Aus der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Die Expression von Cathepsin S und seinen Inhibitoren Cystatin C und Cystatin F im weiblichen Reproduktionstrakt sowie bei Präimplantationsembryonen der Maus

# **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt von

> Claudia Hölling 2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan Referentin: Priv.-Doz. Dr. Hess Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Fischer Wenn du mit deiner Mannschaft ein Schiff bauen willst, beginne nicht damit, wie man Holz zusammenfügt, sondern lehre sie zunächst die Sehnsucht nach dem großen weiten Meer. (Antoine de Saint-Exupéry) Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

D.M. Baston-Buest, A. Schanz, S. Buest, J.C. Fischer, J.S. Kruessel, A.P. Hess (2010), The embryo's cystatin C and F expression functions as a protective mechanism against the maternal proteinase cathepsin S in mice. *Reproduction*, (139) 741-748

D.M. Baston-Büst, A. Schanz, **C.Hölling**, J. Hirchenhain, J.-S. Krüssel, A.P. Hess (2008), Die Rolle der Zysteinproteinase Cathepsin S und ihrer Inhibitoren in der frühen embryonalen Implantation der Maus.

Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, 5 (6) 364

**C. Hölling**, D.M. Baston-Büst, A. Schanz, S. Büst, J.C. Fischer, W. Janni, J.S. Krüssel, A. P. Hess (2010), Untersuchungen zur Expression von Cathepsin S und seinen Inhibitoren Cystatin C und Cystatin F im weiblichen Reproduktionstrakt sowie bei Präimplantationsembryonen.

Poster zum Doktorandenkongress der Medical Research School Düsseldorf, 23.07.2010

## Abkürzungen

00	unendlich	
°C	Grad Celsius (Einheit der Temperatur)	
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin	
Abb.	Abbildung	
ABC	Avidin-Biotin-Komplex	
AG	Arbeitsgruppe	
AK	Antikörper	
Amp.	Ampicillin	
APCs	antigen presenting cells, antigenpräsentierende Zellen	
ART	assistierte Reproduktionstechniken	
AS	Aminosäure	
BMFZ	Biologisch-Medizinisches-Forschungszentrum	
bp	Basenpaare	
CD	Cluster of Differentiation	
СН	Claudia Hölling	
СК	Cytokeratin, Zytokeratin	
CLIP	class-II-associated invariant chain peptide	
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	
Cts	Cathepsin	
Cst	Cystatin	
Da, kDa	Dalton, kilo Dalton (Einheit der Molekülmasse)	
DAB	3,3-Diaminobenzidin	
DAPI	4`,6-Diamidino-2-phenylindol	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser	
DIR	Deutsches IVF-Register	
DNA, cDNA	Deoxyribonucleicacid, Desoxyribonukleinsäue, complementary Deoxyribonucleicacid, komplementäre Desoxyribonukleinsäue	
dNTP, ddNTP	2´-Desoxynukleosidtriphosphate, 2´,3´-Didesoxynukleosidtriphosphate	
DTT	Dithiothreitol	
E. coli	Escherichia coli	
E <sub>2</sub>	Östrogen	
et al.	<i>et alii</i> ; und andere	
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie	

I

FBS	fetales bovines Serum		
FSH	follikelstimulierendes Hormon		
g, mg, µg, ng	Gramm, Milli-, Mikro-, Nanogramm		
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon		
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde (Einheit der Zeit)		
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid		
hCG	humanes Choriongonadotropin		
HE	Hämatoxylin-Eosin		
HLA	human leukocyte antigen, humanes Leukozyten Antigen		
HLA-DM	human leukocyte antigen-DM, humanes Leukozyten Antigen-DM		
HSA	humanes Serumalbumin		
i.p.	intraperitoneal		
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion		
IFN	Interferon		
IHC	Immunhistochemie		
IL	Interleukin		
IU	international unit, internationale Einheit		
IUI	intrauterine Insemination		
IVF	in vitro-Fertilisierung		
JAKs	Janus-Kinasen		
l, ml, μl	Liter, Milliliter, Mikroliter (Einheit des Volumens)		
LB	Luria Bertani		
LH	luteinisierendes Hormon		
log10	Logarithmus zur Basis 10		
m, cm, mm, μm, nm	Meter, Zenti-, Milli-, Mikro-, Nanometer (Einheit der Länge)		
Μ, mM, μM	Molarität, Milli-, Mikromolarität (Einheit der Stoffmengenkonzentration)		
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid		
МНС	<i>major histocompatibility complex,</i> Haupthistokompatibilitätskomplex		
MMPs	Matrixmetalloproteinasen		
n	Anzahl		
NCBI	<i>National Centre for Biotechnologie Information</i> , Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation		
NIH	National Institute of Health, Nationales Gesundheitsinstitut		
NK-Zellen	natürliche Killerzellen		
P <sub>4</sub>	Progesteron		

pc	post conceptionem		
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung		
<b>PCR</b> <i>polymerase chain reaction,</i> Polymerase-Kettenreakt			
PFA	Paraformaldehyd		
рН	<i>potentia hydrogenii</i> ; Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration		
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin		
pos.	positiv		
RNA, mRNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure, "messenger"-RNA		
RNAse	Ribonuklease		
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute		
RT	Reverse Transkription		
SH2	Src-homology		
STAT	signal transducer and activator of transcription		
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure		
ТСМ	<i>trophoblast conditioned medium,</i> konditioniertes Trophoblastmedium		
TIMPs	Tissue inhibitor of Matrix Metalloproteinases		
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur für Nukleinsäurehybridisierung		
TNF	tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor,		
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan		
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat		
uNK-Zellen	uterine natürliche Killerzellen		
U	unit, Einheit (Einheit der Enzymaktivität)		
UV	Ultraviolett		
V	Volt (Einheit der Spannung)		
VZO	Verkehr zum optimalen Zeitpunkt		
vWF	von Willebrand-Faktor		
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation,		

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen		
Inhaltsverzeichnis		
1. Einleitung		
1.1 Menstrualzyklus der Frau	7	
1.2 Die Befruchtung der Eizelle und die Implantation beim Menschen	8	
1.3 Der Sexualzyklus der Maus	10	
1.4 Die Befruchtung der Eizelle und die Implantation bei der Maus	11	
1.5 Unerfüllter Kinderwunsch	12	
1.6 Cathepsine	13	
1.6.1 Cathepsin S	14	
1.6.2 Cathepsin S im Reproduktionstrakt von Säugern	15	
1.7 Cystatine	16	
1.7.1 Cystatin C	17	
1.7.2 Cystatin C im Reproduktionstrakt von Säugern	18	
1.7.3 Cystatin F	19	
1.7.4 Cystatin F im Reproduktionstrakt des Menschen und der Maus	19	
1.8 Zytokine	19	
1.8.1 Interleukine	20	
1.8.2 Interleukin-6	20	
1.8.3 Interleukin-6 im Reproduktionssystem von Säugern	21	
1.9 Ziele der Arbeit	24	
2. Material und Methoden		
2.1 Versuchstiere	25	
2.2 Gewinnung der Blastozysten	25	
2.3 Reverse Transkription	26	
2.4 Primer	27	

2.	5 Die Polymerase Kettenreaktion	28
	2.5.1 Durchführung der β-Aktin PCR	29
	2.5.2 Prinzip der verschachtelten- (nested-) PCR	30
	2.5.3 Durchführung der Cathepsin S, Cystatin C, Cystatin F und Interleukin-6 <i>nested-</i> PCRs	30
2.	6 Elektrophorese	32
	2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese	32
	2.6.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese	32
2.	7 Detektion der cDNA	33
2.	8 Klonierung	33
	2.8.1 Klonierung in pCR <sup>®</sup> 2.1 <sup>®</sup> TOPO- Vektor	33
2.	9 Transformation elektrokompetenter Escherichia coli Bakterien	34
2.	10 Anzucht und Lagerung bakterieller Transformanden	34
2.	11 Plasmid-DNA-Präparation	34
2.	12 Sequenzierung	34
	2.12.1 Sequenzierung nach Sanger	35
	2.12.2 Cycle-Sequencing	35
	2.12.3 Durchführung der Sequenzierung	36
2.	13 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	36
	2.13.1 Gewinnung der Mausuteri	36
	2.13.2 Anfertigung der Kryoschnitte	37
	2.13.3 Anfertigung der Paraffinschnitte	37
	2.13.4 Das Prinzip der Immunhistochemie	38
	2.13.5 Enzymgekoppelte-immunhistochemische Methoden	38
	2.13.6 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode	38
	2.13.7 Immunhistochemie Cathepsin S, Cystatin C, Cystatin F, Zytokeratin 7, von Willebrand-Faktor	39
	2.13.8 Immunfluoreszenzfärbung	40
	2.13.9 Immunfluoreszenz Cathepsin S und Cystatin C	40

	2.14 Durchflusszytometrie	41
	2.15 Tabellarische Auflistung der Eigenleistung	43
3.	Ergebnisse	
	3.1 Ergebnisse der <i>nested</i> -PCRs	44
	3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Cathepsin S, Cystatin C und Cystatin F Expression im Uterus der Maus auf Proteinebene	46
	3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie	55
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Danksagung	77
8.	Eidesstattliche Versicherung	78

#### 1 Einleitung

#### 1.1 Menstrualzyklus der Frau

Im Körper der geschlechtsreifen Frau wird zum Zeitpunkt des Eisprungs in der Regel eine reife Eizelle aus dem Eierstock (*Ovar*) vom Eileiter aufgenommen. Dieser regelmäßig einmal im Monat auftretende durch die Steroidhormone gesteuerte Vorgang bildet zusammen mit weiteren körperlichen Veränderungen den weiblichen Zyklus.

Dieser wird im Allgemeinen in 3 Phasen unterteilt: Menstruations-, Proliferations- und Sekretionsphase, welche einerseits den hormonellen Zyklusablauf und andererseits die parallel dazu stattfindenden Veränderungen der Gebärmutterschleimhaut (*Endometrium*) beschreiben.

Ein Zyklus dauert in der Regel 28 Tage, Schwankungen von ±3 Tagen werden bei regelmäßigem Zyklus jedoch als normal angesehen.

Beginn und Ende des Menstruationszyklus bildet die Menstruationsphase. Diese wird durch das Einsetzen einer Blutung definiert, in der das *Stratum functionalis* des Endometriums durch Progesteron-( $P_4$ )-Entzug) nach Abfall der Hormonproduktion des Gelbkörpers abgestoßen wird. In der sich anschließenden Proliferationsphase wird es unter Östrogen( $E_2$ )-Einfluss mit seinen zahlreichen Drüsen und Gefäßen neu aufgebaut (Campbell, 1998; Klinke & Silbernagel, 2003).

Die letzte Phase bildet die Sekretionsphase. Diese beginnt nach erfolgtem Eisprung. Durch die im Gelbköper produzierten Hormone, hauptsächlich aber durch P<sub>4</sub>, kommt es zur sogenannten Dezidualisierung des Endometriums (Leidenberger *et al.*, 2009). Die Gefäßversorgung wird weiter ausgebaut, die Anzahl der endometrialen Drüsen nimmt zu und sie produzieren ein nährstoffhaltiges Sekret. Auf diese Weise ist die Schleimhaut auf die Einnistung der befruchteten Eizelle vorbereitet.

Dieser Vorgang der Dezidualisierung, der bei einigen Säugetieren wie z.B. der Maus nur in Anwesenheit eines Embryos stattfindet, erfolgt bei der Frau in jedem Zyklus. Er ist vor allem gekennzeichnet durch die Einlagerung von Lipiden und Glykogen, der Einwanderung definierter Immunzelltypen sowie der Expression entsprechender Proteine und Zytokine. Immunzellen stellen ca. 40% der zellulären Komponenten der Dezidua dar (Siegenthaler & Blum, 2006).

Parallel zu den Veränderungen am Endometrium findet im Ovar die zyklische Reifung einer Eizelle statt.

Stimuliert durch das im Hypothalamus gebildete Gonadotropin-*Releasing*-Hormon (GnRH) wird in der Adenohypophyse follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) gebildet.

Unter FSH-Einfluss treten in jedem Zyklus mehrere Primordialfollikel in den Prozess der Follikelreifung ein.

In der Regel entwickelt sich nur einer der Primordialfollikel über Primär- und Sekundärfollikel zum reifen, sprungbereiten Tertiär- oder Graaf-Follikel. Die übrigen Follikel gehen in Atresie.

Stimuliert durch die steigenden  $E_2$ -Werte kommt es ca. am 14. Zyklustag zur LH-Spitze (*peak*). Der Eisprung erfolgt ca. 36h nach dem LH-*peak*, ca. 14 Tage vor Einsetzen der Menstruationsblutung. Die freigesetzte Eizelle, die nach der Ovulation ca. 6-12h befruchtungsfähig ist, wird durch den Fimbrientrichter des Eileiters aufgefangen.

Im Ovar bildet sich durch den Einfluss von LH aus Granulosaepithelzellen des Graafschen Follikels der Gelbkörper. Die P<sub>4</sub>-bildenden Follikelzellen werden mit Blutgefäßen durchzogen, der P<sub>4</sub>-Spiegel im Blut steigt an, was die Lutealphase charakterisiert und für den Erhalt einer Schwangerschaft nach erfolgreicher Implantation wichtig ist. Während der gesamten Lutealphase bildet der Gelbkörper unter LH-Einfluss P<sub>4</sub>, das dominierende Hormon der zweiten Zyklusphase (Diedrich *et al.*, 2007).

Dieses komplexe Zusammenspiel der im Ovar gebildeten Steroidhormone, hervorgehoben sei an dieser Stelle die Funktion von  $P_4$ , macht eine erfolgreiche Implantation erst möglich. Diese ist beim Menschen nur in einem sehr begrenzten Zeitraum, dem sog. Implantationsfenster, überhaupt möglich (Wilcox *et al.*, 1999). Findet keine Befruchtung bzw. keine Einnistung des Embryos statt, geht der Gelbkörper zugrunde und die  $P_4$ -Produktion nimmt ab. Das *Stratum functionalis* des Endometrium wird in der sich anschließenden Menstruationsphase abgestoßen (Diedrich *et al.*, 2007).

## 1.2 Die Befruchtung der Eizelle und die Implantation beim Menschen

Die Befruchtung der Eizelle erfolgt ca. 6-12h nach der Ovulation im ampullären Teil des Eileiters. Die befruchtete Eizelle wird mittels lokaler, hormonell beeinflusster Transportmechanismen wie Zilienschlag, Sekretstrom und Kontraktionen der Wandmuskulatur durch den Eileiter in Richtung Gebärmutterhöhle (Cavum uteri) transportiert (Moore & Persaud, 2007).

Während der Passage durch den Eileiter teilt sich die Eizelle ca. alle 8h. Die befruchtete Eizelle entwickelt sich durch 3 Furchungsteilungen zum 8-Zellstadium.

Etwa ab dem 4- bis 8-Zellstadium beginnt die menschliche Embryonalentwicklung mit der Translation embryonaler RNA (Braude *et al.*, 1988). Der embryo-maternale Dialog, der auf der Interaktion mütterlicher und embryonaler Peptide basiert, beginnt.

Am 3. Tag *post conceptionem (pc)* erfolgt nach dem 16-Zellstadium die Weiterentwicklung des Embryos zur Morula.

Durch die Ausbildung von Adhäsionsglykoproteinen zwischen den Blastomeren kommt es zur Kompaktierung. Es entsteht ein epithelialer Charakter mit einer äußeren und einer inneren Schicht. Aus der äußeren, epithelialen Schicht bildet sich später der Trophoblast und aus der inneren Schicht der Embryoblast, aus dem sich der Embryo entwickelt.

Die Morula tritt nach ca. 4-tägigem Transport durch den Eileiter in das flüssigkeitsgefüllte *Cavum uteri* ein. Zu diesem Zeitpunkt ist die Morula noch von der *Zona pellucida* umgeben.

Die Blastozystenhöhle bildet sich bei einer ungefähren Zellzahl von 32-58 Zellen am 5. Tag *pc* aus, indem die Trophoblastzellen Flüssigkeit in die Interzellularräume der inneren Zellmasse transportieren. Diese konfluieren und bilden die Blastozystenhöhle.

Ist dieser Vorgang abgeschlossen, dehnt sich die Blastozyste, wie der Embryo jetzt bezeichnet wird, aus und schlüpft aktiv aus der *Zona pellucida* heraus (*hatching*) (Moore & Persaud, 2007).

Der Trophoblastanteil der geschlüpften Blastozyste adaptiert sich mit dem embryoblastären Pol an das Endometrium. Dieser noch instabile Kontakt der Blastozyste zum Endometrium wird als Apposition bezeichnet. Es kommt zum Kontakt der Mikrovilli des polarisierten Trophoblasten mit den Pinopodien des Endometriums (Schanz *et al.*, 2004).

An die Apposition schließt sich die Adhäsion an. Hier entsteht, vermittelt durch Oberflächenantigene, ein stabiler Kontakt zum maternalen Gewebe.

Nun beginnt die Invasion durch das endometriale Epithel bis in das uterine Stroma.

Aus den Trophoblastzellen bilden sich der innere Zytotrophoblast und der äußere, invasive Synzytiotrophoblast. Dieser lysiert die mütterliche Schleimhaut, so dass der Embryo in die Zona compacta des Endometriums invadieren kann (Maltaris *et al.*, 2008).

An der eigentlichen Implantation sind mütterliche sowie embryonale Gewebe beteiligt. Hier kommen neben Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren besonders Proteasen wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Gegenspielern *Tissue inhibitor of Matrix Metalloproteinases* (TIMPs) eine Bedeutung zu. Sie werden entweder durch den Embryo selbst oder durch die dezidualisierten endometrialen Stromazellen als Reaktion auf ihre Sekretionsprodukte wie z.B. Zytokine freigesetzt (Wang *et al.*, 2003; Curry & Osteen, 2003; Hess *et al.*, 2007).

Über Präimplantationsembryonen ist bekannt, dass sie selbst verschiedene Proteine exprimieren, um dem mütterlichen Körper ihre Präsenz anzuzeigen und vor allem ihre Einnistung in die Dezidua zu ermöglichen. Dieser komplexe und zeitlich auf das sog. Implantationsfenster limitierte Vorgang der regelrechten Interaktion zwischen Embryo und rezeptivem Endometrium wird multifaktoriell vermittelt. Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen kommt dabei eine wichtige Rolle zu (Chard, 1995; Tazuke & Giudice, 1996; Sharkey *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997, Jokimaa *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

Während der ersten Phase der Implantation wird der Substratbedarf des Embryos durch Diffusion aus dem endometrialen Gewebe gedeckt. Für die weitere erfolgreiche Etablierung der Schwangerschaft ist hierzu jedoch der Anschluss an das mütterliche Gefäßsystem unerlässlich (Krüssel, 2001).

Vermittelt durch angiogenetische Faktoren kommt es zur Ausbildung von Gefäßverbindungen. Der Synzytiotrophoblast wird durch Bildung von Vakuolen, die später zu größeren Lakunen fusionieren, schwammartig aufgelockert.

Die mütterlichen Kapillaren sind gestaut und zu Sinusoiden erweitert. Der Synzytiotrophoblast dringt in diese gestauten Gefäße vor, so dass mütterliches Blut in die Lakunen übertritt. Durch die weitere Invasion des Trophoblasten entstehen immer weitere Kontaktstellen zwischen den Lakunen und dem venösen und arteriellen Gefäßsystem der Mutter. Auf diese Weise bildet sich der uteroplazentare Kreislauf (Moore & Persaud, 2007).

#### 1.3 Der Sexualzyklus der Maus

Ein regelmäßiger Menstruationszyklus tritt außer beim Menschen lediglich bei höheren Primaten auf. Zwar zeigen auch andere weibliche Säugetiere, darunter die Maus, zyklische Veränderungen der weiblichen Geschlechtsorgane, die Gebärmutterschleimhaut wird jedoch nicht abgebaut und abgestoßen, es finden lediglich Umbauprozesse statt.

Daher wird für diese Vorgänge nicht der Begriff Menstruationszyklus verwendet, sondern Östrus-Zyklus.

Die Maus ist ein polyöstrisches Säugetier. Sofern nicht von einer Schwangerschaft unterbrochen, zeigt sie ca. alle 4-5 Tage Zeichen von Paarungsbereitschaft.

Der Sexualzyklus lässt sich in 5 Phasen einteilen: Diöstrus, Proöstrus, Östrus, Metöstrus-1 und Metöstrus-2 (Allen, 1922; Green *et al.*, 2007).

Das Endometrium der Maus zeigt während des Proösterus und Östrus seine maximale sekretorische Aktivität (Fuxe & Nilsson, 1963). Im Östrus erfolgt dann die Ovulation. Diese erfolgt wie beim Menschen spontan, unabhängig davon, ob eine Verpaarung stattgefunden hat oder nicht (Green *et al.*, 2007). Metöstrus-1 und Metöstrus-2 sind durch degenerative Prozesse charakterisiert. Das Endometrium zeigt deutliche Anzeichen der Zelldegeneration: der Zellverband des Epithels verliert seine Struktur, es bilden sich Vakuolen, Leukozyten wandern in die unteren Zellschichten ein. Diese

Veränderungen nehmen im Metöstrus-2 weiter zu, bis fast keine Zellwände mehr vorhanden und beinahe alle Epithelzellen verlorengegangen sind (Rietschel, 1929). Die endometrialen Drüsen zeigen in dieser Phase ein Minimum an Aktivität. Der Diöstrus stellt eine Ruhephase dar.

Grundlegender Faktor für die Regelmäßigkeit des Sexualzyklus ist bei der Maus wie beim Menschen die zyklische Aktivität des Hypothalamus. Über GnRH kommuniziert dieser mit dem Hypophysenvorderlappen, welcher dadurch getriggert FSH und LH ausschüttet, die wie beim Menschen im Ovar die Steroidhormonsynthese stimulieren und maßgeblich an der Ovulationsinduktion beteiligt sind. Die Entwicklung eines funktionstüchtigen Gelbkörpers findet, anders als beim Menschen, bei dem in jedem Zyklus ein Gelbkörper gebildet wird, bei der Maus nur nach erfolgter Verpaarung statt. Die Verpaarung führt zu einer Aktivierung des Hypothalamus, der die Sekretion von LH, einem Gonadotropin aus dem Vorderlappen der Hypophyse, stimuliert. Der funktionstüchtige Gelbkörper produziert P<sub>4</sub>, das wie auch beim Menschen für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft von entscheidender Bedeutung ist, und unterdrückt bei der Maus neue Sexualzyklen.

Findet keine Verpaarung statt, bleibt die Gelbkörperbildung aus, die Hormonspiegel fallen ab und ein neuer Zyklus beginnt (Green *et al.*, 2007).

#### 1.4 Die Befruchtung der Eizelle und die Implantation bei der Maus

Unmittelbar nach der Verpaarung entsteht in der Scheide der Maus ein Pfropf (*plug*), der 6–12h sichtbar bleibt. Dieser setzt sich hauptsächlich aus Bestandteilen der Samenflüssigkeit zusammen und verschließt die Scheide der begatteten Maus. Der Tag, an dem dieser *plug* nachweisbar ist, wird in der Versuchstierhaltung als Tag 0,5 *pc* festgelegt.

Die Eizelle der Maus ist vergleichbar zur menschlichen Eizelle bis zu 12h nach der Ovulation befruchtungsfähig.

Ebenso wie beim Menschen erfolgt bei der Maus die Befruchtung der Eizelle auch im ampullären Teil des Eileiters (Green *et al.*, 2007). Innerhalb des 1. Tages *pc* vollzieht sich die erste Zellteilung. Ab dem 2-Zellstadium beginnt der Mausembryo bereits mit RNA- und Proteinsynthese (Hamatani *et al.*, 2004). Im Abstand von je etwa 6h schließen sich weitere Zellteilungen an. Am 2. Tag *pc* entwickelt sich der Embryo im 16-Zellstadium zur Morula. Die Kompaktion findet kurz zuvor im 8-Zellstadium statt.

Am 3. Tag *pc* tritt die Morula in das Uteruslumen ein, wo sich etwa am Tag 3,5 *pc* die Blastozyste bildet. Das *hatching* findet etwa am 4. Tag *pc* statt.

Die geschlüpfte Blastozyste lagert sich am 4,5 Tag *pc* an das noch intakte Uterusepithel an. Als Reaktion auf die Implantation der Blastozyste bilden sich uterine Krypten aus und die endometrialen Stromazellen dezidualisieren.

An die Adhäsion schließt sich die Invasion an. Aus den Trophoblastzellen entsteht an der Adhäsionsstelle durch Zellvermehrung der Ektoplazentarconus. Dieser invadiert das Endometriumepithel und die Blastozyste wächst in das endometriale Stroma ein.

Sichtbare Implantationsstellen (*implantation sites*) bilden sich ca. ab dem 7,5 Tag *pc* aus (Afonso *et al.*, 1997; Schenkel, 1995).

## 1.5 Unerfüllter Kinderwunsch

In Deutschland gilt heute etwa jedes 7. Paar als ungewollt kinderlos (Sütterlin, 2009). Sterilität wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Krankheit definiert (World Health Organization, 2013). Ein Paar gilt dann als unfruchtbar, wenn es nach 2 Jahren regelmäßigem Geschlechtsverkehr ohne Kontrazeption zu keiner Schwangerschaft gekommen ist (WHO). Die ärztliche Hilfe zur Erfüllung des Kinderwunsches eines Paares mittels medizinischer Techniken wird als assistierte Reproduktion (ART) bezeichnet.

Zu möglichen Techniken zählen der Verkehr zum optimalen Zeitpunkt (VZO), die intrauterine Insemination (IUI), die *in vitro*-Fertilisierung (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).

Auch nach intensiven Bemühungen zur Verbesserung von Kulturbedingungen und Stimulationsprotokollen ist die Schwangerschaftsrate nach ART weiterhin unbefriedigend niedrig. Aktuellen Daten des Deutschen IVF-Registers (DIR) aus der letzten Erhebung im Jahre 2012 zufolge wurden unter idealen Bedingungen 37,28% der Frauen nach einer IVF und 31,56% nach einer ICSI tatsächlich schwanger (DIR 2012).

Ein Ansatz zur Verbesserung der Ergebnisse in der Sterilitätstherapie stellt die Erforschung der embryo-maternalen Kommunikation auf molekularer Ebene zur Aufdeckung der physiologischen Vorgänge vor und während der Implantation und das bessere Verständnis der Grundlagen dieser komplexen Prozesse dar.

Neue Untersuchungen an *in vitro* Kulturen von primären, menschlichen, dezidualisierten Endometriumzellen, verbunden mit einer Methode zur Imitation der Implantation mittels konditioniertem Trophoblastmedium (TCM) sowie Kokultur von Endometriumzellen und Trophoblast Explantaten aus Schwangerschaften des ersten Trimesters, gefolgt von Microarray mRNA Analysen, lieferten einen neuen Einblick in den zugrundeliegenden molekularen Prozess der Implantation beim Menschen (Popovici *et al.,* 2006; Hess *et al.,* 2007). In diesen Studien stellte sich die Protease Cathepsin S (CtsS) als eines der signifikant hochregulierten Gene dar.

## 1.6 Cathepsine (Cts)

Die große Familie der Proteasen fasst Enzyme zusammen, die in der Lage sind, Peptidbindungen durch Hydrolyse zu spalten. Beim Menschen sind bisher 703 verschiedene Proteasen bekannt, bei der Maus 723 (MEROPS Protease Datenbank http://merops.sanger.ac.uk/). Sie werden abhängig vom Rest ihres aktiven Zentrums in Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Metallo-, Asparagin-, Serin- und Threonin- sowie noch nicht klassifizierte Proteasen unterteilt (MEROPS Protease Datenbank http://merops.sanger.ac.uk/). Unterschieden werden weiterhin Endopeptidasen, die Proteine in der Mitte der Aminosäurensequenz eines Proteins spalten, und Exopeptidasen, die am N- oder C-terminalen Ende eines Proteins spalten.

Auch die Cts gehören zu dieser Gruppe. Der Ausdruck "Cathepsin" stammt aus dem Griechischen und bedeutet "verdauen".

Der Begriff wurde erstmals 1929 von Willstätter und Bamann eingeführt, die mit ihm eine Nonpepsin-Protease der Magenschleimhaut bezeichneten (Willstätter & Bamann, 1929). Insgesamt sind derzeit 15 verschiedene Cts beim Menschen bekannt (MEROPS Protease Datenbank http://merops.sanger.ac.uk/).

Während einige Cysteinproteasen ubiquitär vorkommen, zeigen andere ein strenges gewebs- und zellspezifisches Expressionsmuster (Turk *et al.*, 2001; Linnevers *et al.*, 1997). Ihre zum Teil sehr restriktive Lokalisation macht sie zu besonders interessanten Enzymen (Tabelle 1).

Cts	Lokalisation	Chromosom
А	ubiquitär	20q13.1
В	ubiquitär	8p23.1
С	ubiquitär	11q14.1-14.3
D	ubiquitär	11p15.5
Е	Lymphatisches Gewebe, Magenschleimhaut, Mikroglia	1q31
F	ubiquitär	11q13.2
G	Neutrophile Granulozyten, Monozyten	14q11.2
Н	ubiquitär	15q25.1
К	Osteoklasten	1q21
L	ubiquitär	9q21.33
0	ubiquitär	4q32.1
V	Thymusepithel, Hoden, Cornea	9q22.33
S	Antigenpräsentierende Zellen (APC)	1q21
W	CD8 <sup>+</sup> T- Zellen, NK- Zellen	11q13.1
Х	ubiquitär	20q13

 
 Tabelle 1:
 Auflistung der beim Menschen bekannten Cts mit Angabe der chromosomalen Lokalisation sowie der Lokalisation im Gewebe

#### 1.6.1 Cathepsin S

CtsS ist eine hochpotente, einkettige Endoprotease, die zur Papain Superfamilie C1 gehört. Das CtsS Gen ist auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert und wurde erstmals 1975 beschrieben (Turnsek *et al.*, 1975). Sein aktives Zentrum enthält die katalytische Diade Cystein<sup>25</sup> und Histidin<sup>151</sup> entsprechend der Nummerierung im Papainmolekül.

CtsS weist die Besonderheit auf, dass es auch im neutralen pH-Bereich stabil und aktiv ist (Kirschke *et al.*, 1989).

Während das Aktivitätsprofil der meisten Cysteinproteasen in einem pH-Bereich von ca. 4-5 liegt, behält CtsS seine Stabilität und katalytische Aktivität in einem pH-Bereich von pH 5,0-7,5 mit einem Optimum bei pH 6,5 (Brömme *et al.,* 1993). Durch diese katalytische Aktivität außerhalb der Lysosomen wird CtsS eine Bedeutung bei der Tumorausbreitung und dem Abbau von extrazellulärer Matrix, wie dies auch bei der Implantation obligat notwendig ist, zugesprochen.

Die Expression von CtsS wird beim Menschen durch Zytokine, wie z.B. Interleukin(IL)-1 $\beta$  (Sukhova *et al.*, 1998) und Interferon(IFN)- $\gamma$  (Schwarz *et al.*, 2002; Storm van's Gravesande *et al.*, 2002), induziert.

CtsS wird in den Lysosomen von professionellen, antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen hoch exprimiert (Riese *et al.*, 1996 und 1998; Plüger *et al.*, 2002; Bania *et al.*, 2003).

Seine Funktion im Rahmen der Immunantwort lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Die professionellen APCs als Grundsäulen der adaptiven Immunantwort haben als Hauptfunktion die Präsentation von Antigenen. Diese beinhalten größtenteils Bruchstücke körperfremder Substanzen. Sie werden einer bestimmten Klasse von Lymphozyten, den T-Zellen, dargeboten. Vorraussetzung dafür ist, dass die Antigene im Vorgang der sog. Antigenprozessierung in kleine Peptidfragmente gespalten werden. Danach werden diese Antigenfragmente an Moleküle des *major histocompatibility complex* (MHC) gebunden (Paul, 1993). Es werden MHC-I und MHC-II-Moleküle unterschieden.

Während MHC-I-Moleküle zelleigene Antigene aufnehmen, nehmen MHC-II-Moleküle, welche lediglich von APCs exprimiert werden (Löffler & Petrides, 2002), Peptide aus exogen stammenden Antigenen auf. An die Zelloberfläche transportiert und den CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen präsentiert, setzen sie die notwendigen Abwehrmechanismen in Gang (Jackson & Peterson, 1993; Wolf & Ploegh, 1995). Hierfür ist die Aufnahme einer sog. invarianten Kette notwendig. Diese invariante Kette unterstützt als Chaperon die korrekte Faltung des MHC-II-Moleküls (Romagnoli & Germain, 1994) und verhindert durch eine Blockade der Bindungsfurche die Bindung von partiell gefalteten Proteinen (Roche & Cresswell, 1991; Busch *et al.*, 1996).

Die gebundenen MHC-II-Moleküle werden zum sog. Beladungskompartiment dirigiert (Geuze, 1998; Pieters et al., 1993). Dort angekommen muss die invariante Kette über die Teilstücke lip22 und lip10 zum sog. class-II-associated invariant chain peptide (CLIP-) Fragment degradiert werden. Durch Anlagerung des MHC-II-Beladungskofaktors human leukocyte antigen-DM (HLA-DM) wird das CLIP-Fragment verdrängt (Afonso et al., 1999; Kropshofer et al., 1999) und die Aufnahme von Antigenfragmenten ermöglicht, welche den CD4<sup>+</sup>T-Zellen präsentiert werden können. Diese Antigenpräsentation über den MHC-II-Komplex wird erst durch CtsS ermöglicht, da CtsS die Protease ist, die das Teilstück lip 10 zum CLIP-Fragment spaltet (Nakagawa & Rudensky, 1999; Villadangos & Ploegh, 2000; Villadangos, 2001). Das CtsS im Prozess der Immunantwort eine Schlüsselrolle zukommt, belegen auch Untersuchungen an CtsS knock-out Mäusen, welche eine deutlich eingeschränkte Immunantwort zeigen (Shi et al., 1999). Interessant ist diesbezüglich auch, dass die CtsS-Aktivität durch Zytokine, wie IFN-y, IFN regulatory factor 1, Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha/\beta$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , stimuliert werden kann (Cheng *et al.*, 2006; Schwarz et al., 2002; Storm van's Gravesande et al., 2002).

Auch im komplizierten Prozess der Angiogenese scheint CtsS eine wichtige Bedeutung zu haben. Shi und Mitarbeiter haben in einer Studie an humanen und murinen Endothelzellen sowie an CtsS *knock-out* Mäusen den Einfluss von CtsS auf die Angiogenese untersucht. Hier zeigte sich, dass eine Stimulation von Endothelzellen sowohl humanen als auch murinen Ursprungs mit inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren die Expression von CtsS und damit die Bildung von Gefäßen stimuliert. Hingegen führte die Inhibition von CtsS zu einer verminderten Bildung kleiner Gefäße sowie zu einer Verschlechterung der Zellinvasion. Endothelzellen von CtsS *knock-out* Mäusen zeigten eine reduzierte kollagenolytische Aktivität, eine schlechtere Invasion der Kollagen Typen I und IV sowie eine fehlerhafte Entwicklung von kleinen Gefäßen im Zuge des Wundheilungsprozesses. Dies unterstützt die These, dass CtsS eine essentielle angiogenetische Funktion einnimmt, die auch von grundlegender Bedeutung bei der Implantation des Embryos in das maternale Stroma des Uterus sein könnte (Shi *et al.*, 2003).

#### 1.6.2 Cathepsin S im Reproduktionstrakt von Säugern

Im Reproduktionstrakt des Menschen haben Jokimaa und Mitarbeiter in einer Studie die Gewebeverteilung von CtsB, H, K, L und S in der Proliferations- und Sekretionsphase im humanen Endometrium untersucht (Jokimaa *et al.*, 2001). In allen Proben war mRNA der untersuchten Proteasen nachweisbar. Zu bemerken ist, dass die Konzentration von CtsS mRNA stets deutlich niedriger war als die der anderen Cts. Des Weiteren ist zu

erwähnen, dass die Konzentrationen von CtsH und K mRNA in der Sekretionsphase im Vergleich zur Proliferationsphase geringer war, während sich die Konzentration von CtsB mRNA umgekehrt verhielt. Die Konzentrationen von CtsL und CtsS mRNA blieben hingegen während des gesamten Menstrutionszyklus unverändert.

Im Rahmen dieser Studie wurden auch immunhistochemische Untersuchungen an humanen Endometriumproben durchgeführt. Diese zeigten eine hohe Immunreaktivität des Drüsenendothels für CtsH, K, L und S in der Sekretionsphase. Die höchste Immunreaktivität für CtsB, H, L und S jedoch wurde am Oberflächenepithel nachgewiesen (Jokimaa *et al.*, 2001).

Dies lässt auch auf eine Beteiligung der Cts an der regelrechten Entwicklung des Endometriums, vor allem an der Matrixdegeneration im Rahmen der kontrollierten Apoptose im Menstruationszyklus, schließen.

Am Mausmodel konnten Afonso und Mitarbeiter zeigen, dass CtsB, D und L während der Implantation bei der Maus in Trophoblastzellen hochreguliert sind. Die Injektion eines synthetischen CtsB und L Inhibitors (E-64) in den Reproduktionstrakt schwangerer Mäuse verhindert im Stadium der Blastozystenaggregation in hoher Dosis die Implantation komplett und führt in niedriger Dosis zu einer verringerten Dezidualisierung und zu verkrüppelten Embryonen (Afonso *et al.*, 1997). Dies lässt vermuten, dass die Cts-Proteasen essentielle Faktoren für eine erfolgreiche Implantation sind.

## 1.7 Cystatine (Cst)

Als Cst wurden ursprünglich aus Hühnereiweiß isolierte Moleküle bezeichnet, welche die Aktivität von Papain hemmen (Fossum & Whitaker, 1968; Barrett, 1981).

Der Begriff "Cystatin" leitet sich aus der Zusammensetzung von "Cys" für Cysteinprotease, dem Griechischen "stasis" - "Stillstand" - und "In" für – Inhibitor - ab.

Cst sind einkettige Polypeptide und werden in drei Familien aufgeteilt (Tabelle 2). Der ersten Familie gehören die Cst A und B an, die auch Stefine gennannt werden und intrazellulär vorkommen. Zu der zweiten Familie gehören die extrazellulären Cst C, D, F, S, SN und SA. Zur dritten Familie gehören die intravasalen Kininogene (Turk & Bode, 1991).

Die Cst der 2. Gruppe gelten als die Hauptregler der Aktivität von Cystein-Proteasen (Turk *et al.*, 1995) und zeichnen sich durch große Stabilität gegenüber hohen Temperaturen bis zu 100°C und gegenüber pH-Änderungen von pH 2-12 aus (Otto & Schirmeister, 1997).

Gruppe	Beschreibung	Cst	Chromosom	Lokalisation
Typ 1 Cystatine/ Stefine	Polypeptide (~ 100 AS), keine Disulfidbrücken, keine Kohlenhydrat- seitenketten	A/ Stefin A	3q21	intrazellulär, Hautzellen, Epithelzellen, Blutzellen, Körperflüssigkeiten
		B/ Stefin B	21q22.3	intrazellulär, versch. Zellen (weit verbreitet), Körperflüssigkeiten
	Polypeptide (~ 120 AS), 2 Disulfidbrücken, Signalpeptid für das extrazelluläre Targeting	С	20p11.2	extrazellulär, versch. Zellen (ubiquitär), alle Körperflüssigkeiten
		D	20p11.21	extrazellulär
		E/M	11q13	extrazellulär, Epithelzellen
Typ 2 Cystatine		F	20p11.21	extrazellulär, Hämatopeotische Zellen, Blutzellen des Immunsystems
		S	20p11.2	extrazellulär, Körperflüssigkeiten
		SN	20p11.2	extrazellulär, Körperflüssigkeiten
		SA	20p11.2	extrazellulär, Körperflüssigkeiten
Typ 3 Cystatine	Proteine mit hoher molekularer Masse, 3 hintereinander wiederholte Typ 2- ähnliche Cystatin Domänen	H- Kininogen L-Kininogen	3q21	intravaskulär, Blutplasma, Leber

Tabelle 2: Übersicht über die Cst des Menschen

## 1.7.1 Cystatin C

CstC wurde erstmals 1961 im Liquor beschrieben (Clausen *et al.*, 1961). Da es in der Elektrophorese noch hinter die gamma-Globuline wanderte, erhielt es zunächst den Namen post-gamma Globulin (Butler & Flynn, 1961).

Als Inhibitor von Cystein-Proteasen erhielt es 1985 den Namen CstC (Grubb & Löfberg, 1985). CstC ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 13,3kDa und besteht aus 120 Aminosäuren (AS) (Grubb & Löfberg, 1982). Das humane CstC Gen ist auf Chromosom 20p11.2 lokalisiert (MEROPS Protease Datenbank http://merops.sanger.ac.uk/).

Es gehört in die Familie der Cystein-Proteinase-Inhibitoren. Dies bedeutet, es hemmt Proteasen der Gruppe C1, unter anderem CtsB, H, L und S (Leonardi *et al.*, 1996; Abrahamson *et al.*, 2003). CstC weist gegenüber den anderen Cst die Besonderheit auf, dass es in hohem Maße sezerniert wird (Abrahamson *et al.*, 2003). Es wird von den meisten kernhaltigen Zellen in relativ konstanter Menge produziert (Abrahamson *et al.*, 1990).

## 1.7.2 Cystatin C im Reproduktionstrakt von Säugern

Die Datensammlung über CstC im humanen weiblichen Reproduktionstrakt ist bisher noch nicht sehr umfangreich. Es ist jedoch anzunehmen, dass CstC im Verlauf der Schwangerschaft eine Bedeutung zukommt (Nakanishi *et al.*, 2005).

So konnten Nakanishi und Mitarbeiter CstC immunhistochemisch am schwangeren Uterus im Zytoplasma dezidualisierter Endometriumzellen, im Trophoblasten, im endometrialen Oberflächenepithel und im Epithel der endometrialen Drüsen nachweisen (Nakanishi *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Studie wurden außerdem CstC Werte im Serum von Frauen mit habitueller Abortneigung sowie von Frauen mit normalem Schwangerschaftsverlauf untersucht. Bei Frauen mit habitueller Abortneigung zeigten sich deutlich niedrigere CstC Serumspiegel als in der Kontrollgruppe. Ein möglicher Erklärungsansatz wird von den Autoren darin gesehen, dass im Gewebe gebildetes CstC als extrazelluläres Protein nicht zwingend nur am Ort seiner Bildung nachweisbar ist sondern in die Peripherie freigesetzt wird (Nakanishi *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Ungleichgewicht von Protease und Inhibitor nicht nur, wie in der Hypothese der vorliegenden Arbeit formuliert, die erfolgreiche Implantation sondern ebenfalls den erfolgreichen Verlauf der Frühschwangerschaft gefährdet.

Die Datenlage zur CstC Expression im Reproduktionssystem der Maus ist hingegen detaillierter.

So lässt sich CstC immunhistochemisch im Uterus der Maus nachweisen. Im nichtschwangeren Uterus zeigt sich eine starke Anfärbung der Drüsen und des Endothels (Afonso *et al.*, 1997). Dieses legt die Hypothese nahe, dass es in das Uteruslumen sezerniert wird.

Am schwangeren Uterus der Maus konnten Afonso und Mitarbeiter zeigen, dass CstC während der Dezidualisation besonders stark exprimiert wird und dass im Zeitrahmen des Implantationsfensters das Protein vorwiegend in der dem Embryo benachbarten Dezidua, nicht aber in den invasiven Trophoblastzellen lokalisiert ist.

Ebenfalls lässt sich in der apoptotischen Dezidua nahe dem invadierenden Embryo eine Hochregulation von CstC nachweisen. Im Trophoblast selbst ließ sich in dieser Studie CstC erst mit dem Ende der invasiven Periode am Tag 13,5 nachweisen (Alfonso *et al.*, 1997). Am Model der Ratte konnte mittels *Northern blot* Analyse gezeigt werden, dass CstC am Tag 4 *pc*, kurz bevor eine eventuelle Implantation stattfinden würde, im Epithel der endometrialen Drüsen hoch exprimiert wird und am Tag 5 *pc*, an dem bei der Ratte die Anlagerung der Blastozyste an das Endometrium erfolgt, zurückgeht. Am Tag 6 *pc* zeigte sich eine Abnahme der CstC Expression rund um den invadierenden Embryo, während das die Implantationstelle umgebende endometriale Stroma eine im Verhältnis stärkere Expression zeigte (Quinn *et al.*, 2006). In diese Studie zeigte sich vor Beginn der Implantation. Dies deutet auch darauf hin, dass CstC mit daran beteiligt ist, das Endometrium in einen rezeptiven Zustand zu überführen und damit die Implantation einer befruchteten Blastozyste zu ermöglichen.

#### 1.7.3 Cystatin F

CstF ist ein Typ II Cst, das aufgrund seiner Expression in Zellen des Immunsystems auch als Leukocystatin bezeichnet wird. Beschrieben wurde es erstmals 1998. Es zeigte sich, dass CstF von dendritischen Zellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert wird (Ni *et al.*, 1998; Halfon *et al.*, 1998; Obata-Onai *et al.*, 2002). Humanes CstF besteht aus 126 AS und hat eine molekulare Masse von 14,5Da. Es wird als Dimer sezerniert, das zur Aktivierung zunächst zu einer monomeren Form reduziert werden muss (Cappello *et al.*, 2004; Langerholc *et al.*, 2005). Diese aktivierte Form inhibiert besonders potent CtsL, V, K und F, aber auch CtsS und H, während CtsB, C und X nicht inhibiert werden (Langerholc *et al.*, 2005; Ni *et al.*, 1998). Demzufolge ist CstF ein vergleichsweise spezifischer Inhibitor.

#### 1.7.4 Cystatin F im Reproduktionstrakt des Menschen und der Maus

Über die Expression von CstF im Reproduktionstrakt von Mensch und Maus liegen bis zum heutigen Zeitpunkt keine Daten vor. Dies scheint die erste Arbeit zu sein, welche sich mit Cst F im Rahmen des Peri- und Implantationsgeschehen befasst.

#### 1.8 Zytokine

Der Begriff Zytokin stammt aus dem Griechischen und bedeutet "sich zwischen den Zellen bewegend".

Zytokine sind kleine Proteine (ca. 15-25kDa), die im Körper durch verschiedene Zellen freigesetzt werden. Sie fungieren als Mediatoren, die als Reaktion auf bestimmte äußere Stimuli von kernhaltigen Zellen freigesetzt werden. Zytokine können ihre Wirkungen autokrin, parakrin und zum Teil auch endokrin über spezifische Rezeptoren vermitteln (Löffler & Petrides, 2002; Loppnow, 2001).

Strukturell bestehen die Zytokine aus 4 Hauptfamilien:  $\alpha$ -helikale-,  $\beta$ -Faltblatt-, Mosaikstruktur- und Kurzketten-a/b-Zytokine. Neben dieser Klassifikation besteht auch die Möglichkeit, die Zytokine anhand ihrer Funktion in IFN, IL, Hämatopoetine, TNF, Kolonie-stimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren, transformierende Wachstumsfaktoren, Chemokine und Virokine zu klassifizieren (Loppnow, 2001) (Tabelle 3). Eine weitere Möglichkeit der Klassifikation bildet die Einteilung nach Rezeptortypen.

Familie	Funktion	
	Inhibition der Virusreplikation in virusinfizierten Zellen	
IEN	Immunregulation	
	Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen	
	Antiproliferative Aktivität	
	Informationsaustausch zwischen Leukozyten	
IL	Stimulation der Lymphozytenproliferation	
	Induktion von Fieber	
	Stimulation der Produktion erythroider Zellen	
Hämatopoetine	B-Zell-Aktivierung	
rianatopoetine	T-Zell-Proliferation	
	Differenzierung und Wachstum verschiedenen Zellen	
	Immunregulation	
	Regulierung der Lymphknotenentwicklung	
TNF	Antitumorwirkung	
	Apoptoseauslösung	
	Kostimulation von B-und T-Zellen	
Wachstumsfaktoren	Stimulation der Produktion nicht hämatopoetischer Zellen	
Chemokine	Chemotaxis	
Virokine	Viruskodierte Zytokinhomologe	

Tabelle 3: Übersicht über die verschieden Gruppen von Zytokinen und deren Funktionen (modifiziert nach Janeway *et al.*, 2002)

## 1.8.1 Interleukine (IL)

Die IL bilden eine Untergruppe der Zytokine. Sie wurden erstmals in Blutzellen nachgewiesen und besitzen eine Reihe von Aufgaben im Rahmen von Entzündungsreaktionen, Immunmodulation, Hämatopoese und Apoptose. Sie werden von verschiedensten immunologisch aktiven Zellen nach Stimulation freigesetzt und entfalten Ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische Rezeptoren an der Oberfläche immunologisch aktiver Zellen (Modrow *et al.*, 2010).

## 1.8.2 Interleukin-6

IL-6 wurde erstmals 1987 als Hepatozyten-stimulierender Faktor und als Hauptmediator der Akut-Phase Proteinsynthese in Leberzellen identifiziert (Andus *et al.*, 1987). Das IL-6 Gen ist auf Chromosom 7p21 lokalisiert (Bowcock *et al.*, 1988).

IL-6 ist ein Phospho-Glykoprotein mit einer atomaren Masse von 23-30kDa, bestehend aus 184 AS. Gebildet wird es von Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen, aber auch von Zellen, die nicht dem Immunsystem zuzuordnen sind, z.B. von Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten und Muskelzellen (Papanicolaou *et al.*, 1998).

Der Signaltransduktionsmechanismus von IL-6 läuft über das transmembrane Protein gp 130 und daran gekoppelte Thyrosinkinasen. Die Bindung von IL-6 führt zu einer Dimerisierung des Zytokinrezeptors, welcher normalerweise in Form von Monomeren an der Zelloberfläche vorliegt. Die Dimerisierung des Rezeptors bewirkt, dass auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors zwei Thyrosinkinasen der Janus-Familie - auch als Janus-Kinasen (JAKs) bezeichnet - binden. Diese Bindung bewirkt eine Annäherung der beiden JAKs. Dies führt zu einer Transphosphorylierung der JAKs. Die phosphorylierten JAKs bewirken, dass Bindungsstellen für Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (signal transducer and activator of transcription protein, STAT-Proteine) entstehen. Sobald STAT-Proteine an diese Stellen binden, werden sie durch die JAKs phosphoryliert. Die phosphorylierten STAT-Proteine lösen sich vom Rezeptor und jeweils zwei STAT-Proteine lagern sich auf Grund der Wechselwirkungen ihrer Src-homology 2- (SH2-) Domänen zu Homo- und Heterodimeren zusammen. Diese Dimere können nun in den Zellkern transportiert werden, wo sie zusammen mit Hilfsproteinen an spezifische STAT-Bindungssequenzen der DNA binden und so zur Induktion bestimmter Gene führen.

IL-6 gehört zusammen mit IL-11, *oncostatin M*, *leukemia inhibitory factor*, *ciliary neurotrophic factor*, *cardiotrophin-1* und *cardiotrophin-like cytokine* zu den IL-6-Typ-Zytokinen oder auch 4-Helix-Bündel-Zytokinen. Diese besitzen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Zusammen mit IL-2, IL-3, IL-4, IL-7 und IL-9 spielt IL-6 auch eine Rolle im Rahmen der Immunmodulation (Löffler & Petrides, 2002; Xing *et al.*, 1998).

#### 1.8.3 Interleukin-6 im Reproduktionssystem von Säugern

Beim Menschen wurde die Wirkung von IL-6 auf den Uterus - speziell auf das Endometrium - bereits in einigen Studien untersucht.

Tabibazadeh und Sun konnten IL-6 via IHC und Reverse Transkriptase(RT)-PCR in Epithelzellen und in Stromazellen des humanen Endometriums nachweisen, wobei die Konzentration in den Stromazellen deutlich über der der Epithelzellen lag (Tabibzadeh & Sun, 1992).

Es zeigte sich, dass IL-6 im Endometrium zyklusabhängig exprimiert wird.

Im Verlauf des Menstruationszyklus lassen sich allmählich steigende IL-6 Konzentrationen im Endometrium nachweisen, von Tag 1-14 der Proliferationsphase über die frühe Sekretionsphase von Tag 15-19, in deren Zeitfenster auch die Implantation liegen würde, bis zur mittleren Sekretionsphase von Tag 20-24. Maximalwerte werden in der späten Sekretionsphase an den Tagen 25-28, charakterisiert durch die Vorbereitung auf die Menstruation, erreicht (von Wolff et al., 2002). Diese Ergebnisse auf mRNA-Ebene konnten auch auf Proteinebene durch immunhistochemische Untersuchungen validiert werden. Hier steigerte sich die Anfärbbarkeit endometrialer Drüsen und Stromazellen Beginn vom des Menstruationszyklus bis zu einem Maximum am 5. postovulatorischen Tag, an dem sich neben einer Färbung des Endothels auch noch eine Färbung des Zytoplasmas sowie der sekretorischen Produkte im Drüsenlumen zeigte (Tabibzadeh et al., 1995). Angesichts dieser Daten besteht Grund zu der Vermutung, dass IL-6 für die Implantation und die erfolgreiche Etablierung der Schwangerschaft notwendig ist und auch am Prozess der Menstruation beteiligt sein könnte.

Aber nicht nur auf der mütterlichen Seite sondern auch auf der Seite des Embryos scheinen Zytokine für eine erfolgreiche Implantation von Bedeutung zu sein.

Sharkey und Mitarbeiter konnten an humanen Präimplantationsembryonen ab dem Blastozystenstadium sowohl die Expression von IL-6 als auch des IL-6-Rezeptors nachweisen. In früheren Entwicklungsstufen des Embryos jedoch ließ sich weder IL-6 noch dessen Rezeptor nachweisen. Dies lässt vermuten, dass der Embryo zu diesem Zeitpunkt noch nicht dazu in der Lage ist, IL-6 zu sezernieren oder auf IL-6 als Botenstoff zu reagieren (Sharkey *et al.*, 1995; Sharkey, 1998).

Auch in Präimplantationsembryonen der Maus ist eine IL-6 Expression nachweisbar. Diese ist jedoch nicht wie beim Menschen erst ab dem Blastozystenstadium sondern bereits ab dem 8-Zellstadium der Fall (Gerwin *et al.*, 1995; Rothstein *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1990). Die frühe IL-6 Expression stärkt die These, dass embryonalem IL-6 eine Funktion im Rahmen der erfolgreichen Implantation zukommt.

Auch die Untersuchungen an maternalem Gewebe unterstützen die Hypothese, dass IL-6 eine Schlüsselrolle im Rahmen der Implantation zuzukommen scheint.

So exprimieren aus Mausuteri isolierte Epithelzellen IL-6. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass diese Epithelzellen, wenn sie kultiviert werden, zu Beginn der Kultivierung kaum oder nur sehr geringe IL-6 Expression zeigen, jedoch nach einer Kultivierung von 4 Tagen deutlich höhere IL-6 Expression aufweisen (Kover *et al.*, 1995).

Die intrauterine Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  wird durch E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> kontrolliert (De *et al.*, 1992).

Während der gesamten Schwangerschaft lässt sich IL-6 im Uterus der Maus nachweisen. Es erreicht nach einem Konzentrationsanstieg an den Tagen 1 und 2, der als inflammatorische Reaktion auf die Verpaarung interpretiert werden kann, an den Tagen 3-9 der Schwangerschaft besonders hohe Konzentrationen mit Maximalwerten an den Tagen 5 und 6 (De *et al.*, 1992; De *et al.*, 1993). Dieser Anstieg der Expression kurz nach der Implantation der Blastozyste, die am Tag 4 stattfindet, legt nahe, dass IL-6 eine Funktion bei der Etablierung einer Schwangerschaft zukommt, indem es zusammen mit anderen Faktoren das Endometrium in ein rezeptives Stadium bringt oder auch direkt am Prozess der Implantation beteiligt ist.

Im weiteren Verlauf der Etablierung der Schwangerschaft konnten Motro und Mitarbeiter durch *in situ* Hybridisierung zeigen, dass IL-6 im Rahmen von angiogenetischen Prozessen der maternalen Dezidua an den Tagen 8,5 und 9,5 *pc* von Endothelzellen exprimiert wird. Eine maximale Expression zeigt sich hier am Tag 9,5 *pc*. Ebenfalls ist zu erwähnen, dass sich in Proben der Tage 10,5 und 11,5 *pc* - in späteren Stadien der Frühschwangerschaft - in der Dezidua keine nennenswerte Hybridisierung mehr zeigen ließ (Motro *et al.*, 1990). So scheint IL-6 in diesem angiogenetischen Prozess nicht nur ein lokales sondern auch ein streng temporäres Expressionsfenster zu haben. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IL-6 einer der für die Entstehung und den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft notwendigen Faktoren zu sein scheint, wobei bis heute der genaue Wirkungsmechanismus noch unbekannt ist.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Expression von CtsS und seinen Inhibitoren CstC und CstF im Zusammenhang mit der Implantation, d.h. sowohl im Präimplantationsembryo als auch im Endometrium, durchgeführt.

Zusätzlich wurden Präimplantationsembryonen auf die Expression des Zytokins IL-6 als Aktivator für maternales CtsS untersucht.

Es galt die Hypothese zu prüfen, dass CtsS und seine Gegenspieler CstC und CstF eine essentielle Bedeutung im Zusammenhang mit der erfolgreichen Implantation haben. Potentiell kamen folgende Wirkmechanismen in Frage:

- Der Präimplantationsembryo synthetisiert CtsS. Dieses führt an der Implantationsstelle zur Matrixdegeneration und bereitet durch eine Modulation der immunologischen Situation des Endometriums dieses für eine Implantation vor.
- 2. Das Endometrium selber synthetisiert ohne die Vermittlung durch den Präimplantationsembryo CtsS, um die embryonale Implantation zu fördern.
- 3. Der Präimplantationsembryo synthetisiert IL-6 als parakrinen Faktor, der die Synthese von CtsS im Endometrium aktiviert.
- Das Endometrium synthetisiert die Proteaseinhibitoren CstC und/oder CstF, um die Implantation zu kontrollieren und eine überschieβende Invasion zu verhindern.
- 5. Die untersuchten Proteine werden im nicht schwangeren Endometrium und in der Dezidua vor allem von immunkompetenten Zellpopulationen exprimiert.

Aus ethischen Gründen und auf Grund der gesetzlichen Lage in Deutschland, welche nach § 2 des Embryonenschutzgesetzes die Verwendung extrakorporal erzeugter oder einer Frau vor Abschluss der Einnistung in die Gebärmutter entnommener menschlicher Embryonen zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck verbietet, wurde für die Durchführung der Untersuchungen das Modell der Maus gewählt.

## 2 Material und Methoden

Zur genauen Übersicht über die Eigenleistung der Doktorrandin, die Leistungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe (AG) sowie zur Abgrenzung des durch die AG veröffentlichten Projektes siehe Tabelle 15.

## 2.1 Versuchstiere

Die Aufzucht sowie die Superovulation der Mäuse wurde in Zusammenarbeit mit der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Leitung Herr PD Dr. rer. nat. Sager) gemäß den gültigen Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die Tierversuche wurden unter der Leitung von Herrn Dr. rer. nat. J. Hirchenhain unter der Projektnummer O17/99 durchgeführt. Der Fachkundenachweis gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde dazu im Jahr 2006 erworben.

Als Versuchstiere für diese Studie wurden weibliche B6C3F1 Mäuse mit einem durchschnittlichen Alter von 6-8 Wochen ausgewählt. Diese Mäuse wurden bei konstantem Luftdruck, Luftfeuchtigkeit und Temperaturen von 22-24°C unter einem regelmäßigen 12h Tag-Nacht-Rhythmus gemäß den Tierschutzrichtlinien gehalten. Alle Tiere haben als Basisernährung Pellets (Altromin Haltungsfutter für Mäuse und Ratten) erhalten und Trinkwasser der Stadt Düsseldorf *ad libitum*.

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale (*i.p.*) Injektion von 10IU *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) superovuliert. Nach 48h erfolgte die Induktion der Ovulation durch *i.p.* Injektion von 10IU humanem Choriongonadotropin (hCG) (Sigma- Aldrich) und die Verpaarung mit 12 Wochen alten fertilen männlichen Mäusen der gleichen Linie. Wobei je ein Männchen mit zwei Weibchen über Nacht zusammengesetzt wurde.

Die erfolgreiche Verpaarung wurde durch das Vorhandensein eines vaginalen Propfens (*plugs*) am nächsten Morgen bestätigt.

## 2.2 Gewinnung der Blastozysten

Die verpaarten Mäuse wurden am Tag 3,5 *pc* nach Betäubung mit Äther durch zervikale Dislokation getötet, um Blastozysten zu gewinnen.

Die Blastozyste ist das Stadium der Embryonalentwicklung, das, wie in der Einleitung beschrieben, unmittelbar vor der Einnistung in der Gebärmutter auftritt.

Nach Entnahme der Uteri wurden die Embryonen unter mikroskopischer Kontrolle mittels einer Denudationspipette 140µm (Reproline medical GmbH, Rheinbach, Deutschland) mit auf 37°C erwärmtem IVF-Medium (Cleavage Medium, COOK Medical, Limerick, Irland) herausgespült.

Die Blastozysten wurden mittels einer Pasteur Pipette (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) umgelagert und in einem Tropfen IVF-Medium unter Öl (Reproline Medical GmbH) vorübergehend im Inkubator bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> gelagert und schnellstmöglich ohne vorherige RNA-Isolation einzeln sowie auch als *pool* aus je 3 Blastozysten in die vorbereiteten Reverse-Transkriptions(RT)-Reaktionen (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) überführt. Durch das Zusammenfassen von 3 Blastozysten zu einem *pool* wird die mRNA-Konzentration im Vergleich zu einzelnen Blastozysten deutlich erhöht.

## 2.3 Reverse Transkription (RT)

Die RT dient dazu, aus einzelsträngiger RNA, die als Matrize fungiert, durch eine RNAabhängige DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang (cDNA) zu synthetisieren.

Die RNA-abhängige DNA-Polymerase wird daher auch als Reverse Transkriptase bezeichnet. Die cDNA wird für die Durchführung der sich anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) benötigt, da die verwendete Taq-Polymerase einzelsträngige RNA nicht als Matrize erkennen kann.

Zur Durchführung der RT wurde für jeden Embryo ein 18,2µl RT Mastermix vorbereitet (Tabelle 4).

Konzentration	Agens	Hersteller
1×	RT-PCR-Puffer	
2,5mM	MgCl <sub>2</sub>	
1mM	dNTP Blend	
10mM	DTT	
1,25mM	oligo d(T) <sub>16</sub>	(alles GeneAmp® RNA PCR Reagent Kit, Applied
		Biosystems, Foster City, CA, USA)
	DEPC-dH <sub>2</sub> O	

Tabelle 4: Dargestellt ist der RT-Reaktionsansatz unter Angabe der Endkonzentration

Der Mastermix wurde in Reaktionsgefäße (Biozym Scientific GmbH) verteilt und bis zu seiner Verwendung bei –20°C eingefroren.

Die Embryonen wurden jeweils einzeln mit 1µl Medium in die Reaktionsansätze verteilt.

Die Proben wurden in einem Biometra T-Gradient (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) für 1min auf 99°C zur Denaturierung der Proteine erhitzt, gleich danach auf 4°C abgekühlt und bis zur Zugabe der Enzyme auf Eis gelagert.

Es wurden jeweils 10U Ribonuklease (RNAse) Inhibitor und 15U MultiScribe Reverse Transcriptase pro Reaktion hinzugegeben (beides Applied Biosystems). Die RT wurde wie entsprechend des in Tabelle 5 aufgezeigten Zyklus durchgeführt.

Temperatur	Zeit
25°C	10min
42°C	30min
99°C	5min
4°C	~

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt den bei der RT verwendeten Zyklus

Als Negativkontrolle wurde 1µl des oben genannten IVF-Mediums zu dem RT-Reaktionsansatz gegeben, als Positivkontrolle diente aus Uteri isolierte cDNA. Die Organe wurden ebenfalls aus weiblichen Mäusen des Stammes C6B3F1 entnommen und die RNA nach der von Chomczynski & Sacchi beschriebenen Methode isoliert (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Nach erfolgter Reaktion wurde in jedes Gefäß  $30\mu$ l Diethylpyrocarbonat(DEPC)-dH<sub>2</sub>O gegeben und die cDNA bei – $20^{\circ}$ C bis zur Durchführung der PCR gelagert.

## 2.4 Primer

Die mRNA Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden der *GenBank National Centre for Biotechnologie Information (NCBI)* des *National Institute of Health (NIH)* entnommen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe des Programms: OLIGO 4.1 Primer Analysis Software (National Bioscience, Plymouth, MN; USA) zusammengestellt. Produziert wurden sie durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

Die Primer wurden so gewählt, dass diese Intron-Exon Grenzen überschreiten, um sicherzustellen, dass das Amplikon von der entsprechenden cDNA und nicht aus genomischer DNA stammt.

Ferner sind sie mindestens 17 Basenpaare (bp) lang, haben einen C/G-Gehalt von 40-60% und keine Dimere oder Haarnadelstrukturen gebildet (Tabelle 6).

Obwohl die gewählte Methode mit zwei verschachtelten Primer-Paaren bereits eine hohe Spezifität für die amplifizierte cDNA birgt, wurde die Identität der Amplifikate durch eine Sequenzanalyse, welche durch das Biologisch-Medizinschen-Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt wurde, verifiziert.

Primer	Identifizierungsnummer	Richtung des Primers	Sequenz [5'- 3']
	der mRNA		
β-Aktin	NM_12481	5'	caa ggt gtg atg gtg gga atg g
		3'	cag gat ggc gtg agg gag agc a
CtsS out	AF038546.1	5'	cct acc aag tgg gca tga ac
		3'	gcc atc aag agt ccc ata gc
CtsS in		5'	taa tcg gac att gcc tga ca
		3'	ctg gaa agc ttc ggt cat gt
CstC out	NM_009976	5'	tcg ctg tga gcg agt aca ac
		3'	cat ggc agg tac tgc aag aa
CstC in		5'	tgg tga gag ctc gta agc ag
		3'	tgc agc tga att ttg tca gg
CstF out	NM_009977.2	5'	ggt cct gga gct gta ctt gc
		3'	aga gga gaa cag gca cct ca
CstF in		5'	atg cat cac caa ctg gac aa
		3'	ggg atg acc cag act tca ga
IL-6 out	NM_031168	5'	gtt ctc tgg gaa atc gtg ga
		3'	gga aat tgg ggt agg ga
IL-6 in		5'	tgt gca atg gca att ctg at
		3'	ctc tga agg act ctg gct ttg

Tabelle 6:Verwendeten Primer mit Angabe der Identifizierungsnummer und der Sequenz[5'-3'] (modifiziert nach Baston-Buest *et al.*, 2010).

## 2.5 Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR)

Die PCR dient dazu, DNA *in vitro* zu amplifizieren. Etabliert wurde die Methode 1983 durch den Chemiker Kary Mullis. Die Methode der PCR macht sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutzen, DNA zu duplizieren.

Das Prinzip der PCR besteht aus drei Schritten, die über mehrere Zyklen wiederholt werden:

Denaturierung: Trennung der DNA-Doppenstränge in zwei komplementäre Einzelstränge bei 92-98°C.

Annealing: die Primer hybridisieren an die DNA, wobei die Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der verwendeten Primer ist.

Elongation: die Polymerase erzeugt den fehlenden DNA-Strang, wobei sie den vorhandenen als Matrize nutzt. Die Temperatur in der Elongationsphase wird dabei dem Arbeitsoptimum des eingesetzten Enzyms angepasst.

Beendet wird die Reaktion durch eine finale Elongation von 10min. Danach wird die Reaktion auf 4°C abgekühlt und bis zur Auswertung bei 4°C bzw. –20°C gelagert.

## 2.5.1 Durchführung der β-Aktin PCR

Zur Überprüfung der erfolgreichen cDNA-Synthese in der RT wurde unter Verwendung eines Qiagen HotStar Taq plus Kits eine PCR für das *housekeeping gene* β-Aktin durchgeführt.

Dafür wurden 5µl (1/10) des verdünnten RT-Produktes zu 45µl PCR-Mastermix (Tabelle 7) gegeben.

Konzentartion	Agens	Hersteller
1×	PCR Puffer	
2U	HotStarTaq plus DNA Polymerase	beides Qiagen, Hilden, Deutschland
0,2mM	dNTPs	dNTP Set, Eppendorf, Hamburg,
		Deutschland
0,2µM	3'-Primer	
0,2µM	5' Primer	beide MWG Biotech AG
ad 50µl	DEPC-dH <sub>2</sub> O	

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermixes zur Durchführung der β-Aktin PCR

Die Komponenten wurden gemischt, in ein 0,5ml PCR-Gefäß (Biozym Scientific GmbH) gegeben und mit Öl (Sigma Aldrich) überschichtet.

Als Negativkontrolle wurde DEPC-dH<sub>2</sub>0 und als Positivkontrolle 2µl Milz cDNA einer Maus gleichen Stammes plus 3µl DEPC-dH<sub>2</sub>O zum Mastermix gegeben.

Die PCR wurde entsprechend des in Tabelle 8 aufgeführten Programmes in einem T-Gradient (Biometra) durchgeführt.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5min	
94°C	30s	)
54°C	45s	40
72°C	1min	J
72°C	10min	
4°C	∞	

Tabelle 8: Programm zur Durchführung der β-Aktin-PCR

Im Anschluss wurde eine Agarosegel-Elektrophorese zur Identifizierung der Amplifikate und evtl. aufgetretener Kontaminationen durchgeführt.

Die weiterführende PCR Untersuchung der Blastozysten auf CtsS, CstC, CstF und IL-6 mRNA Expression wurde nur an  $\beta$ -Aktin pos. Blastozysten durchgeführt.

## 2.5.2 Prinzip der verschachtelten- (nested-) PCR

Eine *nested*-PCR basiert auf dem Prinzip zweier ineinander verschachtelter Polymerase-Kettenreaktionen.

In einer ersten PCR wird mit Hilfe eines 1. Primerpaares (*outer pair*) ein Amplikon synthetisiert. Aus dem Produkt der ersten PCR wird in einem zweiten PCR-Schritt mit Hilfe eines 2. Primerpaares (*inner pair*) ein kleineres Fragment des ersten PCR-Produktes amplifiziert.

Dieses Vorgehen erhöht die Sensitivität und Spezifität der Methode und ermöglicht den Nachweis geringer DNA Mengen (Chelly *et al.*, 1989).

# 2.5.3 Durchführung der Cathepsin S, Cystatin C, Cystatin F und Interleukin-6 *nested*-PCRs

Zur Untersuchung von Einzel-Blastozysten auf CtsS, CstC, CstF und IL-6 wurde die Methode der *nested*-PCR angewendet. Auf diese Weise war es möglich, selbst geringe Mengen des gewünschten Produktes in der mittels RT synthetisierten cDNA nachzuweisen (Chelly *et al.*, 1989).

Außerdem ermöglichte diese Methode, ein *poolen* der Blastozysten zu verhindern und damit Informationen über einzelne Blastoszysten zu erhalten.

Hierfür wurde ein Mastermix entsprechend den Angaben in Tabelle 9 hergestellt.

Konzentration	Agens	Hersteller	
1×	PCR-Puffer		
1×	Q-Solution		
2,5U	HotStarTaq Plus		
2mM	MgCl <sub>2</sub>	alles Qiagen	
0,2mM	dNTPs	Applied Biosystems	
je 0,3µM	Primer	MWG Biotech AG	
	DEPC-dH <sub>2</sub> O		

Tabelle 9: Zusammensetzung des für die Durchführung der *nested*-PCRs verwendeten Mastermixes

Wie schon bei der  $\beta$ -Aktin PCR wurde in der CtsS sowie in der CstC und CstF *nested*-PCR cDNA isoliert aus der Milz einer Maus gleichen Stammes als Positivkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle der IL-6 nested-PCR wurde cDNA isoliert aus der Milz einer Maus, die zuvor eine Infektion mit Plasmodium chabaudi (Erreger der Malaria) überlebt hatte, eingesetzt, da sich erst in der Milz von Mäusen, deren Immunsystem durch eine systemische Infektion, im vorliegenden Fall mit Malaria, aktiviert wurde, IL-6 nachweisen ließ. Bei allen PCRs diente DEPC-dH<sub>2</sub>O als Negativkontrolle.

Die genaue Zusammensetzung der Ansätze der einzelnen Reaktionen ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Amplifikat	Länge	Volumen der	Template/Positivkontrolle/ Negativkontrolle	Annealing-
	[bp]	PCR		Temperatur
		Reaktion		[°C]
		[µl]		
CtsS out	659	50	Template: 5µI cDNA	56
			Positivkontrolle: 2µl Milz cDNA	
			Negativkontrolle: 5µI DEPC-dH <sub>2</sub> O	
CtsS in	240	50	Template: 5µl aus Produkt CtsS out	60
			Pos. Kontrolle: 1µl Produkt der Pos. Kontrolle	
			aus CtsS out, 1:10 verdünnt	
CstC out	481	50	Template: 5µI cDNA	51
			Positivkontrolle: 2µl Milz cDNA	
			Negativkontrolle: 10µI DEPC-dH <sub>2</sub> O	
CstC in	206	50	Template: 5µl aus Produkt CstC out	51
			Positivkontrolle: 2µl Produkt der Pos. Kontrolle	
			aus CstC out	
CstF out			Template: 5µl cDNA	57
			Positivkontrolle: 2µI Milz cDNA	
			Negativkontrolle: 5µI DEPC-dH <sub>2</sub> O	
CstF in			Template: 5µl aus Produkt CstF out	57
			Positivkontrolle: 2µl Produkt der Pos. Kontrolle	
			aus CstF out	
IL-6 out	339	50	Template: 5µI cDNA	56
			Positivkontrolle: 2µl inf. Milz cDNA	
			Negativkontrolle: 5µI DEPC-dH <sub>2</sub> O	
IL-6 in	226	50	Template: 5µl aus Produkt IL-6 out	56
			Positivkontrolle: 3µl Produkt der Pos. Kontrolle	
			aus IL-6 out	
1	1	1		1

Tabelle 10:Übersicht der Ansätze der durchgeführten nested-PCRs für CtsS, CstC, CstF und<br/>IL-6 mit aus Einzel-Blastozysten generierter cDNA als Matrize

Die Reaktionen wurden in 0,5ml PCR-Gefäßen (Biozym Scientific GmbH) nach Überschichtung mit Öl (Sigma-Aldrich) entsprechend dem in Tabelle 11 angegebenen Programm durchgeführt. Die verwendete *Annealing* Temperatur ist aus Tabelle 10 zu entnehmen.

Temperatur	Zeit	Zyklen	
95°C	5min		
94°C	30s	٦	
Annealing Temperatur	45s	<b>}</b> 40	
72°C	1min	ر	
72°C	10min		
4°C	8		

Tabelle 11: Programm zur Durchführung der nested-PCRs

## 2.6 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Molekülgemischen unterschiedlicher Größe bzw. Ladung. Gelöste ionische Verbindungen wandern in einem elektrischen Feld durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff, wobei sich Teilchen mit positiver Ladung zur Kathode und solche mit negativer Ladung zur Anode bewegen.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei proportional der Feldstärke und der Ionenladung, umgekehrt proportional dem Teilchenradius und der Viskosität des Stoffes.

## 2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Das Verfahren der Agarosegelelektrophorese wird seit 1961 durchgeführt. Entwickelt wurde es von Arne Tiselius, der dafür 1948 den Nobelpreis erhielt.

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus Rotalgen der Gattung Geledium und Gracillaria gewonnen wird. Es handelt sich dabei um ein Polymer, bestehend aus verschieden verknüpften Galaktoseeinheiten.

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine gängige Methode, um einzelne Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe aufzutrennen. Die neg. geladenen Nukleinsäuren wandern bei angelegter Spannung zur pos. geladenen Anode.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA-Molekülen ist dabei umgekehrt proportional dem log10 der Anzahl der bp und abhängig von der Größe des DNA-Fragments, der angelegten Spannung, der Agarosekonzentration und dem gewählten Laufpuffer. Ein in der gleichen Elektrophorese aufgetrennter Größenstandard ermöglicht die Größenbestimmung des gewonnenen Amplifikats.

#### 2.6.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine horizontale Gelelektrophorese mit 2%igen Agarosegelen durchgeführt.

Zur Herstellung wurde die Agarose mit 1× Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE)-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und ca. 15min unter Rühren abgekühlt,
0,5µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und das flüssige Gel auf einen Schlitten gegossen.

Die Gele wurden bis zum vollständigen Auspolymerisieren ca. 20-30min abgedeckt bei Raumtemperatur möglichst dunkel stehen gelassen.

Die Elektrophorese wurde mit 3-4V/cm in 1×TBE-Puffer in einem Spannungsgerät Power N PAC 300 (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Programm GelDoc 1000 (Bio-Rad) unter ultraviolettem(UV)-Licht analysiert.

## 2.7 Detektion der cDNA

Zur Darstellung der entstandenen PCR-Fragmente wurde den verwendeten Agarosegelen Ethidiumbromid beigefügt.

Ethidiumbromid gehört zu den DNA-interkalierenden Substanzen, die aufgrund einer planaren Struktur in der Lage sind, sich reversibel in die Basenabfolge einzulagern. Die Sequenz der Basen ist dabei nicht von Bedeutung.

Die Verbindung Ethidiumbromid zeigt kaum Fluoreszenz, wenn sie in einer Lösung ihre Konformation frei ändern kann. Durch Bindung an DNA wird die Fluoreszenz jedoch stark erhöht.

Bei Bestrahlung von DNA mit interkaliertem Ethidiumbromid durch UV-Licht der Wellenlänge 300nm tritt eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich auf.

Die Methode ist so empfindlich, dass sich DNA-Banden mit weniger als 5ng DNA pro Bande nachweisen lassen.

# 2.8 Klonierung

Klonierung bezeichnet die Herstellung eines transgenen Bakterienstammes, der ein von außen eingebrachtes DNA-Fragment enthält.

Hierfür essentiell ist die Integration eines DNA-Fragmentes in einen Klonierungsvektor z.B in ein Plasmid, einen Phagen oder ein Virus.

Der Vektor ermöglicht die Übertragung der DNA in eine Wirtszelle, z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*), und somit die Vermehrung der rekombinanten DNA.

# 2.8.1 Klonierung in pCR<sup>®</sup>2.1<sup>®</sup>-TOPO Vektor

Die Klonierung in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1<sup>®</sup>-TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande) zur Transformation in *E. coli* erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits nach Herstellerangabe.

Aufgrund eines 3'-Desoxythymidin-Überhangs des Vektors (Marchuk *et al.*, 1991) ist eine durch die kovalent an den aktivierten Vektor gebundene Topoisomerase I aus dem

*Vaccinia*-Virus katalysierte Ligation (Shuman *et al.*, 1994) nur mit Produkten mit 3'-Desoxyadenin-Überhang, wie sie z.B. durch eine PCR mit *Taq*-Polymerase entstehen, möglich.

Für die Ligation wurden 4µl aufgereinigtes PCR-Produkt, 1µl 1:10 verdünnte Salzlösung und 1µl TOPO-Vektor vorsichtig gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde bis zur anschließenden Transformation in *E. coli* auf Eis gelagert.

## 2.9 Transformation elektrokompetenter Escherichia coli Bakterien

Transformation bezeichnet die Einschleusung fremder DNA in eine Zelle, wobei mehrere Möglichkeiten zur Einschleusung existieren.

Die Transformation der Vektoren in elektrokompetente *E. coli* TOP10 wurde mittels Elekroporation durchgeführt.

Dabei wird durch ein elektrisches Feld der Verlust der Semipermeabilität der Zellmembranen der Bakterien erzeugt, was den Übertritt von DNA aus dem Umgebungsmedium in die Zelle ermöglicht.

## 2.10 Anzucht und Lagerung bakterieller Transformanden

Für die sich anschließende Selektionierung wurden Luria Bertani(LB)-Platten mit  $50\mu$ g/ml Ampicillin (LB<sub>Amp.</sub>-Platten) hergestellt. LB ist ein komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien. Erfunden wurde es 1951 von Giuseppe Bertani. Die auf den LB<sub>Amp.</sub>-Platten selektionierten Transformanden wurden in 5ml LB-Medium mit 60 $\mu$ g/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 200-300rpm und 37°C inkubiert.

## 2.11 Plasmid-DNA-Präparation

Die Plasmid-DNA-Präparation erfolgte unter Verwendung eines NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren Deutschland) basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983). Die Plasmid-DNA wurde aus 2ml LB<sub>Amp</sub>. Kulturen nach Herstellerangabe von chromosomaler DNA und zellulären Proteinen getrennt.

## 2.12 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung beschreibt die Bestimmung der Nukleotidfolge eines DNA-Stranges. Unterschieden werden gelgestützte und gelfreie Sequenzierungsmethoden.

#### 2.12.1 Sequenzierung nach Sanger

Die von Fred Sanger 1975 entwickelte Sequenzierungsmethode wird auch als Didesoxyverfahren oder Kettenabbruchverfahren bezeichnet.

Von einer bekannten Startersequenz, z.B. der Sequenz der verwendeten PCR Primer, wird durch Hinzufügen eines Nukleotidgemisches und einer DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA-Stranges induziert.

Die Reaktion wird in 4 verschiedenen Ansätzen durchgeführt, wobei in jedem Ansatz ein anderes der 2'-Desoxynukleotide (dNTP) teilweise durch ein 2'-3'-Didesoxynukleotid (ddNTP) ersetzt ist.

Hierbei sollte das Verhältnis dNTP:ddNTP etwa bei 1:200 liegen, da nur so die Synthese langer Produkte möglich ist.

Kommt es bei der DNA-Strangsynthese zum Einbau eines ddNTP, bricht an dieser Stelle die Synthese des DNA-Stranges ab, weil hier die 3'-OH-Gruppe als Bindeglied zum Phosphat des nächsten Nukleotids fehlt.

Auf diese Weise kann in jedem Reaktionsansatz die PCR selektiv bei A, C, G oder T abgebrochen werden.

Da zu jedem Zeitpunkt der Strangsynthese zufällig ein dNTP oder ein ddNTP eingebaut wird, entstehen während der Reaktion DNA-Fragmente verschiedener Länge, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit einem ddNTP enden.

Nach Ablauf der Reaktion werden die Reaktionsprodukte elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Visualisierung der Banden stehen verschiedene Methoden wie z.B. die Isotopenmarkierung oder die heute bevorzugte Markierung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (beispielsweise Fluoreszein, Tetramethylrhodamin, Texas Red oder Cyaninfarbstoffe) zur Verfügung.

Durch Übereinanderlegen der Gele aus allen 4 Teilreaktionen entsteht ein spezifisches Bandenmuster, aus dem sich die Sequenz ablesen lässt.

## 2.12.2 Cycle-Sequencing

Das *Cycle-Sequencing* stellt eine Modifikation der Methode nach Sanger dar. Es handelt sich um eine Kombination von PCR-Technologie und dem Didesoxy-Verfahren.

Der Reaktionsansatz unterscheidet sich von dem einer herkömmlichen PCR dadurch, dass dieser nur einen Primer enthält, folglich wird nicht exponentiell sondern nur linear amplifiziert.

Neben dem Primer enthält der Ansatz eine DNA-Matrize, z.B. ein PCR-Produkt, eine Polymerase, Reaktionspuffer und ein dNTP-ddNTP-Gemisch.

Dieser Ansatz durchläuft dann ca. 30 Zyklen eines thermischen Programmes bestehend

aus Primerdenaturierung Primerhybridisierung DNA-Synthese

Die DNA-Polymerase verlängert dabei solange entlang der einzelsträngigen Matrize, bis durch den Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs ein zufälliger Strangabbruch erfolgt. Es entstehen so unterschiedlich lange DNA-Stränge, an deren Ende sich jeweils eines der vier unterschiedlich markierten ddNTP befindet.

## 2.12.3 Durchführung der Sequenzierung

Die Sequenzierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durch das molekularbiologische Zentrallabor des BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gemäß der Sangermethode mit der *Cycle sequencing*-Technologie unter Verwendung markierter *Dye*-Terminatoren (BigDyes und Rhodaminfarbstoffe) durchgeführt. Als *Dye*-Terminatoren werden mit einem fluoreszierenden Farbstoff (*dye*) markierte ddNTPs bezeichnet. Als Primer wurde M13 universal gewählt.

## 2.13 Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz

## 2.13.1 Gewinnung der Mausuteri

Für den immunhistochemischen Nachweis wurden Kryo- und Paraffinschnitte von Uteri von Mäusen des Stammes B6C3F1 angefertigt.

Die Mäuse des Stammes B6C3F1, gezüchtet in der Tierversuchsanlage Düsseldorf, wurden nach Betäubung mit Äther durch zervicale Dislokation getötet und die Uteri entnommen.

Zur Untersuchung von Uteri mit Endometrium in verschiedenen hormonellen Phasen wurden sowohl Uteri von unverpaarten Weibchen verwendet, deren Endometrium sich in der E<sub>2</sub>.dominanten Phase befand, die vergleichbar mit der Proliferationsphase des weiblichen Zyklus des Menschen ist, als auch Uteri von verpaarten Weibchen, deren Endometrium neben E<sub>2</sub>- auch unter P<sub>4</sub>-Einfluss stand und sich daher mit der Sekretionsphase des menschlichen Menstruationszyklus vergleichen lässt.

Daneben wurden zur Untersuchung von *implantation sites* Uteri von verpaarten schwangeren Weibchen am 7. Tag *pc* entnommen.

Weiterhin wurden Blastozysten am Tag 3 *pc* in Utero untersucht. Zur Anfertigung dieser Schnitte wurden die Blastozysten zunächst aus dem Uterus herausgespült, um dann gezielt wieder im *Cavum uteri* platziert zu werden.

## 2.13.2 Anfertigung der Kryoschnitte

Die entnommenen Uteri wurden in Optimal Cutting Temperature Compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Zoeterwounde, Niederlande) direkt in flüssigem Stickstoff auf ca. – 190°C tiefgefroren und bis zur Anfertigung der Schnitte bei –80°C gelagert.

Es wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) Schnitte von 5µm Dicke angefertigt, auf Objektträger aufgebracht (Vector, Burlingarme, USA) und bis zur Färbung bei –20°C gelagert.

Zur besseren Übersicht wurde jeder 10. Schnitt nach Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

## 2.13.3 Anfertigung der Paraffinschnitte

Die entnommenen Mäuseuteri wurden zur Entwässerung in 4% Formalin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) überführt und darin bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die weitere Behandlung erfolgte mit maschineller Hilfe, wobei das Gerät Citadel 2000 (Shandon, Frankfurt, Deutschland) verwendet wurde.

Die Uteri wurden über 2h mit Leitungswasser gespült, um das Formalin auszuwaschen und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tabelle12).

Agens und Konzentration	Zeit
Ethanol 80%	3h
Ethanol 96%	1½h
Ethanol 96%	1h
Ethanol 98%	1h
Ethanol 98%	1h
50% Aceton in 98% Ethanol	1h
50% Aceton in 98% Ethanol	1h
Aceton 100%	1h
Aceton 100%	1h

Tabelle 12: Zur Dehydrierung der Präparate verwendete aufsteigende Alkoholreihe und deren Einwirkzeit

Es schloss sich die Inkubation in 56-58°C heißem Paraplast regular® (Sigma-Aldrich) für je  $2 \times 2h$  an, bevor die Schnitte in einem Histocentre2 (Shendon) in Paraplast regular® (Sigma-Aldrich) eingebettet wurden.

Die Schnitte wurden auf einem Mikrotom (Leica) mit einer Dicke von 3µm geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und auch hier jeder 10. Schnitt mit HE gefärbt.

#### 2.13.4 Das Prinzip der Immunhistochemie

IHC ermöglicht die Visualisierung antigener Komponenten in Zellen oder Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Antikörper (AK).

Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der ein AK an eine bestimmte antigene Komponente, z.B. an ein bestimmtes Protein bindet. Dieser AK ist an ein Detektionssystem, z.B. einen Fluoreszenzfarbstoff, ein Enzym oder ein radioaktives Isotop gekoppelt, welches die Antigen-AK-Bindung im Präparat verdeutlicht.

Der AK, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, wird auch als spezifischer AK (1. AK) bezeichnet.

Wesentliche Voraussetzung für eine hohe Aussagekraft der Methode ist die Spezifität dieses AKs.

## 2.13.5 Enzymgekoppelte-immunhistochemische Methoden

Unter den enzymgekoppelten Systemen werden prinzipiell zwei Methoden unterschieden. Bei der direkten Methode ist der mit dem Antigen reagierende 1. AK direkt an eine Peroxidase gekoppelt. Ein nachfolgend zugefügtes Substrat, z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 3,3-Diaminobenzidin (DAB), färbt den Immunkomplex.

Bei der indirekten Methode bindet ein 1. AK an das Antigen. Zur Lokalisierung dieses Komplexes wird ein Peroxidase-konjugierter 2. AK hinzugefügt. Dieser 2. AK, der gegen das Fc-Fragment des 1. AKs gerichtet ist, bindet und die Reaktion wird durch Zugabe eines Substrates, z.B. DAB, gefärbt.

Zu dieser Methode gibt es weitere Varianten, die dazu dienen, die Färbung zu verstärken.

Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode verwendet.

## 2.13.6 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Hier wird die Affinität von Avidin für Biotin zur Bildung von Komplexen ausgenutzt. Der 1. unkonjugierte AK reagiert mit dem Antigen. Der danach hinzugegebene 2. AK ist mit Biotin konjugiert, wobei das Biotin kovalent an den AK gebunden ist.

Während der nachfolgenden Reaktion reagiert der 2. AK über vorgebildete Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe mit einem Markerenzym. Da mehrere Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe mit einem 2. AK reagieren und auch untereinander vernetzte Verbindungen bilden können, wird das Signal verstärkt.

Der Farbnachweis entsteht in der abschließenden Enzym-Substrat Reaktion mit DAB als Chromogen und  $H_2O_2$ .

# 2.13.7 Immunhistochemie Cathepsin S, Cystatin C, Cystatin F, Zytokeratin 7 (CK7), Von-Willebrand-Faktor (vWF):

Die Paraffinschnitte einer Dicke von 3µm wurden nach folgendem Schema immunhistochemisch mit Hilfe der bereits beschriebenen ABC-Methode gefärbt:

Zunächst erfolgte die Paraffinentfernung durch 10min Inkubation in Xylol mit anschließender Rehydrierung in einer Verdünnungsreihe von 98%, 95% und 70% Ethanol für je 5min mit nachfolgender Waschung mit PBS.

Währenddessen wurde die Antigen *unmasking solution* (Vector) in der Mikrowelle aufgekocht, 3min unter ständigem Bewegen abgekühlt und die Schnitte für 20min eingestellt.

Danach wurde erneut mit PBS gewaschen.

Nun wurden die Schnitte mit einem ImmEdge<sup>TM</sup> Stift (Vector) eingekreist, 5min zur Absättigung endogener Peroxidaseaktivität mit 3%  $H_2O_2$  und danach kurz mit PBS überschichtet.

Daran schloss sich eine 20min Inkubation in Blocking Serum (ABC Vectastain Kit) der Spezies des 2. AKs an.

Der 1. AK wurde mit Blocking Serum verdünnt (Tabelle 13) und die Schnitte damit für 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Waschung mit PBS erfolgte dann die Inkubation mit dem 2. biotinylierten AK (Vector) nach Angaben des Herstellers für 30min bei Raumtemperatur.

In der Zwischenzeit wurde die ABC-Lösung vorbereitet, da diese 30min bei Raumtemperatur ruhen muss.

Die Schnitte wurden darin für 30min inkubiert und danach mit PBS gewaschen.

Jetzt wurde die DAB-Lösung (Vector) nach Angabe des Herstellers appliziert und die Färbung zwischenzeitlich ca. alle 2min mikroskopisch kontrolliert.

Nach erneuter Waschung mit PBS erfolgte die Dehydrierung in 70%, 95% und 98% Ethanol für je 10min und in Xylol für 20min.

Die fertigen Schnitte wurden in Mounting Medium (Vector) eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert.

Protein	Bezeichnung	Verdünnung
CtsS	cathepsin S (H-50): sc-30057	1: 10
	(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)	
CstC	Anti-mCystatin C: AF1238	1: 12,5
	(R&D Systems, Wiesbaden–Nordenstadt, Deutschland)	
CstF	cystatin F (N-18): sc-46901	1: 50
	(Santa Cruz Biotechnology)	
CK7	Zytokeratin 7 (RCK105): sc-23876	1: 80
	(Santa Cruz Biotechnology)	
vWF	VWF (C-20): sc-8068	1:20
	(Santa Cruz Biotechnology)	

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten 1. AK und deren Konzentration

## 2.13.8 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz wurde 1940 von dem Mikrobiologen Albert Coons eingeführt.

Das Prinzip der Immunfluoreszenz entspricht grundsätzlich dem der IHC. Auch hier ist der entscheidende Mechanismus eine Antigen-AK-Reaktion unter Einsatz spezifischer AKs zur Detektion bestimmter antigener Komponenten in Zellen oder in einem Gewebe. Diese sind bei der Immunfluoreszenz jedoch nicht mit einem Enzym sondern mit einem Fluorochrom konjugiert. Diese Methode wurde angewandt, da sich während der Durchführung der Experimente zeigte, dass sich CtsS und CstC mittels Immunfluoreszenzfärbung besonders deutlich darstellen ließen.

Wiederum existieren eine direkte und eine indirekte Methode.

Bei der direkten Methode ist der 1. AK direkt mit einem Flourochrom, wie z.B. Fluorescein oder Rhodopsin, konjugiert. Nach Inkubation und Binden der AKs kann die Verteilung der Immunfärbung unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Bei der indirekten Methode wird, wie auch bei der IHC, ein unkonjugierter 1. AK verwendet. In einem weiteren Schritt wird nun ein mit einem Fluorochrom konjugierter und gegen das Fc-Fragment des 1. AKs gerichteter 2. AK eingesetzt.

Die Auswertung erfolgt ebenfalls unter dem Fluoreszenzmikroskop.

## 2.13.9 Immunfluoreszenz Cathepsin S und Cystatin C

Die Kryoschnitte einer Dicke von 5µm wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 5min in 3,7% Paraformaldehyd (PFA) in PBS und 1min in –20°C kaltem Aceton fixiert.

Zur Permeabilisierung und leichten Sättigung wurden die Objektträger dann für 30min in einer Lösung aus 0,05% Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (TWEEN® 20) (Sigma-Aldrich) und 0,5% hormonreduziertem (*charcoal stripped*) fetalem bovinem Serum (FBS) (Biowest, Nuaille, Frankreich) in PBS inkubiert.

Nach Waschung mit PBS erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungen durch 30min Inkubation in 10% FBS in PBS.

Nach einem weiteren Waschschritt in PBS erfolgte die Inkubation mit dem 1. AK, verdünnt in 0,5% humanem Serumalbumin (HSA) (CAF DCF, Brüssel, Belgien) in PBS bei 4°C über Nacht (Tabelle 14).

Im Anschluss an einen weiteren Waschschritt in PBS erfolgte die Inkubation mit dem 2. AK ebenfalls mit 0,5% HSA in PBS verdünnt bei Raumtemperatur im Dunkeln für 2h.

Danach wurden die Objektträger erneut in PBS gewaschen und in 4`,6-Diamidino-2-phenylindol-(DAPI-)haltiges Mounting Medium (Vector) eingebettet.

Die Schnitte wurden bis zur Betrachtung unter einem Lichtmikroskop mit Fluoreszenzeinheit (Leica, DC 300 F) und Auswertung (Leica IM500 Image Manager Programm) dunkel bei 4°C gelagert.

		Bezeichnung	Verdünnung
CtsS	1. AK	rabbit polyclonal anti-cathepsin S	1:50
		(Santa Cruz)	
	2. AK	Alexa ® Fluor 568 anti-rabbit IgG	1:600
		(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	
CstC	1. AK	Anti-mCystatin C	1:20
		(R&D, Systems)	
	2. AK	Alexa ® Fluor 488 chicken anti-goat IgG	1:600
		(Invitrogen)	

Tabelle 14: Übersicht über die zur Immunfluoreszenz verwendeten AK und deren Verdünnung

## 2.14 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting; FACS)

FACS ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen.

Das Prinzip basiert darauf, dass ähnlich wie bei der Fluoreszenzmikroskopie mittels fluoreszenzmarkierter AKs, Antigene nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie, bei der die Zellen im Gewebeverbund vorliegen, wird beim FACS jedoch eine vereinzelte Zellsuspension untersucht.

Die gelösten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom an einem fokussierten Laserstrahl vorbeigeführt und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird mittels geeigneter Detektoren gemessen.

Zur Untersuchung mittels FACS wurden *gepoolte* Proben aus Uteri von nichtschwangeren Mäusen (n=4), Dezidua von schwangeren Mäusen (n=4) sowie das Blut von 8 Wochen alten weiblichen Mäusen, entnommen am Tag 9 pc, verwendet.

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden mittels LymphoPrepTM (Fresenius Kabi Norge AS for Axis- Shield Poc AS, Oslo, Norwegen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Gewebeproben wurden mechanisch zerkleinert, mittels 0,25% Trypsin und 0,05% Kollagenase in PBS (Sigma-Aldrich) verdaut und für 1h bei 37°C auf einen Orbital Shaker gestellt.

Zur Isolation der nukleären Zellen wurden das Gewebe durch einen 100µm Filter filtriert, die Zellen gezählt, zentrifugiert und in 0,5% FBS in PBS resuspensiert.

Die AK Färbung zur Zytometrie startete mit 10<sup>5</sup> Zellen pro FACS-Gefäß (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).

Zuerst wurden mittels mouse*T lymphocyte subset antibody cocktail* (PE-Cy7 CD3e, PE CD4, and APC CD8a), FITC rat anti-mouse CD122, PE rat anti-mouse CD122, PE-Cy7 armenian hamster anti-mouse CD3 (alles BD Pharmingen) nach Herstellerangaben unter Beachtung der entsprechenden Konzentrationen die extrazellulären Targets gefärbt. Dafür wurden die Zellen 20min im Dunkeln bei 4°C inkubiert, zweimal in PBS gewaschen und in 0,1% Formalin gelöst.

Als Nächstes wurden die intrazellulären Targets gefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst bei 37°C über 10min in 2% Formalin fixiert und über 30min mit 1% Tween 20 (Sigma Aldrich) permeabilisiert. Nach zweimaliger Waschung erfolgte nun die Inkubation mit den 1. AKs: rabbit anti-mouse CTSS (Santa Cruz), goat anti-mouse CST7 (Santa Cruz) und goat anti-mouse CST3 jeweils in einer Konzentration von 1:200 in 10% Serum der Wirts Spezies des 2. AK.

Nach zweimaliger Waschung in PBS wurden die Zellen mit dem 2. AK Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 und 594 anti-goat IgG (Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration von je 1:4000 inkubiert, im Anschluss nochmals gewaschen und in 0,1% Formalin fixiert.

Zur Auswertung der Probe diente ein Cytomics FC 500 Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).

Die Datenanalyse erfolgte mittels RXP Software (Beckman Coulter).

## 2.15 Tabellarische Auflistung der Eigenleistung

Experiment	Seite	
Gewinnung der Blastozysten und Uteri	S. 25	Nach Anleitung durch die AG hat CH alle
	S. 36	Blastozysten eigenständig gewonnen.
RT	S. 26	Nach Anleitung durch die AG hat CH alle
		Untersuchungen durchgeführt.
Zusammenstellung der Primer	S. 27	CH hat die Primer für CtsS, CstC, IL-6
		entwickelt, CstF und $\beta$ -Aktin waren in der
		AG bereits vorrätig.
PCR β-Aktin	S. 29	Etablierung der Methode duch die AG.
		Durchführung der Methode an allen
		untersuchten Blastozysten durch CH.
nested-PCR CtsS, CstC, CstF, IL-6	S. 30	Etablierung der Methode und
		Durchtunrung aller Experimente durch
Agereegelelektrenhereeg	0.00	UH. Calbatändiga Durahführung allar
Agarosegelelektrophorese	5.32	Selbstandige Durchlunrung aller
Klopierupa	C 33	Durchführung durch die AG unter
Kionierung	0.00	Teilnahme von CH
Anfertigung der Kryo- und Paraffinschnitte	S 37	Erfolgt durch AG
IHC	S 39	Etablierung der Methode duch CH unter
	0.00	Supervision der AG. Durchführung an
		insgesamt n=10 verschiedenen
		Mausuteri davon n=2 durch CH und n=8
		durch AG. Auswertung unter Mithilfe der
		AG.
Immunfluoreszenz	S. 40	Etablierung der Methode duch AG.
		Durchführung von allen n=8
		Experimenten durch CH. Auswertung
		unter Mithilfe der AG.
FACS	S. 41	Etablierung der Methode durch AG unter
		Teilnahme von CH. Insgesamt an n=8
		Mäusen und n=5 Mausblutproben, davon
		n=1 durch CH und n=12 durch AG.

Tabelle 15: Detaillierte Auflistung über die Eigenleistung der Doktorandin Claudia Hölling (CH) und der Leistungen der AG

## 3 Ergebnisse

## 3.1 Ergebnisse der nested-PCRs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 156 Blastozysten untersucht.

Hiervon waren 143 pos. für die Expression von  $\beta$ -Aktin.

β-Aktin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes Strukturprotein und wird, da es konstitutiv, d.h. unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen, exprimiert wird, als *housekeeping gene* bezeichnet.

Diese 143 Blastozysten wurden auf die Expression von CtsS, CstC, CstF und IL-6 weiteruntersucht.

Bei den untersuchten Blastozysten ließ sich in nur 2 Fällen CtsS-mRNA nachweisen (Tabelle 16).

Da nur eine solch geringe Anzahl an Blastozysten eine Expression von CtsS zeigte und sich auch in den *gepoolten* Blastozysten keine weitere Expression nachweisen ließ, scheint es sich hier am ehesten um CtsS-mRNA mütterlichen Ursprungs zu handeln, welche auf die Blastozyste übertragen wurde, oder um eine Kontamination in der eingesetzten Probe.

Der Cystein-Proteinase-Inhibitor CstC konnte in allen 143 und CstF in 74 der untersuchten Blastozysten nachgewiesen werden (Tabelle 16 u. Abb. 1).

Die Untersuchung auf IL-6 mRNA Expression zeigte bei 95 Blastozysten ein pos. Ergebnis (Tabelle 16 u. Abb. 1).

	pos. Blastozysten	neg. Blastozsten	prozentualer Anteil der pos. Blastozysten (%)
CtsS	2	141	1,40
CstC	143	0	100
CstF	74	69	51,75
IL-6	95	48	66, 44

Tabelle 16: Übersicht über die Ergebnisse der nested-PCRs



Abb. 1: Dargestellt sind Beispiele für die PCR-Produkte der durchgeführten nested-PCRs, aufgetragen auf 2%iges Agarosegel nach horizontaler Elektrophorese unter UV-Licht. Zur Größendetektion des PCR-Produktes wurde ein Standard-DNA-Leiter (M) sowie je eine Negativkontrolle (n) und eine Positivkontrolle (p) aufgetragen (Baston- Buest et al, 2010).

# 3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Cathepsin S, Cystatin C und Cystatin F Expression im Uterus der Maus auf Proteinebene

Zur besseren Darstellung des sehr fragilen Endometriums wurden die Untersuchungen an Schnitten kompletter Uteri durchgeführt.

Unterschieden wurden Uteri mit proliferativem,  $E_2$ -dominantem Endometrium, wie es im Sexualzyklus unverpaarter Weibchen vorliegt, Uteri mit sekretorischem,  $P_4$ -dominantem Endometrium, entnommen am Tag 3,5 *pc*, sowie Uteri mit  $P_4$ -dominantem Endometrium von schwangeren Weibchen, entnommen am Tag 7,5 *pc*, die deutlich sichtbare Implantationsstellen aufwiesen.

Die Auswertung sowohl der IHC als auch der mit Hilfe von Immunfluoreszenz gefärbten Uterusschnitte erfolgte durch zwei unabhängige Beobachter (Tabelle 17).

Eine quantitative Auswertung, die eine Signifikanzberechnung zulassen würde, wurde nicht durchgeführt.

Zur Bestätigung der beschriebenen Lokalisation von CtsS-, CstC- und CstF-Protein in den Epithelien der endometrialen Drüsen und den Gefäßendothelien wurden Uterusschnitte derselben Schnittserien IHC mittels CK7 - (Abb. 3G-H; Abb. 5G-H; Abb. 8G-H) und Von-Willebrand-Faktor (vWF) spezifischem AK (Abb. 3I-J; Abb. 5I-J; Abb. 8I-J) gefärbt.

CK gelten als Marker für Epithelzellen. Jedes epitheliale Gewebe weist ein charakteristisches Zytokeratinmuster auf. An dieser Stelle wurde ein spezifischer AK gegen CK7 gewählt, welches bekanntermaßen in einschichtigen Epithelien sowie in luminalen Drüsenzellen exprimiert wird.

vWF ist ein für den Prozess der Blutgerinnung *in vivo* unerlässliches Glykoprotein. Gebildet wird vWF von Endothelzellen und Megakaryozyten, Zellvorläufern der Thrombozyten. Außerdem ist er aufgrund endothelialer Sekretion in der subendothelialen Matrix und im Blutplasma nachweisbar. An dieser Stelle dient er zur Darstellung der Gefäßendothelien.

Zur besseren Illustration der Fluoreszenzbilder ist in den gezeigten Abb. neben einem HE (Abb. 2A) oder ungefärbtem Schnitt (Abb. 2B; Abb. 4A-B; Abb. 7A-B) zusätzlich ein mittels DAPI gefärbter Schnitt (Abb. 2F-H; Abb. 4E-F; Abb. 7F-H) dargestellt. DAPI ist ein Farbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung der Zellkerne eingesetzt wird. Außerdem ist eine Übereinanderlagerung des DAPI und des mit spezifischem AK gefärbten Uterusschnitt aufgeführt (Abb. 2I-K; Abb. 4G-H; Abb. 7I-K).

Beide Methoden zeigen, dass CtsS und CstC im Uterus der unverpaarten Maus mit  $E_{2^-}$  dominantem Endometrium (Abb. 2C-E u. I-K; Abb. 3A-D), im Uterus am Tag 3,5 *pc* mit P<sub>4</sub>-dominantem Endometrium (Abb. 4C-D u. G-H; Abb. 5A-D), in Tag 3 Blastozysten

*in utero* (Abb. 6) und im schwangeren Uterus am Tag 7,5 *pc* (Abb. 7C-E u. I-K; Abb. 8A-D) nachweisbar sind.

Unter  $E_{2^{-}}$  sowie unter  $P_{4^{-}}$ Einfluss sind Protease und Inhibitor in den Endothelien der endometrialen Drüsen und Gefäße lokalisiert (Abb. 2C-E u. I-K; Abb. 3A-D; Abb. 4C-D u. G-H; Abb. 5A-D).



Abb. 2: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen 5µm dicker Uterus-Kryoschnitte mit E<sub>2</sub>dominantem Endometrium, entnommen aus unverpaarten Weibchen, unter Verwendung eines CtsS (C,D) und CstC (E) spezifischen AK.

Der mittels HE gefärbte Schnitt (A) gleicher Serie sowie der ungefärbte Schnitt (B) dienen der Übersicht. Weiterhin ist die Färbung mittels DAPI (F,G,H) abgebildet.

Die Schnitte I und J zeigen die Übereinanderlagerung von CtsS- und DAPI-Färbung, Schnitt K die Übereinanderlagerung von CstC- und DAPI-Färbung.

Die untersuchte Protease sowie der Inhibitor sind vor allem im Endothel der Drüsen und Gefäße lokalisiert. Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Beobachter (Tabelle17).



Abb. 3: Repräsentative IHC Färbungen 3µm dicker Uterus-Paraffinschnitte mit E<sub>2</sub>-dominantem Endometrium, entnommen aus unverpaarten Weibchen, bei 100× Vergrößerung (A,C,E,G,I) und 400× Vergrößerung (B,D,F,H,J). Unter A und B ist die Färbung mittels CtsS spezifischem AK, unter C und D die Färbung mittels CstC spezifischem AK und unter E und F die Färbung mittels CstF spezifischem AK abgebildet (modifiziert nach Baston-Buest *et al.*, 2010). Die Bewertung erfolgte durch zwei unabhängige Beobachter (Tabelle 17).

Die Schnitte G und H, welche mittels CK7 spezifischem AK sowie die Schnitte I und J, welche mittels vWF spezifischem AK gefärbt wurden, bestätigen die Lokalisation der untersuchten Proteine in den Endothelien von Drüsen und Gefäßen. Auch der spezifische Inhibitor CstF wird hier exprimiert.

Während die Lokalisationen von CtsS und CstC durch den Wechsel des dominierenden Hormons nicht beeinflusst zu werden scheinen, zeigen sich unter wechselndem Hormoneinfluss dennoch Unterschiede hinsichtlich der Konzentration besagter Proteine (Tabelle 17).

Gewebe		CtsS	CstC	CstF
	E <sub>2</sub> -dominante Phase		++	+
Stroma	P <sub>4</sub> -dominante Phase	+	+	+
	P4-dominante Phase mit Implantationsstellen		+	+
Gefäßendothel	E <sub>2</sub> -dominante Phase		+	+
	P <sub>4</sub> -dominante Phase	+	+	-
	P <sub>4</sub> -dominante Phase mit Implantationsstellen	+	+	+
Drüsenepithel	E <sub>2</sub> -dominante Phase		++	++
	P <sub>4</sub> -dominante Phase	+++	+	++
	P <sub>4</sub> -dominante Phase mit Implantationsstellen	++	++	+
Embryonalanlage		-	++	

Tabelle 17: IHC-Färbung muriner Uteri (Stroma, Gefäßendothel, Drüsenepithel) jeweils in E<sub>2</sub>und P<sub>4</sub>-dominanter Phase sowie in P<sub>4</sub>-dominanter Phase mit Implantationsstellen am Tag 7,5 *pc* bewertet durch zwei unabhängige Beobachter.

- keine Anfärbung; + schwache Anfärbung; ++ moderate Anfärbung;

+++ starke Anfärbung (modifiziert nach Baston-Buest et al., 2010)

Unter P<sub>4</sub>-Einfluss zeigt sich bei Betrachtung der mittels CtsS spezifischem AK gefärbten Uterusschnitte (Abb. 4C u. G; Abb. 5A-B) eine stärkere Anfärbung als unter E<sub>2</sub>-Einfluss (Abb. 2C-D; Abb. 3A-B; Tabelle 17). Die Expression von CtsS steigt im Endometrium schwangerer Mäuse weiter an, wobei es überwiegend im Endometrium in unmittelbarer Nähe zur Dezidua lokalisiert ist (Abb. 7C-D u. I-J; Abb. 8A-B).



 Abb. 4: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen 5µm dicker Uterus-Kryoschnitte mit P<sub>4</sub>dominantem Endometrium, entnommen aus verpaarten Weibchen am Tag 3,5 *pc* unter Verwendung eines CtsS (C) und CstC (D) spezifischen AK bei 400× Vergrößerung.
Die ungefärbten Schnitte dienen der Übersicht (A,B). Die Färbung mittels DAPI ist unter E und F abgebildet. Weiterhin ist die Übereinanderlagerung von CtsS und DAPI Färbung

(G) und von CstC und DAPI Färbung (H) dargestellt. Nach Auswertung durch zwei unabhängige Beobachter fällt auf, dass die Expression von CtsS und CstC bei gleicher Lokalisation in Drüsen und Gefäßen, unter P<sub>4</sub>-Einfluss höher zu sein scheint als unter E<sub>2</sub>-Einfluss (Tabelle 17).



Abb. 5: Beispiele für IHC Färbungen 3µm dicker Uterus-Paraffinschnitte mit P<sub>4</sub>-dominantem Endometrium, entnommen aus verpaarten Weibchen am Tag 3,5 *pc* bei 100× (A,C,E,G,I) bzw. 400× Vergrößerung (B,D,F,H,J), wobei die Schnitte A und B mittels CtsS spezifischem AK, C und D mittels CstC spezifischem AK, E und F mittels CstF spezifischem AK gefärbt wurden.

Zur Bestätigung der Lokalisation des Färbesignals in den Endothelien der Drüsen und Gefäße sind unter G und H die Färbung mittels CK7 spezifischem AK sowie unter I und J die Färbung mittels vWF spezifischem AK abgebildet.

Es wird nach Auswertung durch zwei unabhängige Beobachter deutlich, dass P<sub>4</sub>-Exposition zu einer Zunahme von CtsS führt (Tabelle 17).



Abb. 6: IHC Färbung von Blastozysten der Maus *in utero* an Tag 3,5 *pc* bei 450× Vergrößerung, die kleinen Kästen zeigen die 100× Vergrößerung. Gefärbt mittels für CtsS spezifischem AK (A), zeigt sich keine Anfärbung der Blastozyste, diese wird jedoch nach Färbung mittels CstC spezifische AK (B) und CstF spezifischem AK (C) deutlich (Baston-Buest *et al.*, 2010).

Die Blastozysten selber zeigen hingegen keine Expression von CtsS (Abb. 6A).

Im Gegensatz dazu sinkt die Expression von CstC von der  $E_2$ - zur  $P_4$ -dominanten Phase ab. Nach Färbung mittels CstC spezifischem AK zeigte sich außerdem eine intensive Anfärbung der Blastozyste am Tag 3 (Abb. 6B) sowie des Endometriums und der Dezidua in direkter Nachbarschaft zur Embryonalanlage von Uterusschnitten am Tag 7,5 *pc* (Abb. 7E u. K; Abb. 8C-D).

Nach Färbung mit CstF spezifischem AK zeigt sich analog zur Färbung mit CstC spezifischem AK eine besonders intensive Anfärbung der Blastozyste (Abb. 6C). Weiterhin zeigte sich eine Anfärbung der Implantationsstelle und der angrenzenden Dezidua ebenso wie eine Anfärbung der meisten Drüsenepithelien der übrigen Dezidua (Abb. 8E-F).



Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbungen 5µm dicker Uterus-Kryoschnitte mit P<sub>4</sub>-dominantem Endometrium und Implantationsstellen, entnommen aus verpaarten Weibchen am Tag 7,5 *pc* bei 400× Vergrößerung unter Verwendung eines CtsS (C,D) und CstC (E) spezifischen AK.

Zur Übersicht dienen die ungefärbten Schnitte (A,B). Die Schnitte F, G und H zeigen die Färbung mittels DAPI, außerdem ist die Übereinanderlagerung von CtsS- (I,J) sowie CstC- (K) und DAPI- Färbung dargestellt.

Die Auswertung durch zwei unabhängige Beobachter kommt zu dem Schluss, dass die Färbeintensität von CtsS in dem der Dezidua benachbarten Endometrium zunimmt, während das Färbesignal von CstC unter zunehmendem  $P_4$ -Einfluss eher abnimmt (Tabelle 17).



Abb 8: IHC Färbungen 3μm dicker Uterus Parafinschnitte mit P<sub>4</sub>-dominantem Endometrium und Implantationsstellen entnommen am Tag 7,5 *pc* bei 100× (A,C,E,G,I) bzw. 400× (B,D,F,H,J) Vergrößerung.

Die Auswertung durch zwei unabhängige Beobachter zeigt, dass nach Färbung mittels CtsS spezifischem AK (A,B) die Färbeintensität besonders im Endometrium in Nachbarschaft der Dezidua weiter ansteigt. Nach Färbung mittels CstC spezifischem AK (C,D) fällt in der Dezidua selber sowie in der Embryonalanlage ein ausgeprägtes Färbesignal auf (modifiziert nach Baston-Buest *et al.*, 2010).

Nach Färbung mit CstF spezifischem AK (E,F) zeigt sich ebenfalls ein besonders intensives Färbesignal der Implantationsstelle sowie der angrenzenden Dezidua (Tabelle 17).

Analog zu den bisherigen Abb. sind weiterhin unter G und H die Färbung mittels CK7 spezifischem AK und unter I und J die Färbung mit vWF spezifischem AK dargestellt.

## 3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der zellulären Herkunft von CtsS, CstC und CstF wurde eine FACS-Analyse zur Untersuchung immunkompetenter Zellen durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Oberflächenmarker zur Charakterisierung der unterschiedlichen Immunzellen verwendet:

Abb. 9 zeigt ein representatives Beispiel für die Charakterisierung einer Zellpopulation mittels FACS.



Abb. 9: Beispielhafte Abbildung für die Charakterisierung einer Zellpopulation mittels FACS. Die oberen Zeile zeigt Histogramme zu den Färbungen goat anti-mouse CSTC plus Alexa Fluor 488 (links oben), PE rat anti-mouse CD122 (oben Mitte), PE-Cy7 armenian hamster anti-mouse CD3 (rechts oben).

Auf der x-Achse ist dabei die Intensität des Signals, auf der Y-Achse die Zellzahl abgebildet.

Die untere Zeile zeigt einen Streulicht *dot-plot* immunkompetenter Zellen (SSLin Seitwärtsstreulicht; FSLin Vorwärtsstreulicht), wobei der grün gefärbte Bereich die Fraktion der Lymphozyten (Lym) charakterisiert (unten links) sowie einen *dot-plot* der Fluoreszenzmessung für die Färbung mittels PE rat anti-mouse CD122 und goat anti-mouse CST3 plus Alexa Fluor 488 (unten rechs).

CD3 diente hierbei als Marker für reife T- und NK-Zellen in Mäusen. CD4 charakterisiert MHC-II pos. T-Zellen sowie Subpopulationen von NK-Zellen. CD8 wird von Makrophagen, MHC-I pos. T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Uterine NK(uNK)- Zellen werden als CD3-neg. (CD3<sup>-</sup>) und CD122-pos. (CD122<sup>+</sup>) beschrieben (Yadi *et al.*, 2008).

Bei Betrachtung der am schwangeren Uterus durchgeführten sowie der am nicht schwangeren Uterus durchgeführten Untersuchungen fällt als erstes eine deutliche Zunahme von CD3<sup>-</sup>/CD122<sup>+</sup> Zellen von 372 auf 3679 Zellen in der Dezidua auf (Tabelle 18).

Diese uNK-Zellen exprimieren unter  $E_{2^-}$  wie auch unter  $P_4$ -Einfluss sowohl CtsS als auch CstC und CstF. Während in der Dezidua im Vergleich zum nicht schwangeren Uterus die Anzahl der CstC exprimierenden Zellen jedoch von 90% auf 68,58% zurückgeht und die von CstF mit einer Erhöhung von 61,54% auf 78,8% nur vergleichsweise diskret zunimmt, so zeigt sich mit einer Steigerung von 44,9% auf 92,12% ein deutlicher Anstieg an CtsS exprimierenden Zellen (Tabelle 18).

CD4<sup>+</sup> Zellen, zu denen auch die T-Helferzellen zählen, waren im nicht schwangeren Uterus mit einer Zellzahl von 507 wie auch in der Dezidua mit einer Zellzahl von 567 in ähnlicher Dimension vorhanden. Im nicht schwangeren Uterus zeigen mit 74,4% ein großer Teil dieser Zellen eine Expression von CtsS und immerhin auch 60% dieser Zellen eine Expression von CstF, während CstC mit einer Expression in nur 10% der Zellen hier in verhältnismäßig geringem Maße exprimiert wird.

In der Dezidua fällt ein kompletter Rückgang von CstF exprimierenden CD4<sup>+</sup> Zellen auf, während die Zahl an CstC exprimierenden CD4<sup>+</sup> Zellen mit einer Abnahme von 10% auf 8,5% weitgehend unverändert bleibt und auch die Anzahl an CD4<sup>+</sup> Zellen, welche die Protease CtsS exprimieren, von 74,4% nur vergleichsweise wenig auf 63,46% abnimmt (Tabelle 18).

Bei Auswerung der CD8<sup>+</sup> Zellen, zu denen z.B. zytotoxische T-Zellen und dentritische Zellen zählen, zeigt sich mit einer Zellzahl von 258 Zellen pro Probe im nicht schwangeren Uterus in der Dezidua ein Abfall der CD8<sup>+</sup> Zellen auf 39 Zellen pro Probe. Zeigten im nicht schwangeren Uterus immerhin 2,9% der Zellen eine CtsS Expression, so wies in der Dezidua keine der detektierten CD8<sup>+</sup> Zellen eine Expression von CtsS auf, alle zeigten jedoch im Vergleich zum nicht schwangeren Endometrium eine erhöhte Expression beider Inhibitoren mit einer Zunahme der CstC Expression um 25% und einer Zunahme der CstF Expression von 5% auf 33,3% (Tabelle 18).

Die Anzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen, also an reifen T- und NK-Zellen, nahm in der Dezidua im Vergleich zum nicht schwangeren Uterus mit 2157 und 1113 Zellen ebenfalls ab, die Expression sowohl von CtsS als auch der Inhibitoren blieb jedoch konstant bei fast 90% (Tabelle 18).

Marker	Durchschnittliche	CtsS	CstC	CstF	Horkupft dor Drobo
	Zellzahl pro Probe	%	%	%	Herkunn der Flöbe
CD3 <sup>-</sup> /CD122 <sup>+</sup>	372	44,9	90	61,54	nicht schwangerer Uterus
	3679	92,12	68,58	78,8	Dezidua
CD4 <sup>+</sup>	507	74,4	10	60	nicht schwangerer Uterus
	567	63,46	8,5	0	Dezidua
CD8 <sup>+</sup>	258	2,9	0	5	nicht schwangerer Uterus
	39	0	25	33,3	Dezidua
CD3 <sup>+</sup>	2157	90,38	86	93,24	nicht schwangerer Uterus
	1113	86,4	85,95	90,98	Dezidua

Tabelle 18: Ergebnisse der FACS-Analyse für CD Moleküle ausgewählter immunkompetenter Zellen (extrazelluläre Färbung) sowie der Prozentanteil der Zellen mit Expression der untersuchten Proteine CtsS, CstC und CstF (intrazelluläre Färbung), jeweils im Vergleich nicht schwangerer Uterus mit Dezidua der Maus an Tag 9 *pc* (n=4) (Baston-Buest *et al.*, 2010).

#### 4 Diskussion

Beim Menschen findet die Implantation eines Embryos in das maternale Endometrium nur während einer bestimmten Periode des Menstruationszyklus statt. Dieser Zeitraum wird auch als Implantationsfenster bezeichnet.

Bildlich gesprochen kann die Einnistung einer Blastozyste in das Endometrium nur dann stattfinden, wenn das Implantationsfenster geöffnet ist.

Dieser nach der erfolgreichen Befruchtung für die Entstehung einer Schwangerschaft obligat notwendige Schritt blieb jedoch lange unverstanden und gibt der Wissenschaft bis heute in weiten Teilen noch immer Rätsel auf. Technische Fortschritte ermöglichen eine immer feinere und exaktere Erforschung implantationsassoziierter Phänomene. Auf diese Weise gewinnt die Forschung im Laufe der Zeit immer größere Einsichten in die komplexen Interaktionen zwischen mütterlichem und embryonalem Gewebe.

In der Literatur findet sich ein breitgefächertes Spektrum sehr heterogener Studien, welche die Implantationsereignisse aus verschiedenen Blickwinkeln beleuchten.

Wichtige Kernfragen bleiben weiterhin ungeklärt. Auf welche Weise gelingt es dem *semi-allogenen* Embryo, der Eliminierung durch das mütterliche Immunsystem zu entgehen? Wie sieht die Rollenverteilung im Prozess der Implantation aus? Ist die Blastozyste der "Angreifer", der sich aktiv in das rezeptive Endometrium vorarbeitet oder nimmt das mütterliche Gewebe die Blastozyste aktiv in sich auf und ermöglicht auf diese Weise erst die Etablierung einer Schwangerschaft?

Unumstritten scheint jedoch, dass die embryo-maternale Kommunikation einen der ersten Schritte zur erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft darstellt. Diese erfolgt über eine Vielzahl von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteinasen. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Funktion der Cystein-Proteinase CtsS, deren Expression in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe an dezidualisierten Stromazellen nach Kontakt mit TCM deutlich hoch reguliert war (Hess *et al.,* 2007). Außerdem wurden die CtsS Inhibitoren CstC und CstF sowie das Zytokin IL-6, über das in der Literatur beschrieben wird, dass es in dendritischen Zellen der Maus die Expression von CtsS stimulieren kann (Kitamura *et al.,* 2005), genauer untersucht.

Zu Beginn der Forschungsarbeiten wurde zunächst von der Hypothese ausgegangen, dass der invadierende Embryo die Protease CtsS sezerniert und durch Matrixdegeneration aktiv in das rezeptive Endometrium eindringt. Am Modell des Goldhamsters konnte bereits die Expression von Cts L und P durch Blastozysten mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Sireesha *et al.*, 2008).

Überraschenderweise lieferten die Untersuchungen mittels *nested*-PCR auf CtsS mRNA Expression nicht das erwartete Ergebnis. Es scheint nicht der Embryo zu sein, der durch

die Expression einer Protease aktiv seine Invasion in das Endometrium induziert (Baston-Buest *et al.*, 2010).

Zwar zeigten zwei untersuchte Blastozysten eine pos. CtsS Expression. Es muss jedoch retrospektiv davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen beiden scheinbar CtsS pos. Blastozysten nicht um eine echte, von der Blastozyste ausgehende, pos. mRNA Expression handelt. Die geringe Anzahl an exprimierenden Blastozysten spricht vielmehr dafür, dass es sich um eine Übertragung mütterlicher mRNA im Sinne eines *maternal carry over* zu handeln scheint.

Weiterhin spricht für diese These, dass sich auch in untersuchten anderen Entwicklungsstadien sowie in *gepoolten* Blastozysten, die angefertigt wurden, um die mRNA Konzentration zu erhöhen und auf diese Weise auch niedrig exprimierte Produkte nachzuweisen, keine CtsS mRNA Expression zeigen ließ. Auch auf Proteinebene bestätigten sich diese Ergebnisse. Die mittels IHC untersuchten Blastozysten in Utero zeigten keine Anfärbung mittels spezifischem AK und demnach ebenfalls keine CtsS Expression (Baston-Buest *et al.*, 2010) (Abb. 6).

Die fehlende Expression der Cts-Protease durch die Blastozysten lässt sich auch mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichen. So konnten CtsB und D in Präimplantationsembryonen der Maus ab dem 2-Zellstadium nachgewiesen werden. Die Expression der hauptsächlich in den Lysosomen lokalisierten Proteasen nahm bis zum Erreichen des Morulastadiums noch weiter zu, während die untersuchten Blastozysten fast keine CtsB oder D Expression zeigten (Tsukamoto *et al.*, 2013).

Es wäre also denkbar, dass es sich auch bei CtsS um eine Protease handeln könnte, welche während der frühen embryonalen Entwicklung nur intermittierend exprimiert wird. Somit bestünde die Option zu untersuchen, ob frühere Entwicklungsstadien präimplantativer Mausembryonen (z.B. 2-Zeller) eine Expression von CtsS zeigen.

Auf maternaler Ebene zeigte sich mittels IHC nach Inkubation mit CtsS spezifischem AK eine starke Anfärbung des Endothels der Drüsen und Gefäße im Endometrium unter  $E_{2^{-}}$ sowie unter P<sub>4</sub>-Einfluss mit einer vergleichsweise höheren Intensität der Färbung unter P<sub>4</sub>-Einfluss. Im schwangeren Uterus nahm die Intensität der Färbung sogar noch weiter zu. Hier fiel außerdem auf, dass CtsS besonders im Endometrium benachbart zu Dezidua lokalisiert war (Baston-Buest *et al.*, 2010).

Die Expression an der Grenzfläche maternalen und embryonalen Gewebes lässt prinzipiell 2 Hypothesen zu.

Auf der eine Seite könnte die Protease entweder die für eine erfolgreich Implantation obligat notwendigen matrixdegenerierierenden und angiogenetischen Vorgänge unterstützen, auf der anderen Seite jedoch auch ein Eindringen des *semi-allogenen* Embryos limitieren.

Cystein Cts, zu denen auch CtsS gehört, erfüllen im Organismus ein weitreichendes Aufgabenprofil.

Untersuchungen an CtsS sowie CstC *knock-out* Mäusen zeigten die Bedeutung von CtsS für Angiogenese und neoplastische Prozesse im Zusammenhang mit Tumorwachstum (Wang *et al.*, 2006). Dies ist ein Modell, welches hohe Ähnlichkeit mit dem Prozess der Blastozystenimplantation besitzt und daher erlaubt, Parallelen zu ziehen. Shi und Mitarbeitern, die im Rahmen von Studien zur Wundheilung mittels CtsS *knock-out* Mäusen basierend auf einem C57/B16 Stamm zeigten, dass ein Fehlen von CtsS eine gestörten Angiogenese zur Folge hatte (Shi *et al.*, 2003), verstärken die Hypothese, dass CtsS auch während der Implantation in den Prozess der Angiogenese involviert zu sein scheint und auf diese Weise einen Beitrag zur erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft leistet.

Weiterhin spricht für diese These, dass Untersuchungen an einem *in vitro* Modell mit bovinen Endothelzellen darauf schließen ließen, dass eine Induktion von CtsS durch Zytokine und pro-angiogenetische Faktoren eine Angiogenese begünstigt, während eine Hemmung von CtsS z.B. durch CstC zu einer deutlichen Verschlechterung der Neovaskulisierung zu führen schien (Shi *et al.*, 2003).

Was die generelle Beteiligung von Cts am Prozess der Etablierung einer Schwangerschaft anbelangt, findet sich ein verhältnismäßig umfangreiches Spektrum an Literatur. Die Proteasen der Cathepsinfamilie sind im Gewebe des Reproduktionstraktes verschiedener Spezies beschrieben und zeigen im Rahmen der Implantation und Plazentation ein weitreichendes, teilweise phasenabhängiges Verteilungsmuster. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Song eine Expression der CtsB, D, H, K, L, S und Z im Endometrium und in der Plazenta von Schafen (Song *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Implantation der Maus werden CtsB und CtsL in Trophobastzellen sowie der Dezidua beschrieben und gelten als wichtige Faktoren für die Embryoimplantation und Dezidualisierung (Afonso *et al.*,1997). Erst durch eine gesteigerte Cts Expression durch die Trophoblastzellen scheint die Invasion in das uterine Stroma der Maus möglich zu sein (Afonso *et al.*,1997). In Untersuchungen zur Expression von Cts B, H, K, L und S im humanen Endometrium konnte ebenfalls CtsS nachgewiesen werden. Die genannten Cts zeigten im Endometrium eine breitgefächerte Verteilung. CtsS zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten Cts jedoch eine vergleichsweise geringe Expression mit einer hauptsächlichen Lokalisation im Oberflächen- und Drüsenepithel. Anders als in der vorliegenden Arbeit am Modell der Maus zeigte sich im Rahmen dieser Studie jedoch keine Änderung der Expression während Proliferations- und Sekretionsphase sondern eine gleich bleibende Expression. Ferner legt der Nachweis von Cathepsinproteasen über den gesammten Verlauf des Menstruationszyklus die Vermutung nahe, dass den Cts ebenfalls eine Rolle in der Aufrechterhaltung des weiblichen Zyklus zuzukommen scheint (Jokimaa *et al.*, 2001). Der fehlende Anstieg der Cts-Expression in der P<sub>4</sub>-dominanten Phase des humanen Endometriums lässt sich möglicherweise auf das Fehlen einer Embryonalanlage, welche wie bereits beschrieben zur Dezidualisierung des Endometriums der Maus obligat notwendig ist, zurückführen.

Die Tatsache, dass CtsS immhunhistochemisch und mittels Immunfluoreszenz in der Dezidua in unmittelbarer Nachbarschaft des implantierten Embryos lokalisiert ist, liefert Grund zur Annahme, dass der Embryo ein Signal aussendet, das das mütterliche Endometrium dazu veranlasst, CtsS zu exprimieren. Da wie bereits beschrieben bekannt ist, dass CtsS durch IL-6 induziert werden kann, wurden die zuvor neg. auf die Expression von CtsS untersuchten Blastozysten auf die Expression dieses Zytokins weiter untersucht. Interessanterweise ließ sich die Expression von IL-6 mRNA in annähernd allen untersuchten Einzelblastozysten nachweisen.

Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Daten anderer Arbeitsgruppen überein. Bereits im Jahre 1990 beschrieb die Arbeitsgruppe um Murray die Expression von IL-6 mRNA in Blastozysten der Maus des Stammes C57BL/6 (Murray *et al.*, 1990). Zwei Jahre später publizierte die Arbeitsgruppe um Rothstein, dass IL-6 in B6D2F1 Mäusen sogar bereits ab dem 8-Zell Stadium exprimiert wird (Rothstein *et al.*, 1992). Weiterhin lieferten Studien an kultivierten Blastozysten der Maus bereits erste Hinweise darauf, dass es sich bei IL-6 um ein Sekretionsprodukt handeln könnte (Murray *et al.*, 1990).

Nach zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutet alles darauf hin, dass IL-6 im frühen Stadium der Implantation der Maus ein von der Blastozyste freigesetzer parakriner Faktor ist, der CtsS im mütterlichen Gewebe aktivieren kann.

Da sich mittels IHC zwar die Lokalisation von CtsS detektieren ließ, jedoch unklar blieb, welche Zellen es nun konkret sind, die die Protease sezernieren, schloss sich eine FACS-Analyse zur Detektion immunkompetenter Zellpopulationen mit entsprechendem Cts/Cst-Profil an.

Hier zeigte sich, dass uNK-Zellen, denen schon länger eine entscheidende Funktion bei der erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft nachgesagt wird (Herington & Bany, 2007), eine der Hauptquellen für CtsS darstellten, während sich CD8<sup>+</sup>-Zellen nach den Ergebnissen der FACS-Analyse als Ursprung der Protease CtsS im Zusammenhang mit der Implantation ausschließen ließen (Baston-Buest *et al.*, 2010).

Nach Vorliegen dieser Ergebnisse wurden Untersuchungen zur Expression der CtsS Inhibitoren CstC und F sowohl auf embryonaler als auch auf maternaler Ebene angeschlossen. Im Jahre 2008 konnten Hamilton und Mitarbeiter zeigen, dass die Aktivität von CtsS in T-Zellen sowie anderen Leukozyten durch CstF reguliert wird (Hamilton *et al.*, 2008) und auch über CysC ist bekannt, dass es als Inhibitor von CtsS fungieren kann (Abrahamson *et al.*, 2003).

Die zuvor neg. auf die Expression von CtsS untersuchten Blastozysten wurden ebenfalls mittels *nested*-PCR auf eine mögliche Expression von CstC und CstF untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Expression von CstC mRNA in nahezu allen untersuchten Blastozysten sowie eine Expression von CstF mRNA in nahezu 50% der untersuchten Blastozysten. Auf Proteinebene zeigte sich eine intensive Anfärbung der Blastozysten mit CstC genause wie mit CstF spezifischem AK (Baston-Buest *et al.*, 2010) (Abb. 6).

Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass sich die Blastozyste durch Expression von Proteaseinhibitoren aktiv gegen einen Verdau, durch das mütterliche Endometrium zu schützen scheint. Ferner wäre auch die Hypothese denkbar, dass sie durch Sekretien von CstC und F als antiinvasives Signal ihre eigene Invasion in das rezeptive Endometrium reguliert, indem sie die kollagenolytischen und elastonolytischen Eigenschaften von CtsS inhibiert und eine überschießende Invasion verhindern kann.

Auf maternaler Ebene fiel genau wie bei der Protease eine Expression der Inhibitoren im Endothel endometrialer Drüsen und Gefäße auf. Hier nahm jedoch die Konzentration in der P<sub>4</sub>-dominanten Phase im Vergleich zur E<sub>2</sub>-dominanten Phase ab. Bemerkenswert war hier außerdem eine besonders intensive Anfärbung der Dezidua unmittelbar benachbart dem implantierten Embryo. Die Ergebnisse der FACS-Analyse machten weiterhin deutlich, dass CD8<sup>+</sup>Zellen in der Dezidua eine Quelle von CstC und F darzustellen scheinen, wohingegen sich keine dieser CD8<sup>+</sup>Zellen als pos. für CtsS zeigte (Baston-Buest *et al.*, 2010).

Auch in früheren Studien, welche sich mit der Implantation befassten, konnte bereits gezeigt werden, dass die embryonale Expression von CstC einen Schutz vor reguliertem Zelltod, induziert durch Proteinasen der Cathepsinfamilie, darstellen könnte. So wurde bereits eine Regulation von CtsB und CtsL durch CstC in Trophoblast Riesenzellen beschrieben, die Behandlung von Mäusen mit einem spezifischen CstC Inhibitor E-64 in hoher Konzentration ging in dieser Studie sogar mit einem vollständigen Implantationsversagen einher (Afonso *et al.*, 1997).

Die höhere CstC Expression in der E<sub>2</sub>-dominierten Phase ist ebenfalls ein Hinweis auf ein vom mütterlichen Organismus ausgehendes antiinvasives Signal. Das sich in der proliferativen Phase befindende Endometrium ist nicht auf die Aufnahme eines Embryos vorbereitet. Es deutet alles darauf hin, dass die Cystein Proteinase CtsS und Ihre Inhibitoren CstC und F einen weiteren am Prozess der Implantation essentiell beteiligten Enzym-Inhibitor Verband darstellen.

In diesem Zusammenhang noch interessanter als der Nachweis von CstC dürfte jedoch der Nachweis von CstF sein, denn während CstC eine sowohl im Organismus der Maus als auch des Menschen weit verbreitete Protease-Inhibitor darstellt (Abrahamson *et al.*, 1990), so zeigt CstF ein deutlich zellspezifischeres Expressionsmuster. Es wird ausschließlich in Zellen des Immunsystems, wie z.B. T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert (Magister *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 1998; Halfon *et al.*, 1998; Obata-Onai *et al.*, 2002).

Mittels FACS-Analyse ließen sich CstC und CstF vor allem in CD3<sup>-</sup>/CD122<sup>+</sup> uNK-Zellen sowie CD3<sup>+</sup> reifen T- und NK-Zellen detektieren, wobei die Anzahl der die Inhibitoren exprimierenden Zellen wie auch die Zellzahl selbst in nicht schwangerem Endometrium und Dezidua teilweise stark variierten (Baston-Buest *et al.*, 2010). An dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben muss auch die Tatsache, dass CD4<sup>+</sup> MHC-I pos. T-Zellen im nicht schwangeren Endometrium CstF exprimieren, in der Dezidua jedoch keine Expression zeigen, während die Expression von CstC stabil bleibt (Baston-Büst *et al.*, 2010) (Tabelle 18).

Diese Ergebnisse führen zu einem weiteren zu berücksichtigenden Punkt im Hinblick auf die erfolgreiche Implantation und den weiteren Verlauf der Schwangerschaft, nämlich die immunologische Betrachtung. Der mütterliche Organismus akzeptiert den Embryo, der unterschiedliche Antigene von Mutter und Vater enthält und somit ein *semi allogenes* Transplantat darstellt. Studien zur Verteilung immunkompetenter Zellen während der Implantation gehen sogar soweit zu beschreiben, dass es erst die Zellen des mütterlichen Immunsystems – z.B. mütterliche NK- und dendritische Zellen – sind, die eine erfolgreiche Schwangerschaft möglich machen (Hanna *et al.*, 2006; Plaks *et al.*, 2008).

Alle diese Zellen wandern in der frühen sekretorischen Phase in das mütterliche Endometrium ein und sind an der Vorbereitung auf die Implantation beteiligt.

Der Dialog von embryonalen Zytokinen und Chemokinen sowie die mütterliche Reaktion hierauf scheinen einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Implantation zu leisten (van Mourik *et al.*, 2009). Mit anderen Worten, die Immunologie der Schwangerschaft resultiert aus einer Kombination von Signalen und Antworten, welche einerseits vom mütterlichen Immunsystem und andererseits vom embryo-maternalen Immunsytem ausgehen (Mor *et al.*, 2011).

Abschließend lässt sich zusammenfassen: Es scheint sich zu bestätigen, dass CtsS an der erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft beteiligt ist, wobei es durch das

rezeptive Endometrium exprimiert und durch von der Blastozyste freigesetztes IL-6 induziert wird. Gegenspieler bilden von der Blastozyste exprimiertes CstC und CstF (Baston-Buest *et al.*, 2010).

Es deutet jedoch vieles darauf hin, dass dieser weitere Schritt in der Erforschung des Periimplantationsgeschehens noch lange nicht der letzte gewesen sein wird.

In Untersuchungen an CtsS *knock-out* Mäusen zeigten sich diese ebenso wie CstC *knock-out* Mäuse als fertil (Huh *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999). Es scheinen also parallele, zum Ziel führende Wege zu existieren. So ist z.B. das Vorhandensein weiterer Proteasen und ihrer Inhibitoren denkbar und beschrieben.

Die erfolgreiche Entstehung einer Schwangerschaft scheint auf mehreren Ebenen streng limitiert zu sein. So ist die Eizelle nur wenige Stunden befruchtungsfähig. Erfolgt in diesem kurzen Zeitfenster die erfolgreiche Befruchtung durch eine männliche Samenzelle, schließen sich Zellteilungen an, die jede für sich mit der Möglichkeit einhergehen, dass Mutationen stattfinden, welche die weitere Entwicklung verändern oder sogar beenden. Der Transport der Blastozyste durch den Eileiter stellt die nächste Hürde auf dem langen Weg in den Uterus dar. Hier beginnt bereits der erste embryomaternale Dialog. Im Uterus angekommen, ist für die Blastozyste nicht etwa das Ziel erreicht, sondern es folgt der vielleicht komplexeste und aufwendigste Schritt in der Entstehung einer Schwangerschaft, die eigentliche Implantation in das endometriale Stroma.

Die Einführung von ART besonders der IVF- und ICSI-Methode stellte einen Meilenstein in der Sterilitätstherapie dar.

Mit der Geburt von Louise Brown im Juli 1978, dem ersten Kind nach erfolgreicher IVF, eröffneten sich für viele ungewollt kinderlose Paare neue Perspektiven. Seither wurden die Methoden der ART kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert.

Die Zahlen des DIR 2012, nach denen im Jahr 2012 in Deutschland 47807 Frauen mit ART behandelt wurden (DIR 2012), machen deutlich, dass die weitere Erforschung des komplexen Implantationsgeschehen nicht nur von theoretischer sondern vielmehr von klinischer Bedeutung ist.

Trotz jahrelanger Forschung und klinischer Erfahrung ist die Schwangerschaftsrate weiterhin niedrig.

In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Entwicklung eines rezeptiven Endometriums auseinandersetzen (Achache & Ravel 2006; Sherwin *et al.*, 2006). Es wurde versucht, die Kulturbedingungen für den Embryo im Rahmen von ART durch Veränderung von Kulturmedien und Kulturbedingungen zu verbessern (Gardner 2007). Dennoch werden viele Frauen entweder gar nicht erst schwanger oder erleiden frühe Fehlgeburten (Arck *et al.*, 2008). Nach neuesten

Erhebungen des DIR kam es im optimalen Fall im Jahr 2012 nach einer konventionellen IVF in 37,28% und nach einer ICSI in 31,59% der durchgeführten Embryonentransfers zu einer Schwangerschaft (DIR 2012).

Die Entscheidung zur Durchführung einer Kinderwunschbehandlung bedeutet für das ungewollt kinderlose Paar stets einen bedeutenden Schritt, der mit erheblicher körperlicher, psychischer aber auch finanzieller Belastung verbunden ist.

Daher sollte es auch weiterhin das Ziel bleiben die Erfolgsrate nach ART zu verbessern. Während des eigentlichen Prozesses der Implantation scheint dem frühen embryomaternalen Dialog eine entscheidende Bedeutung zuzukommen. Aufgrund seiner Komplexität und Empfindlichkeit bedarf er wohl auch weiterhin intensiver Untersuchungen, um die Ergebnisse der ART auch in Zukunft weiter verbessern zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung von präimplantativen Blastozysten sowie in der Betrachtung der Vorgänge an der embryomaternalen Grenzfläche. Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass die Proteinase CtsS und ihre Inhibitoren CstC und CstF ein Puzzle-Stück im komplexen Agonist-Inhibitor Profil der erfolgreichen Implantation darstellen.

Dennoch werden auch weiterhin intensive Forschungen zur Ergründung dieses unglaublich vielseitigen Prozesses notwendig sein.

#### 5 Zusammenfassung

Bis heute ist der molekulare Mechanismus der erfolgreichen Implantation eines Embryos in das mütterliche endometriale Stroma nur unvollständig verstanden.

Es steht jedoch fest, dass dieser Vorgang einen fein aufeinander abgestimmten Dialog zwischen mütterlichem und embryonalem Gewebe erfordert. An diesem sehr sensiblen Prozess sind neben Chemokinen, MMPs und Wachstumsfaktoren auch Cystein-Proteasen und entsprechende Inhibitoren beteiligt. Besondere Bedeutung scheint hier solchen Proteasen zuzukommen, welche zur Matrixdegeneration fähig sind. Diese können sowohl die invasiven Eigenschaften des invadierenden Embryos als auch die immunologische Situation auf Seiten des Endometriums zugunsten einer erfolgreichen Implantation modifizieren. Besonderes Augenmerk wurde im Rahmen dieser Untersuchung auf die Expression von CtsS und seinen Inhibitoren, CstC und F an der embryo-maternalen Grenzfläche und in Präimplantationsembryonen der Maus gerichtet. Angewandt wurden RT-PCR zur Untersuchung embryonaler mRNA, Immunfluoreszenz und immunhistochemische Proteinlokalisation zur Untersuchung mütterlicher und embryonaler Gewebe sowie FACS-Analyse zur Unterscheidung immunkompetenter Zellpopulationen des Uterus.

CtsS unterliegt im mütterlichen Gewebe der hormonellen Regulation durch E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> und scheint auf mütterlicher Seite durch Matrixdegeneration die Implantation zu fördern. CtsS ist im endometrialen Stroma der Implantationsstelle hochreguliert. Eine Schwangerschaft induziert einen Einstrom von CtsS pos. uNK-Zellen in das endometriale Stroma. Im Gegensatz dazu zeigten die untersuchten Präimplantationsembryonen zwar eine Expression der Transkripte der CtsS-Inhibitoren CstC und F, jedoch keine Transkripte von CtsS selbst.

Der eindringende Embryo kann durch Expression von CtsS-Inhibitoren die Tiefe seiner Invasion selbst limitieren. Darüber hinaus ist ein Schutzmechanismus gegen die mütterliche Proteaseaktivität denkbar. Durch die Synthese von IL-6 scheint er außerdem selbst die CtsS Expression im mütterlichen Endometrium anzuregen.

Der beobachtete Abfall an CD3<sup>+</sup> Zellen zeigt außerdem, dass es in der Dezidua zu einer Verminderung zytotoxischer T-Zellen zu Gunsten einer Implantation des *semi-allograften* Embryos kommt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die untersuchte Protease CtsS und ihre Inhibitoren CstC und F an dem komplexen Kommunikationssystem zwischen invadierendem Embryo und mütterlichem Endometrium beteiligt sind. Auf diese Weise stellen die Ergebnisse der Untersuchungen ein weiteres kleines Puzzlestück in der Erforschung der erfolgreichen Implantation dar.

#### 6 Literaturverzeichnis

Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM **2003** "Cystatins" *Biochemical Society Symposium (70):179-199* 

Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall A, Jensson O, Grubb A **1990** "Structure and expression of the human cystatin C gene" *Biochemical Journal 268(2): 287-294* 

Achache H, Revel A **2006** "Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation" *Human Reproduction Update 12(6): 731-746* 

Afonso S, Romagnano L, Babiarz B **1997** "The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation" *Development 124(17): 3415-3425* 

Afonso S, Romagnano L, Babiarz B **1999** "Expression of cathepsin proteinases by mouse trophoblast in vivo and in vitro" *Developmental Dynamics 216(4-5): 374-384* 

Allen E **1922** "The oestrus cycle in the mouse" *American Journal of Anatomy 30: 297-371* 

Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, Kishimoto T, Heinrich PC **1987** "Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells" *FEBS Letters 221(1): 18-22* 

Arck PC, Rücke M, Rose M, Szekeres-Bartho J, Douglas AJ, Pritsch M, Blois SM, Pincus MK, Bärenstrauch N, Dudenhausen JW, Nakamura K, Sheps S, Klapp BF **2008** "Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women" *Reproductive Biomedicine Online* 17(1): 101-113

Bania J, Gatti E, Lelouard H, David A, Cappello F, Weber E, Camosseto V, Pierre P **2003** "Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A 100(11): 6664-6669* 

Barrett AJ **1981** "Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases" *Methods in Enzymology 80: 771-778* 

Baston-Buest DM, Schanz A, Buest S, Fischer JC, Kruessel JS, Hess AP **2010** "The embryo's cystatin C and F expression functions as a protective mechanism against the maternal proteinase cathepsin S in mice" *Reproduction 139(4): 741-748* 

Birnboim HC **1983** "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA" *Methods in Enzymology 100: 243-255*  Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, Daneshvar L, May LT, Ray A, Sehgal PB, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL **1988** "The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21" *Genomics 3(1): 8-16* 

Braude P, Bolton V, Moore S **1988** "Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development" *Nature 332(6163): 459-461* 

Brömme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Kirschke H, Peters C, Thomas DY, Storer AC, Vernet T **1993** "Functional expression of human cathepsin S in Saccharomyces cerevisiae. Purification and characterization of the recombinant enzyme" *The Journal of Biological Chemistry 268(7): 4832-4838* 

Busch R, Cloutier I, Sékaly RP, Hämmerling GJ **1996** "Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum" *The EMBO Journal 15(2): 418-428* 

Butler EA, Flynn FV **1961** "The occurrence of post-gamma protein in urine: a new protein abnormality" *Journal of Clinical Pathology. 14:* 172-178

Campbell NA **1998** "Biologie" *Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage 1998* 

Cappello F, Gatti E, Camossetto V, David A, Lelouard H, Pierre P **2004** "Cystatin F is secreted, but artificial modification of its C-terminus can induce its endocytic targeting" *Experimental Cell Research* 297(2): 607-618

Chard T **1995** "Cytokines and implantation" *Human Reproduction Update 1(4):* 385-396

Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A **1989** "Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A 86(8): 2617-2621* 

Chen H-W, Chen JJW, Tzeng C-R, Li H-N, Chang S-J, Cheng Y-F, Chang C-W, Wang R-S, Yang P-C, Lee Y-T **2002** "Global analysis of differentially expressed genes in early gestational decidua and chorionic villi using a 9600 human cDNA microarray" *Molecular Human Reproduction 8(5): 475-484* 

Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, Nagasaka T, Saka M, Kimata T, Noda A, Nagata K, Jin H, Shi GP, Iguchi A, Murohara T, Yokota M **2006** "Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure" *Hypertension* 8(5): 979-987

Chomczynski P, Sacchi N **1987** "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Analytical Biochemistry 162(1): 156-159*
Clausen J **1961** "Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum" *Proceedings of the Society for Experimental Biologyand Medicine 107: 170-172* 

Curry TE, Osteen KG **2003** "The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle" *Endocrine Reviews 24(4): 428-465* 

De M, Sanford TH, Wood GW **1992** "Detection of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the uterus during the second half of pregnancy in the mouse" *Endocrinology* 131(1): 14-20

De M, Sanford TR, Wood GW **1992** "Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone" *Developmental Biology 151(1)*: *297-305* 

De M, Sanford TR, Wood GW **1993** "Expression of interleukin 1, interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy" *Journal of Reproduction and Fertility 97(1):* 83-89

Deutsches IVF-Register **2013** "DIR Jahrbuch 2012" *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie Sonderheft 2/2013* 

Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-T M, Weiss JM **2007** "Gynäkologie und Geburtshilfe" *Springer-Lehrbuch, 2. Auflage 2007* 

Fossum K, Whitaker JR **1968** "Ficin and papain inhibitor from chicken egg white" *Archives of Biochemistry and Biophysics 125(1): 367-375* 

Fuxe K, Nilsson O **1963** "The mouse uterine surface epithelium during the estrus cycle" *The Anatomical Record 145: 541-548* 

Gardner DK **2007** "Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics" *Reproduction, Fertility and Development 20(1): 9-18* 

Gerwin N, Jia GQ, Kulbacki R, Gutierrez-Ramos JC **1995** "Interleukin gene expression in mouse preimplantation development" *Developmental Immunology* 4(3): 169-179

Geuze HJ **1998** "The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning" *Immunology Today 19(6): 282-287* 

Green L, Coleman DL, Dagg CP; Fuller JL, Green MC, Kaliss N, Russell ES, Staats J (The staff of the Jackson Laboratory) **2007** "Biology of the laboratory mouse" *Dover publications, 2. Auflage, 1966 Onlineversion adaptiert durch Mouse Genome Informatics, 2007* http://www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml

## Grubb A, Löfberg H **1982**

"Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis"

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A 79(9): 3024-3027

Grubb A, Löfberg H **1985** 

"Human gamma-trace. Structure, function and clinical use of concentration measurements" *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum.* 177: 7-13

Halfon S, Ford J, Foster J, Dowling L, Lucian L, Sterling M, Xu Y, Weiss M, Ikeda M, Liggett D, Helms A, Caux C, Lebecque S, Hannum C, Menon S, McClanahan T, Gorman D, Zurawski G **1998** "Leukocystatin, a new Class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells"

The Journal of Biological Chemistry 273(26): 16400-16408

Hamatani T, Carter MG, Sharov AA and Ko MSH **2004** "Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development" *Developmental Cell 6: 117-131* 

Hamilton G, Colbert JD, Schuettelkopf AW, Watts C **2008** "Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis" *The EMBO Journal 27(3): 499-508* 

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" *Nature Medicine 12(9): 1065-1074* 

Herington JL, Bany BM **2007** "Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization" *Biology of Reproduction 76(4): 579-588* 

Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, Genbecev-Krtolica O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J, Fazleabas AT, Fisher SJ, Giudice LC **2007** "Decidual Stromal Cell Response to Paracrine Signals from the Trophoblast: Amplification of Immune and Angiogenic Modulators" *Biology of Reproduction 76: 102-117* 

Huh CG, Håkansson K, Nathanson CM, Thorgeirsson UP, Jonsson N, Grubb A, Abrahamson M, Karlsson S **1999** "Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene" *Molecular Pathology* 52(6): 332-340

Jackson MR, Peterson PA **1993** "Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules" *Annual Review of Cell Biology 9:207-235* 

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M **2002** "Immunologie" *Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage 2002* 

Jokimaa V, Oksjoki S, Kujari H, Vuorio E, Anttila L **2001** "Expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the human endometrium" *Molecular Human Reproduction 7(1): 73-78*  Kirschke H, Wiederanders B, Brömme D, Rinne A **1989** "Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins." *The Biochemical Journal 264: 467-473* 

Kitamura H, Kamon H, Sawa S, Park SJ, Katunuma N, Ishihara K, Murakami M, Hirano T **2005** "IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells" *Immunity* 23(5): 491-502

Klinke R, Silbernagel S **2003** "Lehrbuch der Physiologie" *Georg Thieme, 4. Auflage 2003* 

Kover K, Liang L, Andrews GK, Dey SK **1995** "Differential expression and regulation of cytokine genes in the mouse uterus" *Endocrinology 136(4): 1666-1673* 

Kropshofer H, Hämmerling GJ, Vogt AB **1999** "The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules." *Immunological Reviews.* 172: 267-278

Krüssel JS **2001** "Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen der embryonalen Implantation" *Habilitationsschrift* http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~kruessel/Habil/Habil%20JSK.pdf

Langerholc T, Zavasnik-Bergant V, Turk B, Turk V, Abrahamson M, Kos J **2005** "Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells" *The FEBS Journal 272(6): 1535-1545* 

Leidenberger FA, Strowitzki T, Ortmann O **2009** "Klinische Endokrinologie für Frauenärzte" *Springer Medizin Verlag, 4. Auflage 2009* 

Leonardi A, Turk B, Turk V **1996** "Inhibition of bovine cathepsins L and S by stefins and cystatins." *Biological Chemistry Hoppe Seyler.* 377(5): 319-321

Linnevers C, Smeekens SP, Brömme D **1997** "Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8<sup>+</sup> Tlymphocytes" *FEBS Letters 405: 253-259* 

Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis OK, Rosenwaks Z **1997** "Expression of IGFs and their receptors is a potential marker for embryo quality" *American Journal of Reproductive Immunology 38(4)* 237-245

Löffler G, Petrides PE **2002** "Biochemie und Pathobiochemie" *Springer Medizin Verlag; 7. Auflage 2002* 

Loppnow H **2001** "Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen" *Der Internist 42(1): 13-27*  Magister Š, Obermajer N, Mirković B, Švajger U, Renko M, Softić A, Romih R, Colbert JD, Watts C, Kos J **2012** 

"Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells" *European journal of cell biology 91: 391–401* 

Maltaris T, Dittrich R, Kölbl H, Seufert R, Fischl F **2008** "Faktoren der Implantation und frühen Embryonalentwicklung" *Journal für Gynäkologische Endokrinologie18(1): 15-18* 

Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS **1991** "Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products" *Nucleic Acids Research 19(5): 1154* 

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H **2010** "Molekulare Virologie" *Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage 2010* 

Moore KL, Persaud TVN **2007** "Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese – Klinik" *Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 5. Auflage 2007* 

Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S **2011** "Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site" *Annals of the New York Academy of Sciences 1221: 80-87* 

Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E **1990** "Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 87(8): 3092-3096

Murray R, Lee F, Chiu CP **1990** "The genes for leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are expressed in mouse blastocysts prior to the onset of hemopoiesis" *Molecular and Cell Biology 10(9):* 4953-4956

Nakagawa TY, Rudensky AY **1999** "The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation" *Immunological Reviews 172: 121-129* 

Nakanishi T, Ozaki Y, Blomgren K, Tateyama H, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K **2005** "Role of cathepsins and cystatins in patients with recurrent miscarriage" *Molecular Human Reproduction 11(5): 351-355* 

Ni J, Fernandez MA, Danielsson L, Chillakuru RA, Zhang J, Grubb A, Su J, Gentz R, Abrahamson M **1998** 

"Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor" *The Journal of Biological Chemistry* 273(38): 24797-24804

Obata-Onai A, Hashimoto S, Onai N, Kurachi M, Nagai S, Shizuno K, Nagahata T, Matsushima K **2002** "Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes" *International Immunology 14*(*10*): *1085-1098* 

Otto HH, Schirmeister T **1997** "Cysteine Proteases and Their Inhibitors" *Chemical Reviews* 97(1): 133-172 Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP **1998** "The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease" *Annals of International Medicine 128(2): 127-137* 

Paul WE **1993** "Fundamental immunology" New York: Raven Press, 3.Auflage 1993

Pieters J, Bakke O, Dobberstein B **1993** "The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail" *Journal of Cell Science 106: 831-846* 

Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Jung S **2008** "Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice" *The Journal of Clinical Investigation 118(12): 3954-3965* 

Plüger EB, Boes M, Alfonso C, Schröter CJ, Kalbacher H, Ploegh HL, Driessen C **2002** "Specific role for cathepsin S in the generation of antigenic peptides in vivo" *European Journal of Immunology 32(2):* 467-476

Popovici RM, Betzler NK, Krause MS, Luo M, Jauckus J, Germeyer A, Bloethner S, Schlotterer A, Kumar R, Strowitzki T, von Wolff M **2006** "Gene Expression Profiling of Human Endometrial-Trophoblast Interaction in a Coculture Model" *Endocrinology* 147(12): 5662-5675

Quinn CE, Simmons DG, Kennedy TG **2006** "Expression of Cystatin C in the rat endometrium during the peri-implantation period" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349(1): 236-244

Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA, Shi GP, Palmer JT, Karp ER, De Sanctis GT, Ploegh HL, Chapman HA **1998** "Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity" *The Journal of Clinical Investigation 101(11): 2351-2363* 

Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA **1996** "Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading" *Immunity 4(4): 357-366* 

Rietschel PE **1929** "Zur Morphologie und Histologie der Genitalausführungsgänge im Individualcyclus der weissen Maus" *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 135: 428-494* 

Roche PA, Cresswell P **1991** "Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A 88(8): 3150-3154* 

Romagnoli P, Germain RN **1994** "The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy" *The Journal of Experimental Medicine 180(3): 1107-1113* 

Rothstein JL, Johnson D, DeLoia JA, Skowronski J, Solter D, Knowles B **1992** "Gene expression during preimplantation mouse development" *Genes & Development 6(7): 1190-1201*  Schanz A, Hess A, Shahin A, Hirchenhain J, Krüssel JS **2004** "Molekulare Mechanismen der Embryoimplantation im Endometrium" *Der Gynäkologe 37: 123-127* 

Schenkel, J **1995** "Transgene Tiere" *Spektrum Akademischer Verlag (Reihe Labor im Fokus)* 

Schwarz G, Boehncke WH, Braun M, Schröter CJ, Burster T, Flad T, Dressel D, Weber E, Schmid H, Kalbacher H **2002** "Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma" *The Journal of Investigative Dermatology 119(1): 44-49* 

Sharkey A **1998** "Cytokines and implantation" *Reviews of Reproduction 3(1): 52-61* 

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" *Biology of Reproduction 53(4): 974-981* 

Sherwin R, Catalano R, Sharkey A **2006** "Large-scale gene expression studies of the endometrium: what have we learnt?" *Reproduction 132(1): 1-10* 

Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, Zhang Y, Pan JH, Lu ML, Cheng XW, Iguchi A, Perrey S, Lee AM, Chapman HA, Libby P **2003** "Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth" *Circulation Research* 92(5): 493-500

Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA **1999** "Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development" *Immunity 10(2): 197-206* 

Shuman S **1994** "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase" *The Journal of Biological Chemistry* 269(51): 32678-32684

Siegenthaler W, Blum HE **2006** "Klinische Pathophysiologie" *Georg Thieme Verlag, 9. Auflage 2006* 

Sireesha GV, Mason RW, Hassanein M, Tonack S, Navarrete Santos A, Fischer B, Seshagiri PB **2008** "Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster" *Molecular Human Reproduction* 14(6): 337-346

Song G, Bazer FW, Spencer TE **2007** "Differential expression of cathepsins and cystatin C in ovine uteroplacental tissues" *Placenta 28(10): 1091-1098* 

Sütterlin S **2009** "Ungewollte Kinderlosigkeit" *Online Handbuch Demographie des Berlin-Instituts für Bevölkerung und Entwicklung*  Storm van's Gravesande K, Layne MD, Ye Q, Le L, Baron RM, Perrella MA, Santambrogio L, Silverman ES, Riese RJ **2002** "IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression" *The Journal of Immunology 168(9): 4488-4494* 

Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P **1998** "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells" *The Journal of Clinical Investigation 102(3): 576-583* 

Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT **1995** "Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window" *Human Reproduction 10(10): 2793-2799* 

Tabibzadeh S, Sun XZ **1992** "Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle" *Human Reproduction 7(9): 1214-1221* 

Tazuke SI, Giudice LC **1996** "Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal: embryonic interactions" *Seminars in reproductive endocrinology 14*(*3*): 231-245

Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T **2013** "Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development" *The Journal of reproduction and development;59(1):33-39* 

Turk B, Bieth JG, Björk I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, Kos J, Colic A, Stoka V, Turk V **1995** "Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins" *Biological Chemistry Hoppe Seyler.* 376(4): 225-230

Turk V, Bode W **1991** "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases" *FEBS Letters 285(2): 213-219* 

Turk V, Turk B, Turk D **2001** "Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities" *The EMBO Journal 20 (17): 4629-4633* 

Turnsek T, Kregar I, Lebez D **1975** "Acid sulphydryl protease from calf lymph nodes" *Biochimica et Biophysica Acta: 403(2):514-520* 

van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ **2009** "Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment" *Journal of Leukocyte Biology 85(1): 4-19* 

Villadangos JA **2001** "Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them" *Molecular Immunology* 38(5): 329-346

Villadangos JA, Ploegh HL **2000** "Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge?" *Immunity* 12(3): 233-239 von Wolff M, Thaler CJ, Zepf C, Becker V, Beier HM, Strowitzki T **2002** "Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle" *Gynecological Endocrinology* 16(2): 121-129

Wang B, Sun J, Kitamoto S, Yang M, Grubb A, Chapman HA, Kalluri R, Shi GP **2006** "Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors" *The Journal of Biological Chemistry 281(9): 6020-6029* 

Wang H, Wen Y, Mooney S, Li H, Behr B and Polan ML **2003** "Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos" *Fertility and Sterility 80(Supp.2): 736-742* 

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR **1999** "Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy" *The New England Journal of Medicine* 340(23):1796-1799

Willstätter R, Bamann E **1929** "Über die Proteasen der Magenschleimhaut" Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 180(1-3): 127-143

Wolf PR, Ploegh HL **1995** "Antigen presentation. DM exchange mechanism" *Nature 376(6540): 464-465* 

World Health Organization **2013** "International Classification of Diseases (ICD)" *ICD-10 Version 2013, Kapitel 14* 

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK **1998** "IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses" *The Journal of Clinical Investigation 101(2): 311-320* 

Yadi H, Burke S, Madeja Z, Hemberger M, Moffett A, Colucci F.**2008** "Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells" *Journal of Immunology 181(9): 6140-614* 

## 7 Danksagung

Nach Fertigstellung meiner Dissertation ist es nun an der Zeit, einigen Menschen, die mich auf dem langen Weg bis hierher begleitet haben, meinen Dank auszusprechen.

Meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Alexandra Hess danke ich für die Überlassung des spannenden Themas und die permanente Bereitschaft, mir in wissenschaftlichen Fragen zur Seite zu stehen.

Frau Dr. rer. nat. Dunja Baston-Büst danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor und für Ihre ständige Bereitschaft, für alle Fragen zur Verfügung zu stehen.

Gemeinsam danke ich Euch für eure unendliche Geduld, wenn es nicht funktionieren wollte oder wenn andere Dinge dazwischen kamen. Zuletzt danke ich Euch für die nicht mehr zählbaren Stunden eurer kostbaren Zeit, die Ihr in meine Dissertation investiert habt.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jan-S. Krüssel, bei Herrn Dr. rer. nat. Jens Hirchenhain und dem Team des UniKiD bedanken, die mir stets mit ihrer Erfahrung, ihrem Fachwissen und ihrer konstruktiven Kritik zur Seite gestanden haben.

Ihr seid ein unbeschreibliches Team, Eure Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten, Eure Hartnäckigkeit und kollegialer Zusammenhalt haben mich immer sehr beeindruckt und werden mir sicherlich stets ein Vorbild sein.

Außerdem gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Mann, die mich über die ganze Zeit unterstützt haben.

Hättet Ihr mir nicht immer den Rücken frei gehalten und an mich geglaubt, wäre ich sicherlich niemals fertig geworden. Ich weiß mein Glück zu schätzen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) verdient meine Anerkennung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (HE- 3544/2-1).

## 8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Claudia Hölling