2.1 Sphäroide auf nicht vordezidualisierten St-T1b ohne Zugabe von Faktoren

Die ersten Versuche wurden auf nicht vorbehandelten St-T1b Zellen ohne Zugabe von Faktoren durchgeführt (Abbildung. 3.2).

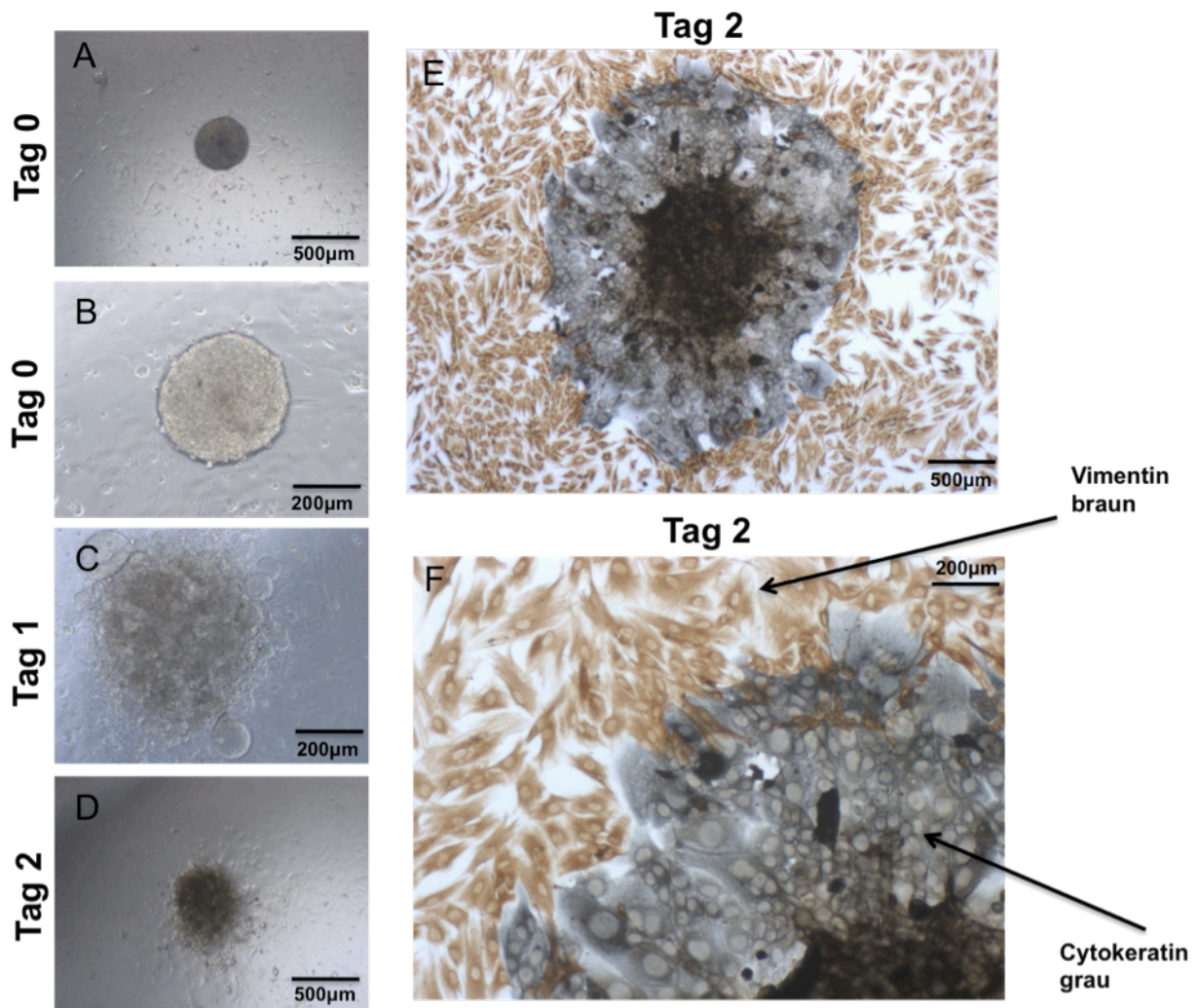


Abb. 3.2: Sphäroid-Expansionsassay. Sphäroide aus AC-1M88 Trophoblastzellen auf nicht differenzierten St-T1b Zellen. A-D: Die Ausbreitung des Sphäroids wird über 2 Tage verfolgt. Phasenkontrastaufnahmen mit 4x Objektiv (A, D) oder 10x Objektiv (B, C). E-F: Immunzytochemie, Tag 2. Anfärbung der St-T1b Zellen mit Vimentin-Antikörper – braun, der AC-1M88 Zellen mit Cytokeratin-Antikörper (CK7) – grau. 4x Objektiv (E), bzw. 10x Objektiv (F).

Das Verhalten der Sphäroide auf den St-T1b Zellen über 2 Tage wurde beobachtet. Die aufplattierten Sphäroide wurden am Tag 0, Tag 1, Tag 2 nativ und nach immunzytochemischer Färbung photographiert. Der Durchmesser des Sphäroids am Tag 0 beträgt etwa 500 µm. In dem Modell verweilt das aufplattierte Sphäroid die ersten Stunden lose auf der ESZ Oberfläche. Am Tag 1 beobachtet man das Auswandern der Trophoblastzellen aus dem kompakten Sphäroid und eine radiale Ausbreitung auf dem Stromazellrasen. Am Tag 2 werden die Umrise des Sphäroids nativ nicht mehr sichtbar. Man kann die Konturen des verbreiteten Trophoblasten nur erahnen (Abbildung 3.2), daher wird die duale Immunzytochemie, mit der sich die Zelltypen unterscheiden lassen, angewendet. Der Durchmesser des Sphäroids am Tag 2 beträgt etwa 2 mm, das entspricht einer Vergrößerung der Fläche um den Faktor 16. In dem ersten Versuch wurden die St-T1b

in einer Zelldichte von $4,0 \times 10^4$ pro Kammer in den 8-Kammer-Objektträger ausgesät, in Anlehnung an vorhergehende Versuche mit primären ESZ (Gonzalez *et al.* 2011). Allerdings ergab sich die Menge als nicht ausreichend zur Formierung eines gleichmäßigen Zellrasens, deshalb wurde die Dichte für weitere Experimente auf $4,5 \times 10^4$ erhöht.

3.2.2 Sphäroide auf St-T1b: Einfluss der Faktoren

In den folgenden Versuchen wurden die Zelllinien in der Ko-Kultur mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Dafür wurden HB-EGF, LIF, IL-1 β , OPN, E₂, P₄ alleine und in Kombination angewendet (Abbildung 3.3, 3.4 und 3.5). Die Inkubationszeit der Ko-Kultur betrug 2 Tage. In diesem Versuch haben die Kontrollen 23fach expandiert.

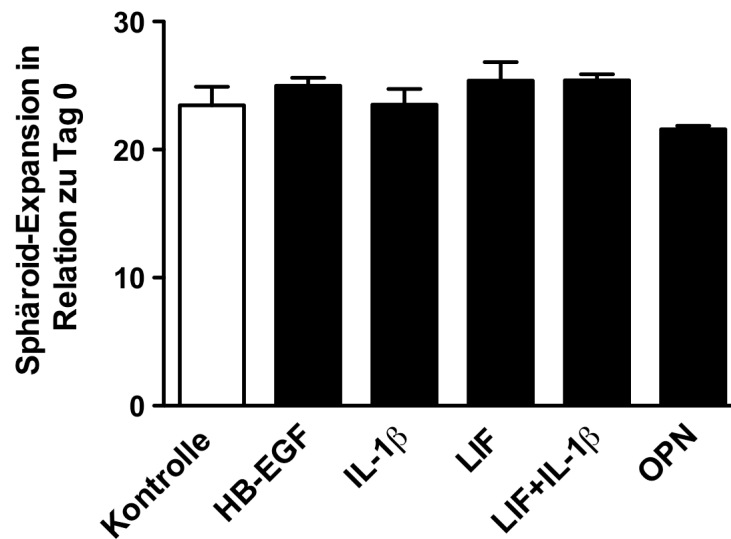


Abb. 3.3: Sphäroid-Expansionsassay. Einfluss von Faktoren auf Sphäroide auf nicht präzedualisierten St-T1b. Die Sphäroid-Fläche wurde am Tag 2 gemessen und in Relation zu Tag 0 gesetzt. Mittelwerte \pm SD von n=3 Sphäroiden.

Aus der Grafik (Abbildung 3.3) lässt sich herleiten, dass die Expansion der Sphäroide unter Einfluss von HB-EGF, IL-1 β , LIF, IL-1 β +LIF, OPN gegenüber Kontrolle und unter einander nicht verändert war.

Im nächsten Schritt wurden die Faktoren mit den Steroidhormonen E₂ und/oder P₄ kombiniert (Abbildung 3.4 und 3.5).

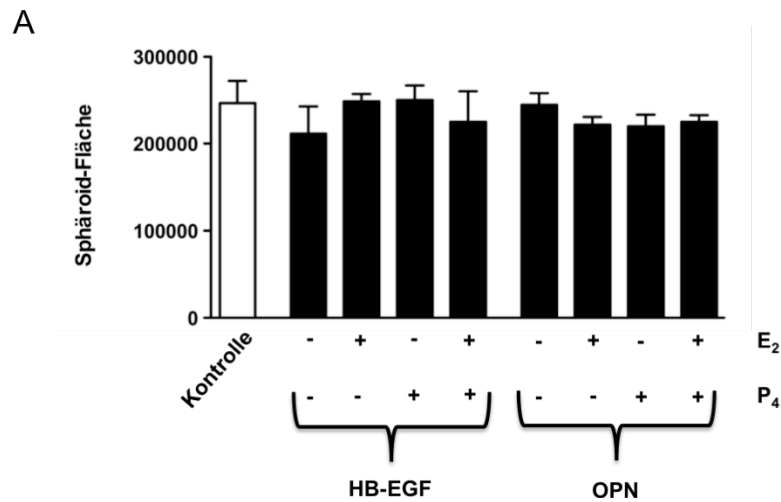


Abb. 3.4: Sphäroid-Expansionsassay. Einfluss von HB-EGF und OPN in Kombination mit Steroidhormonen auf Sphäroide auf nicht präzedualisierten St-T1b. Die Sphäroid-Fläche wurde am Tag 2 gemessen. Mittelwerte \pm SD von n=3 Sphäroiden.

Auch hier zeigte sich jedoch keine Veränderung der Sphäroid-Expansion im Vergleich zu unbehandelten Kulturen.

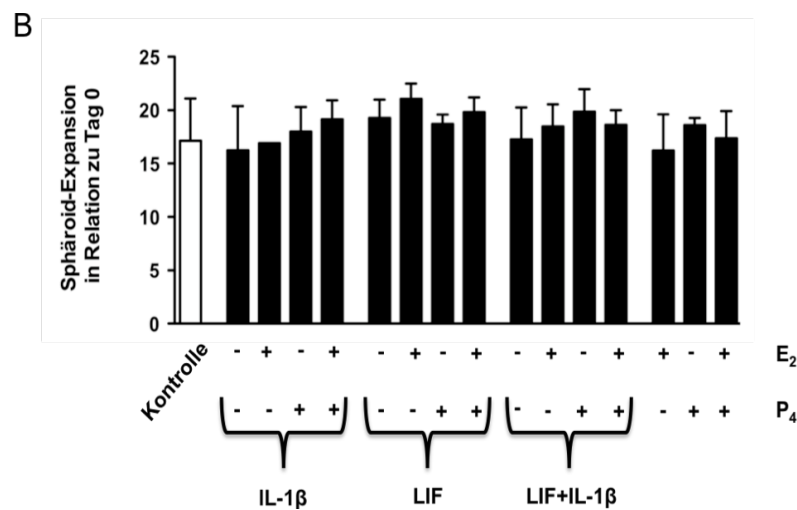


Abb. 3.5: Sphäroid-Expansionsassay. Einfluss von IL-1 β und LIF in Kombination mit Steroidhormonen auf die Sphäroid-Expansion auf nicht präzedualisierten St-T1b. Die Sphäroid-Fläche wurde am Tag 2 gemessen und in Relation zu Tag 0 gesetzt. Mittelwerte \pm SD von n=3 Sphäroiden.

In einem weiteren Schritt wurde die Inkubationszeit auf 3 Tage erhöht, um einen möglicherweise längerfristigen Effekt zu beobachten.

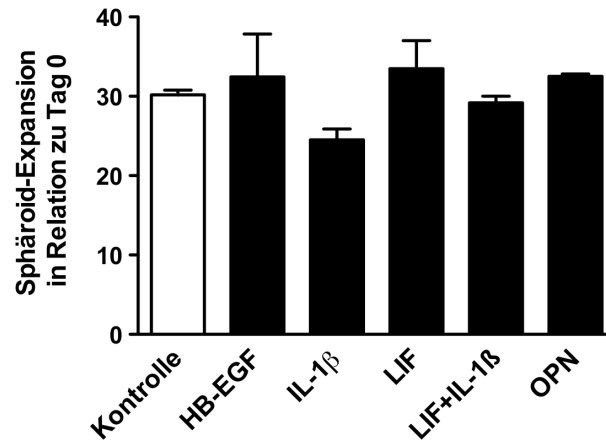


Abb. 3.6: Sphäroid-Expansionsassay. Einfluss der Faktoren auf die Sphäroid-Expansion auf nicht prädezidualisierten St-T1b bei verlängerter Ko-Kulturzeit auf 3 Tage. Die Sphäroid-Fläche wurde am Tag 3 gemessen und in Relation zu Tag 0 gesetzt. Mittelwerte \pm SD von n=3 Sphäroiden.

Aus der Grafik (Abbildung 3.6) sind geringe Veränderungen in der Expansion der Sphäroide auf den nicht vordezidualisierten St-T1b gegenüber Kontrolle zu sehen. Nach der Durchführung der One-Way-ANOVA Analyse hat es sich jedoch ergeben, dass verlängerte Inkubationszeit keinen signifikanten Unterschied auf die Sphäroid-Expansion bei der Behandlung mit den Faktoren im Vergleich zur Kontrolle ausübt.

3.2.3 Sphäroide auf St-T1b. Einfluss der Dezidualisierung

Von unserer Arbeitsgruppe war beobachtet worden, dass sich Sphäroide auf vordezidualisierten primären ESZ stärker ausbreiten als auf nicht vordezidualisierten primären ESZ (Gonzalez *et al.* 2011). Wir versuchten, diese Ergebnisse auf St-T1b Zellen zu reproduzieren.

In einem Vorversuch testeten wir zunächst, ob eine alleinige Färbung der St-T1b Zellen für die Auswertung der Ergebnisse genügend sei. Zum Vergleich wurden parallele Kulturen der vorher beschriebenen Doppelfärbung unterzogen. Das Stimulationsprotokoll der Kulturen wurde von Versuchen mit primären ESZ adaptiert: Vordezidualisierung der St-T1b Zellen über 5 Tage mit cAMP, jedoch weglassen der cAMP Behandlung während der 2 Tage Ko-Kultur mit den Sphäroiden oder Zugabe von 10^{-6} M MPA zu der Ko-Kultur (Abbildung 3.8, Nummer 2. und 3.). Die Anwesenheit von cAMP hatte sich als toxisch für AC-1M88 Zellen erwiesen. Es zeigte sich, dass für die Auswertung der Ergebnisse die ausschließliche Färbung der St-T1b Zellen ausreichend ist (Abbildung 3.7).

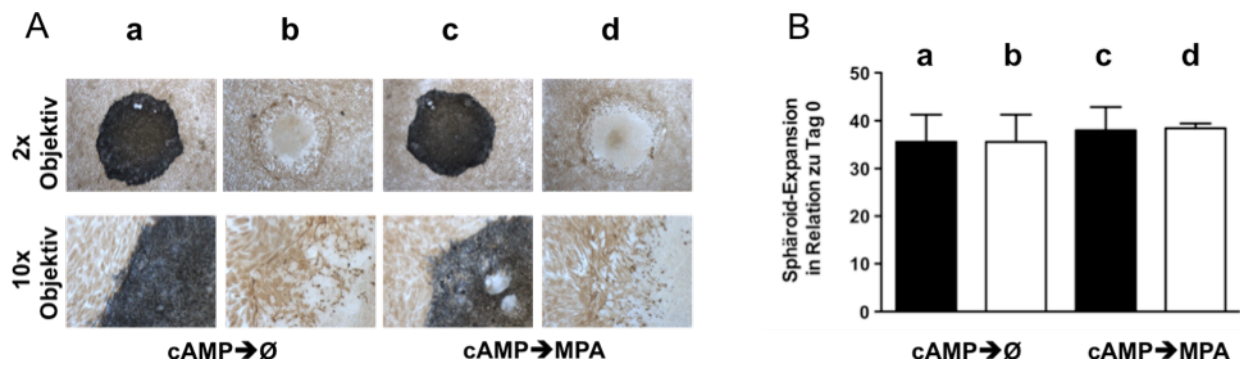


Abb. 3.7: Sphäroid-Expansionsassay. Sphäroide auf (mit 0,5 mM 8-Br-cAMP) prädezidualisierten St-T1b Zellen. Während der Ko-Kultur wurde das 8-Br-cAMP entzogen (cAMP→∅; a, b), oder MPA zugegeben (cAMP→MPA; c, d). (A): Immunzytochemie wurde auf Vimentin und Cytokeratin (a, c) oder nur auf Vimentin (b, d) durchgeführt, 2x Objektiv. (c,d) Aufrechterhaltung der Dezidualisierung erfolgte mit 10^{-6} M MPA. (B): Sphäroid-Flächenmessung am Tag 2 in Relation zu Tag 0. Mittelwerte \pm SD von n=3 Sphäroiden.

Um die Rolle der Dezidualisierung in der Sphäroid-Expansion in der Ko-Kultur besser untersuchen zu können, wurden unterschiedliche Protokolle der Stimulation gewählt (Abbildung 3.8).

| | Vordezidualisierung der ESZ über 5 Tage | Behandlung der Ko-Kultur über 2, 3 oder 4 Tage |
|----|-----------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1. | ∅ (keine Vordezidualisierung) | ∅ (keine Behandlung) |
| 2. | 0,5 mM 8-Br-cAMP | ∅ (keine Behandlung) |
| 3. | 0,5 mM 8-Br-cAMP | 0,5 mM 8-Br-cAMP |
| 4. | 0,5 mM 8-Br-cAMP | 0,25 mM 8-Br-cAMP |
| 5. | 0,5 mM 8-Br-cAMP | 10^{-6} M MPA |

Abb. 3.8: Protokolle der Behandlung der ESZ und der Ko-Kultur. Protokoll (2) – blau markiert – klassisches Protokoll der Stimulation im Sphäroid-Expansionsassay bei Verwendung von primären ESZ.

Die Induktion der Dezidualisierung in den Stromazellen erfolgte mittels 8-Br-cAMP. Die Weitererhaltung der Dezidualisierung in der Ko-Kultur erfolgte entweder mit 8-Br-cAMP oder MPA. Die Zugabe von 0,5 mM 8-Br-cAMP zu der Ko-Kultur übte allerdings einen zytotoxischen Effekt auf die Sphäroide aus. Die Reduktion der Konzentration auf 0,25 mM 8-Br-cAMP konnte nichts zum Überleben der Sphäroide bewirken. Es kam zu einer drastischen

Drosselung der Sphäroid-Expansion bei der Stimulation der Ko-Kultur mit 0,25 mM 8-Br-cAMP (0,5 mM cAMP → 0,25 mM cAMP). Deshalb wurde beschlossen, die Weitererhaltung der Dezidualisierung in der Ko-Kultur durch MPA zu erzielen (Abbildung 3.9).

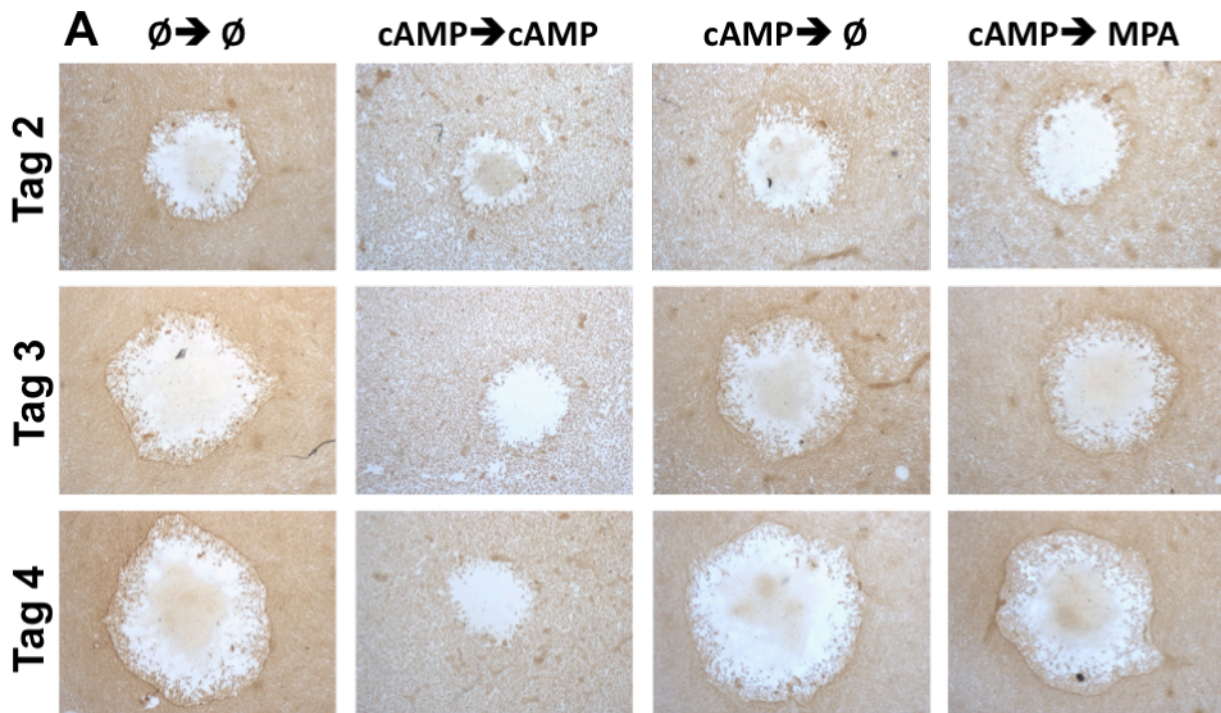


Abb. 3.9: Sphäroid-Expansionsassay. **A:** Sphäroide auf nicht vor- ($\emptyset \rightarrow \emptyset$) und mit 0,5 mM 8-Br-cAMP vordezidualisierten St-T1b Zellen. Immunzytochemie über 2, 3, 4 Tage, 2x Objektiv. ($cAMP \rightarrow cAMP$) - bei der Weitererhaltung der Dezidualisierung durch cAMP in der Ko-Kultur ist es zur Retardierung des Sphäroidwachstums gekommen. ($cAMP \rightarrow \emptyset$) - keine Stimulation der Ko-Kultur nach der Vordezidualisierung der Stromazellen und Aufplattierung der Sphäroide. ($cAMP \rightarrow MPA$) - Weitererhaltung der Dezidualisierung mit 10^{-6} M MPA. Die Sphäroidmorphologie bleibt darunter erhalten. **B:** Grafische Darstellung: Weißer Balken - ($\emptyset \rightarrow \emptyset$). Schwarzer Balken - ($cAMP \rightarrow \emptyset$). Schraffierter Balken - ($cAMP \rightarrow MPA$).

Man hat vermutet, dass der Stimulus, den 8-Br-cAMP den Stromazellen während der Vordezidualisierung gibt, in der Ko-Kultur durch 10^{-6} M MPA ersetzt werden kann. Bei den mit 0,5 mM 8-Br-cAMP über 5 Tage vorbehandelten St-T1b Zellen und anschließender Behandlung der Ko-Kultur mit 10^{-6} M MPA, bleibt die Dezidualisierung der Stromazellen weiterhin erhalten und das Sphäroid unbeschädigt (cAMP → MPA). Es zeigte sich, dass die Stromazellen unter dem Sphäroid über den angegebenen Zeitraum verschwinden und vermutlich zu dem Randbereich des Sphäroids aktiv abwandern und ihn als eine Art Wall einkreisen. (Abbildung 3.9).

Die Behandlung mit 10^{-6} M MPA erwies allerdings keinen bedeutenden Einfluss auf die Expansion der Sphäroide verglichen mit der der Kontrolle oder alleinigen Vordezidualisierung mit 8-Br-cAMP und keiner weiteren Behandlung der Ko-Kultur (cAMP → ∅).

Somit wurde gezeigt, dass die Vordezidualisierung der St-T1b Zellen keinen Einfluss auf die Expansion der Sphäroide in der Ko-Kultur im Vergleich mit den nicht vordezidualisierten St-T1b Zellen aufweist.

An St-T1b Zellen konnten schlussfolgernd die Ergebnisse, die mit den primären ESZ von unserer Arbeitsgruppe beobachtet wurden, nicht reproduziert werden und die Zelllinie erwies sich für unsere Versuche als nicht geeignet. Deshalb wurde für die weiteren Versuche die T-HESC Linie als Stromazellkomponente verwendet.

3.2.4 Sphäroide auf T-HESC. Einfluss der Dezidualisierung

Der Effekt der Dezidualisierung auf die Sphäroidausbreitung wurde weiterhin in der Ko-Kultur mit T-HESC Zellen untersucht.

Nach der Prädezidualisierung der T-HESC mit 0,5 mM 8-Br-cAMP über 5 Tage und anschließendem Überführen der Zellen in 8-Kammer-Objektträger, wurden die Sphäroide auf den T-HESC Zellrasen aufplattiert. Es erfolgte entweder eine Behandlung der Ko-Kultur mit einem Progestin (10^{-6} M MPA) über 2 bzw. 3 Tage oder keine (Abbildung 3.8). Es wurde eine Tendenz zur Sphäroidflächenzunahme auf den T-HESC unter Einfluss der Dezidualisierung (cAMP → ∅, cAMP → MPA) im Vergleich zu Kontrolle (∅ → ∅) am Tag 3 beobachtet, die am Tag 2 jedoch noch nicht sichtbar war. Zwei typische Versuche sind gezeigt (Abbildung 3.10 und 3.11). Obwohl die Tendenz zur vermehrten Sphäroidexpansion auf dezidualisierten T-HESC Zellen wiederholt beobachtet wurde, war sie in der statistischen Auswertung nicht signifikant.

Es wurde beschlossen für die zukünftige Versuche, die Ko-Kultur, für den Sphäroid-Expansionsassay mit T-HESC, über eine Dauer von 3 Tagen durchzuführen, wohingegen bei Verwendung von primären ESZ 2 Tage optimal sind (Gonzalez *et al.* 2011).

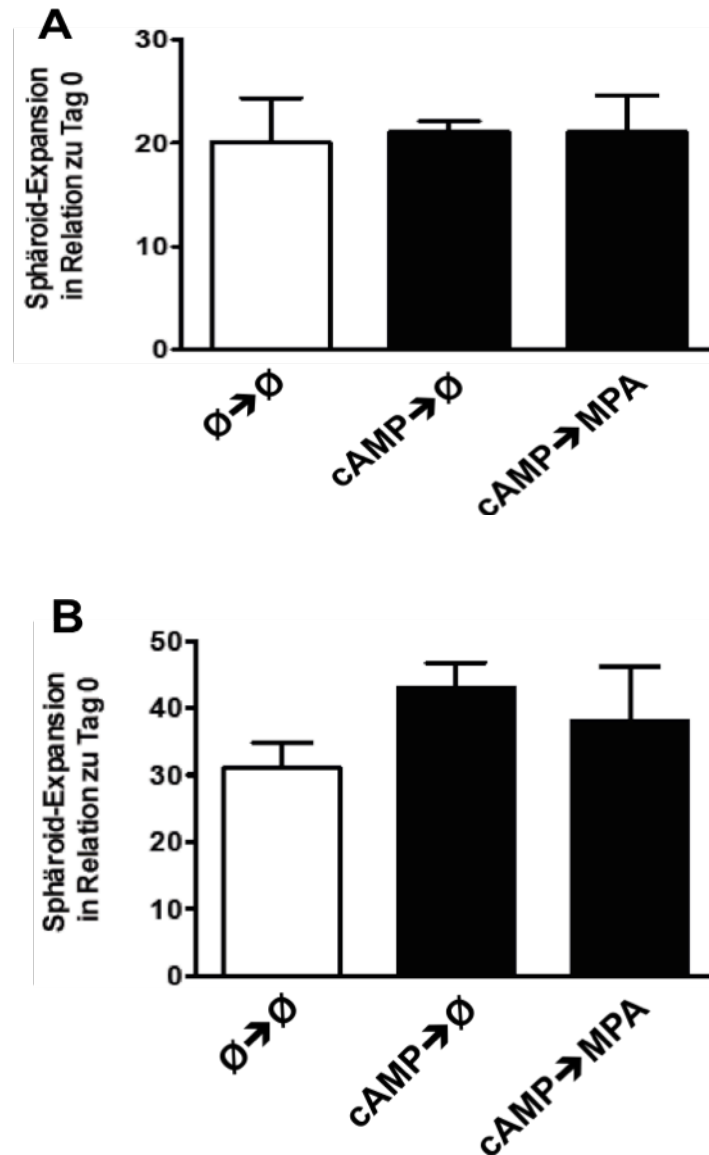


Abb. 3.10: Sphäroid-Expansionsassay. Grafische Darstellung. Sphäroide auf den nicht vordezidualisierten und vordezidualisierten T-HESC über 2 Tage **(A)** und über 3 Tage **(B)**. (Ø→Ø) – keine Vorbehandlung der Stromazellen und keine Behandlung der Ko-Kultur. (cAMP→Ø) – Vordezidualisierung der Stromazellen mit 0,5 mM 8-Br-cAMP ohne weitere Behandlung der Ko-Kultur. (cAMP→MPA) – Vordezidualisierung der Stromazellen mit 0,5 mM 8-Br-cAMP und anschließender Behandlung der Ko-Kultur mit 10^{-6} MPA. Die Sphäroid-Fläche wurde am Ende der Inkubation gemessen und in Relation zu Tag 0 gesetzt. Mittelwerte \pm SD von n=3 Sphäroiden.

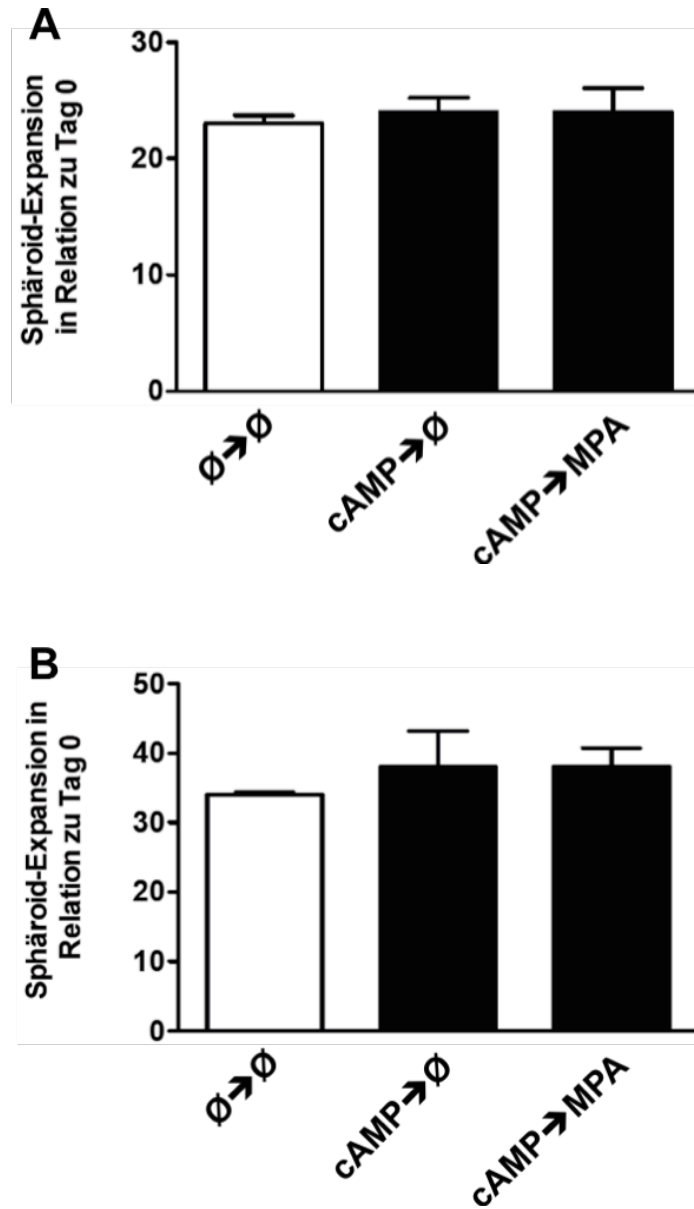


Abb. 3.11: Sphäroid-Expansionsassay. Grafische Darstellung. Sphäroide auf den nicht vordezidualisierten und vordezidualisierten T-HESC über 2 Tage (A) und über 3 Tage (B). Die Durchführung ist wie in Abb. 3.10 beschrieben.

3.2.5 Sphäroide auf T-HESC. Einfluss von Faktoren

Der Sphäroid-Expansionsassays mit der T-HESC Zellen wurden weiterhin mit den folgenden Faktoren durchgeführt: HB-EGF, LIF, IL-1 β , LIF/IL-1 β , OPN (Abbildung 3.12).

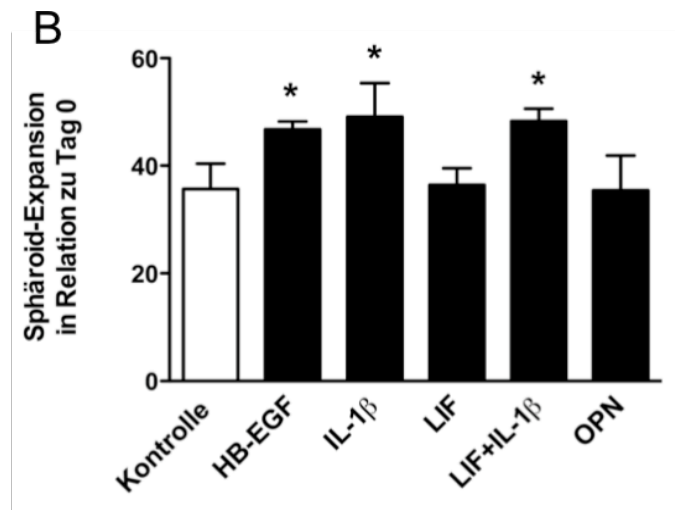
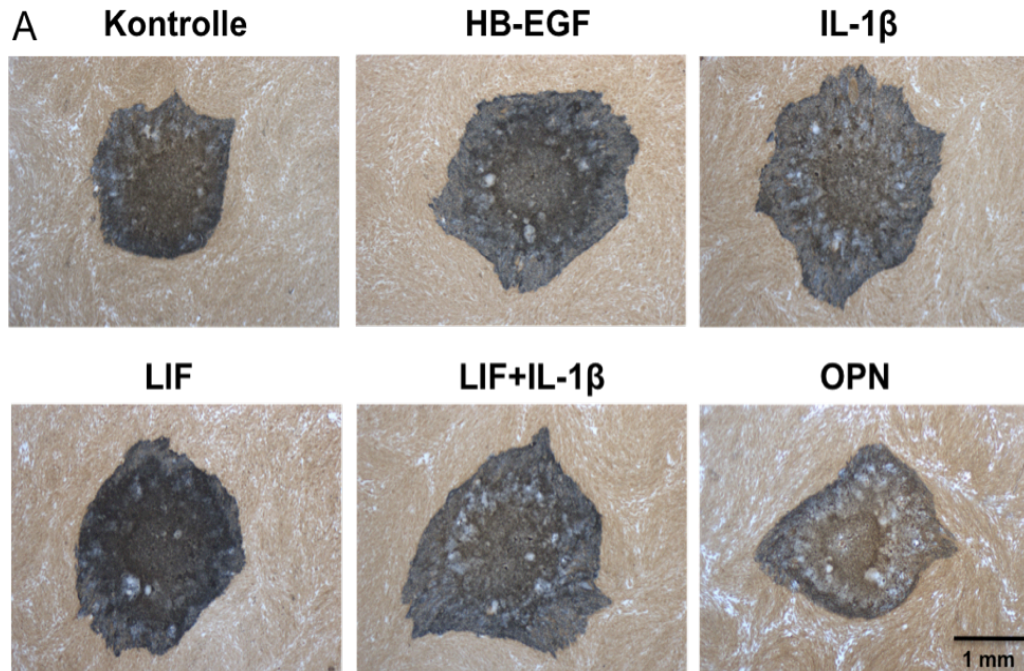


Abb. 3.12: Sphäroid-Expansionsassay: Einfluss von Faktoren auf Sphäroide auf nicht vordezidualisierten T-HESC nach dreitägiger Ko-Kultur. A. Repräsentative Bilder, 2x Objektiv. **B:** Statistische Darstellung, n=3 unabhängige Versuche mit Triplikaten. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expansion der Sphäroide auf den nicht vordezidualisierten T-HESC unter Einfluss von HB-EGF, IL-1 β , IL-1 β /LIF gegenüber der Kontrolle. Die alleinige Zugabe von LIF zu der Ko-Kultur bewirkte keine signifikante

Flächenzunahme der Sphäroide im Vergleich zur Kontrolle. OPN zeigte keine Wirkung auf die Sphäroidausbreitung. Diese Ergebnisse waren mit den Versuchen auf primären nicht vordezidualisierten ESZ vergleichbar, die von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurden (Gonzalez *et al.* 2011). Dieselben Faktoren, wie HB-EGF, IL-1 β und die Kombination aus LIF/IL-1 β ergaben eine Zunahme der Expansion der Sphäroidfläche im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.12).

3.3 Apoptose-Nachweis mit dem *cleaved* PARP Antikörper

Bei der Durchführung der Sphäroid-Expansionsassays wurde beobachtet, dass die Stromazellen unter der Sphäroidfläche verschwinden (siehe Abbildung 3.9).

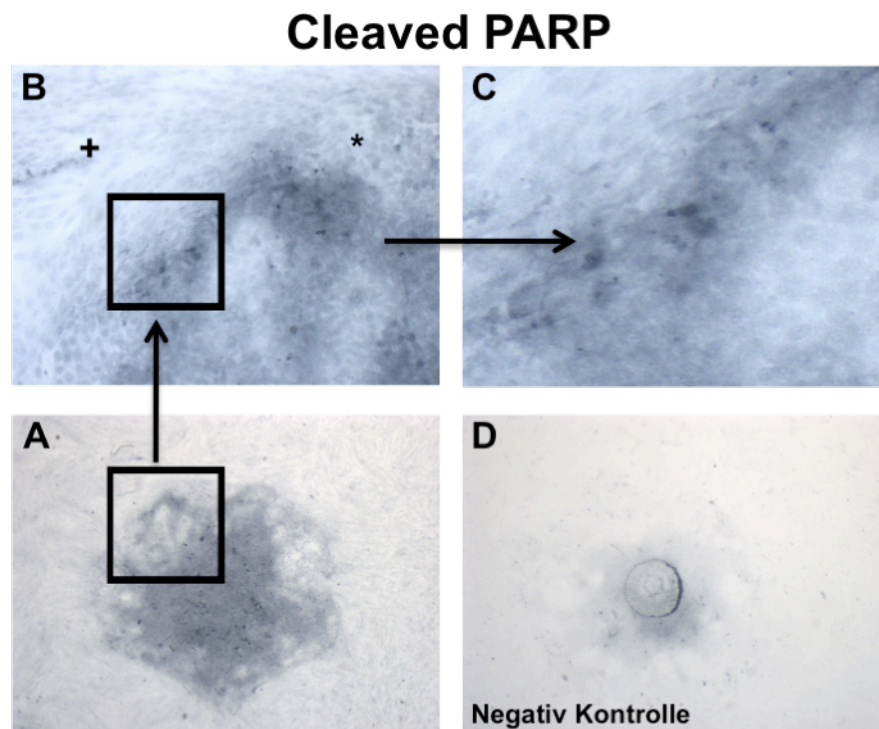


Abb. 3.13: Sphäroide auf nicht vordezidualisierten T-HESC. Apoptose-Nachweis in der Ko-Kultur mittels cPARP nach dreitägiger Inkubation. (A-D) Immunzytochemie. (A) 2x Objektiv. (B) Bereich aus der A-Kolumne, 10x Objektiv. (+) Stromazellen. (*) Sphäroid-Randbereich. (C) Bereich aus B-Kolumne, vergrößert. (D) Negativ Kontrolle, 2x Objektiv. Die Zellen mit stark schwarz gefärbten Kernen befinden sich in der Apoptose.

Um dem Hintergrund dieses Geschehens näher zu kommen wurde überlegt, ob die Zellen in die Apoptose gehen. Für die Untersuchungen wurde ein Antikörper zur Detektion von

cleaved PARP-Fragment (cPARP) als Anzeiger von apoptotischen Zellen verwendet (Abbildung 3.13).

Dieser Antikörper erkennt spezifisch das 85 kDa-PARP-Fragment, das bei der Apoptose durch die Spaltung des PARP-Proteins durch die Kaspase entsteht. Das intakte 116 kDa PARP-Protein wird nicht detektiert (Lazebnik *et al.* 1994).

In der Immunzytochemie hat man folgendes Ausbreitungsmuster beobachten können: Das cPARP Fragment (schwarz) wird in den Kernen der Zellen detektiert. Es sind nur wenige Zellen cPARP positiv. Allerdings lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob die apoptotischen Veränderungen nur die Stromazellen, AC-1M88 Zellen im Sphäroid, oder die beiden Zelltypen betreffen.

3.4 Nachweis von Ki67

Zur Analyse der Proliferationsrate in der Ko-Kultur wurden die Zellen auf das Vorhandensein des Proliferationsmarkers Ki67 getestet (Abbildung 3.14).

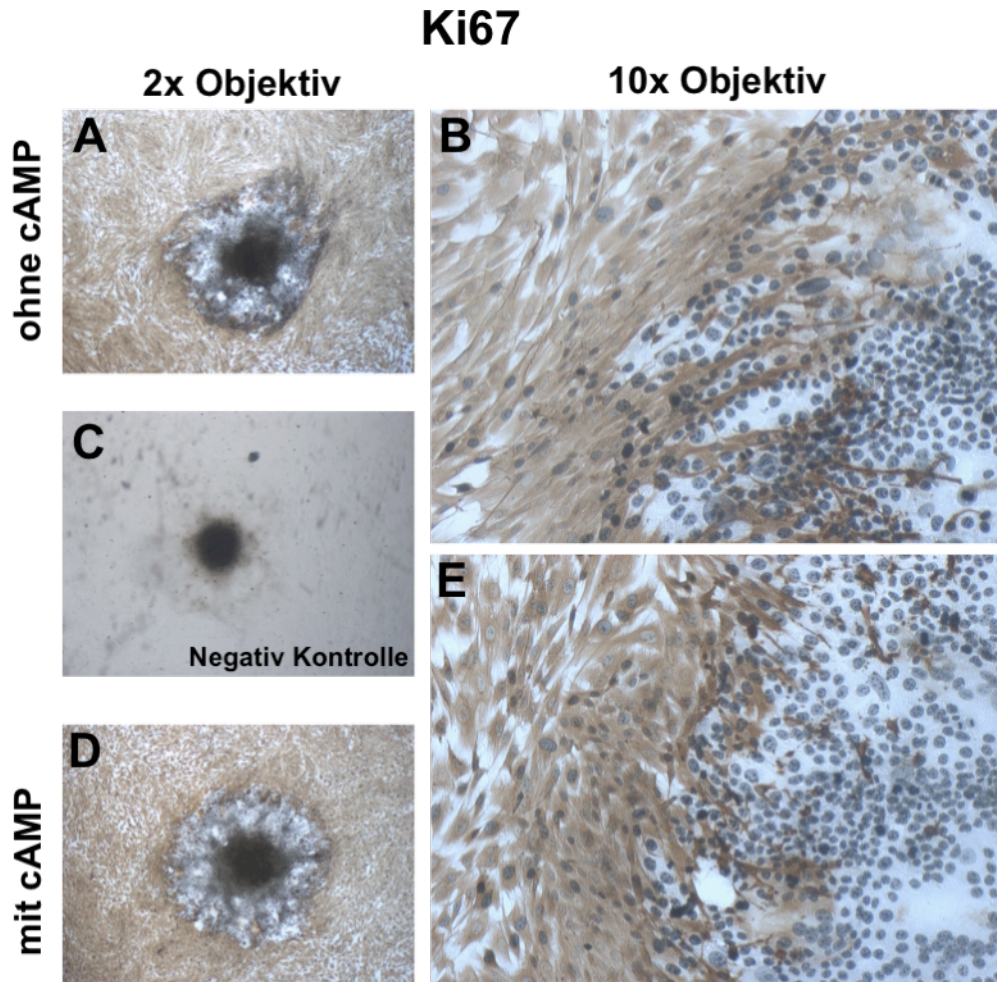


Abb. 3.14: Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 in Sphäroid-ESZ-Ko-Kultur. Sphäroide auf nicht vor- (A, B) und mit 8-Br-cAMP vordezidualisierten (D,E) T-HESC nach 3-tägiger Ko-Kultivierung. T-HESC wurden mit Vimentin-Antikörper braun angefärbt. Die Kerne proliferierender Zellen wurden mit Ki67 schwarz angefärbt. B, E – Der Randbereich des Sphäroids wurde vergrößert dargestellt. C – Negativ Kontrolle: keine Zugabe von Ki67-Antikörper; unspezifische Färbung des dichten Zentrums des Sphäroids.

Sowohl die Kerne der T-HESC, als auch der AC-1M88 Zellen sind am Tag 3 Ki67 positiv und besitzen dementsprechend eine hohe Proliferationsrate. Die Abbildung 3.14 zeigt, dass die Stromazellen bezüglich der Expression des Ki67-Antigens heterogen sind. Sowohl bei undezidualisierten als auch bei vordezidualisierten T-HESC Zellen finden sich proliferierende und nicht proliferierende Zellen. Dagegen zeigen die AC-1M88 Zellen eine ausgeprägte und gleichmäßige Proliferation. Daraus lässt sich schließen, dass beide Zelllinien das Teilungspotential in der Ko-Kultur behalten.

In dieser immunzytochemisch angefärbten Ko-Kultur lässt sich gut darstellen, dass sich die T-HESC nur unter dem Sphäroidrand befinden und sich also mit weiterer Ausbreitung des Sphäroids zu seinem Randbereich zurückziehen. An der Sphäroid-Stromazellen-Grenze sieht man eine Anhäufung der T-HESC um das Sphäroid herum und die Bildung einer Verdichtung.

4 Diskussion

Implantation und Formierung der Plazenta sind durch zwei markante Charakteristiken gekennzeichnet: deziduale Transformation der ESZ und die Invasion des Trophoblasten. Der Trophoblast als spezifisches Plazentagewebe spielt die Hauptrolle in der Formierung der fetal-maternalen Grenzfläche. Mechanismen, durch welche die ESZ die Implantation der Blastozyste und Invasion des Trophoblasten steuern, sind noch wenig verstanden. Es ist erkannt worden, dass ein komplexes Netzwerk aus Signalwegen und Signalmolekülen, die sowohl vom Embryo als auch vom Endometrium gesendet werden, für das Erreichen einer Kompetenz der Blastozyste und der Rezeptivität des Endometriums notwendig sind. Der Dialog zwischen Embryo und dem Endometrium schließt eine Reihe an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Matrixrezeptoren und Lipidmediatoren ein, die durch vielseitige Interaktionen die Anhaftung der Blastozyste und die Invasion des Trophoblasten in das endometriale Stroma ermöglichen (Kliman 2000, Fazleabas *et al.* 2004, Red-Horse *et al.* 2004, Ferretti *et al.* 2007, Gellersen *et al.* 2007b, Makrigiannakis and Minas 2007, Salamonsen *et al.* 2007).

Mehrere Zellkulturmodelle sind zur Untersuchung der Invasion des Trophoblasten entwickelt worden. Unser Modell stellt eine Annäherung an die dritte Phase der Implantation dar, nachdem die Blastozyste das Epithel durchdrungen und die Basalmembran durchbrochen hat und sich weiter implantiert – Invasion des Trophoblasten. Ähnliche Modelle, die die dritte Phase darstellen, sind auch von anderen Forschern entwickelt worden. Grewal *et al.* konstruierten ein Modell aus murinen Blastozysten, die auf einer konfluenten Zellschicht aus primären humanen ESZ platziert wurden (Grewal *et al.* 2010). Mit diesem Modell hat man die kritische Rolle der Aktivität der Proteine der Rho-GTPase-Familie in den primären dezidualisierten humanen ESZ während der Invasion der Maus-Blastozyste betrachtet. Es wurde gezeigt, dass die Expansion der Blastozyste von dem Migrationspotential der ESZ abhängig ist. So führte die Inhibierung der Signalwege, die die Motilität, Reorganisation des Zytoskeletes und fokale Adhäsion in den ESZ regulieren, zu schwerwiegender Beeinträchtigung der Expansion der Blastozyste. Eine gesteigerte Motilität der ESZ an der Kontaktzone mit der Blastozyste wurde beobachtet, die als eine Bewegung weg vom Embryo interpretiert wurde (Grewal *et al.* 2008, Grewal *et al.* 2010). Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe unterstreichen, dass das Migrations- und Invasionspotential der ESZ in dem Zeitraum der Differenzierung in den dezidualen Phänotyp merklich erhöht ist und seine volle Ausprägung als Antwort auf die Anwesenheit des Trophoblasten erreicht (Gellersen *et al.* 2010). Shiokawa *et al.* präsentieren ein Modell der humanen Dezidua, auf die eine Maus-Blastozyste aufgesetzt wurde. In der Ko-Kultur wurde die Flächenzunahme der sich ausbreitenden Blastozyste, bzw. des Trophoblasten, beobachtet und nach 48 bis 96 Stunden

gemessen. Es wurde gesehen, dass die Expansion der Blastozyste mit der Dauer der Ko-Kultivierung mit der Dezidua steigt (Shiokawa *et al.* 2000). Das gleichmäßige Ausbreitungsmuster der Maus-Blastozyste auf den humanen Deziduazellen ist dem Muster, das in unserem Modell beobachtet wurde, sehr ähnlich. Die Fläche ist in unserem Modell über eine längere Ko-Kultivierung ebenfalls gestiegen.

Das ultimative *in vitro* Modell der embryonalen Implantation sollte alle Zelltypen des Endometriums beinhalten. Eine potentielle Untersuchung aller Stadien der Implantation: Vorbereitung, Anhaftung, epitheliale Penetration, Invasion der Basalmembran und der Stromazellen, Regulierung der Proliferation und Differenzierung der EEZ durch die parakrinen Ereignisse der ESZ und umgekehrt, demzufolge die Beförderung der Progression der Implantation, werden dadurch ermöglicht. Auf diese Weise können komplexere Interaktionen zwischen dem maternalen Gewebe und der Blastozyste genau charakterisiert werden. Allerdings ist die Rekonstruktion der physiologischen drei-dimensionalen Architektur des Endometriums mit den darin befindlichen Drüsen, Stromazellen, uNK, anderen Leukozytenpopulationen, Blutgefäßen etc. eine große Herausforderung (Mardon *et al.* 2007). Einige komplexe *in vitro* Ko-Kultur-Modelle sind etabliert worden (Cartwright *et al.* 2002, Helige *et al.* 2001, Dunk *et al.* 2003, Bentin-Ley *et al.* 1994, Park *et al.* 2003). In den meisten Modellen dient die EZM als Substrat für die Invasion (Trew *et al.* 2000, Karmakar and Das 2002, Korff *et al.* 2004, LaMarca *et al.* 2005). Hanna *et al.* injizierten in Matrigel eingebettete deziduale NK-Zellen in Nacktmäuse. In diesen tastbaren Injektaten konnten die Zellen die Eigenschaft des *in vivo* Wachstums beibehalten. Trophoblastzellen, die das Matrigel invadierten und mit den darin verweilenden Leukozyten interagierten, wurden später dazu injiziert (Hanna *et al.* 2006). Beide, sowohl die Trophoblastzellen, als auch NK-Zellen wurden in diesem Modell aber isoliert und dementsprechend aus ihrer natürlichen Umgebung entzogen. Helige *et al.* benutzten im Gegenteil dazu Fragmente der humanen Ersttrimester Dezidua parietalis mit allen dazugehörigen Komponenten als Substrat für die Invasion des Trophoblasten (Helige *et al.* 2008). Kryostatische Schnitte dieser Ko-Kultur wurden, nach immunhistochemischer Färbung, mit der *in vivo* Plazentation verglichen. In diesem Modell wurde die Interaktion zwischen dem invasiven Trophoblasten und dezidualen Leukozyten, die, wie es angenommen wird, eine wichtige Rolle während der Invasion des Trophoblasten spielen, innerhalb des Gewebes, das normalerweise *in vivo* existiert, untersucht ohne einzelne Zellen zu isolieren (Helige *et al.* 2008).

Anhand des von uns verwendeten Zelllinien-Ko-Kultur-Modells wollen wir Ausbreitung der Trophoblastzellen und die Rolle der umgebenden ESZ untersuchen. Der Prozess der Trophoblast-ESZ Interaktion in unserem *in vitro* Modell der Implantation beinhaltet die Anhaftung des Sphäroids an den ESZ Rasen, trophoblastäre Ausbreitung auf der Monoschicht, trophoblastäre Verdrängung der ESZ und/oder aktive Bewegung der ESZ und

Einkreisung des Sphäroids und gleichmäßige Expansion der Sphäroide auf der Objektträger-Oberfläche des benutzten Kultursystems. Da unser Modell nur reine ESZ Linien enthält, kann es die gesamte Komplexität der Dezidua nicht nachbilden. Allerdings ist das Trophoblast-Invasions-Modell sehr definiert und ermöglicht eine direkte Zugabe von verschiedenen Faktoren in das System und Beobachtung deren Wirkung auf beide „Teilnehmer“ sowohl separat, als auch in der Ko-Kultivierung über einen bestimmten Zeitraum. Unter Anwendung der dualen Immunzytochemie ist es möglich, die beschriebenen Prozesse zu visualisieren, und den gegenseitigen Einfluss der Beteiligten zu betrachten.

Bei den hier verwendeten ESZ Linien handelt es sich um mittels Telomerase immortalisierte primäre endometriale Stromazellen: St-T1b (Samalecos *et al.* 2009) und T-HESC (Krikun *et al.* 2004). Diese Zelllinien sind karyotypisch, morphologisch und phänotypisch und anhand des Expressionsmusters der fibroblastären Marker, und Fähigkeit zur Dezidualisierung mit den primären ESZ vergleichbar.

Als Modell des invasiven extravillösen Trophoblasten diente die AC-1M88 Zelllinie. Diese ist eine Trophoblast-Hybrid Zelllinie: Fusion des primären extravillösen Trophoblasten mit Mutanten der JEG3 Chorionkarzinom Zelllinie. Ein großer Unterschied zu dem normalen invasiven EVT besteht jedoch in der Koexistenz von Proliferation und Invasion. AC-1M88 sind sehr gut charakterisiert und werden von vielen Gruppen als Modell für EVT eingesetzt (Bamberger *et al.* 2000b, Briese *et al.* 2005a, Blaschitz *et al.* 2000, Bamberger *et al.* 2006, Hannan *et al.* 2006, Hannan and Salamonsen 2008, Tapia *et al.* 2008, Hannan *et al.* 2010, Samalecos *et al.* 2009).

Anhand unseres Ko-Kultur Systems haben wir unter anderem den Einfluss solcher Zytokine und Wachstumsfaktore, wie HB-EGF, LIF, IL-1 β und Osteopontin in der Trophoblast-ESZ-Interaktion beobachtet. Es ist schon bekannt, dass die oben genannten Faktoren eine Rolle im Prozess der Implantation spielen. HB-EGF unterstützt die endometriale Proliferation, glanduläre epitheliale Sekretion und deziduale Transformation sowohl bei den Nagetieren als auch beim Menschen und stärkt das Überleben von ESZ gegenüber dem Angriff der Apoptosefaktoren TNF α und TNF β (Simon *et al.* 2000, Paria *et al.* 2001, Chobotova *et al.* 2005). Bei Mäusen wird die HB-EGF mRNA im Epithel des Uterus ausschließlich auf der Seite der Implantation 6-7 Stunden vor der Anhaftung der Blastozyste exprimiert mit anschließender Anreicherung des Proteins während der Anhaftung (Das *et al.* 1994). Ausschalten des HB-EGF Genes in Mäusen führt zur Verzögerung der Implantation und zur Größenminderung des Wurfes im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Xie *et al.* 2007). Die Zugabe von HB-EGF zu humanen Chorion-Explantaten des 1. Trimenons steigert die Differenzierung des villösen ZTB in den extravillösen Phänotyp, erhöht seine invasive Aktivität und stimuliert die Zellmotilität (Das *et al.* 1994, Leach *et al.* 2004). Das letztere konnten wir auch in unserer Arbeit zeigen. In unseren Untersuchungen stieg die Expansion der Sphäroidfläche auf T-

HESC Zellen unter HB-EGF Stimulation im Vergleich zu Kontrolle signifikant an. Das stimmt auch mit den Ergebnissen, die von unserer Arbeitsgruppe mit HB-EGF auf primären ESZ beobachtet werden konnten, überein (Gonzalez *et al.* 2011).

Der andere Faktor, der anhand der Ko-Kultur charakterisiert wurde ist IL-1 β . Es ist bekannt, dass beim Pavian, bei dem im Gegensatz zum Menschen keine zyklische Dezidualisierung des Endometriums auftritt, stellt IL-1 β ein von der Blastozyste abgeleitetes Signal dar, der die Dezidualisierung initialisiert (Fazleabas *et al.* 2004). Eine bedeutende Funktion von IL-1 β besteht in der Hochregulierung von PGE₂ durch Enzyminduktion (Dey *et al.* 2004). PGE₂ induziert Migration und Differenzierung des villösen Trophoblasten aus dem Ersttrimester (Horita *et al.* 2007, Nicola *et al.* 2008). Unsere Resultate zeigen, dass die Expansion der Sphäroidfläche unter Einfluss von IL-1 β auf nicht vordezidualisierten T-HESC gegenüber der Kontrolle signifikant steigt. Dieser Effekt wurde von unserer Arbeitsgruppe mit IL-1 β auf nicht vordezidualisierten primären ESZ ebenfalls beobachtet (Gonzalez *et al.* 2011). In dieser Arbeit haben wir die Wirkung von IL-1 β sowohl alleine, als auch in Kombination mit LIF beobachtet.

LIF wurde als erstes Zytokin beschrieben, das eine entscheidende Rolle bei der Implantation bei Mäusen spielt (Stewart *et al.* 1992). Das Expressionsmuster im menschlichen Endometrium lässt ebenfalls eine Rolle von LIF in der Implantation vermuten. Auf nicht vordezidualisierten T-HESC in unserem Sphäroid-Expansionsassays haben wir beobachtet, dass die Stimulation der Ko-Kultur mit LIF alleine keinen signifikanten Unterschied bei der Sphäroidflächenzunahme im Vergleich zu Kontrolle zeigte. Frühere Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe konnten auch keinen signifikanten Einfluss von LIF alleine auf die Expansion der Sphäroide auf nicht vordezidualisierten primären ESZ zeigen. Im Gegensatz dazu, beeinflusst eine Ko-Stimulation aus LIF+IL-1 β die Sphäroid-Expansion auf nicht vordezidualisierten T-HESC und auf primären ESZ positiv (Gonzalez *et al.* 2011). Horita *et al.* zeigten, dass eine Ko-Stimulation der trophoblastären HTR-8/SVneo-Zelllinie mit LIF+IL-1 β die Produktion von PGE₂ in diesen Zellen und deren Migration im Vergleich zur alleiniger Stimulation mit LIF oder mit IL-1 β enorm steigert. Es handelt sich um einen synergistischen Effekt der Faktoren (Horita *et al.* 2007).

Unser Interesse bestand auch in der Untersuchung der Auswirkung der Stimulation von OPN auf die Expansion der Sphäroide in der Ko-Kultur. Es ist zwar gezeigt worden, dass OPN ein wichtiger Faktor bei dem Prozess der Implantation ist, in unseren Experimenten konnte OPN aber keinen signifikanten Einfluss auf die Sphäroidflächenzunahme in der Ko-Kultur mit nicht vordezidualisierten ESZ ergeben. Der fehlende Effekt könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die AC-1M88 Zellen selbst OPN exprimieren (Hannan *et al.* 2010). Die exogene Zufuhr von OPN führt daher zu keinem weiteren stimulierenden Effekt.

Während sich der vorher beobachtete Effekt von HB-EGF, IL-1 β und LIF+IL-1 β bei Ko-Kultur mit den primären ESZ in dieser Arbeit an der T-HESC Zelllinie reproduzieren ließ, war dies bei der St-T1b Linie nicht der Fall. Infolgedessen erwies sich die St-T1b Linie für diese Art der Experimente als nicht geeignet. Es veranlasste uns zur weiteren Verwendung der T-HESC Linie als Modell der ESZ.

Ein anderer Aspekt unserer Untersuchungen wurde dem Einfluss der Dezidualisierung auf die Sphäroid-Expansion gewidmet. Es wird vermutet, dass das Ausbleiben einer effizienten Dezidualisierung mit einer Schwangerschaftsstörung assoziiert ist (Brosens *et al.* 2009, Brosens and Gellersen 2010). Um eine Dezidualisierung herbeizuführen, haben wir die ESZ vor dem Durchführen eines Sphäroid-Expansionsassays über 5 Tage mit 0,5 mM 8-Br-cAMP vorbehandelt. Unter anderem haben wir auch die Wirkung des Progestins MPA in der Ko-Kultur untersucht.

Die vorausgegangenen Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe haben den Einfluss der Dezidualisierung in dem Sphäroid-Expansionsassay mit primären ESZ beobachtet und festgestellt, dass sich die Sphäroide auf prädezidualisierten primären ESZ besser ausbreiten, als auf nicht prädezidualisierten (Gonzalez *et al.* 2011). Somit würde der Dezidua eine unterstützende Rolle bei der Trophoblastinvasion zufallen.

In dieser Arbeit konnten wir am Tag 3 der Ko-Kultur eine Tendenz zur stärkeren Expansion der Sphäroide auf mit 8-Br-cAMP und/oder MPA vorbehandelten T-HESC gegenüber Kontrolle erkennen. Wir konnten allerdings keinen signifikanten Effekt der Dezidualisierung auf die Expansion der Sphäroide beobachten. Die genaue Ursache für diesen Unterschied zu primären ESZ ist noch nicht bekannt.

Das besondere Interesse in der Untersuchung bestand auch darin, das Verhalten der Stromazellen unter der Sphäroidfläche zu beobachten. In den meisten konstruierten Ko-Kultur-Systemen aus den ESZ oder Fragmenten der Dezidua mit den Trophoblastzellen wurde das Augenmerk auf die Beweglichkeit des EVT gelegt. Der Aktivität der ESZ wurde hingegen kaum Aufmerksamkeit geschenkt (Mardon *et al.* 2007). Das übliche Konzept der *in vitro* Kulturmodelle präsentiert das Bild des motilen und aktiv invadierenden EVT in einer Matrix aus passiven Deziduazellen, die die Invasion limitieren (Achache and Revel 2006, Bischof *et al.* 2000, Carson *et al.* 2000, Makrigiannakis *et al.* 2006).

Neue Untersuchungen von Grewal *et al.* zeigten jedoch, dass die Expansion der menschlichen Blastozyste auf der Monoschicht aus vordezidualisierten ESZ vom Migrationspotential der ESZ abhängig ist, das unter anderem durch Rho GTPasen, wie RhoA (*Ras homolog gene family, member A, small GTPase binding protein*) und RAC1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, small GTP binding protein*), reguliert wird. Das geschieht als Antwort auf die implantierende Blastozyste. Die Wissenschaftler vermuten,

dass die Migration der ESZ weg von der Stelle der Implantation die Invasion des Trophoblasten in das stromale Kompartiment begünstigt (Grewal *et al.* 2008). Beeinträchtigung der ESZ Motilität, z.B. direkt durch die Inhibierung der RAC1, könnte eine erfolgreiche Implantation verhindern und sich in einem Ausbleiben der Schwangerschaft oder einer pathologischen Plazentation äußern. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass die Hemmung der Motilität der ESZ als ein wichtiger Mechanismus in der Einschränkung des Ausmaßes der Invasion des Trophoblasten während der normalen Implantation fungieren könnte (Grewal *et al.* 2010, Grewal *et al.* 2008).

Die neuesten Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen neue Erkenntnisse zu funktionalen Eigenschaften der ESZ anhand von Migrations- und Matrigel-Invasionsassays. Gellersen *et al.* postulierten, dass die Deziduazellen selbst nicht nur ein Migrations-, sondern auch ein hohes Invasionspotential aufweisen. Demzufolge sind die ESZ auf eine aktive Unterstützung der Bewegung des EVT in die tiefen Dezidua-Schichten eingerichtet, indem sie den EVT einkreisen (Gellersen *et al.* 2010) und weiterhin seine gerichtete Migration zu den Spiralarterien fördern. Der Prozess der Dezidualisierung resultiert in der Verstärkung dieser Eigenschaft, was wiederum auch durch die Trophoblastsignale gesteigert wird. So ruft ein Kontakt des EVT mit ESZ in den letzten ein hoch motiles Verhalten hervor (Brosens and Gellersen 2010, Gellersen *et al.* 2010).

Die Immunzytochemie der Ko-Kultur aus Sphäroiden (AC-1M88) und endometrialen Stromazellen (St-T1b oder T-HESC) in dieser Arbeit zeigte, dass auf 8-Kammer-Objektträgern die Stromazellen unter dem Sphäroid über 2, 3 Tage Inkubationszeit verschwinden. Vermutlich bewegt sich die Mehrheit der ESZ aktiv zum Randbereich des aggressiven Interaktionspartners, macht den Weg für den EVT frei und „umhüllt“ ihn, indem sie eine Art von Wall um den Sphäroid herum bildet. Diese Beobachtung kann einen kleinen Beitrag zu den neuesten Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe leisten (Gellersen *et al.* 2010).

Andererseits ist es möglich, dass einige Stromazellen einer Apoptose infolge von Hypoxie und Mangel an Nährstoffen unter dem Sphäroid unterliegen. Die Apoptose an der fetomaternalen Grenzfläche wurde schon in Details untersucht und führte zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Typen von apoptotischen Zellen. Mehrere Autoren berichteten über Apoptose in den Trophoblastzellen während der normalen Schwangerschaft (Qiu *et al.* 2005, Huppertz *et al.* 2006). Es wird vermutet, dass die Differenzierung und Apoptose der stromalen und glandulären Zellen während der Dezidualisierung des rezeptiven Endometriums einerseits äußerst wichtig für die Immuntoleranz gegenüber der Schwangerschaft sind, andererseits für Limitierung der Invasion des Trophoblasten und für seinen engen Kontakt zu den maternalen Blutgefäßen Verantwortung tragen (Abrahamsohn and Zorn 1993, Welsh 1993, Bellgrau *et al.* 1995). Interessant ist die Arbeit von Hsu und

Mitarbeitern, die zeigten, dass die implantierende Blastozyste eine Apoptose in den endometrialen epithelialen Zellen induziert. Die Arbeitsgruppe konstruierte Sphäroide aus den BeWo Zellen (Chorionkarzinomzellen) (Pattillo and Gey 1968), die eine Blastozyste imitierten und ko-kultivierte diese mit dem Monolayer der endometrialen epithelialen RL95-2 Zelllinie. Neben dem verdrängenden Wachstum der Sphäroide gegenüber den EEZ Linien, konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Apoptose mit einem Marker, der irreversibel die aktivierte Kaspase bindet, in den EEZ unter dem Sphäroid detektiert werden (Hsu *et al.* 2008). Kayisli *et al.* zeigten, dass die Zugabe von hCG zu den humanen ESZ in der Ko-Kultur mit T-Lymphozyten (Jurkat Zellen) und Deziduazellen eine Apoptose sowohl in den T1-Zellen als auch in den ESZ selbst, durch die Regulierung der Fas- und FasL-Expression (Fas-Ligand), induziert. Obwohl diese Untersuchungen in Abwesenheit des Trophoblasten durchgeführt wurden, behaupten die Wissenschaftler, dass diese Regulierung durch hCG auf eine autokrine und parakrine Weise in der Entwicklung der peritrophoblastären Immuntoleranz beteiligt ist, indem eine Apoptose durch direkten Trophoblast-Deziduazellen Kontakt hervorgerufen wird (Kayisli *et al.* 2003). Deziduazellen sind motiler, wenn sie Signale vom Trophoblasten erhalten (Gellersen *et al.* 2010, Brosens and Gellersen 2010) während die EEZ nicht unter der Sphäroid-Fläche abwandern sondern liegen bleiben (Hsu *et al.* 2008), was zur Apoptose beitragen könnte. Die ESZ bewegen sich, darum ist die Wahrscheinlichkeit apoptotische Zellen nachzuweisen relativ gering. Die immunzytochemische Färbung, die in dieser Arbeit angewendet wurde, erlaubt leider die dynamische Beobachtung der Ko-Kultur-Partner und deren Bewegungsmuster nicht. Wir haben aber einen Antikörper zur Detektion des *cleaved* PARP-Fragments in den apoptotischen Zellen an der Sphäroid-Stromazellen Grenze eingesetzt. Dieser Antikörper erkennt spezifisch das 85 kDa-PARP-Fragment, das bei der Apoptose durch die Spaltung des PARP-Proteins durch die Kaspase entsteht. Das intakte 116 kDa PARP-Protein wird nicht detektiert (Lazebnik *et al.* 1994). Das *cleaved* PARP-Fragment wird in den Kernen der Zellen detektiert. Wir haben im schmalen Sphäroid-Stromazellen Überlappungsbereich eine Anhäufung einiger weniger *cleaved* PARP positiver Zellen beobachtet. Allerdings lässt sich anhand der Immunzytochemie keine eindeutige Aussage treffen, ob die apoptotischen Veränderungen nur die Stromazellen oder AC-1M88 Zellen in dem Sphäroid, oder die beiden Zelllinien involvieren.

Zur Analyse der Proliferationsrate der Zelllinien in der Ko-Kultur wurden die Zellen auf das Vorhandensein des Proliferationsmarkers Ki67 getestet. Ki67 wird in diesen Experimenten sowohl in den Kernen der T-HESC, als auch der AC-1M88 Zellen am Tag 3 detektiert, somit besitzen diese Zellen eine hohe Proliferationsrate. Das Expressionsmuster in den Stromazellen ist heterogen und zeigt sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen. Dagegen zeigen die AC-1M88 Zellen eine ausgeprägte und gleichmäßige

Proliferation. Auch Korff et al. wiesen die Expression des Ki67-Markers in den Sphäroiden nach, die aus primären Trophoblastzellen des ersten und dritten Trimenon gebildet worden waren, mit bevorzugter Lokalisation der Ki67 positiven Zellen in der Zone zwischen dem Zentrum und der lose aggregierter Oberfläche (Korff et al. 2004). In unseren Experimenten ließ sich kein spezifisches Lokalisationsmuster bei der Detektion des Ki67-Antigens in AC-1M88 Zellen in dem Sphäroid verfolgen. Eine gleichmäßige Proliferation der AC-1M88 Zellen in unseren Sphäroiden weist darauf hin, dass zumindest bei einer immortalisierten Zelllinie der invasive Weg die zelluläre Proliferation nicht ausschließt. Damit wird die Ähnlichkeit der AC-1M88 Zellen mit Chorionkarzinomzellen betont. Im Gegensatz dazu besteht beim *in vivo* Trophoblasten eine Trennung zwischen Proliferation und Invasion. Der Trophoblast entwickelt seine invasiven Eigenschaften *in vivo* nach dem Einstellen der Proliferation (Helige et al. 2008).

Zum Schluss ist zusammenfassend zu sagen, dass unsere Ergebnisse die Einbeziehung gewisser Prozesse in der Invasion des Trophoblasten demonstrierten. In dieser Arbeit ist das Trophoblast-Endometriale-Stromazelllinien Ko-Kultur-Modell verwendet worden. Dieses System kann zur Untersuchung der Effekte von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Steroidhormonen an der fetal-maternalen Grenzfläche verwendet werden.

Obwohl die Dezidualisierung auf die Sphäroid-Expansion auf T-HESC Zellen nicht den erheblichen Einfluss ausübte, der vorher bei primären ESZ beobachtet worden war (Gonzalez et al. 2011), ließen sich jedoch die stimulierenden Effekte von HB-EGF, IL-1 β , LIF+IL-1 β hervorragend reproduzieren. So könnten wir die Ergebnisse, die von unserer Arbeitsgruppe mit denselben Faktoren auf nicht vordezidualisierten primären ESZ beobachtet werden konnten (Gonzalez et al. 2011) in dieser Arbeit auf nicht prädezidualisierten T-HESC Zellen sehr gut wiedergeben. Dagegen konnte LIF alleine und Osteopontin keine fördernden Eigenschaften auf die Sphäroid-Expansion in diesem Modell einbringen.

Die St-T1b Zellen als Modell der ESZ eignet sich hingegen für diese Art der experimentellen Interventionen nicht. Weder die Zugabe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Steroidhormonen zu der Ko-Kultur, noch die Vordezidualisierung der St-T1b konnten die Ergebnisse auf primären ESZ reproduzieren.

Die AC-1M88 Trophoblast-Chorionkarzinom Hybridzellen erwiesen sich als geeignet, Sphäroide herzustellen, die als Modell der Trophoblastausbreitung aus einer Blastozyste angesehen werden können.

Die Beobachtungen des Verhaltens der Stromazellen in der Ko-Kultur könnten zu den Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe (Gellersen et al. 2010) einen zusätzlichen

Einblick geben. Wir vermuteten eine aktive Abwanderung der ESZ unter dem Sphäroid zu seinem Randbereich hin.

Allerdings besteht die Einschränkung in der Anwendung dieses Modells, da wir zu dem Einsatz von Zelllinien und nicht den primären Trophoblastzellen oder primären ESZ gekommen sind. So, zum Beispiel, wäre in diesem Fall die Konstruierung eines Ko-Kultur-Modells aus primären extravillösen Trophoblastzellen und primären ESZ für die Erforschung der Interaktionen an der feto-maternalen Grenzfläche optimal gewesen. Gleichwohl könnte dieses System in der Zukunft als Hilfe zur Strategienausarbeitung in dem Management von Krankheiten, die mit einer ungenügenden Invasion des Trophoblasten assoziiert sind, eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Ein parakrines Geflecht aus Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren agiert aktiv an der feto-maternalen Grenzfläche (Salamonsen *et al.* 2007, Hannan and Salamonsen 2008). Anhand unser Ko-Kultur-Modells in Form des Sphäroid-Expansionsassays haben wir den Einfluss von HB-EGF, IL-1 β , LIF, Osteopontin alleine und in Kombination miteinander und/oder mit Steroidhormonen auf die Sphäroid-Expansion untersucht.

Unsere Ergebnisse demonstrierten einen stimulierenden Einfluss von HB-EGF, IL-1 β , LIF+IL-1 β auf die Sphäroid-Expansion auf nicht differenzierten T-HESC gegenüber Kontrolle und bestätigten damit die Resultate von unserer Arbeitsgruppe auf nicht vordezidualisierten primären ESZ (Gonzalez *et al.* 2011). LIF alleine und Osteopontin übten keinen stimulierenden Effekt auf die Sphäroidflächenveränderung aus. Die St-T1b Linie eignet sich im Gegensatz zur T-HESC Linie als Modell der ESZ für diese Art der Versuche nicht. Die Resultate auf primären ESZ konnten auf St-T1b Zellen nicht wiedergegeben werden. Die AC-1M88 Hybridzellen repräsentieren ein akzeptables Modell des normalen invasiven Trophoblasten.

Die Interaktion der Stromazellen mit dem Sphäroid zeigte, wie wir vermuten, eine aktive Bewegung der Stromazellen zum Rand des Sphäroids hin. Es ist klar, dass das hier vorgestellte Trophoblast-Stromazelllinien-Invasionsmodell nur eine orientierende Vorstellung über die zellulären Vorgänge des Implantationsprozesses wiedergibt. Die Konstruierung eines Modells aus primären extravillösen Trophoblastzellen und primären ESZ wäre für die Untersuchung der Interaktionen an der feto-maternalen Grenzfläche optimal. Dennoch könnte unser System in der Zukunft zur Erforschung des parakrinen Netzwerkes bei der Plazentaformierung, bzw. deren Pathologie als auch zur Verfolgung morphologischer Interaktion beider Partner angewendet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsohn PA, Zorn TM (1993) Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266:603-628
- Achache H, Revel A (2006) Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 12:731-746
- Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren BM (2003) Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 79 Suppl 1:808-814
- Aghajanova L (2004) Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 1034:176-183
- Anne Croy B, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C (2006) Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* 214:161-185
- Apparao KB, Murray MJ, Fritz MA, Meyer WR, Chambers AF, Truong PR, Lessey BA (2001) Osteopontin and its receptor $\alpha(v)\beta(3)$ integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4991-5000
- Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A (2009) Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 127:26-39
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C (1998) Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 16:27-55
- Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL (1995) Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1908-1915
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287:860-864
- Aspillaga MO, Whittaker PG, Grey CE, Lind T (1983) Endocrinologic events in early pregnancy failure. *Am J Obstet Gynecol* 147:903-908
- Austgulen R, Arntzen KJ, Vatten LJ, Kahn J, Sunde A (1995) Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor- β) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10:171-176
- Baggish MV, R.; Guedj, H (2007) *Hysteroskopie: Visual Perspectives of Uterine Anatomy, Physiology & Pathology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Baird DT, Cameron ST, Critchley HO, Drudy TA, Howe A, Jones RL, Lea RG, Kelly RW (1996) Prostaglandins and menstruation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 70:15-17
- Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Loning T, Bamberger MC (2000a) Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3932-3936
- Bamberger AM, Sudahl S, Loning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A (2000b) The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol* 156:1165-1170
- Bamberger AM, Minas V, Kalantaridou SN, Radde J, Sadeghian H, Loning T, Charalampopoulos I, Brummer J, Wagener C, Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP, Makrigiannakis A (2006) Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *Am J Pathol* 168:141-150
- Bankers-Fulbright JL, Kalli KR, McKean DJ (1996) Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci* 59:61-83

- Baranao RI, Piazza A, Rumi LS, Polak de Fried E (1997) Determination of IL-1 and IL-6 levels in human embryo culture-conditioned media. *Am J Reprod Immunol* 37:191-194
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-632
- Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Larsen JF, Hamberger L, Horn T (1994) Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil* 101:327-332
- Berek J (2007) *Berek & Novak's Gynecology*. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Bergh PA, Navot D (1992) The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 58:537-542
- Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL (1991) Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11408-11412
- Bigsby RM (2002) Control of growth and differentiation of the endometrium: the role of tissue interactions. *Ann N Y Acad Sci* 955:110-117
- Bischof P, Campana A (2000) A putative role for oncogenes in trophoblast invasion? *Hum Reprod* 15 Suppl 6:51-58
- Bischof P, Meisser A, Campana A (2000) Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta* 21 Suppl A:S55-60
- Bischof P, Meisser A, Campana A (2002) Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol* 55:3-10
- Blaschitz A, Hutter H, Leitner V, Pilz S, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P (2000) Reaction patterns of monoclonal antibodies to HLA-G in human tissues and on cell lines: a comparative study. *Hum Immunol* 61:1074-1085
- Blauer M, Heinonen PK, Martikainen PM, Tomas E, Ylikomi T (2005) A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Hum Reprod* 20:864-871
- Briese J, Oberndorfer M, Patschenik C, Schulte HM, Makrigiannakis A, Loning T, Bamberger AM (2005a) Osteopontin is colocalized with the adhesion molecule CEACAM1 in the extravillous trophoblast of the human placenta and enhances invasion of CEACAM1-expressing placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5407-5413
- Briese J, Oberndorfer M, Schulte HM, Loning T, Bamberger AM (2005b) Osteopontin expression in gestational trophoblastic diseases: correlation with expression of the adhesion molecule, CEACAM1. *Int J Gynecol Pathol* 24:271-276
- Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG (1972) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1:177-191
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA (2002) The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 187:1416-1423
- Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA (2009) A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 200:615 e611-616
- Brosens JJ, Gellersen B (2010) Something new about early pregnancy: decidual biosensing and natural embryo selection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 36:1-5
- Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3:1169-1180
- Butler WT (1989) The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23:123-136
- Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JW, Lye SJ, Letarte M (1997) Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology* 138:4977-4988

- Carrington B, Sacks G, Regan L (2005) Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17:591-597
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K (2000) Embryo implantation. *Dev Biol* 223:217-237
- Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, Crocker IP, Aplin JD, Baker PN, Whitley GS (2002) Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. *Placenta* 23:232-235
- Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I, Mardon H (2003) An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod* 18:283-290
- Cavagna M, Mantese JC (2003) Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta* 24 Suppl B:S39-47
- Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA, Quinonero A, Pellicer A, Simon C (2007) Embryonic adhesion is not affected by endometrial leptin receptor gene silencing. *Fertil Steril* 88:1086-1092
- Chaouat G, Menu E, Delage G, Moreau JF, Khrishnan L, Hui L, Meliani AA, Martal J, Raghupathy R, Lelaidier C, et al. (1995) Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. *Hum Reprod* 10 Suppl 2:55-59
- Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL (2000) Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 141:4365-4372
- Chobotova K, Spyropoulou I, Carver J, Manek S, Heath JK, Gullick WJ, Barlow DH, Sargent IL, Mardon HJ (2002) Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev* 119:137-144
- Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, Mardon HJ (2005) Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90:913-919
- Cloke B, Huhtinen K, Fusi L, Kajihara T, Yliheikkila M, Ho KK, Teklenburg G, Lavery S, Jones MC, Trew G, Kim JJ, Lam EW, Cartwright JE, Poutanen M, Brosens JJ (2008) The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium. *Endocrinology* 149:4462-4474
- Cohen M, Meisser A, Bischof P (2006) Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 27:783-793
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL (1996) Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3115-3120
- Danielsson KG, Swahn ML, Bygdeman M (1997) The effect of various doses of mifepristone on endometrial leukaemia inhibitory factor expression in the midluteal phase-an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 12:1293-1297
- Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey SK (1994) Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. *Endocrinology* 134:971-981
- De los Santos MJ, Mercader A, Frances A, Portoles E, Remohi J, Pellicer A, Simon C (1996) Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol Reprod* 54:563-574
- Denhardt DT, Guo X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7:1475-1482
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107:1055-1061
- Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25:341-373

- Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G (2007) The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 13:365-377
- DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ (1999) Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 155:293-301
- Dimitriadis E, Salamonsen LA, Robb L (2000) Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod* 6:907-914
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 11:613-630
- Dimitriadis E, Menkhorst E, Salamonsen LA, Paiva P (2010) Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta* 31 Suppl:S99-104
- Dosiou C, Giudice LC (2005) Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 26:44-62
- Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL (1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* 11:191-196
- Dunk C, Petkovic L, Baczyk D, Rossant J, Winterhager E, Lye S (2003) A novel in vitro model of trophoblast-mediated decidual blood vessel remodeling. *Lab Invest* 83:1821-1828
- Edwards DP (2005) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67:335-376
- 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
- Feige A, Rempfen A, Würfel W, Jawny J, Rohde A (2006) *Frauenheilkunde: Fortpflanzungsmedizin, Geburtshilfe, Onkologie, Psychosomatik*. 3 ed. München: Elsevier, Urban&Fischer
- 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
- Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD (1987) Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 262:9702-9708
- Franzen A, Heinegard D (1985) Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232:715-724
- Funayama H, Gaus G, Ebeling I, Takayama M, Fiizesi L, Berthold Huppertz B, Kaufmann P, Frank H-G (1997) Parent cells for trophoblast hybridisation II: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPRT-Negative Mutants of the Choriocarcinoma cell line JEG-3. *Trophoblast Research* 10:191-201
- Gabinskaya T, Salafia CM, Gulle VE, Holzman IR, Weintraub AS (1998) Gestational age-dependent extravillous cytotrophoblast osteopontin immunolocalization differentiates between normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 40:339-346
- Gaus G, Funayama H, Huppertz B, Kaufmann P, Frank H-G (1997) Parent cells for trophoblast hybridisation I: Isolation of extravillous trophoblast cells from human term chorion laeve. *Trophoblast Research* 10:181-190
- Gearing DP (1993) The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv Immunol* 53:31-58
- 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, 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, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM (2010) Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod* 25:862-873
- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ (1996) Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 97:540-550
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277:1669-1672
- 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
- Giudice LC, Irwin JC (1999) Roles of the insulinlike growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface. *Semin Reprod Endocrinol* 17:13-21
- Gonzalez M, Neufeld J, Reimann K, Wittmann S, Samalecos A, Wolf A, Bamberger AM, Gellersen B (2011) Expansion of human trophoblastic spheroids is promoted by decidualized endometrial stromal cells and enhanced by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interleukin-1 beta. *Mol Hum Reprod* (advance access 27 Feb 2011)
- Göretzlehner G, Lauritzen C, Göretzlehner U (2007) *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*. 5th ed. Berlin: Walter de Gruyter
- Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ (2008) Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16189-16194
- Grewal S, Carver J, Ridley AJ, Mardon HJ (2010) Human endometrial stromal cell rho GTPases have opposing roles in regulating focal adhesion turnover and embryo invasion in vitro. *Biol Reprod* 83:75-82
- Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, Thaler CJ (2003) Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* 9:785-791
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS (2009) The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med* 27:62-79
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12:1065-1074
- Hannan NJ, Jones RL, White CA, Salamonsen LA (2006) The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the fetomaternal interface. *Biol Reprod* 74:896-904
- Hannan NJ, Salamonsen LA (2007) Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 19:266-272
- Hannan NJ, Salamonsen LA (2008) CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast: potential roles in human embryo implantation. *Biol Reprod* 79:58-65
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA (2010) Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod* 82:235-245
- Helige C, Hagendorfer G, Smolle J, Dohr G (2001) Uterine natural killer cells in a three-dimensional tissue culture model to study trophoblast invasion. *Lab Invest* 81:1153-1162
- Helige C, Ahammer H, Hammer A, Huppertz B, Frank HG, Dohr G (2008) Trophoblastic invasion in vitro and in vivo: similarities and differences. *Hum Reprod* 23:2282-2291

- Heneweer C, Kruse LH, Kindhauser F, Schmidt M, Jakobs KH, Denker HW, Thie M (2002) Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: rho protein regulation. *Mol Hum Reprod* 8:1014-1022
- Hertig AT, Rock J, Adams EC, Menkin MC (1959) Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 23:202-211
- Horita H, Kuroda E, Hachisuga T, Kashimura M, Yamashita U (2007) Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum Reprod* 22:1801-1809
- Hsu WL, Chen YH, Chao KC, Chang SP, Tsui KH, Li HY, Sung YJ (2008) Anti-fas activating antibody enhances trophoblast outgrowth on endometrial epithelial cells by induction of P38 MAPK/JNK-mediated apoptosis. *Placenta* 29:338-346
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Krussel 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
- Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC (2006) Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 195:29-39
- Irving JA, Lala PK (1995) Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- β , IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 217:419-427
- Irwin JC, Suen LF, Faessen GH, Popovici RM, Giudice LC (2001) Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua:trophoblast interface during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2060-2064
- Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R (1996) Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil* 108:147-155
- Iwamoto R, Mekada E (2000) Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:335-344
- Jackson P, Marreiros A, Russell PJ (2005) KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 37:530-534
- Jacobs AL, Hwang D, Julian J, Carson DD (1994) Regulated expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by uterine stroma. *Endocrinology* 135:1807-1815
- Jessmon P, Leach RE, Armant DR (2009) Diverse functions of HBEGF during pregnancy. *Mol Reprod Dev* 76:1116-1127
- Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW (1999a) Ovine osteopontin: II. Osteopontin and $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol Reprod* 61:892-899
- Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Bazer FW (1999b) Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. *Biol Reprod* 61:884-891
- Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE (2003) Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 69:1458-1471
- Jokhi PP, King A, Loke YW (1994) Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum Reprod* 9:1660-1669
- Jones MC, Fusi L, Higham JH, Abdel-Hafiz H, Horwitz KB, Lam EW, Brosens JJ (2006) Regulation of the SUMO pathway sensitizes differentiating human endometrial stromal cells to progesterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16272-16277
- Karmakar S, Das C (2002) Regulation of trophoblast invasion by IL-1 β and TGF- β 1. *Am J Reprod Immunol* 48:210-219
- Katz VL, G Lobo, R; Gershenson, D (2007) comprehensive gynecology. 5th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier
- 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

- Kauma S, Matt D, Strom S, Eierman D, Turner T (1990) Interleukin-1 β , human leukocyte antigen HLA-DR α , and transforming growth factor- β expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* 163:1430-1437
- Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A (2003) Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol* 171:2305-2313
- Keltz MD, Attar E, Buradagunta S, Olive DL, Kliman HJ, Arici A (1996) Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol* 175:1611-1619
- Kim MR, Park DW, Lee JH, Choi DS, Hwang KJ, Ryu HS, Min CK (2005) Progesterone-dependent release of transforming growth factor- β 1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Mol Hum Reprod* 11:801-808
- King A (2000) Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 6:28-36
- Kishimoto T, Taga T, Akira S (1994) Cytokine signal transduction. *Cell* 76:253-262
- Kliman HJ (2000) Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am J Pathol* 157:1759-1768
- Knight DA, Lydell CP, Zhou D, Weir TD, Robert Schellenberg R, Bai TR (1999) Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor in human lung. Distribution and regulation of LIF release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:834-841
- Kniss DA, Zimmerman PD, Garver CL, Fertel RH (1997) Interleukin-1 receptor antagonist blocks interleukin-1-induced expression of cyclooxygenase-2 in endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 177:559-567
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T (1994) Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 50:882-887
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J (1995) Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod* 10:1907-1911
- 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
- Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, Rahman M, Caze R, Qumsiyeh M, Lockwood CJ (2004) A novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progestational response. *Endocrinology* 145:2291-2296
- Lacroix MC, Guibourdenche J, Fournier T, Laurendeau I, Igout A, Goffin V, Pantel J, Tsatsaris V, Evain-Brion D (2005) Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* 146:2434-2444
- Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X (1997) The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 12:569-574
- LaMarca HL, Ott CM, Honer Zu Bentrup K, Leblanc CL, Pierson DL, Nelson AB, Scandurro AB, Whitley GS, Nickerson CA, Morris CA (2005) Three-dimensional growth of extravillous cytotrophoblasts promotes differentiation and invasion. *Placenta* 26:709-720
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347
- Leach RE, Khalifa R, Ramirez ND, Das SK, Wang J, Dey SK, Romero R, Armant DR (1999) Multiple roles for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor are suggested by its cell-specific expression during the human endometrial cycle and early placentation. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3355-3363
- Leach RE, Khalifa R, Armant DR, Brudney A, Das SK, Dey SK, Fazleabas AT (2001) Heparin-binding EGF-like growth factor modulation by antiprogestin and CG in the baboon (*Papio anubis*). *J Clin Endocrinol Metab* 86:4520-4528

- Leach RE, Romero R, Kim YM, Chaiworapongsa T, Kilburn B, Das SK, Dey SK, Johnson A, Qureshi F, Jacques S, Armant DR (2002) Pre-eclampsia and expression of heparin-binding EGF-like growth factor. *Lancet* 360:1215-1219
- 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
- Lebowitz PFS, S. M. (2006) *Cancer Chemotherapie & Biotherapie: Principles & Practices*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G (2002) Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 17:213-218
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 90:188-195
- Lessey BA (2002) Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* 55:101-112
- Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ (1994) Interleukin-1 β regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem* 269:17125-17131
- Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L (2007) Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol* 269:85-92
- Lin Z, Kubota T, Masuda M, Aso T (1998) Role of nitric oxide synthase in release of endothelin from cultured human endometrial cells. *Eur J Endocrinol* 138:467-471
- Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht VA, Papp C, Schatz F (1998) Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal. *Endocrinology* 139:4607-4613
- Lockwood CJ, Krikun G, Schatz F (1999) The decidua regulates hemostasis in human endometrium. *Semin Reprod Endocrinol* 17:45-51
- Lockwood CJ, Krikun G, Schatz F (2001) Decidual cell-expressed tissue factor maintains hemostasis in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 943:77-88
- Loke YW, Burrows T, King A (1995) [Adhesion molecules and trophoblastic invasion]. *Contracept Fertil Sex* 23:573-575
- Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, Hermo L (2002) Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biol Reprod* 66:1437-1448
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-2278
- Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP (2006) Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 17:178-185
- Makrigiannakis A, Minas V (2007) Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* 14:102-109
- Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM (2000) Osteoprotegerin is an $\alpha v \beta 3$ -induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 275:20959-20962
- Mardon H, Grewal S, Mills K (2007) Experimental models for investigating implantation of the human embryo. *Semin Reprod Med* 25:410-417
- Marikovsky M, Breuing K, Liu PY, Eriksson E, Higashiyama S, Farber P, Abraham J, Klagsbrun M (1993) Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3889-3893
- Martin KL, Barlow DH, Sargent IL (1998) Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 13:1645-1652
- Martin MU, Wesche H (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1592:265-280

- McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:279-307
- Miller WL (1998) Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. *Clin Perinatol* 25:799-817, v
- Milstone DS, Redline RW, O'Donnell PE, Davis VM, Stavrakis G (2000) E-selectin expression and function in a unique placental trophoblast population at the fetal-maternal interface: regulation by a trophoblast-restricted transcriptional mechanism conserved between humans and mice. *Dev Dyn* 219:63-76
- Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A (2005) Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online* 10:205-216
- Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED (1998) Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *Am J Reprod Immunol* 40:136-144
- Mullen CA (1998) Review: analogies between trophoblastic and malignant cells. *Am J Reprod Immunol* 39:41-49
- Murphy CR (2000) Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods-or uterodomes? *Hum Reprod* 15:2451-2454
- Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A (1996) The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 81:801-806
- Nicola C, Chirpac A, Lala PK, Chakraborty C (2008) Roles of Rho guanosine 5'-triphosphatase A, Rho kinases, and extracellular signal regulated kinase (1/2) in prostaglandin E2-mediated migration of first-trimester human extravillous trophoblast. *Endocrinology* 149:1243-1251
- Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, Jones HW, Jr. (2000) Surface morphology of the human endometrium. Basic and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 900:316-324
- Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BL (1988) Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 106:441-450
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400-1408
- Okada H, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H (2004) Interleukin-1 inhibits interleukin-15 production by progesterone during in vitro decidualization in human. *J Reprod Immunol* 61:3-12
- Omigbodun A, Ziolkiewicz P, Tessler C, Hoyer JR, Coutifaris C (1997) Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology* 138:4308-4315
- Paiva P, Menkhorst E, Salamonsen L, Dimitriadis E (2009) Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:319-328
- Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK (1999) Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development* 126:1997-2005
- Paria BC, Song H, Dey SK (2001) Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol* 45:597-605
- Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK (2002) Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 296:2185-2188
- Park DW, Choi DS, Ryu HS, Kwon HC, Joo H, Min CK (2003) A well-defined in vitro three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion. *Cancer Lett* 195:185-192
- Pattillo RA, Gey GO (1968) The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res* 28:1231-1236
- Pellicer A, Dominguez F, Remohi J, Simon C (2002) Molecular basis of implantation. *Reprod Biomed Online* 5 Suppl 1:44-51

- Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI (1995) Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* 270:10915-10922
- Pepe GJ, Albrecht ED (1995) Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 16:608-648
- Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, Goffin F, Hagelstein M-T, Noe A, A.Hazout A, Foidart J-M, Geenen V (2004) Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic–endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Human Reproduction* 19 2633–2643
- Pollheimer J, Knofler M (2005) Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* 26 Suppl A:S21-30
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A (2005) Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol* 65:121-132
- Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M (1996) Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 122:637-645
- Raab G, Klagsbrun M (1997) Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1333:F179-199
- Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ (2004) Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 114:744-754
- Redman CW (1997) Cytotrophoblasts: masters of disguise. *Nat Med* 3:610-611
- Riese DJ, 2nd, Stern DF (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20:41-48
- Safran JB, Butler WT, Farach-Carson MC (1998) Modulation of osteopontin post-translational state by 1, 25-(OH)₂-vitamin D₃. Dependence on Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 273:29935-29941
- Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G (2003) Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review. *Placenta* 24 Suppl A:S76-85
- 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
- Samalecos A, Reimann K, Wittmann S, Schulte HM, Brosens JJ, Bamberger AM, Gellersen B (2009) Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol Endocrinol* 7:76
- Schofield G, Kimber SJ (2005) Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol Reprod* 72:872-878
- Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S, Smith SK (1995) Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 53:974-981
- Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, Loke YW, Smith SK (1999) Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod* 60:355-364
- Shen MM, Leder P (1992) Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8240-8244
- Shiokawa S, Sakai K, Akimoto Y, Suzuki N, Hanashi H, Nagamatsu S, Iwashita M, Nakamura Y, Hirano H, Yoshimura Y (2000) Function of the small guanosine triphosphate-binding protein RhoA in the process of implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4742-4749

- Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML (1993) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 β in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77:549-555
- Simon C, Frances A, Piquette G, Hendrickson M, Milki A, Polan ML (1994) Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 78:847-854
- Simon C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A (1997) The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol* 37:64-72
- Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohi J, Pellicer A (1999) Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2638-2646
- Simon C, Martin JC, Pellicer A (2000) Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14:815-826
- Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA (1995) Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270:28471-28478
- Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:279-303
- Song H, Lim H, Das SK, Paria BC, Dey SK (2000) Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol* 14:1147-1161
- Stauber M, Weyerstahl T (2007) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- 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
- Strakova Z, Srisuparp S, Fazleabas AT (2000) Interleukin-1 β induces the expression of insulin-like growth factor binding protein-1 during decidualization in the primate. *Endocrinology* 141:4664-4670
- Svenson M, Hansen MB, Heegaard P, Abell K, Bendtzen K (1993) Specific binding of interleukin 1 (IL-1) β and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) to human serum. High-affinity binding of IL-1ra to soluble IL-1 receptor type I. *Cytokine* 5:427-435
- Tabibzadeh S, Sun XZ (1992) Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 7:1214-1221
- Tapia A, Salamonsen LA, Manuelpillai U, Dimitriadis E (2008) Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum Reprod* 23:1724-1732
- Teklenburg G, Macklon NS (2009) Review: in vitro models for the study of early human embryo-endometrium interactions. *Reprod Sci* 16:811-818
- Thomas EJ (1990) Preventive, symptomatic and expectant management of endometriosis. *Prog Clin Biol Res* 323:197-208
- Thomas JM, T (2007) *Oxford Handbook of Clinical Examination and Praktical Skills*. 1st ed. New York: Oxford University Press
- Tierney EP, Tulac S, Huang ST, Giudice LC (2003) Activation of the protein kinase A pathway in human endometrial stromal cells reveals sequential categorical gene regulation. *Physiol Genomics* 16:47-66
- Tinel H, Denker HW, Thie M (2000) Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation. *Mol Hum Reprod* 6:1119-1130
- Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Wurfel W, Thaler CJ, Makrigiannakis A (2010) Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 85:25-32

- Trew AJ, Lash GE, Baker PN (2000) Investigation of an in vitro model of trophoblast invasion. *Early Pregnancy* 4:176-190
- Trundley A, Moffett A (2004) Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63:1-12
- Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN (1996) Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1118-1122
- Tseng L, Mazella J (2002) Endometrial cell specific gene activation during implantation and early pregnancy. *Front Biosci* 7:d1566-1574
- Tuckey RC (2005) Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26:273-281
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB (1993) Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol* 7:1256-1265
- Uede T, Katagiri Y, Iizuka J, Murakami M (1997) Osteopontin, a coordinator of host defense system: a cytokine or an extracellular adhesive protein? *Microbiol Immunol* 41:641-648
- van den Brule F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Foidart JM (2005) Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy* 88:163-180
- Vogiagis D, Marsh MM, Fry RC, Salamonsen LA (1996) Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 148:95-102
- von Wolff M, Strowitzki T, Becker V, Zepf C, Tabibzadeh S, Thaler CJ (2001) Endometrial osteopontin, a ligand of β 3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil Steril* 76:775-781
- von Wolff M, Bohlmann MK, Fiedler C, Ursel S, Strowitzki T (2004) Osteopontin is up-regulated in human decidual stromal cells. *Fertil Steril* 81 Suppl 1:741-748
- Wanggren K, Lalitkumar PG, Hambiliki F, Stabi B, Gemzell-Danielsson K, Stavreus-Evers A (2007) Leukaemia inhibitory factor receptor and gp130 in the human Fallopian tube and endometrium before and after mifepristone treatment and in the human preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 13:391-397
- Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC (2004) Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 82-83:583-592
- Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271:509-512
- Welsh AO (1993) Uterine cell death during implantation and early placentation. *Microsc Res Tech* 25:223-245
- White CA, Johansson M, Roberts CT, Ramsay AJ, Robertson SA (2004) Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol Reprod* 70:123-131
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M (2001) Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology* 142:969-973
- Xie H, Wang H, Tranguch S, Iwamoto R, Mekada E, Demayo FJ, Lydon JP, Das SK, Dey SK (2007) Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18315-18320
- Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ (1997) Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet* 21:102-108
- Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, Yano T, Ayabe T, Tsutsumi O, Taketani Y (2003) Endometrial stromal cells undergoing decidualization down-regulate their properties to produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 β via reduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2236-2241

- Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW (1990) cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7:491-502
- Zhang Z, Funk C, Roy D, Glasser S, Mulholland J (1994) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is differentially regulated by progesterone and estradiol in rat uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology* 134:1089-1094
- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 91:950-960
- Zhou Y, Genbacev O, Fisher SJ (2003) The human placenta remodels the uterus by using a combination of molecules that govern vasculogenesis or leukocyte extravasation. *Ann N Y Acad Sci* 995:73-83

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. M. Schulte danke ich für die freundliche und großzügige Aufnahme in der Forschungsabteilung des Endokrinologikum Hamburg.

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 Möglichkeit an dieser Arbeitsgruppe tätig zu sein.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Birgit Gellersen, Endokrinologikum Hamburg, für die Überlassung des Dissertationsthemas, das mir gute Einblicke in die Welt der Wissenschaft ermöglichte. Ihre hervorragende konstruktive und engagierte Betreuung hat mir die Arbeit sehr erleichtert und für ihre freundschaftliche und stets motivierte Art danke ich ihr sehr herzlich.

Frau Anja Wolf und Frau Maren Schwenke danke ich für die Anregungen bezüglich des Schreibens.

Frau Dr. rer. nat. Stefanie Wittmann, Frau Annemarie Samalecos und Frau Katja Reiman danke ich für die Einführung in die experimentellen Methoden, ihre ständige Bereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich besonders herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich in jeder Entscheidung immer unterstützt hat.

8 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Julia Neufeld, an Eides statt,

dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Untersuchung der Invasion des Trophoblasten anhand eines Ko-Kultur-Modells mit endometrialen Stromazellen“

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stelle sind als solche gekennzeichnet.