

# **Der Chemokin-regulierende Einfluss von Syndecan-1 auf die embryonale Implantation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Olga Altergot-Ahmad**  
aus Schachtinsk

Düsseldorf, April 2015

aus der Universitätsfrauenklinik / Universitäres, interdisziplinäres  
Kinderwunschzentrum Düsseldorf (UniKiD) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. med. Alexandra Petra Hess

Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Reproduktion der Frau</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das Endometrium	2
1.1.2	Die humane embryonale Implantation	3
1.1.3	Die humane Infertilität	4
<b>1.2</b>	<b>Zytokine</b>	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Chemokine und ihre Rezeptoren</b>	<b>6</b>
1.3.1	Chemokine <i>CXC-motif ligand 1</i> (CXCL1)	9
1.3.2	Chemokine <i>CXC-motif receptor 2</i> (CXCR2)	10
1.3.3	Ko-Rezeptor Syndecan-1 (Sdc-1)	11
<b>1.4</b>	<b>Signalwege in der embryonalen Implantation</b>	<b>14</b>
1.4.1	MAPK - ERK/JNK - Signalwege	15
1.4.2	Wnt-Signalweg	17
<b>1.5</b>	<b>Sphäroide – Etablierung eines <i>in vitro</i> Implantationsmodells</b>	<b>22</b>
<b>1.6</b>	<b>Charakterisierung der <i>Sdc-1-knock out</i>-Maus</b>	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>26</b>
<b>2.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>26</b>
2.2.1	Aussaat von Zelllinien	26
2.2.2	Mediumwechsel	27
2.2.3	Passagieren	27
2.2.4	Zellstocks	27
2.2.5	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	28
2.2.6	Dezidualisierung	28
2.2.7	Isolation und Kultur primärer endometrialer Stromazellen	29
2.2.8	Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut	30

<b>2.3 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>30</b>
2.3.1 RNA-Isolation	30
2.3.1.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit	31
2.3.1.2 DNase-Verdau	31
2.3.2 Reverse Transkription	32
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i> )	32
2.3.4 <i>Nested</i> -PCR	33
2.3.5 <i>Touchdown</i> -PCR	33
2.3.6 Quantitative <i>real time</i> Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	34
2.3.7 Verwendete Oligonukleotide	34
2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.9 Rekombinante DNA-Techniken	36
2.3.9.1 Verwendete Bakterienstämme	36
2.3.9.2 Anzuchtbedingungen für gramnegative Bakterien	37
2.3.9.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	38
2.3.9.4 RNA-Interferenz (RNA-Silencing, RNAi)	39
2.3.9.5 Generierung einer stabilen induzierbaren CXCR2- <i>kd</i> -Zelllinie	39
2.3.9.6 Midi-Plasmidisolierung	45
2.3.10 QuantiGene Plex Assay (QGP Assay)	47
2.3.11 Luminex-Technologie	47
2.3.12 Probenaufbereitung für QGP Assay	48
<b>2.4 Biochemische Methoden</b>	<b>49</b>
2.4.1 Proteinisolierung	49
2.4.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	49
2.4.1.2 Lysepuffer	50
2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	50
2.4.3 Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.4.4 Western blot/Dot blot und Immunodetektion	52
2.4.5 Probenherstellung für PCR, qRT-PCR, TD-PCR und WB	54
2.4.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	55
2.4.7 Probenherstellung für CXCL1-ELISA (Signalwege)	55
2.4.8 Anfertigung von Paraffinschnitten	55
2.4.9 Immunhistochemie (IHC)	56
2.4.10 Immunfluoreszenz (IF)	57
<b>2.5 Sphäroidanalysen</b>	<b>57</b>
2.5.1 Sphäroidformation	57

2.5.2	Sphäroidentwässerung und –einbettung für IHC	58
2.5.3	MitoTracker®-Färbung	59
2.5.4	Konfrontationsversuche	60
<b>2.6</b>	<b>Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus</b>	<b>61</b>
2.6.1	Haltungsbedingungen	61
2.6.2	Sdc-1-ko-Nachweis	61
2.6.3	Verpaarungsversuche und Gewichtsbestimmung	61
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Generierung eines stabilen induzierbaren CXCR2 <i>kd</i> in der endometrialen Stromazelllinie St-T1</b>	<b>62</b>
3.1.1	Generierte putative <i>KdCXCR2</i> -Zellklone	62
3.1.2	CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis	63
3.1.2.1	CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis – PCR	64
3.1.2.2	CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis – qRT-PCR	69
3.1.2.3	CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis – IHC und IF	70
3.1.2.4	CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis – WB	75
3.1.3	Steigerung und Optimierung der CXCR2-Expression und -amplifikation	77
3.1.3.1	<i>Nested</i> -PCR	77
3.1.3.2	Dezidualisierung und IL-1 $\beta$ -Inkubation	78
3.1.3.3	Hypoxie	79
3.1.3.4	CXCR2-Expressionssteigerung durch entzündliche Stimuli	82
3.1.4	CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis mittels QGP Assay	82
3.1.4.1	QGP Assay-Probelauf	82
3.1.4.2	QGP Assay	84
3.1.4.2.1	CXCR2	85
3.1.4.2.2	Sdc-1	86
3.1.4.2.3	CXCL1	86
3.1.4.2.4	MMP7	88
3.1.4.2.5	MMP9	89
3.1.4.2.6	VEGFA	90
3.1.5	Analysen eines putativ weiteren CXCL1-Rezeptors	91
<b>3.2</b>	<b>Signalwege in der humanen endometrialen Stromazelllinie St-T1</b>	<b>92</b>
3.2.1	MAPK-Signalweg	93
3.2.2	Wnt-Signalweg	97

<b>3.3 Sphäroide – 3D-Ko-Kultur als Modell für die embryonale Implantation</b>	<b>100</b>
3.3.1 Fluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskop-Aufnahmen	100
3.3.2 IHC und Lichtmikroskop-Aufnahmen	106
<b>3.4 Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus</b>	<b>109</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>113</b>
<b>4.1 Generierung einer stabilen induzierbaren CXCR2-<i>kd</i>-Zelllinie</b>	<b>113</b>
4.1.1 Die Rolle von CXCL1 und Sdc-1 in der Implantation	119
4.1.2 Die Rolle von VEGFA, MMP7 und MMP9 in der Implantation	123
<b>4.2 Signalwege in der humanen endometrialen Stromazelllinie St-T1</b>	<b>131</b>
<b>4.3 Sphäroide – 3D-Ko-Kultur als Model für die embryonale Implantation</b>	<b>137</b>
<b>4.4 Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus</b>	<b>140</b>
<b>4.5 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>144</b>
<b>4.6 Summary and prospects</b>	<b>147</b>
<b>5 LITERATUR</b>	<b>150</b>
<b>5.1 Eigene Publikationen, Poster &amp; Vorträge</b>	<b>178</b>
<b>6 ANHANG</b>	<b>180</b>
<b>6.1 Putative <i>kd</i>CXCR2-Zellklone</b>	<b>180</b>
<b>6.2 Auswertung der CXCR2-IF-Aufnahmen</b>	<b>182</b>
<b>6.3 Sphäroid-Konfrontationsversuche</b>	<b>185</b>
<b>7 DANKSAGUNG</b>	<b>188</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Graphische Darstellung des weiblichen Zyklus .....	1
Abb. 2: Schematische Darstellung der Implantation der Blastozyste .....	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der Chemokinstrukturen .....	6
Abb. 4: Schematische Darstellung des Sdc-Aufbaus .....	12
Abb. 5: Vereinfachte schematische Darstellung des MAPK-Signalwegs .....	16
Abb. 6: Der kanonische Wnt-Signalweg .....	19
Abb. 7: Schematische Darstellung der beiden nicht-kanonischen Wnt-Signalwege .....	20
Abb. 8: Schematische Darstellung des natürlichen RNAi-Mechanismus in Säugerzellen .....	40
Abb. 9: pENTR-H1/TO-Vektor-Karte <sup>184</sup> .....	42
Abb. 10: Schematische Darstellung der Ligation der beiden ss-Oligo zu einem ds-Oligo .....	46
Abb. 11: Das Luminex Reader Design .....	47
Abb. 12: QGP 2.0 Assay Basics .....	48
Abb. 13: Übersicht über die beiden verwendeten Sphäroidformationsmethoden .....	58
Abb. 14: Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten MitoTracker® .....	59
Abb. 15: Ergebnis der Gradienten-PCR nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte....	63
Abb. 16: $\beta$ -Aktin Expressionsanalyse .....	64
Abb. 17: CXCR2 <i>kd</i> Nachweis mittels CXCR2-PCR .....	65
Abb. 18: Erste CXCR2-PCR-Wiederholung mit den Proben auf der 1. Transfektion .....	66
Abb. 19: Zweite CXCR2-PCR-Wiederholung mit den Proben auf der 1. Transfektion.....	66
Abb. 20: TD-CXCR2-PCR mit den Proben der ersten Transfektion.....	67
Abb. 21: CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis mittels TD-CXCR2-PCR .....	68
Abb. 22: CXCR2-IHC-Färbung von einem <i>kd</i> CXCR2-Zellklon .....	71
Abb. 23: CXCR2-IHC-Färbung von Endometriumgewebe .....	73
Abb. 24: CXCR2-IHC-Färbung von Endometriumgewebe .....	73
Abb. 25: CXCR2-IF-Färbung einer <i>Kd</i> CXCR2-Zelllinie mit und ohne Tet-Induktion .....	75
Abb. 26: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-WB-Analyse.....	76
Abb. 27: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-WB-Analyse.....	77
Abb. 28: Repräsentatives Ergebnis einer <i>nested</i> -CXCR2-PCR.....	78
Abb. 29: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-PCR .....	79
Abb. 30: Repräsentative Ergebnisse für einen Hypoxienachweis .....	80
Abb. 31: Repräsentatives Ergebnis des Versuchs der Inkubationszeitbestimmung .....	81
Abb. 32: Detektion der CXCR2-Expression in PSZ nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli .....	82
Abb. 33: Graphische Darstellung des CXCR2-Ergebnisses aus dem QGP Assay-Probelauf .....	83
Abb. 34: Graphische Darstellung des CXCR2-Ergebnisses aus dem QGP Assay .....	85
Abb. 35: Graphische Darstellung des Sdc-1-Ergebnisses aus dem QGP Assay.....	86
Abb. 36: Graphische Darstellung des CXCL1-Ergebnisses aus dem QGP Assay .....	87
Abb. 37: Graphische Darstellung des MMP7-Ergebnisses aus dem QGP Assay.....	88

Abb. 38: Graphische Darstellung des MMP9-Ergebnisses aus dem QGP Assay.....	89
Abb. 39: Graphische Darstellung des VEGFA-Ergebnisses aus dem QGP Assay .....	90
Abb. 40: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR1-PCR.....	91
Abb. 41: Sdc-1 <i>kd</i> Nachweis auf Proteinebene mittels Dot blot. ....	93
Abb. 42: Dezidualisierungsnachweis mittels PRL-PCR .....	94
Abb. 43: Proteinexpression-Analyse von ERK und c-Jun und den jeweiligen phosphorylierten Formen, pERK und pc-Jun . ....	94
Abb. 44: ELISA-Ergebnis der CXCL1-Expression nach MEK1/2-Inhibitor-Inkubation .....	95
Abb. 45: ELISA-Ergebnis der CXCL1-Expression nach JNK-Inhibitor-Inkubation .....	96
Abb. 46: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhibitorversuche .....	97
Abb. 47: Dezidualisierungsnachweis mittels PRL-PCR in dKdS1+Tet.....	98
Abb 48: Proteinexpressionsanalyse von FZD4 und FZD6 in dSt-T1 und dKdS1.....	99
Abb 49: Graphische Zusammenfassung der FZD4- und FZD6- Expressionsanalysen .....	100
Abb. 50: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit zwei St-T1-Sphäroiden als Kontrolle .....	101
Abb. 51: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit HTR8/SVneo- und St-T1-Sphäroiden .....	102
Abb. 52: Gegenüberstellung von repräsentativen Ergebnissen der St-T1+St-T1-Negativkontrolle und der HTR8/SVneo+St-T1-Konfrontationskultur .....	103
Abb. 53: Ergebnis der Mittelpunkt-Distanzmessungen von Sphäroiden nach Ko-Kultur .....	104
Abb. 54: Ergebnis eines Konfrontationsversuchs mit einem HTR8/SVneo-Sphäroid und einem St-T1-Sphäroid nach 24h .....	105
Abb. 55: Repräsentative Ergebnisse der IHC-Färbung von St-T1+HTR8/SVneo-Sphäroiden .....	106
Abb. 56: Repräsentative Ergebnisse der Vimentin-IHC-Färbung von Sphäroiden .....	107
Abb. 57 Auswertung der Mittelpunkt-Distanzmessung der Sphäroid-Ko-Kultur nach IHC-Färbung ..	108
Abb. 58: Gegenüberstellung von Fluoreszenz (F)- und IHC-gefärbten Sphäroid-Ko-Kulturen .....	109
Abb. 59: Sdc-1- <i>ko</i> -Nachweis mittels PCR.....	110
Abb. 60: Ergebnis der Gewichtsbestimmung der Weibchen vor und nach der Verpaarung .....	111
Abb. 61: Gewichtsbestimmung der Sdc-1- <i>ko</i> - und WT-Jungtiere .....	112
Abb. 62: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit zwei KdS1-Sphäroiden als Negativkontrolle.....	185
Abb. 63: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit einem KdS1-Sphäroiden und einem St-T1-Sphäroid als Negativkontrolle .....	186
Abb. 64: Gegenüberstellung von repräsentativen Ergebnissen der KdS1+KdS1-Negativkontrolle und der HTR8/SVneo+KdS1-Konfrontationskultur .....	187

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Chemokinfamilie .....	8
Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien .....	26
Tab. 3: Übersicht über die Zusammensetzung der spezifischen Zellkulturmedien .....	28
Tab. 4: Standard-PCR-Programm .....	33
Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide .....	35
Tab. 6: Übersicht über die bei der Hitze-Schock-Transformation verwendeten Bakterienstämme .....	37
Tab. 7: Verwendete ss-Oligo .....	41
Tab. 8: Zusammensetzung der <i>annealing</i> -Reaktion .....	41
Tab. 9: Zusammensetzung der Ligationsreaktion .....	42
Tab. 10: Zusammensetzung des Transfektionspuffers für die Nukleofektion .....	44
Tab. 11: Verwendete Vektoren und erstellte Plasmid-Konstrukte .....	45
Tab. 12: Verwendete Primär-AK bei WB, IHC und IF Analysen .....	54
Tab. 13: Verwendete Sekundär-AK bei WB, IHC und IF Analysen .....	54
Tab. 14: Graphische Zusammenfassung der drei durchgeführten CXCR2-PCR .....	67
Tab. 15: Exemplarisches Ergebnis einer qRT-PCR als CXCR2- <i>kd</i> -Nachweis .....	69
Tab. 16: CXCR2-IHC-Auswertung .....	72
Tab. 17: CXCR2-IF-Auswertung .....	74
Tab. 18: Exemplarisches Ergebnis einer CXCR2-qRT-PCR nach Hypoxiebehandlung .....	80
Tab. 19: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR1-qRT-PCR .....	92
Tab. 20: Übersicht über die verpaarte Tieranzahl, Trächtigkeitsraten, Anzahl der Jungtiere .....	110
Tab. 21.: Übersicht über die Anzahl der durchgeführten Transfektionen .....	180
Tab. 22: CXCR2-IHC-Auswertung aller IHC-Abb. mit endometrialem Gewebe .....	182

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
β-TrCP	<i>β-transducin repeat-containing protein</i>
λ	Lambda
ΨB	Nährmedium für Bakterien
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
6Ckine	CCL21
7TM-	7 Transmembran-
<b>A</b>	
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase
AC-IM88	Humane epitheliale trophoblastäre Chorionkarzinom-Zelllinie
ADAM	<i>a disintegrin-like and metalloprotease domain</i>
AK	Antikörper
AMAC1	<i>alternative macrophage activation-associated CC chemokine-1, CCL18</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AN3-Ca	Humane epitheliale endometriale Adenokarzinom-Zelllinie
AP	alkalische Phosphatase
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC-Protein	<i>Adenomatous polyposis coli</i> -Protein
A-Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma A</i>
ART	assistierte Reproduktionstechniken
AS	Aminosäure
ASK	<i>apoptosis signal-regulating kinase</i>
Axin-Protein	<i>axis inhibition</i> -Protein
<b>B</b>	
BCA-1	CXCL13
BeWo	Humane Chorionkarzinom-Zelllinie
BLC	<i>B lymphocyte chemoattractant, CXCL13</i>
BMFZ	Biologisch medizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaar
B-Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma B</i>
BRAK	<i>breast and kidney-expressed chemokine, CXCL14</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	
ca.	<i>circa</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
cAMP	Cyclischen Adenosin-3',5'-monophosphat
C-	Carboxyl-
CCL1	CC-Motiv-Chemokinligand 1
CCL10	CC-MotivChemokinligand 10
CCL11	CC-Motiv-Chemokinligand 11

CCL12	CC-Motiv-Chemokinligand 12
CCL13	CC-Motiv-Chemokinligand 13
CCL14	CC-Motiv-Chemokinligand 14
CCL15	CC-Motiv-Chemokinligand 15
CCL16	CC-Motiv-Chemokinligand 16
CCL17	CC-Motiv-Chemokinligand 17
CCL18	CC-Motiv-Chemokinligand 18
CCL19	CC-Motiv-Chemokinligand 19
CCL2	CC-Motiv-Chemokinligand 2
CCL20	CC-Motiv-Chemokinligand 20
CCL21	CC-Motiv-Chemokinligand 21
CCL22	CC-Motiv-Chemokinligand 22
CCL23	CC-Motiv-Chemokinligand 23
CCL24	CC-Motiv-Chemokinligand 24
CCL25	CC-Motiv-Chemokinligand 25
CCL26	CC-Motiv-Chemokinligand 26
CCL27	CC-Motiv-Chemokinligand 27
CCL28	CC-Motiv-Chemokinligand 28
CCL3	CC-Motiv-Chemokinligand 3
CCL4	CC-Motiv-Chemokinligand 4
CCL5	CC-Motiv-Chemokinligand 5
CCL6	CC-Motiv-Chemokinligand 6
CCL7	CC-Motiv-Chemokinligand 7
CCL8	CC-Motiv-Chemokinligand 8
CCL9	CC-Motiv-Chemokinligand 9
CCR1	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
CCR10	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 10
CCR11	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 11
CCR2	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
CCR3	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
CCR4	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CCR6	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 6
CCR7	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
CCR8	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 8
CCR9	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 9
CD8	<i>cluster of differentiation 8</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
c-Fos	Transkriptionsfaktor
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CK $\beta$ 8	CCL23
CK $\beta$ 8-1	CCL23
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Corpus luteum	Gelbkörper
CRD	<i>Cystein rich domain</i>
csFBS	<i>charcoal stripped fetal bovine serum</i>
CTACK	<i>cutaneous T-cell-attracting chemokine</i> , CCL27
CX3CL1	CX3C-Motiv-Chemokinligand 1
CX3CR1	CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor 1
CXCL1	CXC-Motiv-Chemokinligand 1
CXCL10	CXC-Motiv-Chemokinligand 10
CXCL11	CXC-Motiv-Chemokinligand 11
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokinligand 12

CXCL13	CXC-Motiv-Chemokinligand 13
CXCL14	CXC-Motiv-Chemokinligand 14
CXCL15	CXC-Motiv-Chemokinligand 15
CXCL16	CXC-Motiv-Chemokinligand 16
CXCL17	CXC-Motiv-Chemokinligand 17
CXCL2	CXC-Motiv-Chemokinligand 2
CXCL3	CXC-Motiv-Chemokinligand 3
CXCL4	CXC-Motiv-Chemokinligand 4
CXCL5	CXC-Motiv-Chemokinligand 5
CXCL6	CXC-Motiv-Chemokinligand 6
CXCL7	CXC-Motiv-Chemokinligand 7
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokinligand 8
CXCL9	CXC-Motiv-Chemokinligand 9
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CXCR6	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 6
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
<b>D</b>	
d	dezidualisiert
DAAM1	<i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DC-CK1	<i>dendritic cell (DC)-chemokine 1, CCL18</i>
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIR	Deutsches IVF Register
Dkk	<i>Dickkopf-related protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
<i>Dsh</i>	<i>Dishvelled</i>
<b>E</b>	
EtBr	Ethidiumbromid
E <sub>2</sub>	Östradiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELC	<i>EBI1 ligand chemokine, CCL19</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELR <sup>-</sup>	Glutamin-Leucin-Arginin positiv
ELR <sup>+</sup>	Glutamin-Leucin-Arginin negativ
ENA-78	<i>epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78, CXCL5</i>
Eotaxin-1	CCL11
Eotaxin-2	CCL24
Eotaxin-3	CCL26
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>

ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
Eskine	CCL27
EtOH	Ethanol
Exodus-1	CCL20
Exodus-2	CCL21
Exodus-3	CCL19
<b>F</b>	
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
for	<i>forward</i>
Fraktalkin	CX3CL1
sFRP	<i>secreted FZD-related protein</i>
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FZD	Frizzled
FZD1	Frizzled 1
FZD10	Frizzled 10
FZD2	Frizzled 2
FZD3	Frizzled 3
FZD4	Frizzled 4
FZD5	Frizzled 5
FZD6	Frizzled 6
FZD7	Frizzled 7
FZD8	Frizzled 8
FZD9	Frizzled 9
<b>G</b>	
g	Erdbeschleunigung
GADD45 $\alpha$	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein <math>\alpha</math></i>
GCP2	<i>granulocyte chemotactic protein 2, CXCL6</i>
gDNA	Genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
Glu-Leu-Arg	Glutamin-Leucin-Arginin
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing hormone</i>
GnRH-IR	<i>Gonadotrophin-releasing hormone-1 receptor</i>
GRO $\alpha$	<i>Growth regulated oncogene <math>\alpha</math>, CXCL1</i>
GRO $\beta$	<i>Growth regulated oncogene <math>\beta</math>, CXCL2</i>
GRO $\gamma$	<i>Growth regulated oncogene <math>\gamma</math>, CXCL3</i>
GTP	Guanosintriphosphat
<b>H</b>	
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ham's F12	Zellkulturmedium
HBEGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HCC1	CCL14
HCC2	CCL15
HCC4	CCL16
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEC-1A	humane endometriale Adenokarzinomzelllinie
HELLP	<i>hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i>
HESC	humane embryonale Stammzellen
HH	<i>hedgehog</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math></i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HRPT1	Hypoxanthin- Phosphoribosyl-Transferase 1

HTR8/SVneo	humane Trophoblastzelllinie
<b>I</b>	
I309	CCL1
ICAT	<i>inhibitor of <math>\beta</math>-catenin</i>
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGFBP-1	<i>Insulin-like growth factor binding protein-1</i>
IHH	<i>indian hedgehog</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-8	Interleukin-8, CXCL8
<i>il-8rb</i>	CXCR2-Gen
ILC	<i>IL-11 R-alpha-locus chemokine</i> , CCL27
IP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-1,4,5- Trisphosphat
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i> , CXCL10
ITAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i> , CXCL11
IUI	intrauterine Spermieninjektion
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
<b>J</b>	
JAK-STAT	<i>januskinase-signal transducers and activators of transcription</i>
JAR	humane Chorionkarzinomzelllinie
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
<i>kd</i>	<i>knock down</i>
kDa	Kilodalton
KdS1	humane endometriale Stromazelllinie mit Sdc-1 <i>kd</i>
KLE-Zellen	humane endometriale Adenokarzinomzelllinie
<i>ko</i>	<i>knock out</i>
<b>L</b>	
LANUV	Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
LARC	<i>liver activation regulated chemokine</i> , CCL20
LB	<i>lysogeny broth</i> <i>luria bertani</i>
LCC-1	CCL16
LD78 $\alpha$	CCL3
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LEC	CCL16
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	<i>ILeukemia inhibitory factor</i>
Lkn-1	<i>leukotactin-1</i> , CCL15
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>lipoprotein-related protein</i>
Lungkine	CXCL15
<b>M</b>	
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MCDB 105	Zellkulturmedium
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i> , CCL2
MCP2	<i>monocyte chemoattractant protein 2</i> , CCL8
MCP-3	<i>monocyte-specific chemokine 3</i> , CCL7

MCP-4	CCL13
MCP-5	<i>monocyte chemotactic protein 5</i> , CCL12
MDC	CCL22
MEC	<i>mucosae-associated epithelial chemokine</i> , CCL28
MEK	<i>mitogen/extracellular signal-regulated kinase</i>
MEKK	<i>mitogen/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
MEOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGSA-α	<i>melanoma growth stimulating activity-α</i> , CXCL1
MGSA-β	<i>melanoma growth stimulating activity-β</i> , CXCL2
MGSA-γ	<i>melanoma growth stimulating activity-γ</i> , CXCL3
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i> , CXCL9
min	Minuten
MIP-1α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i> , CCL3
MIP-1β	<i>macrophage inflammatory protein 1β</i> , CCL4
MIP-1γ	<i>macrophage inflammatory protein-1γ</i> , CCL9
MIP-1δ	<i>macrophage inflammatory protein-1γ</i> , CCL15
MIP-3α	<i>macrophage inflammatory protein-3α</i> , CCL20
MIP-3β	<i>macrophage inflammatory protein-3β</i> , CCL19
ml	Milliliter
MLK	<i>mixed lineage protein kinase</i>
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrixmetalloprotease
MNC	<i>mononuclear cells</i>
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
MPIF1	<i>myeloid progenitor inhibitory factor 1</i> , CCL23
MPIF2	<i>myeloid progenitor inhibitory factor 2</i> , CCL24
MuC10	CCL6
<b>N</b>	
N-	Amino-
NaCl	Natriumchlorid
NAP-2	CXCL7
NMaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NME1	<i>Nometastatic gene 23-H1</i>
<b>O</b>	
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600nm
<b>P</b>	
P <sub>4</sub>	Progesteron
p44/p42	ERK1/2
PARC	<i>Pulmonary and activation-regulated chemokine</i> , CCL18
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>plateled-derived growth factor</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PF-4	<i>plateled factor-4</i> , CXCL4

PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIB	Peptidylpropyl-Isomerase B
PRL	Prolaktin
PSZ	primäre Stromazellen
PTK	Proteinthyrosinkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<b>Q</b>	
QGP Assay	QuantiGene Plex Assay
qRT-PCR	quatitative <i>real time</i> PCR
<b>R</b>	
R	Resistenz
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> , CCL5
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
rev	<i>reverse</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RL95-2	humane endometriale Epithelzelllinie
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROCK	<i>Rho-associated kinase</i>
Ror	Rezeptor-Thyrosin-Kinase-ähnlicher Orphan-Rezeptor
RPL19	ribosomales Protein L19
rpm	<i>roundsevolutions per minute</i>
RPMI 1640	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
Ryk	Rezeptor-Thyrosin-Kinase
<b>S</b>	
s	Sekunde
S.O.C.	<i>super optimal broth</i>
SAPE	Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin
SAPK	<i>stress-activated phospho-kinase</i>
Sdc-1	Syndecan-1
Sdc-2	Syndecan-2
Sdc-3	Syndecan-3
Sdc-4	Syndecan-4
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i> , CXCL12
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SLC	<i>secondary lymphoid-tissue chemokine</i> , CCL21
SOS	<i>son of sevenless</i>
SRPSOX	CXCL16
ssRNA	<i>single stranded</i> RNA
SSW	Schwangerschaftswoche
STCP-1	CCL22

ST-T1	humane endometriale Stromazelllinie
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle
TARC	thymus and activation regulated chemokine, CCL17
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS- <i>buffered saline</i>
TBST	TRIS- <i>buffered saline</i> -Tween20
TD-PCR	<i>touchdown</i> -PCR
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i> , CCL25
Tet	Tetracyclin
TetR	Tetracyclin-Repressor
TFB1	<i>transformation buffer 1</i>
TFB2	<i>transformation buffer 2</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zellen	Thymus-Zelle
<b>U</b>	
UE	Untereinheit
ü. N.	über Nacht
uNK	Uterine natürliche Killerzellen
UV	ultraviolettes Licht
<b>V</b>	
V	Volt
VCC	<i>EGF co-regulated chemokine 1</i> , CXCL17
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VT	Volumenteil
v/v	<i>volume/volume</i>
<b>W</b>	
WB	Western blot
Wnt	<i>wingless-Int-1</i>
Wnt11	Wnt-Ligand 11
Wnt5a	Wnt-Ligand 5a
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>
<b>Z</b>	
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Reproduktion der Frau

Die Reproduktionsvorgänge der Frau bestehen aus einem komplexen Zusammenspiel aus dem hormonproduzierenden Hypophysen-Hypothalamus-System und den hormonregulierten primären Geschlechtsorganen.

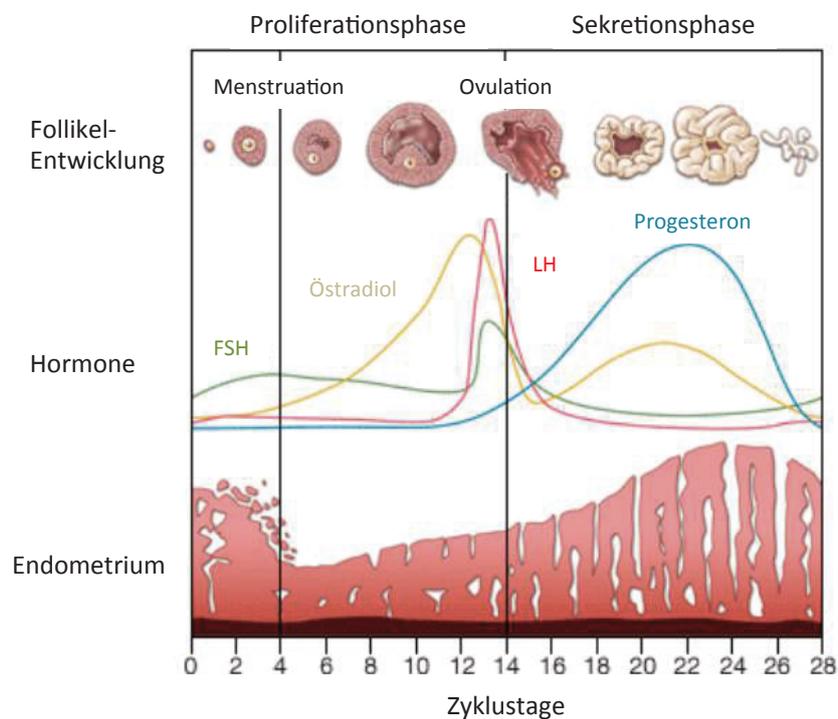


Abb. 1: Graphische Darstellung des weiblichen Zyklus unterteilt in Proliferationsphase und Sekretionsphase mit den dazugehörigen Veränderungen im Eierstock, endokrinen Faktoren und Umwandlung des Endometriums (modifiziert nach<sup>1</sup>)

Der weibliche Zyklus besteht aus 2 aufeinander aufbauenden Phasen: der Östrogen ( $E_2$ )-dominanten Proliferationsphase und der Progesteron ( $P_4$ )-dominanten Sekretionsphase. In der nach der Menstruation beginnenden Proliferationsphase erfolgt die, durch das aus dem Hypophysenvorderlappen ausgeschüttete Follikelstimulierende-Hormon (FSH) stimulierte Follikulogenese. Der heranreifende Follikel sezerniert vermehrt  $E_2$ , das für die Proliferation des Endometriums verantwortlich ist. Weiterhin bewirkt der steigende  $E_2$ -Spiegel eine vermehrte Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) aus der Hypophyse. Dies induziert

die Ovulation der herangereiften Oozyte aus dem Follikel in den Eileiter (*Tuba uterina*). Aus den Resten des rupturierten Follikels entwickelt sich der Gelbkörper (*Corpus luteum*), der für die Bildung kleiner Mengen  $E_2$  und vor allem für den starken Anstieg des  $P_4$  in der sekretorischen Phase zuständig ist. Das  $P_4$ , auch Gelbkörperhormon genannt, ist essenziell für die Umwandlung des proliferativen in ein rezepitives Endometrium im Uterus. Dieser als Dezidualisierung bezeichnete Vorgang und die embryonale Implantation finden im Uterus unter hypoxischen Bedingungen statt, die sich während der Schwangerschaft ändern.<sup>2,3</sup>

Findet keine Befruchtung der Oozyte statt, wird das Endometrium mit der nächsten Menstruation abgestoßen. Der beschriebene Ablauf des weiblichen Zyklus ist in Abb. 1 schematisch zusammengefasst dargestellt.

### 1.1.1 Das Endometrium

Das humane Endometrium besteht aus einer drüsenreichen Epithel- und der darunterliegenden stark durchbluteten stützenden Stromazellschicht und unterliegt zyklischen Umwandlungen bedingt durch das  $E_2$  und das  $P_4$ . Wie bereits erwähnt, findet in der Proliferationsphase des weiblichen Zyklus die  $E_2$ -gesteuerte Proliferation des Endometriums statt. Hierbei kommt es zu einer raschen Vermehrung der Stromazellen und es bildet sich ein Drüsen- und Gefäßnetzwerk aus. Weiterhin wird die Angiogeneseaktivität gesteigert und dadurch die Vaskulogenese des neu proliferierenden Gewebes gefördert.<sup>4</sup> In der Proliferationszeit von ca. 14 Tagen wächst das Endometrium auf eine Dicke von 8-10mm heran. Durch den Einfluss des  $P_4$  aus dem *Corpus luteum* findet in der Sekretionsphase eine Differenzierung des proliferierten Endometriums statt. Diese Phase ist vor allem durch die Ausbildung von Spiralarterien, der Differenzierung von endometrialen Stroma- und Drüsenzellen und einer starken Zunahme der uterinen immunkompetenten Zellen, wie z. B. uterinen natürlichen Killerzellen (uNK), gekennzeichnet<sup>5</sup> und wird auch Dezidualisierung (d) genannt. Außerdem finden folgende Reaktionen als Folge der Zelltransformation statt: Sezernierung des laktotropen Hormons Prolaktin (PRL) und des *Insulin-like growth factor binding protein-1* (IGFBP-1), Änderungen der zellulären Matrix und Modulationen der Plasmamembran und des Zytoskeletts, Expressionsänderungen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Zytokinrezeptoren sowie Aktivitätsmodifikationen von Hormonrezeptoren.<sup>6</sup> Die dezidualisierten Stromazellen (dES) bilden mit dem darüber liegenden Epithel einen optimalen Ort für

die Blastozysteninvasion und die anschließende Implantation des Embryos. Die optimalen Bedingungen für eine Implantation, das sogenannte Implantationsfenster, ist in der Dezidua zeitlich limitiert und nur wenige Tage - ca. 5. bis 10. Tag nach Ovulation – präsent.<sup>7</sup> Nach erfolgreicher Befruchtung und Transport der Blastozyste durch den Eileiter in die Gebärmutterhöhle (Uterus) findet ein komplexer, hochsensibler und feinregulierter Dialog zwischen dem Embryo und dem mütterlichen Endometrium statt.<sup>4</sup>

### 1.1.2 Die humane embryonale Implantation

Der embryonale Implantationsvorgang kann in drei Phasen eingeteilt werden. Bei der Apposition erfolgt die erste, noch instabile Anlagerung der Blastozyste an das Endometrium. Dieser erste Kontakt findet ca. am 6. Tag nach der Befruchtung statt und besteht zunächst nur zwischen den Mikrovilli des Synzytiotrophoblasten, dem humanes Choriongonadotropin (hCG)-produzierenden Teil des Embryos und den endometrialen Pinopodien (Abb. 2).

In der Adhäsionsphase kommt es zur festen Anheftung der Blastozyste an das endometriale Epithel und anschließend zu einer Invasion durch das Epithel in das uterine Stromagewebe (Abb. 2). Während dieser, für die Etablierung einer stabilen Schwangerschaft essentiellen Implantationsvorgänge findet ein reger Austausch zwischen dem invadierenden Embryo und dem rezeptiven Endometrium statt. Wichtige Rollen spielen hierbei Steroidhormonrezeptoren, wie E<sub>2</sub>- und P<sub>4</sub>-Rezeptoren, vasoaktive Faktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), das Endocannabinoidsystem, verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. *transforming growth factor* (TGF) oder *heparin-binding EGF-like growth factor* (HBEGF) und deren Rezeptoren, Zytokine, wie *leukemia inhibitory factor* (LIF) und *CXC-motif ligand 1* (CXCL1), Zytokinrezeptoren und viele weitere Faktoren.<sup>9-12</sup> Die genauen molekularbiologischen Ereignisse sind jedoch bis heute nicht im Detail verstanden.

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Rolle von Chemokinen, einer Untergruppe der Zytokine und deren Rezeptoren an der embryo-maternalen Schnittstelle während der humanen embryonalen Implantation sowie dessen potentielle Rolle bei der humanen Infertilität, die im Folgenden näher erläutert wird.

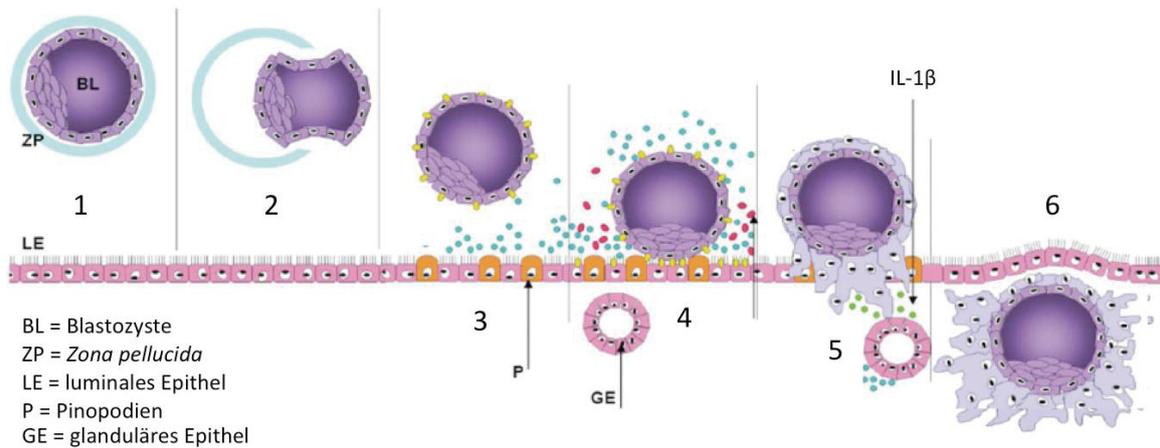


Abb. 2: Schematische Darstellung der Implantation der Blastozyste (BL) in das maternale Endometrium. (1) Frei schwebende Blastozyste mit *Zona pellucida* (ZP) am luminalen Epithel (LE) des Endometriums nach der Passage durch den Eileiter. (2) Schlüpfende Blastozyste (*blastocyst hatching*). (3) Erster Schritt der Implantation: die Apposition der Blastozyste an das Endometrium mittels Pinopodien (P). (4) Zweiter Schritt der Implantation: die Adhäsion der Blastozyste an das Endometrium. (5) Dritter Schritt der Implantation: die Invasion der Blastozyste in das luminal Epithel und anschließend in das dezidualisierte Stromagewebe des Endometriums mit Sekretion verschiedener Faktoren, wie z. B. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). (6) Komplette Invasion der Blastozyste (modifiziert nach<sup>8</sup>).

### 1.1.3 Die humane Infertilität

Die Infertilität ist als Versagen eines Schwangerschaftseintritts nach einem Jahr mit regelmäßigem Geschlechtsverkehr definiert<sup>13</sup> unter der durchschnittlich jedes 7. Paar im fortpflanzungsfähigen Alter leidet.<sup>14</sup> Laut des Statistischen Bundesamts wurden 2012 673.000 Kinder in Deutschland lebend geboren.<sup>15</sup> Davon wurden 10.800 Kinder, also ca. 1,6%, durch die verschiedenen Techniken der assistierten Reproduktion (ART) gezeugt.<sup>16</sup> Diese Zahl erfasst jedoch nur die Lebendgeburten, die durch die Methoden der extrakorporalen Befruchtung entstanden sind. Darunter zu verstehen sind: *in vitro* Fertilisation (IVF), intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und die Transfere von kryokonservierten befruchteten Vorkernstadien nach IVF oder ICSI Therapie. Weniger invasive Behandlungsformen der ART, wie z.B. hormonelle Stimulation der Follikelreifung und anschließender Verkehr zum optimalen Zeitpunkt oder die intrauterine Insemination (IUI), werden nicht systematisch erfasst. Folglich kann die Anzahl, der durch ART entstandenen Kinder nicht genau angegeben werden, jedoch ist sie deutlich höher einzuschätzen als die beschriebenen 10.800 Kinder.

Abhängig von dem Grund und dem Schweregrad der Infertilität, können pro Behandlungszyklus bei den 25-30 Jährigen Patientinnen Schwangerschaftsraten von ca. 40% durch IVF und ca. 35% durch ICSI als Methode der assistierten Reproduktion erreicht werden.<sup>16</sup> Die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit eines gesunden Paares ist ebenfalls stark vom Alter der Frau abhängig und liegt in einem natürlichen Zyklus bei ca. 25-30%.<sup>17</sup> Diese niedrige Prozentzahl ist unter anderem auf die überaus komplizierten und hochsensiblen Vorgänge während der Befruchtung, des Transports des Embryos und der anschließenden Implantation in die mütterliche Dezidua zurück zu führen. Seit der Geburt des ersten IVF-Kindes im Jahr 1978<sup>18</sup> wurden die Methoden der ART stetig weiterentwickelt, verbessert und den natürlichen Bedingungen bestmöglich angepasst.<sup>19</sup> Dies zeigt die enorme Wichtigkeit der Implantation. Das Endometrium – der Ort der embryonalen Implantation – unterliegt der Regulation von vielen unterschiedlichen Faktoren, wie Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Wachstums- und Modulationsfaktoren, Integrinen und den Steroidhormonen E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub>. Die genannten Faktoren sind essenziell für die Ausbildung eines rezeptiven Endometriums.

Die aus dieser Arbeit hervorgehenden Ergebnisse können auch eine Grundlage für neue Therapieansätze bei IVF-Patientinnen bilden. Dadurch könnten die Schwangerschaftsraten bei Anwendung von ART steigen und die zum Teil sehr lange und belastende Wartezeit der Patienten auf ein eigenes Kind deutlich verkürzt werden.

## 1.2 Zytokine

Zytokine sind kleine, 8-40kDa schwere Glykoproteine ohne einheitliche Struktur, die als Signalmoleküle wichtige Funktionen bei komplexen Vorgängen, wie Inflammation, Proliferation und Differenzierung übernehmen. Sie werden von diversen Zellen, wie z. B. Monozyten sezerniert und spielen eine wichtige Rolle als Mediatoren zwischen verschiedenen Zelltypen, bei der Vermittlung von Antworten des angeborenen und adaptiven Immunsystems und bei der Regulation der Synthese weiterer Zytokine. Trotz ihrer hormonähnlichen physiologischen Konzentration im Körper ist die Reichweite ihrer Wirkung im Gegensatz zu Hormonen relativ kurz. Die auto-, endo- und parakrin fungierenden Botenstoffe können in mehrere Hauptgruppen eingeteilt werden: Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren und die besondere Gruppe der Chemokine, auf denen das Augenmerk dieser Arbeit liegt.<sup>20,21</sup>

### 1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

Die humane Chemokinfamilie besteht aus 48 Chemokinliganden und 19 korrespondierenden Rezeptoren.<sup>22</sup> Die Chemokine bilden eine Untergruppe der Zytokine und werden auch als chemotaktische Zytokine bezeichnet. Abhängig von der Position des konservierten Zysteinrests werden die Chemokine in 4 Familien – CXC, CC, CX<sub>3</sub>C und XC – eingeordnet<sup>23</sup> (Abb. 3). Der systematische Name eines Chemokinliganden/-rezeptors setzt sich wie folgt zusammen: Familie + L (Ligand)/ R (Rezeptor) + fortlaufende Nummer (Tab. 1). Des Weiteren lassen sich die Chemokinfamilien in zwei Unterklassen einteilen, Glutamin-Leucin-Arginin (Glu-Leu-Arg)-Motiv positive (ELR<sup>+</sup>) und ELR negative (ELR<sup>-</sup>) Chemokine und Chemokinrezeptoren. ELR<sup>+</sup> Chemokine haben sich als starke angiogenetische Faktoren erwiesen, wogegen ELR<sup>-</sup> Chemokine angiostatische Funktionen aufweisen.<sup>24</sup>

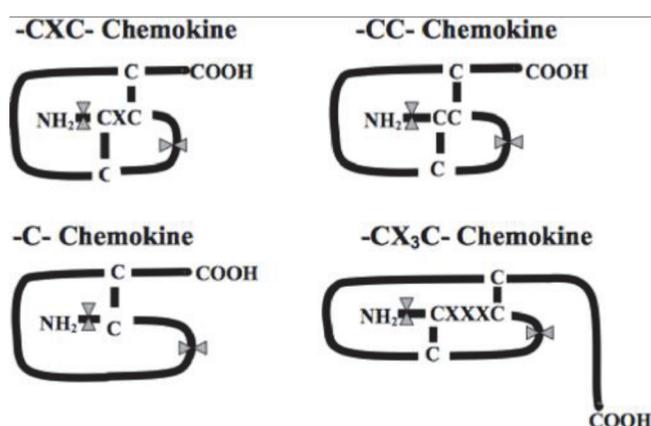


Abb. 3: Schematische Darstellung der Chemokinstrukturen mit den für die Nomenklatur verantwortlichen, konservierten Zysteinresten (C) und den Rezeptorbindungsregionen (dargestellt als graue Pfeilspitzen)<sup>25</sup>

Die kleinen Signalproteine (8-12kDa<sup>26</sup>) können sowohl homöostatisch als auch inflammatorisch fungieren und spielen eine wichtige Rolle, z. B. bei der Migration von Leukozyten, Endothel- und Epithelzellen (Chemotaxisfunktion), der Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems, Angio- und Vaskulogenese und im neuronalen-, kardiovaskulären und hämatopoetischen System.<sup>23,27,28</sup> Des Weiteren sind Chemokine auch an der Lymphozytenreifung, -differenzierung und -aktivierung beteiligt.<sup>29</sup> Einige dieser Vorgänge sind in den humanen embryonalen Implantationsprozess involviert, sodass Chemokine und Chemokinrezeptoren einen hohen Stellenwert bei diesem Prozess einnehmen. Die bereits genannte Chemotaxisfunktion von Chemokinen ist Bestandteil der Invasion des semi-allogenen Embryos in das mütterliche Endometrium in dem sie einen Zustrom von dezidualen

Leukozyten in den Uterus induziert und steuert. Die aus überwiegend uNK-Zellen bestehende deziduale Leukozytenpopulation impliziert eine maternale Immuntoleranz gegenüber dem Embryo mit parentalen Antigenen.<sup>27</sup> Auch die Bildung neuer Blutgefäße ist ein essentieller Vorgang während der Implantation und Plazentation, der die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt.

Neben den Wachstumsfaktoren aus der VEGF-Familie spielen auch hier Chemokine, wie CXCL1, CXCL6, CXCL11 und CXCL12 eine wichtige Rolle. CXCL12 ist weiterhin auch für die Zytotrophoblastdifferenzierung verantwortlich.<sup>27</sup> Die Migration von Zytotrophoblastzellen und deren Überleben wird von CXCL8 gesteuert, einem wichtigen Chemokin, dessen Expression durch ein weiteres Zytokin und Embryosekretionsprodukt, IL-1 $\beta$ , im Endometrium hochreguliert werden kann.<sup>33,34</sup> CCL2, einem Chemokin aus der Familie der CC-Familie wird ebenfalls eine wichtige Funktion bei der embryonalen Implantation zugesprochen, da dessen Expression durch die wichtigen Schwangerschafts-assoziierten Hormone, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> und hCG hochreguliert wird.<sup>35</sup>

Chemokinliganden vermitteln ihre Funktionen durch G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren (Tab. 1). Strukturell setzen sich diese aus 7  $\alpha$ -helikalen transmembranären (7TM) Domänen zusammen, die durch intra- und extrazelluläre Loops verbunden sind und extrazellulär mit einem Amino (N)- und intrazellulär mit einem Carboxyl (C)-Terminus abschließen.<sup>36</sup> Je einer der 4 konservierten Zysteinreste liegt auf dem N-Terminus und jedem der 3 extrazellulären Loops, wobei die Zysteinreste auf den extrazellulären Loops Disulfidbrücken ausbilden, die essentiell für eine korrekte Rezeptorfunktion sind.<sup>37</sup> Die N-terminale Sequenz ist vor allem für die Rezeptorbindung und -spezifität verantwortlich, hingegen spielt der C-Terminus bei der Glykosaminglykanbindung und der Präsentation von Chemokinen auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle.<sup>22</sup> Chemokinrezeptoren bestehen aus ca. 350 Aminosäuren (AS) und sind in der Lage Homo- und Heterodimere auszubilden.<sup>38,39</sup>

Neutrophile, Monozyten, CD8+T-Zellen, Mastzellen, Basophile, NK-Zellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Neurone, Melanozyten und Endothelzellen stellen die vielfältigen Expressionsorte von Chemokinrezeptoren dar.<sup>36</sup> Interessanterweise besitzen alle uterin exprimierten Chemokine einen korrespondierenden Rezeptor auf den dezidualen Leukozyten.<sup>40</sup>

Tab. 1: Übersicht über die Chemokinfamilie. Chemokinliganden mit systematischen und traditionellen Namen und deren korrespondierenden Rezeptoren sortiert nach Familienzugehörigkeit. An der embryo-maternalen Schnittstelle exprimierte Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren sind fett hervorgehoben, + kennzeichnet ELR<sup>+</sup> Chemokine und Chemokinrezeptoren. (modifiziert nach<sup>30-32</sup>)

Nr.	Familie	Systematische Nomenklatur	Traditionelle Nomenklatur	Korrespondierender Rezeptor
1		<b>CXCL1+</b>	GRO- $\alpha$ , MGSA- $\alpha$	<b>CXCR2+</b>
2		CXCL2+	GRO- $\beta$ , MGSA- $\beta$	CXCR2+
3		CXCL3+	GRO- $\gamma$ , MGSA- $\gamma$	CXCR2+
4		CXCL4	PF-4	CXCR3B
5		CXCL5+	ENA-78	CXCR2+
6		<b>CXCL6+</b>	GCP2	<b>CXCR1+</b> , CXCR2+
7		CXCL7+	NAP-2	CXCR2+
8		CXCL8+	IL-8	CXCR1+, CXCR2+
9	CXC	<b>CXCL9</b>	MIG	<b>CXCR3</b>
10		<b>CXCL10</b>	IP-10	CXCR3
11		<b>CXCL11</b>	ITAC	CXCR3, CXCR7
12		<b>CXCL12</b>	SDF-1	<b>CXCR4</b> , CXCR7
13		CXCL13	BLC, BCA-1	<b>CXCR5</b>
14		<b>CXCL14</b>	BRAK	Unbekannt
15		CXCL15	Lungkine	Unbekannt
16		CXCL16	SRPSOX	<b>CXCR6</b>
17		CXCL17	VCC	unbekannt
18		CCL1	I309	CCR8
19		<b>CCL2</b>	MCP-1	<b>CCR2</b> , CCR11
20		<b>CCL3</b>	MIP-1 $\alpha$ , LD78 $\alpha$	<b>CCR1</b> , CCR5
21		CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5, <b>CCR8</b>
22		CCL5	RANTES	CCR1, <b>CCR3</b> , <b>CCR4</b> , <b>CCR5</b>
23		CCL6	MuC10	CCR1
24		<b>CCL7</b>	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
25		CCL8	MCP2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR11
26		CCL9	MIP-1 $\gamma$	CCR1
27		CCL10		Unbekannt
28		CCL11	Eotaxin-1	CCR3
29		CCL12	MCP-5	CCR2
30		CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3, CRR11
31	CC	<b>CCL14</b>	HCC1	CCR1
32		CCL15	HCC2, Lkn-1, MIP-1 $\delta$	CCR1
33		CCL16	HCC4, LEC, LCC-1	CCR1
34		CCL17	TARC	CCR4, CCR8
35		CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC1	CCR3
36		CCL19	ELC, MIP-3 $\beta$ , exodus-3	<b>CCR7</b>
37		CCL20	LARC, MIP-3 $\alpha$ , exodus-1	CCR6
38		<b>CCL21</b>	SLC. 6CKine, exodus-2	CCR7
39		CCL22	MDC, STCP-1	CCR4
40		CCL23	MPIF1, CK $\beta$ 8, CK $\beta$ 8-1	CCR1
41		CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	CCR3
42		CCL25	TECK	CCR9
43		CCL26	Eotaxin-3	CCR3
44		CCL27	Eskine, CTACK, ILC	CCR10
45		CCL28	MEC	CCR10
46	CX3C	<b>CX3CL1</b>	Fraktalkin	<b>CX3CR1</b>
47	XC	XCL1	Lymphotaktin- $\alpha$	XCR1
48		XCL2	Lymphotaktin- $\beta$	

### 1.3.1 Chemokine *CXC-motif ligand 1* (CXCL1)

CXCL1, zunächst als *growth-regulated oncogene α* (GRO $\alpha$ ) bezeichnet, aus der CXC-Familie, gehört zur Gruppe der ELR<sup>+</sup>-Chemokine und wird überwiegend von Makrophagen, Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten sezerniert.<sup>41,42</sup> CXCL1 vermittelt seine Funktionen über seinen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor CXCR2 und den Ko-Rezeptor Syndecan-1 (Sdc-1).<sup>43</sup> Die Bezeichnung GRO $\alpha$  ist auf die Entdeckung von CXCL1, als wachstumsreguliertes und überexprimiertes Gen in Tumorzellen zurück zu führen.<sup>44</sup> Inflammatorische-, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren, wie *tumor necrosis factor* (TNF), Interleukin-1 (IL-1), Lipopolysaccharide (LPS), *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Thrombin sind in der Lage, die CXCL1-Expression zu induzieren.<sup>45–49</sup> Durch seine vielfältigen Funktionen, wie der chemoattraktive Wirkung auf Immunzellen, Regulation von Enzymsezernierung oder Neutrophilendegranulation, spielt CXCL1 eine wichtige Rolle bei Prozessen, wie z. B. Inflammation, Angiogenese, Wundheilung und natürlich auch bei der Implantation.<sup>50–54</sup> Des Weiteren wird CXCL1 eine wichtige Funktion bei Prozessen, wie Tumorgenese, Metastasierung und Ausbildung einer Chemoresistenz zugeschrieben.<sup>52,55</sup> Alzheimer, Atherosklerose, Diabetes mellitus Typ 2 und Multiple Sklerose sind weitere Krankheiten, die mit CXCL1 assoziiert werden.<sup>56–59</sup>

Die Rolle von CXCL1 bei der humanen Implantation war lange unbekannt und wurde erst 2001 bei der Entdeckung des Chemokinliganden im humanen Endometrium und dessen Regulation durch inflammatorische Faktoren und Steroidhormone, wie Dezidualisierungshormone, LPS, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , postuliert.<sup>60</sup> Nachfolgende Studien haben diese Hypothese bestätigt und das Vorhandensein von CXCL1 im Endometrium mehrfach nachgewiesen, sowohl als Basisexpression als auch hochreguliert nach Stimulation von endometrialen Stromazellen mit Trophoblast-konditioniertem Medium und nach Ko-Kultur mit Trophoblastzellen.<sup>54,61</sup> Im Mausmodell konnte für CXCL1 eine angiogenetische Wirkung bei neutrophilabhängigen Immunreaktionen, die über Expression von *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA) vermittelt werden, *in vivo* nachgewiesen werden.<sup>62</sup> Teilweise erhöhte CXCL1-Level wurden im Endometrium mit chronischer Endometritis und in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose gefunden.<sup>63,64</sup> Die genaue Funktion von CXCL1 in der humanen embryonalen Implantation und die Signalwege, die diese vermitteln sind jedoch noch weitgehend

unbekannt. Analysen der Signalwege, die die CXCL1-Expression regulieren, stellten daher einen wichtigen Teil dieser Arbeit dar und die resultierten Ergebnisse können neben der Entschlüsselung implantationsrelevanter Vorgänge auch als Basis für zukünftige, diagnostische und therapeutische Ansätze bei ART oder auch endometrialen Erkrankungen, wie Endometriose genutzt werden.

### 1.3.2 Chemokine *CXC-motif receptor 2 (CXCR2)*

Der ELR<sup>+</sup> Rezeptor CXCR2 wird alternativ auch IL-8RB, IL-8R2 oder IL-8R $\beta$  genannt. Zu seinen Liganden zählen alle ELR<sup>+</sup>Chemokine aus der CXC-Familie mit absteigender Affinität: CXCL3, CXCL8, CXCL6, CXCL1, CXCL2, CXCL7 und CXCL5.<sup>36</sup> Der Ligand CXCL1 kann sowohl als Monomer als auch Dimer an den Rezeptor binden.<sup>65</sup> Homo- und Heterodimerbildung mit anderen Rezeptoren, wie z. B. dem  $\alpha_{1A}$ -Adrenorezeptor ist auch eine Eigenschaft von CXCR2, die vor allem auftritt, wenn kein Ligand anwesend ist.<sup>39,66</sup> Neben der Interaktion mit anderen Rezeptoren über Heterodimerbildung interagiert CXCR2 auch mit Ko-Rezeptoren, wie Heparansulfat Sdc-1.<sup>43</sup> Der genaue Aufbau des Rezeptors CXCR2 mit den 7 TM-Domänen, die durch intra- und extrazelluläre Loops miteinander verbunden sind, ist in Kapitel 1.3 erklärt. Das für den CXCR2 kodierende Gen *il8rb* ist auf dem Chromosom 2q34-35 lokalisiert. Die Proteinstruktur aller Chemokinrezeptoren ist sehr ähnlich und ist zu 25-30% homolog, die AS-Sequenz von CXCR2 und CXCR1 sogar zu 76%. Initial wurde CXCR2 auf der Oberfläche von Granulozyten beschrieben, heute ist bekannt, dass CXCR2 auch auf der Oberfläche vieler anderen Zelltypen, wie Leukozyten, Monozyten, Mastzellen, einigen T- und NK-Zellen und Neutrophilen exprimiert wird.<sup>38</sup>

Die Vermittlung von Signalen erfolgt bei CXCR2 über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade. Das Protein liegt inaktiv vor, wenn an der G-Protein-Einheit ein Guanosindiphosphat (GDP)-Molekül gebunden ist. Die Aktivierung erfolgt durch einen Austausch des GDP durch Guanosintriphosphat (GTP), der durch die Bindung eines Chemokins an den Rezeptor erleichtert wird. Im aktiven Modus dissoziiert das G-Protein in eine G $\alpha$ - und G $\beta$ - Untereinheit (UE). Diese sind anschließend in der Lage die Signalkaskade in Gang zu setzen. G $\alpha$  phosphoryliert eine Proteintyrosinkinase (PTK), die wiederum mehrere hintereinander geschaltete Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von Serin (Ser)- und Threonin (Thr)-resten des CXCR2-C-Terminus, wodurch der

Rezeptor in seinen inaktiven Grundzustand zurück versetzt wird. Sowohl die  $G_{\alpha}$ - als auch die  $G_{\beta}$ -UE können eine Phospholipase C (PLC) aktivieren, die im Anschluss Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ) spaltet, um Phosphatidylinositol-1,4,5-Trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) zu erhalten. Der intrazelluläre *second messenger*  $IP_3$  mobilisiert Calciumionen ( $Ca^{2+}$ ) aus dem intrazellulären Speicher, die mit DAG interagieren, um diverse Proteinkinase C (PKC)-Isoformen zu aktivieren. Die aktivierten PKC und weitere  $Ca^{2+}$ -sensitive Proteinkinase können nun durch Proteinphosphorylierung eine Signalkaskade in Gang setzen, die zu einer zellulären Antwort in Form von z. B. Chemotaxis führt.<sup>36,38</sup> Nach Aktivierung von CXCR2 kann eine erneute Rezeptorstimulation erst nach einer Latenzzeit erfolgen. Die sogenannte Desensibilisierung stellt eine Regulation der Rezeptoraktivität dar. Auch die CXCR2-Expression unterliegt einer Regulation und kann durch verschiedene Faktoren erfolgen:  $TNF\alpha$ - führt zu einer niedrigeren CXCR2-Expression auf Leukozyten, bakterielles LPS scheint die Expression auf Neutrophilen in beide Richtungen beeinflussen zu können und eine Hochregulation der CXCR2-Expression kann durch die Degranulation von neutrophilen sekretorischen Vesikeln durch Formylpeptide erfolgen.<sup>36,67</sup> Allgemein lässt sich die Chemokinrezeptorexpression auch durch äußere Einflüsse, wie z. B. Hypoxie bei CXCR4 regulieren.<sup>68</sup> Die Expression von CXCR2 im Endometrium erfolgt zyklusunabhängig und ist laut Ulukus *et al.* hauptsächlich auf das endometriale Epithel begrenzt.<sup>69,70</sup> Andere Studien wiederum zeigen eine niedrige CXCR2-Expression auch im endometrialen Stroma.<sup>71</sup>

Die Untersuchung der Expression und Funktion von CXCR2, laut Literatur dem einzigen CXCL1-Hauptrezeptor, im endometrialen Stroma, mittels Generierung einer endometrialen stromalen CXCR2 *knock down (kd)* Zelllinie ist daher ein wichtiger Ansatz bei der Dekodierung der genauen CXCL1-Funktion bei der embryonalen Implantation und Bestandteil dieser Arbeit.

### 1.3.3 Ko-Rezeptor Syndecan-1 (Sdc-1)

Die humane Sdc-Familie besteht aus 4 Mitgliedern, Sdc-1-4. Diese Oberflächenmoleküle bestehen aus Proteoglycanen mit Heparansulfat- und/oder Chondroitinsulfatketten, die an der Ektodomäne mit einer Serin-Glycin (Gly)-Konsensussequenz haften. Neben der Ektodomäne besitzen die Proteoglycane eine hochkonservierte TM-Domäne und eine zytoplasmatische Endodomäne<sup>72</sup> (Abb. 4).

Sdc werden auf der Oberfläche aller adhärenen und vieler nicht-adhärenen Zellen exprimiert<sup>73,74</sup> und binden eine große Anzahl unterschiedlicher Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixproteine, Zell-Zell-Adhäsions-Rezeptoren, Proteasen, Proteaseinhibitoren, virale Mantelproteine, Chemokine und andere Zytokine.<sup>75–77</sup>

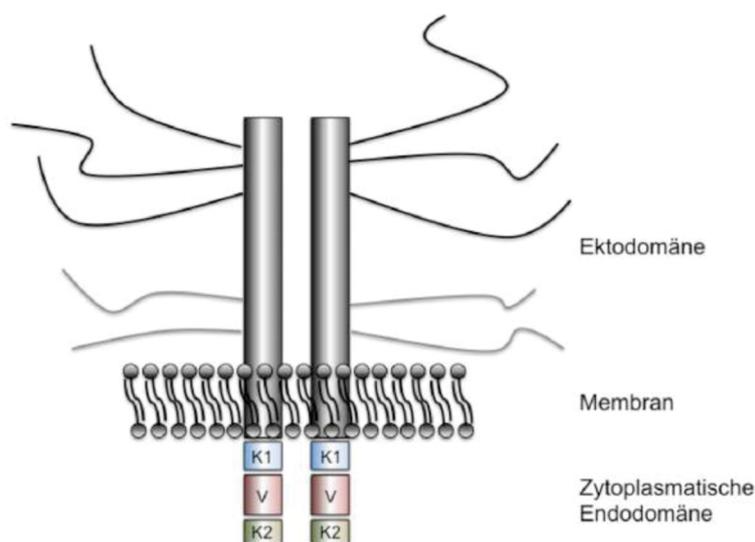


Abb. 4: Schematische Darstellung des Sdc-Aufbaus. Dimere Syndecan-Struktur mit Heparansulfat- (schwarz) und Chondroitinsulfatketten (grau), K1 (blau) und K2 (grün) bilden die konservierten Regionen der zytoplasmatischen Endodomäne, die in allen Sdc gleich sind, V kennzeichnet die variablen Regionen, die für jedes Sdc charakteristisch sind (modifiziert nach<sup>76</sup>)

Sdc-1 fungiert als transmembranärer Ko-Rezeptor hat jedoch auch die Möglichkeit seine Funktionen in löslicher Form auszuüben. Das sogenannte *shedding*, die Abspaltung der Ektodomäne von der membranständigen Region des Sdc erfolgt durch Sheddasen wie Matrixmetalloproteasen (MMP) und *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM)-Metalloproteasen. Die Ektodomäne von Sdc-1 kann z. B. durch MMP2, MMP7 oder auch MMP9 abgespalten werden.<sup>78</sup> Bei Bindung gleicher Liganden kann die Wirkung des membrangebundenen und löslichen Sdcs gleich aber auch gegensätzlich ausfallen. Eine Studie hat gezeigt, dass das membrangebundene Sdc-1 invasionsinhibierend wirkt und die lösliche Form dagegen die Invasion von *michigan cancer foundation 7* (MCF-7)-Zellen in eine Matrigelmatrix fördert.<sup>79</sup> Zu den bisher bekannten Funktionen der Sdc zählen Regulation von Wachstumsvorgängen und –faktoren, diversen Kinase und damit auch von Signalwegen, Modulation von Zytoskelettproteinen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, Zellproliferation, Migration, und die Ko-Rezeptor-Aktivität in

verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen, wie Tumorentwicklung, Energiemetabolismus, Wundheilung, neuronaler Entwicklung und Inflammation.<sup>75,80,81</sup> Die Sdc-1 spezifischen Funktionen sind unter anderem die Rekrutierung von Leukozyten, Proliferation und Invasion von Krebszellen, Matrixremodellierung und Regulation von Immunabwehrmechanismen. Sdc-1 ist ein Ko-Rezeptor für Chemokine, wie CXCL1, CXCL8, CXCL12, Wachstums- und Angiogenesefaktoren.<sup>74,79</sup> Unter der Ko-Rezeptor-Funktion ist keine Rezeptor-Funktion im klassischen Sinne zu verstehen, vielmehr handelt es sich hierbei um eine essentielle Regulator-Funktion der Ligand-abhängigen Aktivierung der Hauptrezeptoren, die darin besteht die Liganden mit Hilfe ihrer Heparansulfatketten an der Zelloberfläche zu binden und dadurch dem Hauptrezeptor zugänglicher zu machen. Neben der Bereitstellung der Liganden für ihre Rezeptoren wurde im Zusammenhang mit den genannten Chemokinen eine weitere Funktion von Sdc-1 als potentieller Chemokinspeicher diskutiert. Dieser Speicher könnte zum einen einer schnelleren Freisetzung der Liganden dienen und zum anderen ihre Freisetzung verzögern, um den proteolytischen Abbau durch Peptidasen oder MMP zu umgehen. Des Weiteren kann durch das Anlagern der Chemokine an Sdc-1 ein, für die Chemotaxis von Immunzellen essentieller Chemokin-Konzentrationsgradient aufgebaut werden.<sup>82,83</sup> Entgegengesetzt können auch Chemokine die Expression von Sdc, wie z. B. IL-1 $\beta$  für Sdc-1 regulieren.<sup>84-86</sup>

Die Expression von Sdc-1 im humanen Endometrium ist zyklusabhängig. Am Anfang und Ende der sekretorischen Phase ist die Sdc-1-Expression im Stroma herunterreguliert und in der mittsekretorischen Phase im luminalen Epithel hochreguliert.<sup>87,88</sup> Demnach liegt eine hormonelle Sdc-1-Expressionsregulation nahe. Weitere Indizien, die die Wichtigkeit von Sdc-1 bei der Implantation belegen, liefern Studien, die Sdc-1 in murinen Embryonen bereits im Vierzellstadium<sup>89</sup> und bei der frühen humanen Embryoentwicklung detektierten.<sup>75,89</sup> Fehlregulationen in der Expression von Sdc-1 können z. B. zu Fehlentwicklungen in der Plazenta führen und dadurch pathologische Schwangerschaftsverläufe wie die intrauterinen Wachstumsretardierung verursachen.<sup>90</sup> Auch Präeklampsie und HELLP-Syndrom sind mit niedrigen Sdc-1-Level im Patientinnenblut assoziiert.<sup>91</sup> Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsbedingte Bluthochdruckerkrankung mit verminderter Organdurchblutung, die in 5% aller Schwangerschaften auftritt und die häufigste Todesursache von Schwangeren in den USA darstellt. Meistens tritt die

Präeklampsie erst ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) auf und kann sich bis hin zur Eklampsie, die durch Krämpfe gekennzeichnet ist, verschlimmern.<sup>92</sup> HELLP steht für *hemolysis* (Haemolysis), *elevated liver enzymes* (erhöhte Leberwerte) und *low platelet count* (niedrige Thrombozytenzahl) und kennzeichnet ein schwangerschaftsbedingtes Syndrom, das in 0,2-0,8% der Schwangerschaften auftritt, in 70-80% der Fälle mit einer Präeklampsie einhergeht und eine schwerwiegende Bedrohung für die Mutter und das ungeborene Kind darstellt.<sup>93</sup> Hierbei ist vermutlich vor allem die inadäquate plazentare Angiogenese, bedingt durch eine möglicherweise zu flache, oberflächliche Implantation und die daraus resultierende fehlerhafte Entwicklung von Spiralarterien von großer Bedeutung.<sup>94,95</sup> Die Generierung eines stabilen und induzierbaren Sdc-1 *kd* in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 durch unsere Arbeitsgruppe und die anschließenden Studien an dieser Sdc-1 *kd* Zelllinie, genannt KdS1, haben starke Veränderungen in den Expressionsprofilen von Chemokinen und Angiogenesefaktoren nach Induktion des Sdc-1 *kd*, Dezidualisierung und Inkubation der Zellen mit Embryosekretionsprodukt IL-1 $\beta$ , aufgedeckt.<sup>43</sup> Diese Ergebnisse deuten auf eine Sdc-1-Regulation der untersuchten, für eine erfolgreiche Embryoimplantation wichtigen Chemokine und angiogenetischen Faktoren hin, die deshalb in dieser Arbeit näher analysiert wurden.

#### 1.4 Signalwege in der embryonalen Implantation

Eine erfolgreiche Implantation ist das Ergebnis einer komplexen Interaktion zwischen dem Embryo und dem rezeptiven Endometrium im Uterus der Mutter.<sup>96</sup> Die Vorgänge, die das Endometrium zyklisch proliferieren und differenzieren, unterliegen einer strengen Regulation von verschiedenen Faktoren, wie Hormonen und Chemokinen. Diese Faktoren agieren mit Hilfe ihrer korrespondierenden Rezeptoren, die nach Aktivierung bzw. Anlagerung eines Liganden meistens eine Signalkaskade in Gang setzen, die das Signal bis in den Nukleus der Zellen weiter übermittelt. Zu den wichtigen Signalfaktoren während der Implantation zählen z. B. vasoaktive Faktoren, wie Histamine, Wachstumsfaktoren der EGF-Familie, Zytokinen, wie LIF und CXCL1, Zellzyklusregulationsfaktoren, Steroidhormone, wie P<sub>4</sub> und Hedgehog (HH)-Proteine, wie *indian hedgehog* (IHH).<sup>12,97</sup> Alle diese Faktoren interagieren mit einem Rezeptor und aktivieren einen Signalweg. HH-, Januskinase (JAK)-*signal transducers and activators of transcription* (STAT)-, *nuclear factor* (NF)- $\kappa$ B-abhängiger-Signalweg und die Signaltransduktionskaskaden *wingless-Int-1* (Wnt)

und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), z. B. *extracellular-signal regulated kinases* (ERK) und c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) sind einige der wichtigen aktiven Signalwege an der embryo-maternalen Schnittstelle.<sup>12,98,99</sup> Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist unter anderem für die Transkriptionsregulation von CXCL1 und CXCL2, die Expression von CXCL8 in angiogenetischen Prozessen und die Induktion der MMP-Expression im endometrialen Stroma *in vitro* verantwortlich.<sup>98,100,101</sup> Es gibt jedoch auch Signalwege, die auf den Implantationsprozess und die Embryonalentwicklung einen negativen Einfluss ausüben. Hierzu gehört z. B. das Endocannabinoid-Signalsystem.<sup>102</sup>

Drei Signalwege – ERK, JNK und Wnt-Signalweg – wurden in dieser Arbeit näher untersucht und werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

#### 1.4.1 MAPK - ERK/JNK - Signalwege

Der MAPK-Signalweg ist einer der ältesten Signalwege in der Natur und besitzt eine große Anzahl unterschiedlicher Funktionen.<sup>103</sup> Zu den wichtigsten Aufgaben, des in allen Eukaryoten vorhandenen Signaltransduktionsweges, zählen unter anderem die Regulation von Proliferation, Differenzierung, des Überlebens von Zellen und der Apoptose.<sup>103</sup> Der G-Protein-gesteuerte Mechanismus der Signalweiterleitung und der Regulationsschnittstelle beinhaltet drei charakteristische Kinasen. Die MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), wie Raf und MEKK1 phosphoryliert und aktiviert MAPK-Kinase (MAPKK), wie MEK und MKK4 (Abb. 5a). Diese aktiviert anschließend die MAPK, wie ERK und JNK ebenfalls durch Phosphorylierung (Abb. 5a).<sup>103</sup>

Die wohl bekannteste MAPK-Signalkaskade besteht aus den Proteinen Ras (benannt nach der Entdeckung im Sarkom der Ratte (*rat sarcoma*)), Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*, Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase), MEK (*mitogen/extracellular signal-regulated kinase*, MAPKK) und ERK (Ser/Thr-Kinase, MAPK).<sup>103</sup> Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg, kurz als ERK-Signalweg bezeichnet, ist in Funktionen, wie Zellproliferation, -transformation, -differenzierung und Apoptose involviert und wird durch eine Vielzahl verschiedener Liganden, wie z. B. Hormonen, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren, Zytokinen, Stressfaktoren und Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert.<sup>103–105</sup> Hierbei wird Ras durch einen Austausch von GDP gegen GTP mit Hilfe von GDP/GTP-Austausch-Faktoren, wie *son of sevenless* (SOS) aktiviert.<sup>103</sup> Bedingt durch die entstandene Adapterfunktion ist das aktivierte Ras in der Lage, eine der drei Raf-Kinasen (Raf-1, A-Raf, B-Raf) zu

binden und sie dadurch an die Zellmembran zu translozieren wo sie anschließend phosphoryliert werden.<sup>103</sup> Die aktivierte Raf-Kinase leitet das Signal weiter, indem es das einzige *up stream*-Ziel, MEK1/2, an den beiden Serin-Resten phosphoryliert.<sup>103</sup> Die nachfolgenden Signalweg-Komponenten, ERK1/2 (auch p44- und p42-MAPK genannt), werden durch die phosphorylierten MEK1 oder MEK2 aktiviert. Aktivierte ERK1/2 können nun Signalwege in Gang setzen, an deren Ende im Zellnucleus die Transkription diverser Gene reguliert wird, die z. B. für Proliferation oder Differenzierung zuständig sind.

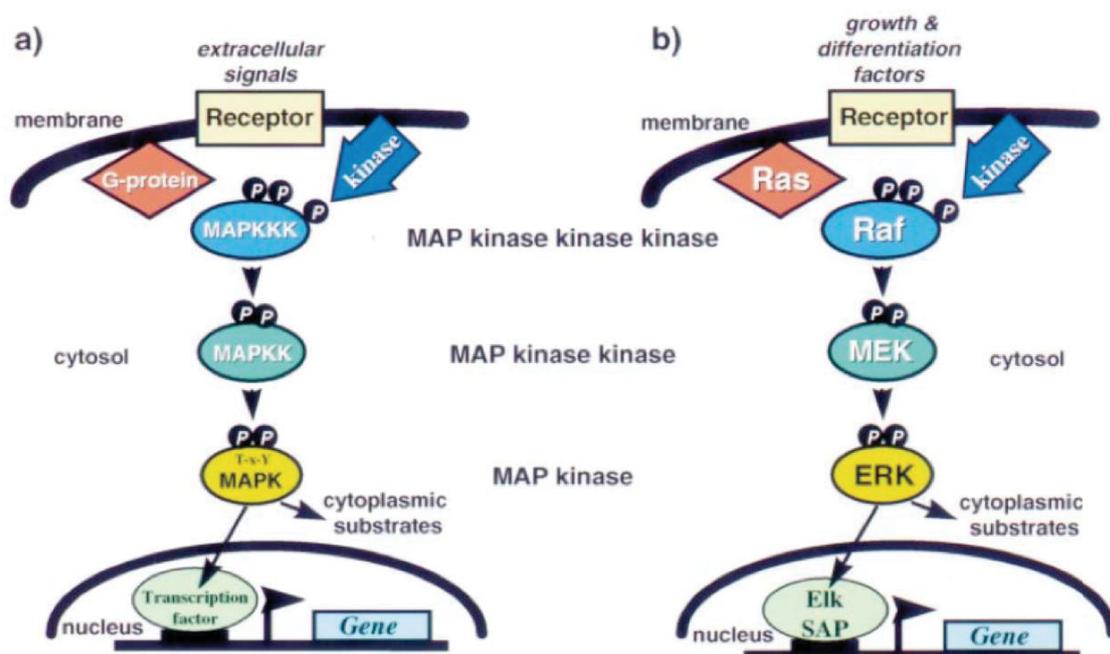


Abb. 5: Vereinfachte schematische Darstellung des MAPK-Signalwegs (a) allgemeine MAPK-Signalweg mit einem Rezeptor, G-Protein, Kinase, der MAPKKK-MAPKK-MAPK-Kaskade und der anschließenden Transkriptionsaktivierung. (b) zeigt einen speziellen MAPK-Signalweg mit der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade<sup>103</sup>

Eine weitere MAPK-Signalkaskade ist der JNK-Signalweg, der auch unter dem Namen *stress-activated phospho-kinase* (SAPK) bekannt ist. Dieser wird primär durch Zytokine und Stresseinwirkung von außen aktiviert<sup>106</sup>, kann jedoch auch durch andere G-Protein-gekoppelte Rezeptorliganden in Gang gesetzt werden.<sup>104</sup> Die Schlüsselkomponenten dieses Signalwegs sind ebenfalls drei hintereinander geschaltete MAPKinasen, die einen Reiz durch Aktivierung einer Phosphorylierungskaskade weiterleiten können. Zu den MAPKKK des JNK-Signalweges zählen z. B. *apoptosis signal-regulating kinase* (ASK), MEK Kinase

(MEKK) und *mixed lineage protein kinase* (MLK), zu MAPKK MKK7 und MKK4 und zu MAPK JNK.<sup>106</sup> Das Hauptziel des JNK-Signalweges ist die Aktivierung des *activator protein 1* (AP-1)-Transkriptionsfaktors, die über die Phosphorylierung von c-Jun vermittelt wird.<sup>106</sup> Hierbei dimerisiert c-Jun mit c-Jun oder c-Fos zu AP-1<sup>107</sup>, das anschließend die Transkription diverser Gene aktiviert, die in Prozesse, wie Zellproliferation, -transformation, -überleben und Apoptose involviert sind.<sup>108–110</sup>

Die Funktionen der MAPK-Signalwege und die Tatsache, dass diese durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, legen nahe, dass diese Signalwege in den Prozess der Implantation involviert sind. Die Expression von CXCL1, einem Chemokin dessen Expression nach Trophoblast-Stimulation in endometrialen Stromazellen *in vitro* stark hochreguliert wird, wird durch die MAPK-Signalkaskade moduliert.<sup>54,111</sup>

Die genannten und weiteren Zusammenhänge zwischen Implantationsprozess und MAPK-Signalwegen wurden bereits aufgedeckt und untersucht. Diese Vielzahl an Untersuchungen zeigt deutlich wie wichtig die Funktionen MAPK-Signalwege an der embryo-maternalen Schnittstelle sind. Die Untersuchungen der CXCL-1-Expression durch den ERK1/2- und JNK-Signalweg war Bestandteil dieser Arbeit und gab Aufschluss darüber, inwieweit Sdc-1 in die Expressionsregulation von CXCL-1 involviert ist.

#### 1.4.2 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein konservierter und sehr alter Signalweg, der in nahezu allen vielzelligen Lebewesen, angefangen bei Nematoden (Fadenwürmern), über *Drosophila* bis hin zum Menschen und auch in Nesseltieren, die bereits vor über 650 Mio Jahren gelebt haben, vorhanden ist.<sup>112</sup> Zu den Funktionen des Wnt-Signaltransduktionswegs zählen die Organogenese, Gewebedifferenzierung und -strukturierung z. B. bei der Entwicklung der Müller-Gänge zur Vagina, Zervix, Uterus und den Eileitern, Extremitäten-Entwicklung, Zell-Schicksal, Adhäsion, Gewebe und Zellpolarität, Migration, Embryogenese, Homöostase, Glykoneogenese und Glykolyse, Implantation und Plazentation.<sup>113–120</sup>

Momentan sind 20 Wnt-Liganden, die aus Zystein-sekretierenden Glykoproteinen bestehen, bekannt, die ihre Funktion über 10 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus der Frizzled (FZD)-Familie und zwei Ko-Rezeptoren *lipoprotein-related protein* (LRP)-5 und -6) vermitteln.<sup>114,121</sup> Bindet ein Ligand an einen FZD-Rezeptor, so kann das

Signal über drei verschiedene Kaskaden weitergeleitet werden.<sup>118,122</sup> Zum einen kann ein kanonischer  $\beta$ -Catenin-abhängiger Weg oder zwei nicht-kanonische,  $\beta$ -Catenin-unabhängige Wege, der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ - und der Wnt/planare Zellpolaritäts (PCP, *planar cell polarity*)-Weg aktiviert werden.<sup>116,122</sup> Im kanonischen Signalweg spielt  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle. Im nicht-aktiven Zustand ist  $\beta$ -Catenin hauptsächlich an den *Zelljunctions* lokalisiert und vermittelt dort die Bindung von E-Cadherin an  $\alpha$ -Catenin, das die epitheliale Integrität steuert.<sup>122</sup> Ist kein Wnt-Ligand vorhanden (*off-state*), liegt  $\beta$ -Catenin als ein Komplex mit dem *adenomatous polyposis coli* (APC)- und *axis inhibition protein* (Axin)-Protein im Cytosol der Zelle vor (Abb. 6). Dieser Komplex, auch Degradationskomplex genannt, fungiert als Signal für die Degradation von  $\beta$ -Catenin durch  *$\beta$ -transducin repeat-containing protein* ( $\beta$ -TrCP) über den Ubiquitin/Proteasom-Weg.<sup>122,123</sup>

Bei Bindung eines Wnt-Liganden (*on-state*) an die Zystein-reiche Domäne eines FZD-Rezeptors kommt es zu einer heterogenen Dimerisierung des Rezeptors mit einem LRP-Rezeptor, die zu einer Aktivierung des Proteins Dsh führt, die wiederum eine Spaltung des  $\beta$ -Catenin-APC-Axin-Komplexes bedingt, wodurch der Abbau des  $\beta$ -Catenin-Proteins inhibiert wird<sup>122</sup> (Abb. 6). Das freie und aktive  $\beta$ -Catenin kann nun in den Nukleus translozieren und die Transkription diverser Gene regulieren.<sup>122</sup> Sowohl die abgespalteten Komplexeinheiten, APC und Axin als auch andere Wnt-Komponenten können im Nukleus ebenfalls an der Modulation der Gentranskription beteiligt sein.<sup>122</sup> *Inhibitor of  $\beta$ -catenin* (ICAT), *secreted FZD-related proteins* (FRP) und Mitglieder der Dickkopf (Dkk)-Familie können als  $\beta$ -Catenin-Inhibitoren fungieren und den kanonischen Wnt-Signalweg inaktivieren.<sup>122,124</sup> Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege sind im Gegensatz zum kanonischen Weg weniger gut untersucht. Sie agieren nicht über  $\beta$ -Catenin und sind sogar potentielle Inhibitoren der  $\beta$ -Catenin-Aktivität.<sup>122</sup> Die Signalweiterleitung nach Bindung der nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11 an einen FZD-Rezeptor erfolgt ohne die Bildung eines FZD-LPR-Dimerkomplexes. Im Wnt/PCP-Weg wird das Signal durch die Aktivierung von den beiden GTPasen RhoA und Rac und ihrer *downstream targets Rho-associated kinase* (ROCK) und JNK transduziert. Wang hat gezeigt, dass dieser Signalweg in Vorgängen, wie Angiogenese, Knochenmorphogenese und Migration von mesenchymalen Zellen während der Gastrulation involviert ist<sup>125</sup>. Liganden des nicht-kanonischen Signalweges, wie Wnt5a, können jedoch auch eine kanonische

Signaltransduktion aktivieren, entscheidend ist hierbei an welchen Rezeptor sie binden.<sup>122</sup>

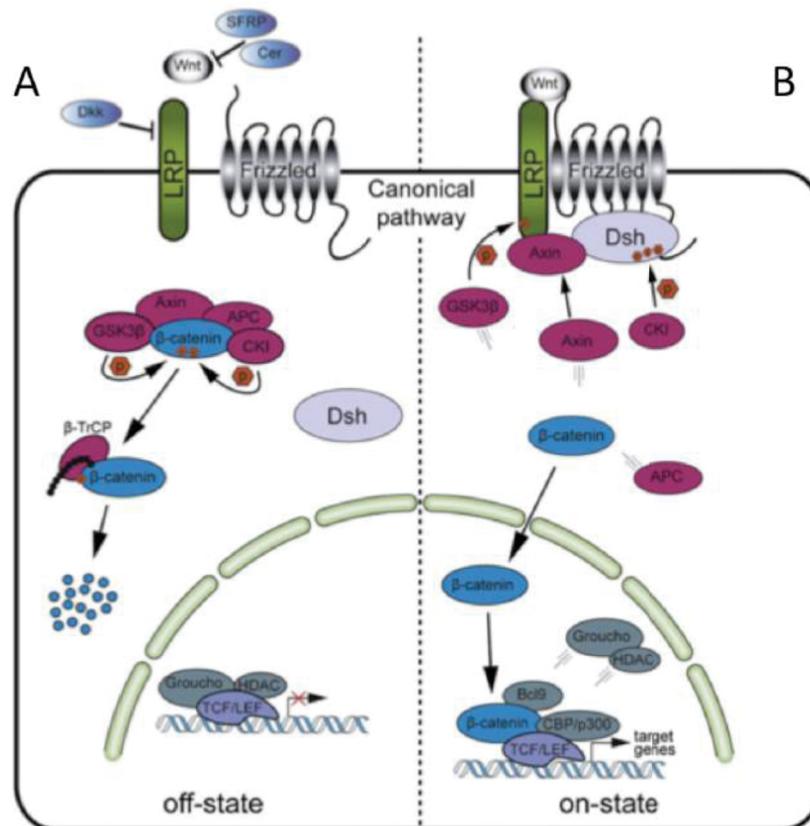


Abb. 6: Der kanonische Wnt-Signalweg im (A) nicht-aktiven (*off-state*)- und (B) aktiven (*on-state*)-Zustand. Der nicht aktive Zustand liegt bei Abwesenheit eines Wnt-Liganden vor, dabei ist  $\beta$ -Catenin in einem Degradationskomplex gebunden. Nach Phosphorylierung wird  $\beta$ -Catenin durch Ubiquitinierung und anschließende Degradierung durch Proteasomen inaktiviert. Nach Bindung eines Wnt-Liganden wird der Signalweg in einen aktiven Zustand überführt, dabei bindet *Dishevelled* (Dsh) an den FZD-Rezeptor und bedingt eine Spaltung des Degradationskomplexes. Das freie  $\beta$ -Catenin kann anschließend in den Nukleus translozieren und die Transkription von Wnt-Zielgenen induzieren<sup>122</sup>

Der nicht-kanonische Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg bedient sich einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung und der daraus resultierenden Inhibierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) oder Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der anschließenden Signalwege<sup>122</sup> (Abb. 7B).

Neben den spezifischen FZD-Rezeptoren können Wnt-Liganden auch über die Rezeptor-Thyrosin-Kinase Ryk und den Rezeptor-Thyrosin-Kinase-ähnlichen Orphan-Rezeptor (Ror) agieren. Ryk ist in Vorgänge der neuronalen Entwicklung

involviert während Wnt5a-anhängige Ror-Aktivierung eine Rolle bei polarisierter Zellmigration spielt.<sup>122</sup>

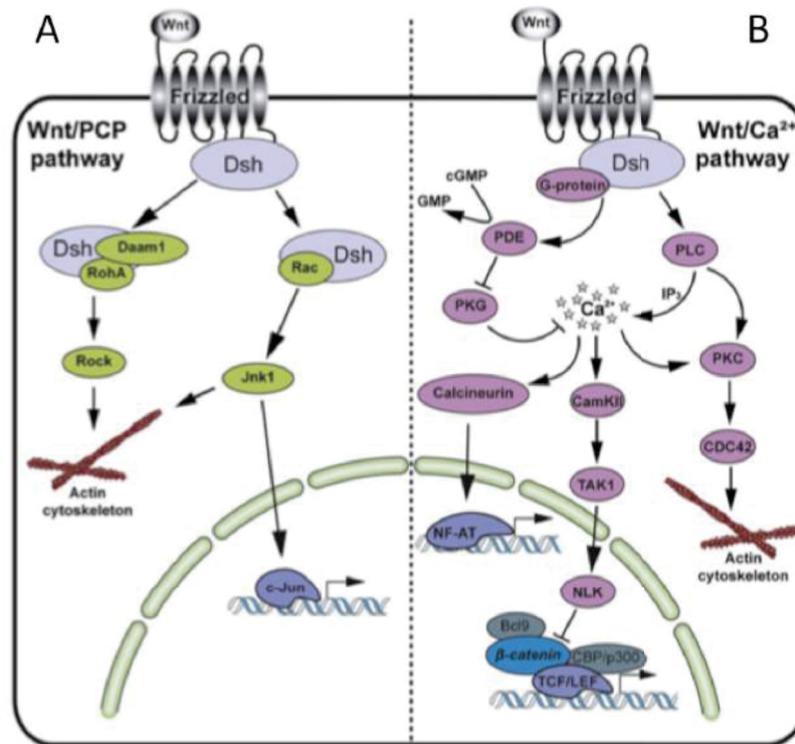


Abb. 7: Schematische Darstellung der beiden nicht-kanonischen Wnt-Signalwege. (A) Wnt/planarer Zellpolaritäts (PCP)-Signalweg ist charakterisiert durch die asymmetrische Verteilung von FZD-Rezeptoren, die in einer Zellpolarität resultiert und der Aktivierung von RhoA/Rock GTPase und JNK durch *Dsh* und DAAM1. (B) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg, der durch die Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  nach Interaktion von Wnt und FZD aktiviert wird<sup>122</sup>

Die Familie der G-Protein-gekoppelten FZD-Rezeptoren besteht aus 10 Mitgliedern, die in Organismen ubiquitär – von Schwämmen bis zu den Menschen - exprimiert werden.<sup>118</sup> Die Familie kann, abhängig von ihrer Homologie in 4 Gruppen eingeteilt werden: FZD1, FZD2 und FZD7 mit 75%, FZD5 und FZD8 mit 70%, FZD4, FZD9 und FZD10 mit 65% und FZD3 und FZD6 mit 50% Sequenzidentität. Strukturell bestehen die Rezeptoren aus 7 hydrophoben TM-Domänen, einer konservierten Zysteinreichen Bindungsdomäne (CRD) für Wnt-Liganden, einem extrazellulären N-Terminus und einer intrazellulären C-terminalen Domäne.<sup>115,118,124</sup> Das FZD-Protein fasst 500-700 AS und ist ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert. Wnt-Liganden binden mit einer hohen Affinität an die FZD-Rezeptoren, die in allen beschriebenen Wnt-Signalwegen agieren.<sup>118</sup> Jedoch ist der genaue Mechanismus der Dsh-Aktivierung durch FZD nach Bindung eines Wnt-Liganden noch weitgehend

unbekannt.<sup>118</sup> Die FZD-abhängige Inhibierung des Wnt-Signalweges kann unter anderem durch den *low-density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor-ähnlichem Protein, das auf Wnt-Art an die CRD des FZD-Rezeptors bindet und damit die Bindestelle für Wnt-Liganden blockiert, erfolgen.<sup>113</sup> Für FZD1 wurde gezeigt, dass der Rezeptor zusammen mit Wnt3a den kanonischen Wnt-Signalweg induziert. Im Gegensatz dazu kann FZD6 mit keinem Wnt-Liganden den kanonischen Signalweg aktivieren, vielmehr inhibiert FZD6 die FZD1/Wnt3a-induzierte Signalkaskade, jedoch ohne Einflussnahme auf die  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung, wenn FZD6 zusammen mit FZD1 exprimiert wird.<sup>121</sup> Dieses Beispiel verdeutlicht, dass FZD-Rezeptoren Wnt-Signalwege nicht nur aktivieren, sondern auch regulieren können.

Viele Wnt-Liganden und -Rezeptoren - Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 8b und FZD1, 4, 6 und 10 - werden im reproduktivem Gewebe vor und während der Implantation und bei der Plazentation exprimiert, wobei Wnt7a ausschließlich im humanen luminalen Epithelzellen gefunden wurde.<sup>116,124</sup> Insgesamt 14 Wnt-Liganden und 8 FZD-Rezeptoren konnten im Plazentagewebe nachgewiesen werden.<sup>119</sup> Eine Studie wies die Expression von FZD4 und FZD6 in murinen Uteri nach und zeigte, dass diese Rezeptoren durch ovarielle Steroidhormone reguliert werden. Das FZD4-Protein wurde hierbei hauptsächlich in murinen uterinen Blutgefäßen und im Embryo umgebenden Stroma während der Dezidualisierung gefunden. FZD6 wurde wiederum im murinen endometrialen Epithel, Stroma und in einigen Gefäßen des Myometriums exprimiert.<sup>126</sup> Des Weiteren wurde FZD6 auch im humanen endometrialen Epithel und Stroma, ohne signifikanten Expressionsunterschied zwischen der proliferativen und sekretorischen Phase, nachgewiesen.<sup>127</sup> Neben FZD6 zeigten Tulac *et al.* auch die Expression von  $\beta$ -Catenin im Epithel und Stroma des humanen Endometriums<sup>127</sup>, sodass angenommen werden kann, dass FZD6 im Endometrium den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert. Des Weiteren wurde  $\beta$ -Catenin auch in Nuclei von murinen Embryozellen gefunden, ein Fehlen der wichtigen kanonischen Wnt-Signalkomponente hatte jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf die Blastozystenformation.<sup>116</sup> FZD-Rezeptoren und die Wnt-Signalweg-Inhibitoren sFRP4 und Dkk1 konnten im endometrialen Stroma und/oder in uterinen Drüsen nachgewiesen werden. Außerdem wird die Expression einiger Wnt-Komponenten, wie Wnt10b, sFRP1, sFRP4 und Dkk1 zyklisch reguliert. Dass die Expression der Wnt-Inhibitoren sFRP1 und 4 während der mittzyklischen starken LH-Zunahme und Dkk1 während der sekretorischen Phase herunterreguliert werden,

untermauert die wichtige Rolle des Wnt-Signalweges bei der Implantation und/oder dem Dezidualisierungsvorgang. Auf der anderen Seite konnte auch eine Hochregulation der Dkk1-Expression durch P<sub>4</sub> nachgewiesen werden. Eine weitere wichtige Rolle der Wnt/FZD-Interaktion scheint, wie Untersuchungen an Mausblastozysten gezeigt haben, die Embryonalentwicklung und die Aktivierung von Blastozysten und die damit einhergehende Steigerung der Implantationskompetenz, zu sein.<sup>116,117</sup>

Ein Ansatz dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Expression der beiden Wnt-Rezeptoren FZD4 und FZD6 in humanen endometrialen Stromazellen nach Dezidualisierung und imitiertem Embryokontakt mittels IL-1 $\beta$  in Abhängigkeit von Sdc-1.

### 1.5 Sphäroide – Etablierung eines *in vitro* Implantationsmodells

Untersuchungen der humanen embryonalen Implantation werden vor allem durch die Tatsache erschwert, dass *in vivo* Analysen an der embryo-maternalen Schnittstelle aus ethischen und rechtlichen Gründen nicht möglich sind. Viele unterschiedliche Implantationsmodelle wurden im Laufe der Zeit für die Erforschung dieses Prozesses etabliert und angewandt, um den vor der Implantation stattfindenden embryo-maternalen Dialog besser zu verstehen. Neben einer tieferen Einsicht in diesen komplexen Vorgang der humanen embryonalen Implantation könnten die Ergebnisse dieser Arbeit als Basis für mögliche Therapieansätze für Frauen unter ART Behandlung und Frauen mit habituellen Aborten verwendet werden. Einfache und mehrschichtige Ko-Kulturen, Migrations- und Invasionsassay mit Embryosurrogaten, wie Sphäroiden stellen eine große Bandbreite an unterschiedlichen Methoden bei der Untersuchung der Implantation dar.<sup>128</sup> Sphäroide sind kleine kugelförmige Zellaggregate mit Tumor-ähnlichen Eigenschaften, die bereits seit mehreren Jahrzehnten in der Forschung – hauptsächlich in der onkologischen Tumorforschung - präsent sind.<sup>129</sup> In einer Vielzahl an Studien wurden Sphäroide unter anderem für die Analyse des Tumormikromilieus, der avaskulären Phase des Tumorwachstums und Tumorbestrahlung eingesetzt.<sup>129–131</sup> Außerdem wurden Sphäroide für onkologische Invasionsstudien mit Gewebe, wie z. B. murinen Bronchialkarzinom-Sphäroiden und embryonalem Herzgewebe des Huhns genutzt.<sup>132</sup> Neben onkologischen Versuchen konnten auch Analysen im Hinblick auf Angiogenese mittels Sphäroiden durchgeführt werden.<sup>133–137</sup> Auch die Untersuchung von bioaktiven Substanzen wie Isoprenalin

konnte bereits an Sphäroiden getestet werden.<sup>138</sup> Bei reproduktionsbiologischen Fragestellungen wurden Sphäroide aus Trophoblastzellen bisher meist mit einschichtigen Zellkulturen (Monolayer) aus Epithel- oder Stromazellen konfrontiert. So untersuchten John *et al.* die Bindung von Chorionkarzinom (JAR)-Sphäroiden an 4 verschiedenen uterinen Epithelzelllinien. Nach 24h konnte eine feste Anlagerung der JAR-Sphäroide an RL95-2-, HEC-1A- und KLE-Zellen beobachtet werden. Keine Anheftung fand an die humane endometriale Adenokarzinomzelllinie AN3-CA statt.<sup>139</sup> BeWo-Sphäroide konnten beim Anwachsen an endometriale Epithelzellen (RL95-2) die durch p38-MAPK-Signalweggesteuerte Apoptose induzieren.<sup>140</sup> Darüber hinaus waren  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren in der Lage, die Adhäsion der BeWo-Sphäroide zu hemmen.<sup>141</sup> Die Ko-Kultur von BeWo-Sphäroiden und RL95-2-Monolayer-Kultur konnte bereits als Hochdurchsatzverfahren zum Testen von Implantationsinhibitoren und –unterstützern etabliert werden.<sup>142</sup> Des Weiteren gab es Studien an JAR-Sphäroiden und uterinen epithelialen Ishikawa-Zellen und Sphäroiden aus humanen embryonalen Stammzellen (HESC), die auch als embryoide Körper bezeichnet werden, und endometrialem Stroma.<sup>143–147</sup> Dezidualisierte und nicht dezidualisierte endometriale Stromazellen wurden ebenfalls als Zell-Monolayer für Sphäroide aus Epithelzellen der Linie AC-1M88 verwendet. Anschließend konnte die Sekretion von Implantations-fördernden Faktoren, wie *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), LIF und IL-1 $\beta$  aus endometrialen Stromazellen detektiert werden.<sup>148</sup> Eine weitere Sphäroidformation-positive Trophoblast-Zelllinie, HTR8/SVneo, konnte ebenfalls erfolgreich mit kleinen Plazentagewebestücken konfrontiert werden und ist demnach für die Erforschung der humanen Implantation als Embryosurrogat geeignet.<sup>149</sup>

Die Etablierung eines neuen 3D-Ko-Kultur Modells als *in vitro* Implantationsmodell aus zwei Sphäroiden zur besseren Imitation der *in vivo* Verhältnisse, statt eines Sphäroiden und einer einschichtigen Zellkultur, wie bisher immer verwendet, stellte einen Teil dieser Arbeit dar.

## 1.6 Charakterisierung der Sdc-1-knock out-Maus

Murines Sdc-1 wurde bisher laut Literatur hauptsächlich mit Tumorgenese, Wundheilung, Inflammation, Organentwicklung und Regulation des Fressverhaltens in Zusammenhang gebracht.<sup>150–156</sup> Die sehr frühe Expression von Sdc-1 während der Embryogenese zeigt auf, wie bedeutsam dieses Heparansulfat-Proteoglykan für die

murine Entwicklung ist.<sup>157</sup> Neben der hohen Expression während der Gehirnentwicklung, wurde Sdc-1 auch im Ovar im Östruszyklus und in Makrophagen in Atherosklerose Läsionen in hohen Konzentrationen lokalisiert.<sup>155,158,159</sup> Allgemein wird Sdc-1 hauptsächlich im epithelialen Geweben exprimiert.<sup>157</sup> Viele Studien haben die Bedeutung von Sdc-1 während der Tumorgenese untersucht. Hier kann Sdc-1 in murinen Brustdrüsen die Wnt-Signalweg-abhängige Tumorgenese modulieren, das P<sub>4</sub>-induzierte Wachstum von Brusttumoren regulieren und die Tumorangio-genese *in vivo* stimulieren.<sup>150,151,160</sup> Damit ist Sdc-1 in der Lage, ein Tumor-freundliches Milieu zu erzeugen und die Tumorprogression zu unterstützen.<sup>161</sup> Neben Brustkrebs ist Sdc-1 auch in die Entwicklung und Progression von Melanomen, Bronchialkarzinom aber auch Wundheilung und Inflammation involviert.<sup>152,153,162–164</sup> Sdc-1 defiziente Mäuse weisen eine verzögerte Wundheilung, verstärkte Leukozytenrekrutierung und eine Resistenz gegen Wnt-Signalweg- induzierte Tumorgenese und mikrobielle Infektionen auf.<sup>74,157,165,166</sup>

Aus reproduktionsbiologischer Sicht ist die Sdc-1-*ko*-Maus zwar fertil und scheint auch gesund zu sein<sup>74</sup>, lässt sich jedoch nach mündlicher Kommunikation mit Arbeitsgruppen, die mit diesem Mausstamm arbeiten, schlecht züchten und weist kleinere Wurfgrößen auf. Durch die Charakterisierung der Sdc-1-*ko*-Maus sollten diese Aussagen untersucht und ein *in vivo* Implantationsmodell für nachfolgende Analysen der embryonalen Implantation etabliert werden.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der komplexe Vorgang der humanen Implantation des Embryos in das maternale rezeptive Endometrium ist trotz vieler Studien noch lange nicht bis ins Detail verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, das Zusammenspiel von Chemokinen, Chemokinrezeptoren und den dazugehörenden Signalwegen an der embryo-maternalen Schnittstelle zu untersuchen.

Der Implantationsvorgang ist mit zellulären Prozessen, wie der Angiogenese, Proliferation und Differenzierung verbunden. Viele dieser Prozesse werden durch Chemokine und ihre Rezeptoren über G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden vermittelt und reguliert. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf einem, bei der Implantation besonders wichtigen Chemokin – CXCL1 – und seinen Rezeptoren CXCR2 und Sdc-1. Durch die Etablierung einer CXCR2 *knock down (kd)* Zelllinie sollte die Funktion des Rezeptors in den endometrialen Stromazellen genau untersucht werden. Die Analyse der Auswirkungen des CXCR2 *kd* auf den Liganden CXCL1 und den daraus möglicherweise resultierenden Konsequenzen für die Implantation stellte einen hochinteressanten Versuchsansatz dar, der einen oder mehrere wichtige Bausteine für die Dechiffrierung des komplexen Vorgangs der embryonalen Implantation liefern könnte. Des Weiteren sollten die für die CXCL1-Expression wichtigen MAPK-Signalwege, ERK1/2 und JNK, in Abhängigkeit des Ko-Rezeptors Sdc-1 sowie auch die Expression der beiden Rezeptoren FZD4 und FZD6 des Wnt-Signalweges in Abhängigkeit von Sdc-1 analysiert werden. Die Etablierung eines 3D-Ko-Kultur-Systems aus 2 Sphäroiden sollte ein physiologisch nahes Implantationsmodell liefern, um zukünftig die erzielten Ergebnisse weiter zu verfolgen. Die initialen Charakterisierungsversuche der Sdc-1-*ko*-Maus, als Basis für weiterführende Analysen sind ebenfalls Teil dieser Arbeit. Diese Charakterisierung kann es gegebenenfalls zukünftig ermöglichen beim Menschen sonst unmögliche Untersuchungen an der embryonalen Implantationsstelle durchzuführen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
St-T1	Humane endometriale Stromazelllinie	<sup>167</sup> Brosens <i>et al.</i> , 1996
Nano	St-T1 mit TetR-Vektor	
Amaxa	St-T1 mit TetR-Vektor	
KdS1	St-T1 mit stabilem induzierbaren <i>Sdc-1 knock down</i>	<sup>43</sup> Baston-Büst <i>et al.</i> , 2010
T-HESC	Humane endometriale Stromazelllinie	<sup>168</sup> Krikum <i>et al.</i> , 2004
HTR8/SVneo	Humane Trophoblast-Zelllinie aus dem ersten Trimester	<sup>169</sup> Graham <i>et al.</i> , 1993
JEG-3	Humane epitheliale Chorionkarzinom Zelllinie	<sup>170</sup> Kohler <i>et al.</i> , 1971
JAR	Humane epitheliale Chorionkarzinom Zelllinie	<sup>171</sup> Pattillo <i>et al.</i> , 1971
BeWo	Humane epitheliale Chorionkarzinom Zelllinie	<sup>172</sup> Pattillo <i>et al.</i> , 1968
HeLa	Humane epitheliale Cervixkarzinom Zelllinie	<sup>173</sup> Gey <i>et al.</i> , 1952
HEK293	Humane epitheliale embryonale Nierenzelllinie	<sup>174</sup> Graham <i>et al.</i> , 1977

### 2.2 Zellkultur

Alle Kultivierungsarbeiten, wie Aussaat, Passagieren und Mediumwechsel fanden unter sterilen Bedingungen statt (Cytair 125, Equipements Scientifiques & Industries S.A.). Die Zellen wurden als Monolayerkulturen in 100mm-Gewebekultur-Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) beziehungsweise in 6-well-Platten (Sarstedt) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien ist Tab. 3 zu entnehmen.

#### 2.2.1 Aussaat von Zelllinien

Die Aussaat der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die bei -80°C gelagerten Zellstocks wurden für 3-5min bei 37°C (Wasserbad, Köttermann, Uetse/Hänigsen, Deutschland) aufgetaut, sofort in 5ml vorgewärmtes Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 15ml-Röhrchen (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) überführt.

Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1.000-2.000rpm für 10min. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine 100mm-Zellkulturschale überführt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24h.

### **2.2.2 Mediumwechsel**

Beim Mediumwechsel wurde das benutzte Zellkulturmedium abgesaugt und durch 10ml bei 100mm-Zellkulturschalen bzw. 2ml pro well bei 6-well-Platten frisches Medium ersetzt.

### **2.2.3 Passagieren**

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei ca. 90%iger Konfluenz. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit ca. 10ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml einer 2x-Trypsin-EDTA-Lösung (Biowest, Nuaille, Frankreich) überschichtet und für 2min bei 37°C inkubiert. Durch das Zufügen einer äquivalenten Menge an Zellkulturmedium stoppte die Trypsinisierung, die Zellen konnten abgewaschen und in ein geeignetes Röhrchen überführt werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (1.000rpm, 10min, RT) wurde der Trypsin-Zellkulturmedium-Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem bestimmten Volumen an frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zelllösung zu gleichen Teilen auf mit Medium gefüllte Zellkulturschalen verteilt.

### **2.2.4 Zellstocks**

Das Anlegen von Zellstocks erfolgte ab einer Passagenzahl von 3. Hierzu wurden die Zellen, wie im Punkt 2.2.3 beschrieben pelletiert, das Pellet anschließend in einem Gemisch aus 70% zellspezifischen Medium, 20% fetales Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) resuspendiert und sofort auf Kryoröhrchen (Sarstedt) verteilt. Die Lagerung der Zellstocks erfolgte bei -80°C.

### 2.2.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Die Komponenten für das Grundmedium aller Zelllinien wurden alle mit der Ausnahme des Insulins (Sigma Aldrich) von der Firma Biowest bezogen. Die zellspezifischen Antibiotika (AB), Blasticidin und Zeocin stammen von der Firma InvivoGen (San Diego, CA, USA).

Tab. 3: Übersicht über die Zusammensetzung der spezifischen Zellkulturmedien für die verwendeten Zelllinien. csFBS= *charcoal stripped* fetales Kälberserum; Pen/Strep= Penicillin/Streptomycin

Komponenten	Zelllinien						
	St-T1	Nano/ Amaya	KdS1	HTR8/ SVneo	JEG-3/ BeWo	JAR	HEK- 293
DMEM	75%	75%	75%	-	-	-	90%
MCDB 105	22%	22%	22%	-	-	-	-
RPMI 1640	-	-	-	94%	-	85%	-
Ham's F12	-	-	-	-	90%	-	-
csFBS	10%	10%	-	5%	10%	15%	10%
FBS (ohne Tet)	-	-	10%	-	-	-	-
Sodiumpyruvat	1x	1x	1x	-	-	1x	1x
L-Glutamin	1x	1x	1x	-	1x	1x	1x
Nicht-essentielle AS	1x	1x	1x	-	1x	1x	1x
Pen/Strep	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Gentamycin	50µg/ml	50µg/ml	50µg/ml	-	-	-	-
Insulin	5µg/ml	5µg/ml	5µg/ml	-	-	5µg/ml	-
Blasticidin	-	6µg/ml	6µg/ml	-	-	-	-
Zeocin	-	-	200µg/ml	-	-	-	-

Die Komponenten aus Tab. 3 wurden unter sterilen Bedingungen zusammengefügt und bei +6°C gelagert. Vor Benutzen des Mediums wurde dieses in einem Schüttelwasserbad (GFL 1083, Burgwedel, Deutschland) auf 37°C erwärmt.

Die Kultur der HTR8/SVneo-Zellen erfolgte für die Sphäroidformation und die anschließenden Konfrontationsversuche in St-T1-Medium.

### 2.2.6 Dezidualisierung

Die Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen erfolgte mit speziellem Dezidualisierungsmedium aus 75% DMEM, 22% MCDB105, 2% Tet-freies FBS, 50µg/ml Ascorbinsäure (VitC), 10µg/ml Transferrin, 40µg/ml Gentamycin, 1x Glutamin, 1x nicht-essentielle AS, 1x Sodiumpyruvat, 314,5ng/ml P<sub>4</sub> und 0,5mM

cAMP. Die zellspezifischen AB sind Tab. 3 zu entnehmen. Die Inkubation der Zellen mit Dezidualisierungsmedium betrug 72h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.

### **2.2.7 Isolation und Kultur primärer endometrialer Stromazellen**

Die Isolation primärer endometrialer Stromazellen (PSZ) erfolgte aus humanem endometrialen Gewebe von 4 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf (Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität, Studiennummer 2.904). Das Gewebe wurde nach schriftlichem Einverständnis der Patientinnen durch eine Strickkürettage entnommen und direkt in Transportmedium überführt. Unter sterilen Bedingungen erfolgte das Zerkleinern der Gewebeprobe mit Hilfe von 2 Skalpellern. Anschließend folgte der erste enzymatische Verdau der Gewebestücke für 30min bei 37°C und 175rpm. Mit Hilfe einer 1.000µl-Pipette wurde die Gewebe-Zell-Suspension mehrmals resuspendiert und erneut für 30min bei 37°C und 175rpm inkubiert. Nach wiederholtem Mischen der Suspension wurde diese durch ein 100µm-Sieb (BD Biosciences) zur Abtrennung grober Rückstände filtriert. Das Filtrat wurde anschließend durch ein weiteres Sieb mit 40µm großen Poren (BD Biosciences) filtriert. Die Rückstände im Sieb bestanden hauptsächlich aus epithelialen Drüsenschläuchen und das Filtrat enthielt die endometrialen Stromazellen. Letztere wurden 3x mit 10ml Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation bei 1.000rpm) und auf 35mm Zellkulturschalen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24h und die darauf folgenden alle 72h.

Transportmedium:

- 88% (v/v) DMEM/F12 (Biowest)
- 10% (v/v) FBS
- 1% (v/v) Pen/Strep
- 0,4% (v/v) Amphotericin B (Biowest)

Enzymatischer Verdau:

- Transportmedium
- 1,5mg/ml (w/v) Kollagenase B (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland)

Kulturmedium:

- Transportmedium
- 1,6% (v/v) L-Glutamin
- 8µg/ml (v/v) Insulin

### 2.2.8 Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut

Die Isolation von mononukleären Zellen (*mononuclear cells*, MNC) aus Vollblut von Probanden erfolgte mittels Ficoll (Axis-Shield, Oslo, Norwegen). Hierbei wurde 1VT Ficoll mit 2VT Vollblut überschichtet und 30min bei 600g zentrifugiert. MNC bildeten nach der Gradientenzentrifugation eine weiße Schicht, die nach der Abnahme 2x mit PBS gewaschen wurden.

1x PBS-Puffer:

- 140mM NaCl
- 2,7mM KCl
- 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1l H<sub>2</sub>O, pH 7,3-7,4

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus behandelten, unbehandelten Zellen und endometrialem Gewebe erfolgte mittels peqGOLD TriFast<sup>®</sup> (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland). Dieses Verfahren beruht auf der Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi.<sup>175</sup> Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurden 1ml bzw. 400µl des peqGOLD TriFast<sup>®</sup> Reagenzes auf eine 100mm bzw. 35mm Zellkulturschale (6-well Platte) direkt auf die Zellen gegeben und 5min zur Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe bei RT inkubiert. Endometriales Gewebe wurde mittels Skalpell zerkleinert und mit 1ml TriFast<sup>®</sup> Reagenz versetzt. Nach Zugabe von 200µl bzw. 80µl Chloroform wurde das Gemisch 15s kräftig geschüttelt und 15min bei 5.000g und 4°C zentrifugiert. Hierbei erfolgte eine Auftrennung in eine obere wässrige RNA-enhaltende Phase und eine untere Interphase mit DNA-Resten.

Beide Phasen wurden durch eine organische Phase, die die Gesamtproteine enthält, getrennt. Für die RNA-Isolation wurde die wässrige Phase zusammen mit 500µl bzw. 200µl Isopropanol (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) in ein neues Probengefäß überführt, mehrmals invertiert und nach einer 10min Inkubation bei RT für 10min bei 4°C zentrifugiert. Die Inter- und organische Phase wurden entweder für die parallel laufende Proteinisolation verwendet oder für eine spätere Proteinisolation bei -20°C eingefroren und gelagert. Das nach der Zentrifugation der wässrigen Phase mit Isopropanol entstandene gelähnliche Pellet wurde mit 1ml bzw. 400µl 75% Ethanol (EtOH, Merck Millipore) gewaschen und für 5min bei 4°C erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes konnte das RNA-Pellet in 30µl Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma Aldrich) aufbereitetem dH<sub>2</sub>O aufgenommen werden. Um das Lösen des Pellets zu beschleunigen wurde die Lösung bei 55°C für 10min erhitzt und für die anschließende photometrische Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 2.3.1.1) auf Eis gelagert. Die dauerhafte Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -80°C.

#### **2.3.1.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit**

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in DNA- bzw. RNA-haltigen Lösungen erfolgte mittels eines Biophotometers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in Plastikkuvetten (Eppendorf) oder eines NanoDrop2000 UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Das Prinzip der Messung beruht auf der Absorption der RNA und DNA bei einer Wellenlänge von 260nm. Wobei eine Absorptionseinheit einer DNA-Konzentration von 50µg dsDNA/ml bzw. 40µg ssRNA/ml entspricht.<sup>176</sup> Verunreinigungen durch Proteine können anhand hoher Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 230nm (Absorption von Peptidbindungen und Extraktionsreagenzien) und 280nm (Absorption von aromatischen Aminosäuren) erkannt werden. Durch das Verhältnis der einzelnen Extinktionswerte lässt sich die Reinheit der Probe bestimmen.

#### **2.3.1.2 DNase-Verdau**

Der DNase-Verdau diente der vollständigen Entfernung von möglichen genomischen (g)DNA-Resten in der RNA-Lösung. Die Reaktion mit dem DNase-Verdau-Kit erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Scientific). 2µg RNA in 10µl wurden mit 3µl Reaktionspuffer (1x) und 1µl DNase versetzt, auf 30µl mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O

aufgefüllt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1µl EDTA und das Erhitzen der gesamten Lösung auf 65°C für 10min zur Inaktivierung der DNase-Reaktivität. Die gDNA-freie RNA-Lösung wurde für die reverse Transkription (RT) eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.2)

### **2.3.2 Reverse Transkription**

Die RT ist eine Methode der cDNA-Synthese aus RNA mittels reverser Transkriptasen. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems by Life Technologies, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben. Zu dem Volumen von 30µl nach dem DNase-Verdau wurden 5µl 10xRT-Puffer (1x), 2µl 25x dNTP Mix (1x), 5µl 10x Randomprimer (1x) und 2,5µl 20x reverse Transkriptase (1x) zugesetzt. Nach Auffüllen auf 50µl mit Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O erfolgte die Inkubation des Versuchsansatzes bei 25°C für 10min, für weitere 2h bei 37°C und anschließend bei 85°C für 5min. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine gut etablierte Standardmethode zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen.<sup>177</sup> Die zu amplifizierende Sequenz wird durch zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (verwendete Oligonukleotide siehe Tab. 5) festgelegt. Die Oligonukleotide (Primer) wurden mit Hilfe des online frei verfügbaren Programms Primer 3<sup>178</sup> entworfen und durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die thermostabile DNA-Polymerase Taq aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Zum Ansetzen der PCR wurde der 2x PCR Master Mix (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwandt. Ein Standard-PCR-Ansatz mit einem Volumen von 25µl setzte sich wie folgt zusammen: 40 bis 200ng cDNA-Template, jeweils 5 bis 12,5pmol eines *forward*- und eines *reverse*-Oligonukleotid-Primers und 1x PCR Master Mix.

Bei der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA getrennt, indem die Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotiden aufgebrochen werden. Im zweiten Schritt, der Hybridisierung, erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Einzelstränge. In der Elongationsphase findet die Verlängerung des Primers

komplementär zum DNA-Einzelstrang statt. Dieser Zyklus wird 20- bis 30-mal wiederholt (Tab. 4).

Durchgeführt wurde die PCR in einem peqSTAR 96X Universal Gradient Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie.

Tab. 4: Standard-PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
Anfangsdenaturierung	95°C	5min	
Denaturierung	95°C	30 bis 45s	← 20 - 30x
Hybridisierung	50 bis 65°C	30 bis 45s	
Elongation	72°C	1,5 bis 6min*	
Endelongation	72°C	5 bis 10min	
Pause	4°C	∞	

\* Dauer abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz

#### 2.3.4 *Nested-PCR*

Bei einer *nested-PCR* wird im ersten Schritt die Zielsequenz großzügig mit der umliegenden Sequenz mittels Standard-PCR unter Benutzung eines äußeren (*outer*) Oligonukleotid-Primerpaars amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt kann anschließend als *DNA-template* für eine quantitative *real time* PCR, kurz qRT-PCR (siehe Kapitel 2.3.6) eingesetzt werden. In dieser zweiten PCR mit einem inneren (*inner*) Oligonukleotid-Primerpaar, das deutlich näher an den Zielsequenz liegt und diese umgibt wird die gesuchte DNA-Sequenz wiederholt amplifiziert und quantifiziert.<sup>179</sup> Dieses Verfahren ermöglicht neben der Quantifizierung von sehr schwach exprimierten Genen auch eine deutliche Reduktion von störenden RNA-Extraktionslösungen, wie z. B. Phenol-Chloroform in dem quantifizierenden qRT-PCR-Schritt. Einen Nachteil dieser Methode stellt die erste Standard-PCR-Amplifikation dar, die zu einer semi-quantitativen Auswertung der Expression des gesuchten Gens führt.<sup>180</sup>

#### 2.3.5 *Touchdown-PCR*

Eine Möglichkeit die Spezifität einer PCR zu erhöhen und dadurch unspezifische Fehlamplifikationen zu vermeiden ist das Durchführen einer *touchdown-PCR* (TD-PCR). Im Gegensatz zu einer Standard-PCR startet man bei einer TD-PCR mit einer

5-10°C höheren-*annealing*-Temperatur die nach einer festgelegten Zyklenanzahl um jeweils 1°C gesenkt wird. Ist die optimale *annealing*-Temperatur erreicht, werden noch ca. 15-20 Zyklen mit dieser Temperatur durchgeführt. Durch die zu hohe *annealing*-Temperatur sollen unspezifische Primerbindungen an das cDNA-*template* vermieden und so die Spezifität der PCR gesteigert werden.<sup>181</sup>

### 2.3.6 Quantitative *real time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Unter qRT-PCR wird eine PCR mit einer Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit verstanden. Die qRT-PCR wurde mit dem 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), den in Tab. 5 aufgeführten Oligonukleotid-Primern und mittels des Roche LightCyclers 1.5 (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. SYBR Green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich an dsDNA-Stränge anlagert und nach der Anlagerung ein fluoreszierendes Signal imitiert. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Konzentration der Amplifikatprodukte zu und wird nach jedem Amplifikationszyklus detektiert.<sup>182</sup> Die Zusammensetzung der qRT-PCR-Ansätze ist dem Standard-PCR-Ansatz (siehe Kapitel 2.3.3) zu entnehmen. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

### 2.3.7 Verwendete Oligonukleotide

Die in der Tab. 5 aufgeführten Oligonukleotide (Primer) dienten der Amplifikation der gewünschten Gensequenz mittels PCR (Kapitel 2.3.3), *nested*-PCR (Kapitel 2.3.4) TD-PCR (Kapitel 2.3.5) oder qRT-PCR (Kapitel 2.3.6) und der DNA-Sequenzanalyse am BMFZ (Biologisch medizinisches Forschungszentrum, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf). Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

### 2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Analyse der z. B. nach einer Plasmid Präparation, einer PCR oder einem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente. Diese werden nach ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung, bedingt durch die Phosphatgruppen, wandern die Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode.

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. for, f: *forward* ("vorwärts"-Primer); rev, r: *reverse* ("gegenläufiger"-Primer)

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'	Fragmentgröße [bp]	Verwendung
H1_for	TGTTCTGGGAAATCACCATA	-	Generierung einer <i>knock down</i> Zelllinie: Sequenzierung der transfizierten shRNA im pENTR/TO-Vektor
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC		
HβACTIN5	CGGGACCTGACTGACTACC	250	Amplifikation einer Teilsequenz des <i>housekeeping</i> Gens β-Aktin
HβACTIN3	AGGAAGGCTGGAAGAGTGC		
H-PRL-5	GCTTCTGTATCATCTGGTCACG	251	Amplifikation einer Teilsequenz des Dezidualisierungsmarkers PRL
H-PRL-3	TGCGTAGGCAGTGGAGCAG		
huCXCR2for	AGACAGTATGGCAGCTTTCCTC	299	Amplifikation einer Teilsequenz des Chemokinrezeptors CXCR2
huCXCR2rev	AAAGTTTTCAAGGTCGTCCTGTT		
CXCR2_429_452_f	TGCTCTTCTGGAGGTGTCTCT	200	CXCR2 <i>knock down</i> Nachweis: Amplifikation einer Teilsequenz von CXCR2 im Bereich des eingebrachten <i>knock down</i> durch 429I und 452I shRNA
CXCR2_429_452_r	AGGGATTCTGGTTCACATGG		
CXCR2_1015_f	GGCCCTGCCTGTCTTACTTT	177	CXCR2 <i>knock down</i> Nachweis: Amplifikation einer Teilsequenz von CXCR2 im Bereich des eingebrachten <i>knock down</i> durch 1015I shRNA
CXCR2_1015_r	AGGGTGAATCCGTAGCAGAA		
CXCR2_1744_f	TTAGAAAGCTTGCCCTGGTG	190	CXCR2 <i>knock down</i> Nachweis: Amplifikation einer Teilsequenz von CXCR2 im Bereich des eingebrachten <i>knock down</i> durch 1744III shRNA
CXCR2_1744_r	GTTGGCCAGCCTGATTTTCT		
1015_neu_f	ACTTTTCCGAAGGACCGTCT	92	CXCR2 <i>knock down</i> Nachweis: Amplifikation einer Teilsequenz von CXCR2 im Bereich des eingebrachten <i>knock down</i> durch 1015I shRNA
1015_neu_r	GTAACAGCATCCGCCAGTTT		
nested_CXCR2_f	TGTGCAAGGTGGTCTCACTC	1319	CXCR2 <i>knock down</i> Nachweis: Amplifikation einer Teilsequenz von CXCR2 für eine <i>nested</i> PCR
nested_CXCR2_r	CGCTCGAGAGTTCAGTTTC		
hCXCR4_f	TACACCGAGGAAATGGGCTCA	112	Amplifikation einer Teilsequenz des Chemokinrezeptors CXCR4
hCXCR4_r	AGATGATGGAGTAGATGGTGG		
hCXCR1_f_neu	GCAGCTCCTACTGTTGGACACA	75	Amplifikation einer Teilsequenz des Chemokinrezeptors CXCR1
hCXCR1_r_neu	CATGTCCTCTCAGTTTCAGCAA		
hCXCL1for	ATAGCCACACTCAAGAATG	194	Amplifikation einer Teilsequenz des Chemokins CXCL1
hCXCL1rev	TCTGCAGCTGTGTCTCTCTT		
hHIF-1α_f	CACAGAAATGGCCTTGTGAAAAAGG	214	Hypoxie-Nachweis: Amplifikation einer Teilsequenz des Hypoxiemarkers HIF-1α
hHIF_1α_r	CCAAGCAGGTCATAGGTGGTTTCTT		
SynF1	CGGCGAAACCTACAGCCCTC	290/ 450	Sdc-1-ko-Nachweis: 290bp= WT-Maus 450bp= Sdc-1-ko-Maus 290bp+450bp= heterozygote Maus
SynF2	GCATCGGCGAGTGGCGAGTC		
N3193	CGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCC		

Die Durchführung erfolgte in horizontalen Apparaturen bei einer konstanten Spannung von 120-140V/cm<sup>2</sup>. Für die Analysen wurden je nach Fragmentgröße 1 bis 2%ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarosetabletten (PEQLAB Biotechnologie) wurden mit dem entsprechenden Volumen 1x TBE-Laufpuffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid (EtBr) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) versetzt und anschließend in eine Gelkammer mit Taschenformer gegossen. Die Interkalation von EtBr und GelRed Nucleic Acid Gel Stain mit der DNA führt zu einer Fluoreszenz unter UV-Licht ( $\lambda=260\text{nm}$ ).

Als Größenstandard diente der 100bp-Marker der Firma Fermentas (Thermo Scientific). Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth bezogen.

Zusammensetzung des (1x) TBE-Laufpuffers:

- 89mM TRIS
- 89mM Borsäure
- 2mM EDTA
- 1l ddH<sub>2</sub>O
- pH 8,0

## 2.3.9 Rekombinante DNA-Techniken

### 2.3.9.1 Verwendete Bakterienstämme

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die in Tab. 6 aufgeführten Bakterienstämme verwendet. Sowohl der XL1blue- als auch der One Shot<sup>®</sup>TOP10-*E.coli*-Stamm wurde für die Hitze-Schock-Transformation verwendet. One Shot<sup>®</sup>TOP10-Bakterien wurden bereits als ein chemisch kompetenter *E.coli*-Stamm von der Firma Life Technologies bezogen. Chemisch kompetente XL1blue-Bakterien wurden in eigener Herstellung gefertigt (siehe Kapitel 2.3.9.3).

Tab. 6: Übersicht über die bei der Hitze-Schock-Transformation verwendeten Bakterienstämme *E.coli*: *Escherischia coli*; Tet: Tetracyclin; Kan: Kanamycin

Stamm	Resistenz	Verwendung	Referenz
<i>E.coli</i> XL1blue	Tet <sup>R</sup>	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien/ Klonierung	<sup>183</sup> Bullock <i>et al.</i> , 1987  <sup>184</sup> BLOCK-iT <sup>TM</sup>
<i>E.coli</i> One Shot <sup>®</sup> TOP10	Kan <sup>R</sup>	Chem. kompetenter <i>E.coli</i> - Stamm/Klonierung	Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit Manual

### 2.3.9.2 Anzuchtbedingungen für gramnegative Bakterien

Die Anzucht der unterschiedlichen *E. coli*-Stämme erfolgte unter Schütteln unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Je nach Verwendung wurden die Bakterien in S.O.C.-, ΨB-, LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Selektions-AB kultiviert. Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen mit Ausnahme von Trypton, Hefe-Extrakt, Pepton (Sigma Aldrich) und NaCl (Carl Roth).

Zusammensetzung der Anzuchtmedien:

- S.O.C.-Medium
- 2% (w/v) Trypton
  - 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
  - 10mM NaCl
  - 2,5mM KCl
  - 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10mM MgSO<sub>4</sub>
  - 20mM Glucose

- LB-Medium
- 10g/l NaCl
  - 10g/l Trypton
  - 5g/l Hefe-Extrakt
  - pH 7,5

- ΨB-Medium
- 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
  - 2,0% (w/v) Pepton
  - 0,4% (w/v) MgSO<sub>4</sub>
  - 10mM KCl
  - pH 7,6

Alle Medien wurden bei 120°C für 20min autoklaviert (Systec VX-95, Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg). Für Agarplatten wurde zu den Anzuchtmedien 1,5% (w/v) Agar (Carl Roth) vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren erfolgte eine leichte Abkühlung der Lösung auf einem Magnetrührer auf ca. 50°C und das Gießen der Agarplatten (100mm Zellkulturschalen, Sarstedt) unter sterilen Bedingungen.

Zur Aufbewahrung selektionierter Bakterienklone wurden die Bakterienkulturen in LB-Medium mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

### 2.3.9.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Kompetenz von Bakterien und Zellen ist ein Maß für die Bereitschaft, fremde DNA durch Transformation aufzunehmen. Durch eine chemische Behandlung der Bakterien und Zellen kann diese Bereitschaft gesteigert und damit die Effizienz der Transformation erhöht werden. Die Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen für die spätere Transformation erfolgte nach der Hanahan-Methode.<sup>185</sup> Hierfür wurden die Bakterien in 300ml ΨB-Medium aerob bei 37°C und leichtem Schütteln kultiviert bis die Kulturlösung eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht hat. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 45min und ein Zentrifugationsschritt für 5min bei 5.000g und 4°C. Die sedimentierten Bakterien wurden in 1/3VT TFB1-Pufferlösung resuspendiert und für 30min erneut auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 5.000g und 4°C für 5min wurden die *E.coli*-Zellen pelletiert und anschließend in 1/30VT TFB2-Puffers aufgenommen. Nach 15min auf Eis wurde die Bakterienlösung bei 4°C in sterile Probengefäße á 200µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

Zusammensetzung der Puffermedien (alle Feststoffe und Glycerin von Merck KGaA):

- TFB1
- 100mM RbCl<sub>2</sub>
  - 50mM MnCl<sub>2</sub>
  - 30mM KAc
  - 10mM CaCl<sub>2</sub>
  - 15% (v/v) Glycerin
  - sterilfiltriert, pH 5,8 (Essigsäure)
- TFB2
- 75mM CaCl<sub>2</sub>
  - 10mM MOPS
  - 10mM RbCl<sub>2</sub>
  - 15% (v/v) Glycerin
  - sterilfiltriert, pH 7,0 (NaOH)

#### 2.3.9.4 RNA-Interferenz (RNA-Silencing, RNAi)

RNA-Interferenz ist ein in allen Eukaryoten vorhandener Mechanismus mit dem die Zelle bestimmte Gene abschalten kann. In der molekularen Biologie wird dieser benutzt um gezielt Gene stillzulegen bzw. deren Expression stark herunter zu regulieren (*kd*).<sup>186</sup> Kurze, 19-23bp lange *small interfering (si)*RNA oder *short hairpin (sh)*RNA, komplementär zum Gen das ausgeschaltet werden soll, werden mit Hilfe von Vektoren und Transfektion in die Zellen eingebracht und durch den natürlichen zelleigenen RNAi-Mechanismus (Abb. 8) für das Stilllegen des Zielgens benutzt.

#### 2.3.9.5 Generierung einer stabilen induzierbaren CXCR2-*kd*-Zelllinie

Das Generieren des stabilen und induzierbaren CXCR2 *kd* in St-T1-Zellen erfolgte mittels BLOCK-IT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kits (Invitrogen by Life Technologies) nach Herstellerangaben und bestand aus mehreren Einzelschritten, die im Folgenden aufgeführt werden. Für die Herstellung der CXCR2-*kd*-Zelllinie wurden die beiden Tet-Repressor (TetR) exprimierenden St-T1-Zelllinien, Nano und Amaxa, die von unserer Arbeitsgruppe bereits für die Generierung der St-T1-Sdc-1-*ko*-Zelllinie, KdS1<sup>43</sup>, hergestellt wurden, verwendet.

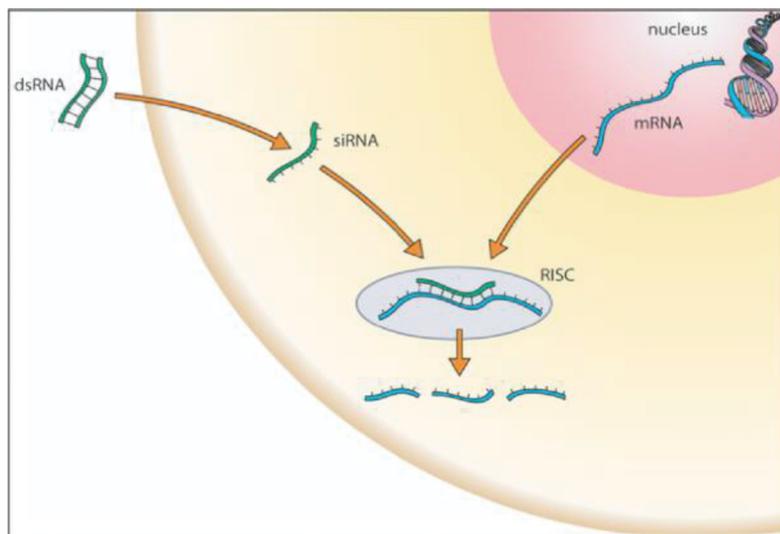


Abb. 8: Schematische Darstellung des natürlichen RNAi-Mechanismus in Säugerzellen. Kleine doppelsträngige (*double stranded*) (*ds*)RNA-Moleküle werden in der Zelle zu einzelsträngigen (*single stranded, ss*) *si*RNA-Molekülen gespalten, die sich anschließend in einem *RNA-induced silencing complex* (RISC) an die komplementäre RNA der Zelle anlagern und dadurch die Spaltung des RNA-Strangs induzieren <sup>187</sup>

#### A) ds-Oligo-Herstellung

Das Designen der *ss*-Oligos für die verschiedenen *sh*RNA erfolgt mit Hilfe des online verfügbaren Programms Invitrogen's RNAi Designer. Das 5'-Ende des *top*-Stranges enthielt eine CACC-AS-Folge, die komplementär zu der Überhangsequenz GTGG am pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO-Vektor ist und die letzten vier Basen des H1/TO-Promoters darstellt. Eine CGAA-*loop*-Sequenz bildet die Mitte des *top*-Stranges. Der *bottom*-Strang beinhaltet am 5'-Ende eine AAAA-Sequenz, die zum einen komplementär zu der TTTT-Überhangsequenz des pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO-Vektor ist und zum anderen die ersten vier Basen des Pol III-Terminators bildet. Tab. 7 zeigt alle in dieser Arbeit für die *sh*RNA-Herstellung verwendeten *ss*-Oligos.

Die *ss*-Oligo für 429I, 452I, 893III, 1145I und 1744III wurden von der Firma Invitrogen (Invitrogen by Life Technologies) synthetisiert. Die Synthese der 1015I-Oligo erfolgte durch Eurofins Genomics. Nach Rekonstitution der lyophilisierten *ss*-Oligo in ddH<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 200µM, konnte die Generierung der *ds*-Oligo mittels *annealing* erfolgen.

Tab. 7: Verwendete ss-Oligo. H1/TO-Promotor-Sequenz ist fett hervorgehoben; die *loop*-Sequenz ist mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet; Pol III-Sequenz ist kursiv dargestellt

<b>shRNA</b>		<b>Sequenz (5'-3')</b>
429I	<i>top</i>	<b>CACCGAGTGACAGCTTTGAAGATTT</b> <i>cgaa</i> <b>AAATCTTCAAAGCTGTC</b> ACTC
	<i>bottom</i>	AAAAGAGTGACAGCTTTGAAGATTTTTCGAAATCTTCAAAGCTGTCACTC
452I	<i>top</i>	<b>CACCGGAAAGGTGAAGATCTTAGT</b> <i>Acgaa</i> <b>TACTAAGATCTTCA</b> CCTTTCC
	<i>bottom</i>	AAAAGGAAAGGTGAAGATCTTAGTATTCGTA <b>CTAAGATCTTCA</b> CCTTTCC
893III	<i>top</i>	<b>CACCGCCATGGACTCCTCAAGATT</b> <i>Cgaa</i> <b>GAATCTTGAGGAGTCCATGGC</b>
	<i>bottom</i>	AAAAGCCATGGACTCCTCAAGATTCTTCGGAATCTTGAGGAGTCCATGGC
1015I	<i>top</i>	<b>CACCAATACAGCAA</b> ACTGGCGGAT <i>Gc</i> <i>gaa</i> <b>CATCCGCCAGTTT</b> GCTG
	<i>bottom</i>	AAAAAATACAGCAA <b>ACTGGCGGATGTT</b> CGCATCCGCCTGTTT <b>GCTG</b>
1145I	<i>top</i>	<b>CACCGGCCACGTTCTTACTAGTTT</b> <i>Cgaa</i> <b>GAAACTAGTAAGA</b> ACGTCGTGGCC
	<i>bottom</i>	AAAAGGCCACGTTCTTACTAGTTTCTTCG <b>GAAACTAGTAAGA</b> ACGTCGTGGCC
1744III	<i>top</i>	<b>CACCGCACTCTATGTTCTAAGAAGT</b> <i>cgaa</i> <b>ACTTCTTAGAACATAGAGTGC</b>
	<i>bottom</i>	AAAAGCACTCTATGTTCTAAGTTT <b>CGACTTAGAACATAGAGTGC</b>

Hierzu wurde ein 20µl Reaktionsansatz (Tab. 8) zusammen pipettiert und für 4min bei 95°C inkubiert. Während der Abkühlphase auf RT fand die Anlagerung der beiden ss-Oligo statt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (ca. 5s) und sanftem Mischen wurde ein Teil der *ds*-Oligostocklösung in zwei Schritten auf 5nM verdünnt. Die Stocklösung und alle Verdünnungen wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 8: Zusammensetzung der *annealing*-Reaktion

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [µl]</b>
<i>top</i> Strang ss-Oligo	5
<i>bottom</i> Strang ss-Oligo	5
10x Oligo- <i>annealing</i> -Puffer	2
DNase/RNase-freies H <sub>2</sub> O	8

## B) Ligation

Im zweiten Schritt wurden die *ds*-Oligo in den pENTR<sup>TM</sup>-H1/TO-Vektor (Abb. 9) ligiert. Unter Ligation wird eine enzymgesteuerte Verbindung von zwei Nukleinsäurefragmenten verstanden. In diesem Fall wurde die Ligation mittels

T4 DNA Ligase durchgeführt. Die 20µl Ligationsreaktion wurde mit in Tab. 9 aufgeführten Reagenzien bei RT angesetzt.

Tab. 9: Zusammensetzung der Ligationsreaktion

Reagenz	Volumen [µl]
5x Ligasepuffer	4
pENTR <sup>TM</sup> -H1/TO (0,75ng/µl)	2
ds-Oligo (5nM)	1-5
T4 DNA Ligase (1U/µl)	1
DNase/RNase-freies H <sub>2</sub> O	8-12

Nach dem Mischen der Reaktion durch Pipettieren erfolgte eine Inkubation für 30min bei RT. Anschließend konnte die Reaktion direkt in einen kompetenten *E.coli*-Bakterienstamm transformiert (Lagerung auf Eis) oder ü.N. bei -20°C aufbewahrt werden.

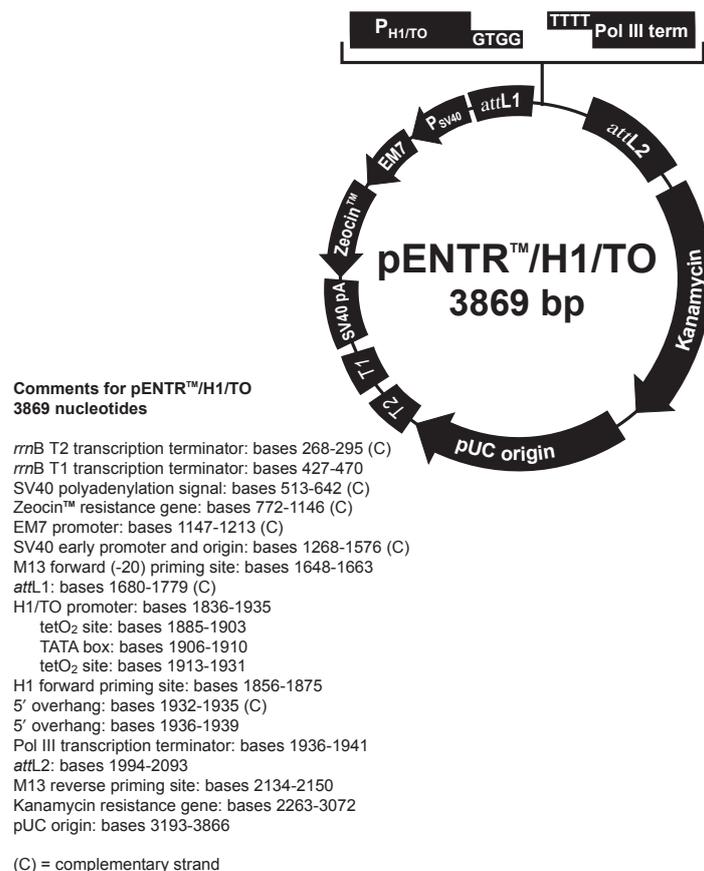


Abb. 9: pENTR-H1/TO-Vektor-Karte<sup>184</sup>

### C) Transformation

Nach erfolgter Ligation wurden die Reaktionen in One Shot<sup>®</sup>TOP10 chemisch kompetente *E.coli* von Invitrogen (Invitrogen by Life Technologies), oder in eigens hergestellte chemisch kompetente XL1blue *E.coli*-Bakterien (Kapitel 2.3.3) mittels Hitze-Schock-Transformation eingebracht. Hierzu wurden 2µl der Ligationsreaktion in die Bakterienlösung vorsichtig pipettiert und für 30min auf Eis inkubiert. Hierbei wurde die Anlagerung der DNA an die Bakterienoberfläche durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen begünstigt. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien erfolgte während eines 30s langen Hitze-Schocks bei 42°C in einem Wasserbad. Anschließend wurde die Reaktion sofort auf Eis überführt und mit 250µl S.O.C.-Medium aufgefüllt. Die Bakterienkultur wurde daraufhin für 1h bei 37°C und 200rpm kultiviert. 50µl und 150µl der Bakterienkultur wurden auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit 50µg/ml Kan unter sterilen Bedingungen ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### D) Transformantenanalyse

Fünf bis 10 Kanamycin-resistente *E.coli*-Kolonien wurden gepickt und in je 4ml LB-Medium mit 50µg/ml Kanamycin ü.N. bei 37°C und 200rpm kultiviert. Die Bakterienkulturen wurden einer Midi-Plasmid-Isolierung unterzogen (siehe Kapitel 2.3.9.6). Anschließend konnte die Plasmid-DNA mit Hilfe der beiden Oligonukleotid-Primer H1\_for und M13\_rev (siehe Tab. 5) am BMFZ sequenziert werden. Mit der Midi-Plasmid-Isolation konnte ausreichend Plasmid-DNA für die anschließenden Transfektionsversuche gewonnen werden. Ein Teil der Bakterienkultur wurde mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

### E) Transfektion (Nukleofektion)

Die Nukleofektion stellt eine Unterart der Transfektion dar. Zwei elektrische Impulse sorgen dafür, dass die Zellmembran permeabel wird und die fremde, von außen zugeführte DNA in die Zelle, teilweise in den Zellkern aufgenommen wird.

Hierzu wurden die zu transfizierenden Zelllinien – Nano und Amaxa (zuvor von der Arbeitsgruppe generiert<sup>43</sup>) - bis zu einer hohen Zelldichte kultiviert, geerntet und das Zellpellet in Transfektionspuffer (Tab. 10) aufgenommen.

Nach Zugabe von 3µg Plasmid-DNA erfolgte die Nukleofektion mittels des Nukleofektors Amaxa<sup>®</sup> (Amaxa<sup>®</sup> Nucleofector<sup>®</sup>, Lonza, Köln, Deutschland) mit 6 unterschiedlichen Programmen T-13; T-23; T-24, U-17; U-23 und U-24. Die elektroporierten Zellen wurden sofort in Zellkulturmedium aufgenommen und auf 6-well-Platten überführt.

Tab. 10: Zusammensetzung des Transfektionspuffers für die Nukleofektion

Substanz	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2)	40mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
NaCl	80mM
KCl	5mM
Glucose	12mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,4mM
HEPES	25mM
ddH <sub>2</sub> O	-

#### F) Zeocin-Selektion

Erfolgreich transfizierte Zellen konnten mittels des Selektionsantibiotikums Zeocin selektiert werden. Das eingebrachte pENTR-H1/TO-Plasmid kodiert unter anderem für eine Zeocin-Resistenz, sodass untransfizierte Zellen innerhalb der Selektionsphase von ca. 4 Wochen eliminiert wurden. Das Zellkulturmedium wurde 24h nach Transfektion mit 200µg/ml Zeocin versetzt. Nach der Selektionsphase wurden für die Isolierung der putativen *knock down* CXCR2 (*kdCXCR2*)-Zellklone zwei Methoden verwendet. Es wurde beobachtet, dass sich pro *well* mehrere Zellkolonien, die aus mehreren erfolgreich transfizierten Zellen hervorgegangen sind, gebildet haben, so dass jede Zellkolonie mit Hilfe eines Klonrings und einer 2x Trypsin-EDTA-Lösung geerntet und auf eine 35mm Zellkulturschale passagiert wurde. Die jeweiligen Zellkolonien wurden isoliert voneinander geerntet. Jede Zellernte entsprach einem putativen *kdCXCR2*-Zellklon.

In Abb. 10 sind alle beschriebenen Schritte schematisch zusammengefasst dargestellt.

Tab. 11: Verwendete Vektoren und erstellte Plasmid-Konstrukte. <sup>R</sup>= Resistenz; Amp= Ampicillin; Kan= Kanamycin

Vektor	Merkmale	Referenz
pcDNA6 <sup>TM</sup> /TR	Amp <sup>R</sup> , Blasticidin <sup>R</sup> , 6662bp	Invitrogen, Waltham, USA
pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO	Kan <sup>R</sup> , Zeocin <sup>R</sup> , 3869bp	Invitrogen, Waltham, USA
	hCXCR2_893III_shRNA in pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO; Transfektion in Nano- und Amaxazelllinie	diese Arbeit
	hCXCR2_1145I_shRNA in pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO; Transfektion in Nano- und Amaxazelllinie	diese Arbeit
	hCXCR2_429I_shRNA in pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO; Transfektion in Nano- und Amaxazelllinie	diese Arbeit
	hCXCR2_452I_shRNA in pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO; Transfektion in Nano- und Amaxazelllinie	diese Arbeit
	hCXCR2_1015I_shRNA in pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO; Transfektion in Nano- und Amaxazelllinie	diese Arbeit
	hCXCR2_1744III_shRNA in pENTR <sup>TM</sup> /H1/TO; Transfektion in Nano- und Amaxazelllinie	diese Arbeit

### 2.3.9.6 Midi-Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit dem Pure Yield<sup>TM</sup> Plasmid Midiprep System (Promega Corporation, Madison USA) nach Herstellerangaben. 100ml einer *E.coli*-Kultur, die das gewünschte Plasmid trägt, wurden nach einer ü.N. Kultivierung 10min bei 3.500rpm sedimentiert. Die Resuspendierung des entstandenen Zellpellets erfolgte in dem entsprechenden Volumen der Resuspensionslösung (*cell resuspension solution*). Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe der Lyselösung (*cell lysis solution*) und der darauf folgenden Inkubation bei RT lysiert. Nach dem Abstoppen der Zelllyse durch die Neutralisationslösung (*neutralization solution*) und dem Überführen der Suspension auf eine Säule (*clearing column*), fand ein weiterer Zentrifugationsschritt statt (2.000rpm, 5min). Hierbei trennte sich der Plasmid-DNA enthaltende Durchfluss von den Zelltrümmern und den restlichen Zellbestandteilen, wie z. B. Proteinen. Nach dem Zentrifugieren des Durchflusses mit Hilfe einer weiteren Säule (*binding column*) bei 3.000rpm für 5min und dem Waschen der Säule mit 5ml Waschpuffer

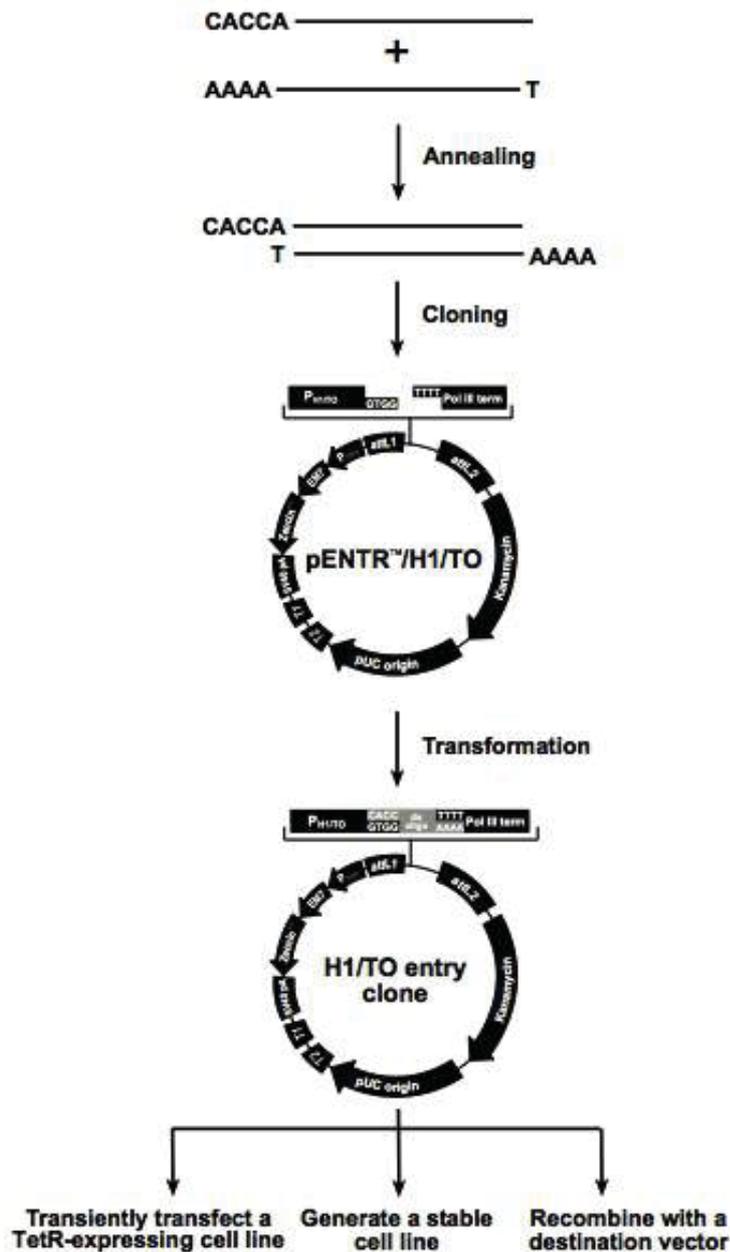


Abb. 10: Schematische Darstellung der Ligation der beiden ss-Oligo zu einem ds-Oligo und dessen Klonierung in den pENTR™/H1/TO-Vektor mit anschließender Transformation<sup>184</sup>

(*endotoxin removal wash solution*) und 20ml Säulenwaschpuffer (*column wash solution*) erfolgte das Eluieren der auf der Membran der Säule gebundenen Plasmid-DNA. Hierzu wurden 600µl nukleasefreies dH<sub>2</sub>O auf die Säulenmembran appliziert und bei 3.000rpm für 5min zentrifugiert. Die isolierte Plasmid-DNA konnte nach der anschließenden photometrischen Konzentrationsbestimmung für weitere Versuche, wie Restriktionsverdau und Transfektion benutzt werden.

### 2.3.10 QuantiGene Plex Assay (QGP Assay)

Der QGP Assay der Firma Affymetrix® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) ist eine RNA-Quantifizierungsmethode, bei der 3 bis 64 unterschiedliche RNA simultan detektiert werden können. Dieser Assay kombiniert die Signalamplifikation mittels kleiner, verzweigter DNA-Moleküle (*branched DNA*, *bDNA*) mit der xMAP® *microspheres* Technologie, die schematisch zusammengefasst in Abb. 12 dargestellt ist.

### 2.3.11 Luminex-Technologie

Das Luminex-System ist eine Kombination aus 3 xMAP®-Technologien, den xMAP® *microspheres* (mit 100 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte magnetischen Polystyrenkügelchen), dem auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie basierenden Luminex-Gerät und der Assay-Komponente. Die Ziel-RNA wird an die entsprechenden Polystyrenkügelchen in einer 96-*well*-Platte gebunden und anschließend einzeln, ähnlich dem Verfahren der Durchflusszytometrie, mittels eines Luminex-Gerätes detektiert.

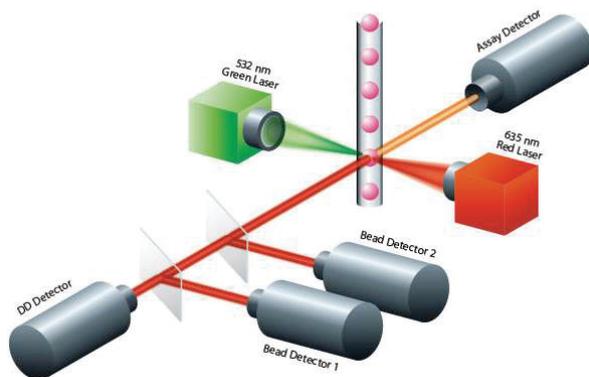


Abb. 11: Das Luminex Reader Design. Dargestellt ist der Aufbau der Luminex-Detektionseinheit mit einem grünen und einem roten Laser, 4 Detektoren und den *microspheres*<sup>188</sup>

Dabei ist jedes Polystyrenkügelchen spezifisch mit einem Gemisch aus rotem und infrarotem Farbstoff spektral markiert. Diese Signatur wird durch die Kombination aus einem grünen Laser (*assay laser*, 532nm), einem roten Laser (*classify laser*, 635nm) und 4 Detektoren erkannt und analysiert (Abb. 11). Die digitale Signalprozessierung erfolgt in Echtzeit. Die Detektionsgrenze liegt laut Hersteller bei <1.000-2.000 mRNA-Kopien pro Assay *well* und die Quantifizierungsgrenze bei <2.000-4.000 mRNA-Kopien pro Assay *well*.

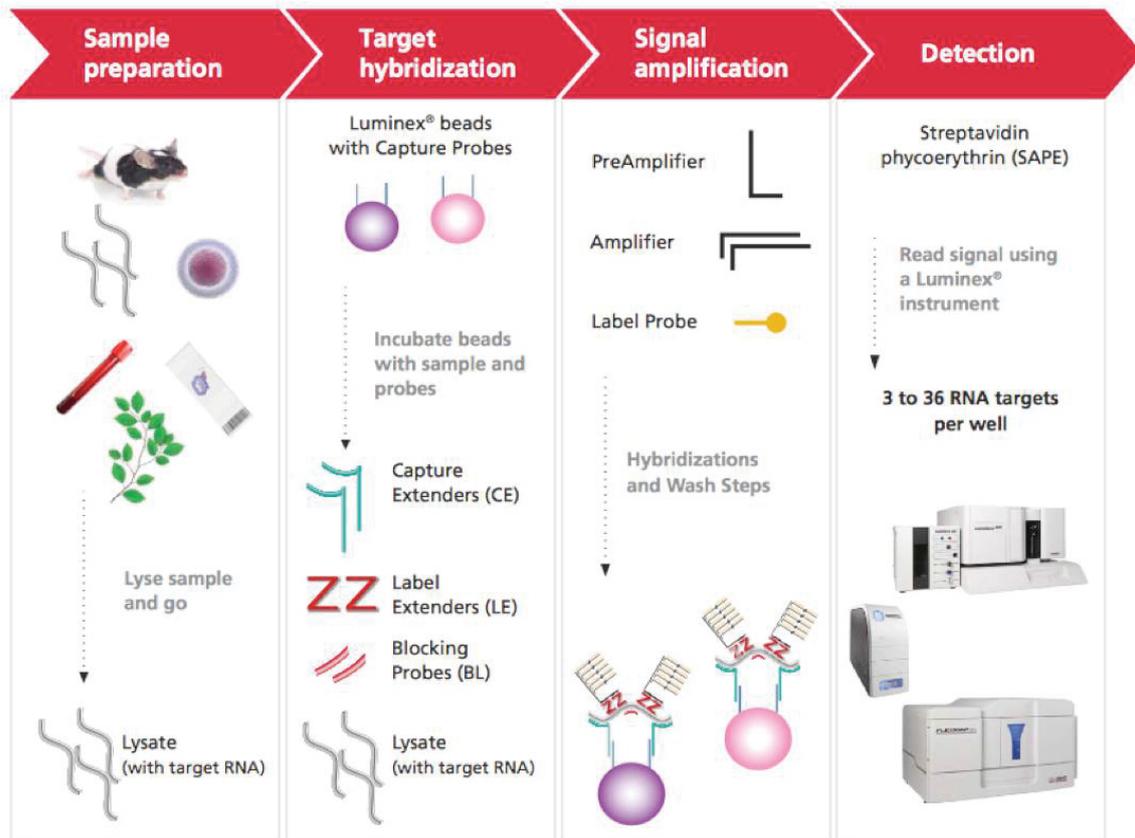


Abb. 12: QGP 2.0 Assay Basics. Schritt 1: Probenaufbereitung (Freisetzung der Ziel-RNA) Schritt 2: Ziel-RNA-Bindung (spezifische mRNA-Moleküle wurden mit Hilfe von *Capture Extender* (CE) und *Capture Probe* (CP) an die entsprechenden *beads* gebunden) Schritt 3: Signalamplifikation (Hybridisierung von 2.0 *Pre-Amplifier*, 2.0 *Amplifier* und der biotinylierten *Label Probe*), anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Substrat (Streptavidin-konjugiertes Phycoerythrin, SAPE) Schritt 4: Detektion (die Analyse erfolgte mit einem Luminex-Gerät)<sup>188</sup>

Die Detektion des QGP Assay erfolgte mit dem Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und die Auswertung der Fluoreszenzergebnisse mit der Bio-Plex Manager™ 6.1-Software (Bio-Rad).

### 2.3.12 Probenaufbereitung für QGP Assay

Die Versuchsdurchführung erfolgt nach Herstellerangaben. Bei einem CXCR2-Probelauf wurde zunächst die optimale Zellanzahl ermittelt. Dieser wurde mit jeweils 2.000, 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen eines *kdCXCR2*-Zellklons #30 (Amara 10151 T-24) mit und ohne Tet-induktion und St-T1-Zellen durchgeführt. Als CXCR2-Positivkontrolle wurden mehrere Volumina (20, 40 und 80µl) Probandenblut verwendet. Anschließend folgte ein kompletter QGP Assay-Lauf mit der Detektion

von CXCR2, Sdc-1, CXCL1, VEGFA, MMP7 und MMP9. Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HRPT1), Peptidylpropyl-Isomerase B (PPIB), ribosomales Protein L19 (RPL19) und  $\beta$ -Aktin dienten als *housekeeping* Gene und Probandenblut als Positivkontrolle für CXCR2. Als *kdCXCR2*-Komponente wurden die Zellklone #27 (Nano 1015I T-24), #28 (Nano 1015I U-17) und #30 (Amaxa 1015 T-24) verwendet. Diese wurden sowohl nicht-induziert und Tet-induziert als auch nicht-dezidualisiert und dezidualisiert eingesetzt, sowie auch die KdS1-Zellen. Sowohl T-HESC- als auch St-T1-Zellen wurden für den Assay ebenfalls einer Dezidualisierung unterzogen. Zum Testen von verschiedenen Stimulantien zur Steigerung der CXCR2-Expression wurden dSt-T1-Zellen für 6h mit 100ng/ml CXCL1<sup>189</sup>, 0,1ng/ml IL-1 $\beta$ <sup>111</sup>, 10ng/ml TNF $\alpha$ <sup>190</sup>, 10 $\mu$ g/ml LPS<sup>191</sup>, 20ng/ml IFN $\gamma$ <sup>192</sup>, einem Mix aus 10 $\mu$ g/ml LPS und 20ng/ml IFN $\gamma$  (Mix 1) für 6h und 12h und einem Mix aus 0,1ng/ml IL-1 $\beta$  und 10ng/ml TNF $\alpha$  (Mix 2) ebenfalls für 6h und 12h inkubiert. Zusätzlich wurden PSZ als Probe verwendet.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinisolierung

Die Proteinisolation erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden, die im Folgenden dargestellt werden.

#### 2.4.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Nach der Auftrennung des Zelllysats-TriFast<sup>®</sup>-Chloroform-Gemischs in eine wässrige und eine Inter- und organische Phase (siehe Kapitel 2.3.1), wurde die letztere für die Proteinisolation verwendet. Hierzu erfolgte zunächst die Zugabe von 300 $\mu$ l 98% EtOH. Durch Invertieren und einer 3min Inkubation bei RT wurden die in der Lösung vorhandenen DNA-Reste präzipitiert und anschließend durch einen Zentrifugationsschritt für 5min bei 1.500g und 4°C pelletiert. Der Protein-haltige Phenol-EtOH-Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5ml Isopropanol versetzt, invertiert und für 10min bei RT inkubiert. Die bei dieser Reaktion ausgefallenen Proteine konnten durch eine Zentrifugation für 10min und 12.000g bei 4°C zu einem Pellet geformt werden. Dieses wurde anschließend durch 3 Waschschriffe à 20min mit Guanidinhydrochlorid in 95% EtOH gewaschen. Nach jedem Waschschriff erfolgte eine 5min Zentrifugation bei 12.000g und 4°C. Der vierte

Waschschritt erfolgte mit 98% EtOH. Anschließend wurde das Proteinpellet vakuumgetrocknet (Speed Vac<sup>®</sup> Plus, Savant by Thermo Scientific) und in 1% SDS-Lösung (Sigma Aldrich) bei 50°C unter Schütteln resuspendiert. Zum Deaktivieren von Proteinasen und Phosphatasen wurde die Proteinlösung mit 1,5mg/ml Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) und jeweils 20µl pro 1ml Proteinlysat Phosphatase-Inhibitor B und C (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) versetzt.

#### **2.4.1.2 Lysepuffer**

Eine schnellere und für Proteine effektivere Variante der Proteinisolierung stellte die Aufreinigung mittels 10x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) nach Herstellerangaben dar. Die unbehandelten oder behandelten Zellen wurden pelletiert, in PBS resuspendiert, erneut pelletiert und bis zur Isolation auf Eis gelagert. Aufgenommen wurde das Zellpellet in 400µl Lysepuffer (für eine 100mm Zellkulturschale) bestehend aus 1x Cell Lysis Buffer, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma Aldrich) und ddH<sub>2</sub>O. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000rpm und 4°C für 10min. Der Überstand enthielt das Gesamtprotein der lysierten Zellen.

#### **2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) nach Vorgaben des Herstellers. Je 50µl der zu messenden Proteinproben wurden mit 1ml der Kupfer enthaltenden Reagenz (*working reagent*) gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Ausgewertet wurden die Proben durch eine photometrische Messung bei 562nm mittels eines Biophotometers der Firma Eppendorf, wobei als Nullwert ein Ansatz ohne Proteinlösung diente.

#### **2.4.3 Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteinauftrennung wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Für die Denaturierung sorgte Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*, Sigma Aldrich). Dieses anionische Detergens sorgt für eine konstante negative Ladung der Proteine, indem es ihre Eigenladung überdeckt, sodass die Auftrennung nur nach einem Parameter erfolgt, der molaren Masse.

Durchgeführt wurde die diskontinuierliche Elektrophorese in einer vertikalen Minigel-Apparatur der Firma Bio-Rad, mit einem 10-12% Trenn- und einem 3%igen Sammelgel.

Die Proteinproben wurden mit 5x-konzentriertem Gelladepuffer versetzt, bei 95°C für 10min erhitzt und nach einer kurzen Abkühlphase auf das Acrylamid-Gel aufgetragen, wobei alle Spuren eines Gels die gleichen Proteinmengen enthielten. Die anschließende Proteinauftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 bis 150V/cm<sup>2</sup> in 1x konzentriertem SDS-Laufpuffer. Ein Proteinmarker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Scientific diente der Molekulargewichtsbestimmung.

Zusammensetzung des 12%-Trenngels:

- 12% (v/v) Acrylamid (Carl Roth)
- 0,44% (v/v) Bis-Acrylamid (Carl Roth)
- 300mM Tris-HCl (Sigma Aldrich) pH 8,8
- 0,08% (v/v) SDS
- 0,05% (v/v) TEMED (Sigma Aldrich)
- 0,05% (v/v) APS (Merck KGaA)

Zusammensetzung des 3%-Sammelgels:

- 3% (v/v) Acrylamid
- 0,08% (v/v) Bis-Acrylamid
- 125mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 0,1% (v/v) SDS
- 0,1% (v/v) TEMED
- 0,05% (v/v) APS

Zusammensetzung des 5x Gelladepuffers:

- 0,375M Tris-HCl (pH 6,8)
- 60% Glyzerin (Merck KGaA)
- 0,3% (v/v) SDS
- 1,5% Bromphenolblau (Sigma Aldrich)

Zusammensetzung des 10x-SDS-Laufpuffers:

- 25mM Tris-HCl (pH 8,3)
- 192mM Glyzin (Merck Millipore)
- 1% (v/v) SDS

#### 2.4.4 Western blot/Dot blot und Immunodetektion

Bei dem Western blot (WB) wurden die zuvor auf einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore) transferiert. Dieser Vorgang wurde für 1h mit 250mA in einem Minitank Elektrobloetter (Bio-Rad) in Transfer-Puffer durchgeführt. Zum Blocken von unspezifischen Proteinbindungen wurde die PVDF-Membran für 1h in 5% Milchpulver/TBS mit 0,1% Tween20 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) (TBST) inkubiert und anschließend 3x 5min in TBS mit 0,1% Tween gewaschen (TBST). Die Inkubation mit dem prim. AK (Tab. 12) dauerte je nach AK zwischen 1h bei RT und ca. 16h (ü. N.) bei 4°C. Unspezifisch gebundene AK-Moleküle wurden durch 3 Waschschrirte à 5min mit TBST entfernt und die Membranen anschließend mit dem sek. *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten AK (Tab. 13) für 1 oder 2h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST erfolgte die Zugabe des Clarity Western ECL Substrates (Bio-Rad). Dieses Reagenz diente der Detektion der transferierten Proteinbanden mittels Chemilumineszenz entweder in der Dunkelkammer auf Fotofilm (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles Buckinghamshire, UK) oder mittels des ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Systems (Bio-Rad). Bei der Dot blot Methode erfolgte keine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Hierbei wurden 30µg des Gesamtproteins direkt auf die PVDF-Membran aufgetropft und anschließend bei RT getrocknet. Das Blocken der unspezifischen AK-Bindungen, die Inkubation mit dem prim. und sek. AK und die anschließende Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgte nach dem Prinzip der WB-Analysen.

Zusammensetzung der TBS-Pufferlösung:

- 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 150mM NaCl

Zusammensetzung der TBST-Pufferlösung:

- 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 150mM NaCl
- 0,1% (w/v) Tween20

1x Transferpuffer:

- 25mM Tris-HCl
- 190mM Glyzin
- 20% MeOH
- 1% SDS (10%)

Das Anfärben aufgetrennter Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Anschließend wurde die unspezifische und überschüssige Färbung der Gele mithilfe einer Entfärbelösung herausgelöst.

Zusammensetzung der Färbelösung:

- 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck KGaA)
- 10% (v/v) Essigsäure
- 40% (v/v) EtOH

Zusammensetzung der Entfärbelösung:

- 7% (v/v) Essigsäure
- 2% (v/v) EthOH

Tab. 12: Verwendete Primär-AK bei WB, IHC und IF Analysen

AK	Reaktivität	Verdünnung	Inkubationszeit /-temperatur	Firma
<i>Mouse</i> anti- $\beta$ -Aktin, monoklonal	human	1:2000	1-2h, RT	Abcam
<i>Mouse</i> anti-GAPDH, monoklonal	human	1:2000	1-2h, RT	Abcam
<i>Mouse</i> anti-CXCR2, monoklonal	human	IHC 1:100 IF 1:300 WB 1:100	2h, RT/ ü. N., 4°C	R&D Systems
<i>Rabbit</i> anti-CXCR2, polyklonal	human	1:1000	ü. N., 4°C	Abnova
<i>Mouse</i> anti-Syndecan, monoklonal	human	1:1000	ü. N., 4°C	Abcam
<i>Rabbit</i> anti-c-Jun, monoklonal	human	1:500	ü. N., 4°C	Cell Signaling
<i>Rabbit</i> anti-p-c-Jun, monoklonal	human	1:500	ü. N., 4°C	Cell Signaling
<i>Rabbit</i> anti-Frizzled 4, polyklonal	human	1:2000	ü. N., 4°C	Abcam
<i>Rabbit</i> anti-Frizzled 6, monoklonal	human	1:500	ü. N., 4°C	Cell Signaling
<i>Mouse</i> anti-Vimentin	human	1:50	ü.N., 4°C	Dako*

\* (Glostrup, Dänemark)

Die Detektion von CXCR2 per IHC, IF und WB erfolgte unter anderem mit einem mehrfach zitierten CXCR2-AK der Firma R&D Systems<sup>193–195</sup> (Tab. 12).

Tab. 13: Verwendete Sekundär-AK bei WB, IHC und IF Analysen

AK	Verdünnung	Inkubationszeit/ temperatur	Firma
Anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt	1:2000	1-2h, RT	R&D Systems
ECL <sup>TM</sup> anti-mouse IgG HRP-gekoppelt	1:2000	1-2h, RT	GE Healthcare
Alexa Fluor® 488 Rabbit Anti-Mouse IgG	1:800	1-2h, RT	Life Technologies

#### 2.4.5 Probenherstellung für PCR, qRT-PCR, TD-PCR und WB

Die Steigerung der CXCL1- und CXCL8-Expression durch entzündliche Stimuli, wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS wurde bereits nachgewiesen.<sup>43,196</sup> Die in der Literatur beschriebenen Stimuli wurden verwendet, um die CXCR2-Expression in endometrialen Stromazellen zu induzieren. Hierfür wurden verschiedene endometriale Stromazellen dezidualisiert und für 6h mit 0,1-0,3 $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$ , 3ng/ml

TNF $\alpha$  und 30ng/ml LPS laut<sup>196</sup> inkubiert. Anschließend erfolgte die CXCR2-Detektion mittels PCR, qRT-PCR, TD-PCR und WB.

#### **2.4.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Das immunologische Nachweisverfahren für Proteine ist AK-basiert und bedient sich einer Farbumschlagsreaktion induziert durch HRP oder alkalische Phosphatase (AP), die mit Hilfe eines photometrischen Plattenlesegerätes ausgewertet wird.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde das humane CXCL1/GRO $\alpha$  DuoSet der Firma R&D Systems® (Abingdon, UK) mit Zellkulturüberständen nach Herstellerangaben verwendet.

#### **2.4.7 Probenherstellung für CXCL1-ELISA (Signalwege)**

Das in Kapitel 2.4.6 beschriebene Verfahren wurde für die Untersuchung der Signalwege in der St-T1- und KdS1-Zelllinie verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst dezidualisiert und mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen für 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Beim MEK1/2-Inhibitor (PD 98.059, Sigma Aldrich) wurden 0; 5; 10; 25 und 50 $\mu$ M und beim JNK-Inhibitor (AEG 3482, Tocris Bioscience by R&D Systems®) 0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25 und 50 $\mu$ M Endkonzentration benutzt. Nach Ablauf der 2h Inkubation erfolgte die Zugabe von 10ng/ml bei undezidualisierten und 0,1ng/ml humanem IL-1 $\beta$  (BioLegend®, San Diego, CA, USA) bei dezidualisierten Zellen. Nach 48h IL-1 $\beta$ -Inkubation wurden die Zellkulturmediumüberstände abgenommen und direkt für einen CXCL1-ELISA-Versuch verwendet oder bei -20°C gelagert. Die behandelten Zellen wurden in TriFast® aufgenommen und einer RNA-Isolation unterzogen. Nach cDNA-Synthese erfolgte der Dezidualisierungsnachweis mittels PRL-PCR.

#### **2.4.8 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die in dieser Arbeit verwendeten Endometriumproben von Patientinnen (nach Einverständnis, Ethikvotum der Heinrich Heine Universität, Studiennr. 2904) wurden für immunhistochemische (IHC) Färbungen eingesetzt. Direkt nach der Entnahme des Gewebes wurde dieses in 4% Formaldehyd (10% Formalin, gepuffert, VWR, Dublin, Irland) fixiert. Nach mind. 24h Formaldehydfixierung konnte das Gewebe in 2x4cm große Plastik-Einbettkassetten (Histosette®, Simport, Beloeil QC, Kanada)

überführt werden. Die Entwässerung wurde im Leica TP1020 Gewebe-Infiltrationsautomat (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Die Inkubation in den verschiedenen Intermediaten betrug jeweils 30-60min, je nach Größe des Gewebes. Anschließend erfolgte das Einbetten in Paraffin mit Hilfe der beheizbaren Paraffinausgießstation Leica EG1150 H (Leica Biosystems) und das Anfertigen von Histologieschnitten mit dem motorisierten Rotationsmikrotom Leica RM2255 (Leica Biosystems). Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger der Firma Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen und nach dem Trocknen bei RT gelagert.

#### **2.4.9 Immunhistochemie (IHC)**

Das Anfärben der konservierten Paraffinschnitte erfolgte mit Hilfe des Vectastain® Elite® ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach Herstellerangaben. Durch eine 10min Inkubation in Histol (Carl Roth) wurden die Gewebeschnitte von Paraffin befreit. Nach der anschließenden Rehydrierung mit je 5min in 99,5%, 95% und 70% EtOH erfolgte ein Waschschrift in PBS (5 bis 10min). Durch die Inkubation der Gewebeschnitte in einer kochenden Demaskierungslösung (Vector) für 20min wurden die Antigene zugänglicher und eine AK-Anheftung folglich effizienter. Das anschließende Überschichten der Schnitte mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung (Sigma Aldrich) minimierte die endogene Peroxidaseaktivität. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Objektträger mit dem Blockserum der entsprechenden Spezies des 2. AK bei RT für 30min. Anschließend wurde der 1. AK verdünnt in Blockserum appliziert. Die Inkubation dauerte je nach AK zwischen 1h bei RT und ca. 16h (ü.N.) bei 4°C (Tab. 12). Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper benetzt und bei RT für 1h stehen gelassen. Die während dieser Wartezeit angesetzte ABC-Lösung stellte die Inkubationslösung für die nächsten 30min dar. Nach einem Waschschrift in PBS erfolgte die Applikation der 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB, DAB Substrate Kit for Peroxidase) für 2 bis 10min. Anschließend wurden die Schnitte wieder dehydriert, indem sie je 5min in 70%, 95%, 99,5% EtOH und 20min in Histol inkubiert wurden. Nach dem Anbringen des Deckgläschens (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) mit Hilfe von 1 bis 2 Tropfen Einbettmedium (Vector) erfolgte die Lagerung bei RT. Mikroskopische Aufnahmen der Färbung wurden am Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland) aufgenommen. Die

Auswertung der IHC-Aufnahmen erfolgte durch eine optische Bewertung der Farbintensität durch drei unabhängige Untersucher, wobei (-) keine, (+) schwache, (++) moderate und (+++) starke Färbung bedeutete.

#### **2.4.10 Immunfluoreszenz (IF)**

Nach dem Kultivieren der Zellkultur auf IHC-geeigneten Objektträgern (Lab Tek® Chamber Slide™ System 177437, Nalgene Nunc International, Rochester USA) wurden die Chamber von den Objektträgern gelöst und die Zellen mit Hilfe einer Inkubation in -20°C MeOH für 5min fixiert. Nach anschließendem Waschen erfolgte eine 20min Inkubation in 10%FBS (in PBS) zur Absättigung unspezifischer Bindungen. Der prim. AK wurde in 0,5%BSA (Carl Roth) in PBS verdünnt und für 2-18h bei RT bzw. 4°C auf die zu färbenden Zellen gegeben. Nach 3x Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sek. Fluoreszenz-gekoppeltem AK für 1-2 bei RT im Dunkeln. Hierbei wurde ein Austrocknen der AK-Lösung durch das Verwenden einer Feuchtkammer vermieden. Nach 3 weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit Dapi-Einbettmedium (Vector) und einem Deckgläschen eingebettet. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4°C im Dunkeln. IF-Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss durchgeführt. Die Auswertung der IF-Versuche erfolgte nach der im Kapitel 2.4.9 für IHC bereits beschriebenen Methode.

## **2.5 Sphäroidanalysen**

### **2.5.1 Sphäroidformation**

Die Bildung der Sphäroide erfolgte nach 2 verschiedenen Methoden. Zum einen wurde die Methode der hängenden Tropfen und zum anderen eine nicht adhäsive Rundboden-96-well-Platte verwendet (Nalge Nunc International).<sup>197</sup> Für die hängenden Tropfen wurden die adhärennten Zellen zunächst geerntet, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (C-Chip™ System Neubauer Improved, Einmal-Zählkammern, PEQLAB) gezählt, im entsprechenden Volumen Zellkulturmedium resuspendiert und in den Deckel einer Zellkulturschale als 30µl große Tropfen pipettiert (Abb. 13A+C). Der Deckel wurde anschließend auf eine mit PBS gefüllte Zellkulturschale gesetzt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Sphäroidbildung (48 bis

72h) inkubiert. Die Zellzahl pro Tropfen betrug bei St-T1- und KdS1-Zellen 30.000 und bei HTR8/SVneo 20.000.

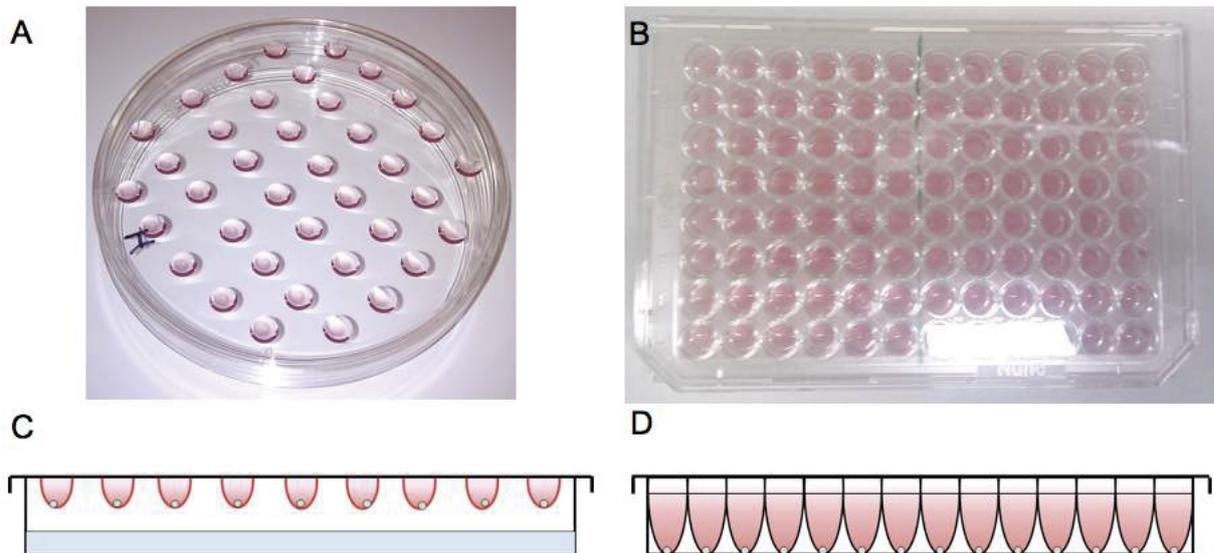


Abb. 13: Übersicht über die beiden verwendeten Sphäroidformationsmethoden. A: Hängende Tropfen auf dem Deckel einer Zellkulturplatte; B: Rundbodenplatte; C: Schematische Darstellung von hängenden Tropfen; D: Schematische Darstellung der Rundbodenplatte

Beim Verwenden der Rundbodenplatten wurden die genannten Zellzahlen in 100 $\mu$ l Medium pro well ausgesät und ebenfalls 48-72h inkubiert (Abb. 13B+D). Durch die antiadhäsive Beschichtung konnten die Zellen auf dem *well*-Boden nicht adhären und bildeten stattdessen eine sphäroide Struktur aus.

### 2.5.2 Sphäroidentwässerung und –einbettung für IHC

Bedingt durch den sehr kleinen Durchmesser der Sphäroide ( $\leq 1$ mm) war die Entwässerung und Einbettung in Paraffin ohne vorherige Vorbehandlung nicht möglich. Hierzu wurde ein Gemisch aus ca. 40°C warmen 4% (w/v) Agar (Merck Millipore) und flüssiger 5% (w/v) Gelatine (Sigma Aldrich)<sup>198</sup> in eine 100mm-Petrischale gegossen. Die Agar-Gelatine-Schicht war dabei nur wenige Millimeter (3-5mm) hoch. Nach Aushärten wurden aus der Agar-Gelatine-Schicht kleine Vierecke mittels eines Skalpell herausgeschnitten, mit den in 4% Formaldehyd (VWR) eingelegten Sphäroiden gefüllt und mit flüssiger, leicht abgekühlter Agar-Gelatine-Lösung verschlossen. Die Sphäroide wurden zur Sichtbarmachung vorher auf einem Löschpapier mit einem Tropfen Eosin (Morphisto, Frankfurt/Main, Deutschland)

angefärbt. Nachdem auch die zweite Schicht Agar-Gelatine ausgehärtet war, konnten die Sphäroide in kleinen Blöckchen herausgeschnitten und für die Entwässerung in Plastik-Einbettkassetten (Histosette<sup>®</sup>) überführt werden. Die Entwässerung der Sphäroide erfolgte nach dem Entwässerungsprotokoll für Paraffinschnitte (siehe Kapitel 2.4.8) mit 30min Inkubationszeit pro Intermediat.

Vor der IHC wurden die Objektträger mit den Schnitten ü.N. bei 56°C inkubiert. Diese Inkubation bewirkte ein Schmelzen des Paraffins und dadurch eine Fixierung des Gewebes an den Objektträger. Die IHC wurde wie in Kapitel 2.4.9 beschrieben durchgeführt.

### 2.5.3 MitoTracker<sup>®</sup>-Färbung

Die Fluoreszenzfärbung von lebenden Sphäroiden wurde mit MitoTracker<sup>®</sup> der Firma Invitrogen (Invitrogen by Life Technologies) durchgeführt. Hierbei wurden 2 verschiedene Farben benutzt: MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (M7514) und MitoTracker<sup>®</sup> Orange CMTMRos (M7510) (Abb. 14).

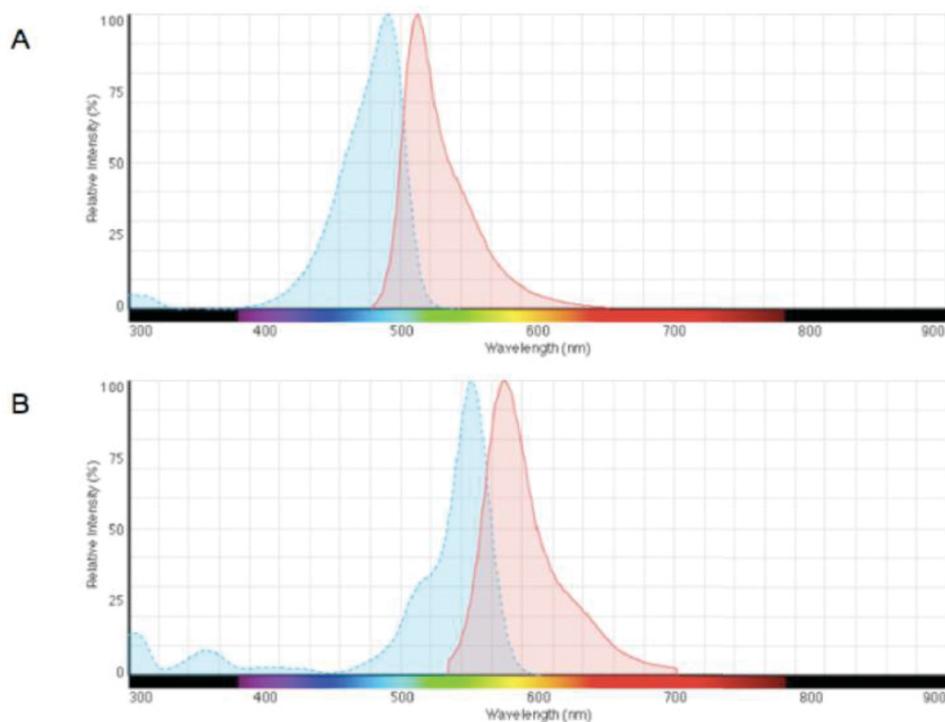


Abb. 14: Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten MitoTracker<sup>®</sup>. Anregungsspektrum (blau), Emissionsspektrum (rot); (A) MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (M7514); (B) MitoTracker<sup>®</sup> Orange CMTMRos<sup>199</sup>

Die MitoTracker<sup>®</sup> Farbstoffe sind zellpermeabel und enthalten Thiol-reaktive Chloromethylgruppen, die an aktive Mitochondrien binden.<sup>200</sup>

Die MitoTracker<sup>®</sup> Applikation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurden zunächst die Sphäroide mit Hilfe einer 1.000µl-Pipette auf den Tropfen eingesammelt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Sphäroide vollständig auf den Boden abgesunken waren, konnte der Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen werden. Die Färbung der Sphäroide erfolgte in 2% FBS-haltigem Zellkulturmedium mit 1µM MitoTracker<sup>®</sup> Endkonzentration (Stockkonzentration betrug 1mM). Hierbei erfolgte die erste Verdünnung des MitoTracker<sup>®</sup> mit DMSO (1:10) und die zweite mit Zellkulturmedium (1:100). Anschließend wurden die Sphäroide für 30min in der Färbelösung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zwei Waschschriffe mit PBS entfernten alle MitoTracker<sup>®</sup> Rückstände und die Sphäroide konnten anschließend in Konfrontationsversuchen eingesetzt werden (Kapitel 2.5.3.1).

#### **2.5.4 Konfrontationsversuche**

Konfrontationsversuche wurden mit Sphäroiden aus HTR8/SVneo-, St-T1- und KdS1-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde entweder nur einer der beiden Sphäroide mit einem MitoTracker<sup>®</sup> oder beide Sphäroide mit zwei verschiedenen MitoTracker<sup>®</sup> angefärbt, in einen Tropfen Zellkulturmedium gegeben und bis zu 96h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach festgelegten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96h) mittels des konfokalen Mikroskops ZEISS LSM 510 META (Carl Zeiss) am Institut für Biochemie & Molekularbiologie II der Heinrich Heine Universität analysiert. Für IHC-Versuche wurden die Sphäroide ohne MitoTracker<sup>®</sup>-Anfärbung in einem Tropfen konfrontiert und bis zu 120h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach vorher festgelegten Zeitpunkten (24, 48, 72, 96, 120h) wurden die Sphäroide aus der Kultur genommen, nach der Fixierung entwässert und für IHC-Versuche in Paraffin eingebettet.

Die Auswertung der Konfrontationsversuche erfolgte mittels Messung der Mittelpunktstanzten zwischen zwei Späroiden. Die Messung wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ durchgeführt und anschließend mit dem t-Test auf ihre Signifikanz geprüft.

## 2.6 Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus

### 2.6.1 Haltungsbedingungen

Die Haltungsbedingungen der Sdc-1-ko-Mäuse und der C57Bl/6-Wildtyp (WT)-Kontroll-Mäuse entsprachen den Deutschen Richtlinien für Haltung und Verwendung von Labortieren gemäß Tierversuchsantrag 87-51.04.2010.A061 des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW.

### 2.6.2 Sdc-1-ko-Nachweis

Der Nachweis des Sdc-1 *ko* in dem verwendeten Sdc-1-ko-Mausstamm erfolgte nach gDNA-Isolation durch das Fast Tissue-to-PCR-Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben mittels Standard-PCR. Ein 20µl PCR-Ansatz bestand aus 1x Tissue Green PCR Master Mix, je 25pmol/µl der Oligonukleotid-Primer SynF1, SynR2 und N3193 und 4µl der gDNA-Lösung aus Schwanzspitzenresektionen von Sdc-1-ko-Mäusen. Das Standard-PCR-Programm (Tab. 4) erfolgte mit dem *annealing*-Schritt bei 72°C für 1min. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wies eine 290bp große Bande auf eine WT-Maus, eine 450bp-Bande auf eine Sdc-1-ko-Maus und bei Vorhandensein beider Banden handelte es sich um eine heterozygote Maus.

### 2.6.3 Verpaarungsversuche und Gewichtsbestimmung

Die Ermittlung der Verpaarungsrate, Wurfgröße und die Gewichtsbestimmung der Muttertiere und der Jungtiere erfolgte in 5 unabhängigen Verpaarungsversuchen mit insgesamt 34 Verpaarungen mit Sdc-1-ko-Mäusen und 24 Verpaarungen mit WT-Kontrollmäusen, wobei einige Mäuse in mehreren Verpaarungen eingesetzt wurden. Die Verpaarung erfolgte jeweils mit einem Sdc-1-ko-Männchen oder einem WT-Männchen ü. N. Die verpaarten Weibchen wurden einen Tag vor der Verpaarung und anschließend jeden 4. Tag nach der Verpaarung bis zum Wurf mit einer Feinwaage (G&G Taschenwaage, Neuss, Deutschland) auf 0,01g genau gewogen. Nach dem Wurf wurden zunächst die Anzahl und anschließend das Gewicht der lebenden Jungtiere bestimmt. Die Gewichtskontrolle der Jungtiere erfolgte jeden 3. Tag bis Tag 100.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Generierung eines stabilen induzierbaren CXCR2 *kd* in der endometrialen Stromazelllinie St-T1

Nach erfolgreicher Generierung des Sdc-1 *kd* in St-T1 und der anschließenden ausführlichen Untersuchung der resultierten *kd* Zelllinie KdS1 durch unsere AG<sup>43</sup> war das Ziel dieser Arbeit den Hauptrezeptor von CXCL1, CXCR2, in der Zelllinie St-T1 mittels RNAi herunter zu regulieren, mögliche Veränderungen im Expressionsprofil von Cytokinen und anderen Modulationsfaktoren, wie VEGFA oder MMP zu untersuchen und dadurch Rückschlüsse auf die Rolle des Rezeptors und auch seines Liganden bei der humanen embryonalen Implantation ziehen zu können.

Die Generierung des CXCR2 *kd* in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 erfolgte nach der in Kapitel 2.3.9.5 ausführlich beschriebenen Methode. Hierzu wurden die TetR-exprimierenden St-T1-Zelllinien Nano und Amaxa aus der Herstellung der KdS1-Zelllinie<sup>43</sup> mit 6 unterschiedlichen CXCR2*sh*RNA-exprimierenden Vektoren transfiziert. Die erfolgreich transfizierten *kd*CXCR2-Zellklone wurden mittels Zeocin selektioniert und anschließend einem *kd*-Nachweis unterzogen.

##### 3.1.1 Generierte putative *Kd*CXCR2-Zellklone

24h nach Transfektion der Nano- und Amaxa-Zellen mit den jeweiligen CXCR2*sh*RNA exprimierenden Vektoren erfolgte die Zugabe des Selektionsantibiotikums Zeocin zum Zellkulturmedium. Die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen dauerte zwischen 4 und 6 Wochen.

Die *kd*CXCR2-Zellklone wurden auf folgende Weise isoliert: einzelne, aus einer einzelnen transfizierten Zelle entsprungene *kd*-Zellklone wurden mit Hilfe von Klonringen isoliert und auf 6-*well*-Platten ausgesät. Anhang 6.1 zeigt eine tabellarische Übersicht über alle isolierten putativen *kd*CXCR2-Zellklone.

Insgesamt konnten 89 putative *kd*CXCR2-Zellklone generiert werden. Davon 15 mit Amaxa-Zellen und hCXCR2\_893III\_*sh*RNA-pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO-Vektor und 11 mit demselben Vektor und Nano-Zellen, 7 mit Amaxa-Zellen und hCXCR2\_1145I\_*sh*RNA-pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO-Vektor und 12 mit demselben Vektor und Nano-Zellen. Jeweils 6 *Kd*CXCR2-Zellklone wurden mit den Amaxa- und Nano-Zellen und den Vektoren hCXCR2\_429I\_*sh*RNA-pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO und

hCXCR2\_452I\_shRNA-pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO generiert, mit dem hCXCR2\_1015I\_shRNA-pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO-Vektor wurden mit Amaxa-Zellen 3 und Nano-Zellen 6 *KdCXCR2*-Zellklone erzielt. Die Transfektion der Zellen Amaxa und Nano mit dem hCXCR2\_1744III\_shRNA-pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO-Vektor brachte 5 bzw. 6 *KdCXCR2*-Zellklone.

Es wurden von allen Zellklonen Zellstocks in Einfriermedium bei -80°C kryokonserviert (Kapitel 2.2.4).

### 3.1.2 CXCR2-*kd*-Nachweis

Die nachfolgenden Ergebnisse der CXCR2-*kd*-Nachweise mittels PCR, qRT-PCR, IHC, IF und QGP Assay stellen repräsentative Ergebnisse dar.

Alle in den folgenden Versuchen eingesetzte Oligonukleotid-Primer wurden vor ihrer Verwendung auf ihre Spezifität geprüft und mittels Gradienten-PCR eine optimale *annealing*-Temperatur festgelegt.



Abb. 15: Ergebnis der Gradienten-PCR nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte. Die Gradienten-PCR mit den 4 verschiedenen Oligonukleotiden (893III/1145I, 429III/452III, 1015I und 1744III) wurde mit der cDNA aus den als CXCR2-Positivkontrolle fungierenden mononukleären Blutzellen (*mononuclear (blood) cells*, MNC) durchgeführt. Pro PCR-Ansatz wurden 80ng MNC-cDNA eingesetzt. Folgende *annealing*-Temperaturen wurden getestet: A= 53°C; B= 54°C; C= 55°C; D= 56°C; E= 58°C; F= 60°C. M= Standardgrößenmarker

Für das Oligonukleotid-Primer-Paar 893III/1145I lag die optimale *annealing*-Temperatur zwischen 53 und 60°C, für 429III/452III zwischen 53 und 55°C, für 1015I und 1744I zwischen 56 und 60°C. Schlussfolgernd wurde für 893III/1145I und 429III/452III eine *annealing*-Temperatur von 55°C und für 1015I und 1744III von 56°C gewählt.

### 3.1.2.1 CXCR2-*kd*-Nachweis – PCR

Nach dem Kultivieren der *kd*-Zellklone und dem Anlegen von Zellstocks wurden die Zellen auf 6-*well*-Platten ausgesät und der CXCR2 *kd* mittels 1µl/ml Tet für 48h induziert. Anschließend wurde die gesamte RNA mit Hilfe von TriFast® isoliert, ein DNase-Verdau durchgeführt und die cDNA mittels RT synthetisiert.

Die erfolgreiche RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde mittels β-Aktin-PCR untersucht. Abb. 16 zeigt das Ergebnis der β-Aktin-PCR der ersten Transfektion, als Beispiel für eine erfolgreich durchgeführte RNA-Isolation, DNase-Verdau und RT. Dieses Verfahren wurde bei allen Transfektionen angewandt. Die Ergebnisse der Transfektionen 2 bis 5 werden hier nicht aufgeführt.

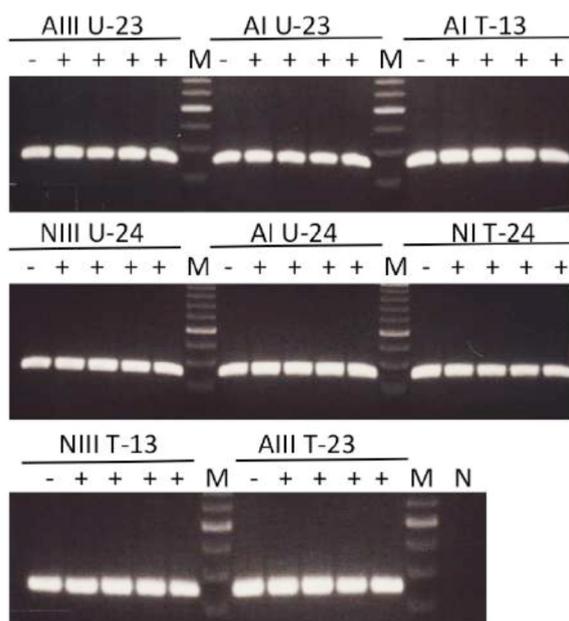


Abb. 16: β-Aktin Expressionsanalyse in allen generierten CXCR2 *kd* Zellklonen der ersten Transfektion. Dargestellt ist das Ergebnis der β-Aktin-PCR basierend auf der cDNA der putativen *kd*CXCR2-Zellklone. A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (-)= nicht induzierte Probe (CXCR2 vorhanden); (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; M= Standardgrößenmarker

Im Anschluss an die β-Aktin-PCR konnte im nächsten Schritt der Nachweis des CXCR2 *kd* mit einer konventionellen PCR durchgeführt werden.

Für die verschiedenen *kd*CXCR2-Zellklone (429I, 452I, 893III, 1015I, 1145I, 1744III) wurden spezifische, die Region des CXCR2 *kd* umfassende und amplifizierende

Oligonukleotid-Primer (Tab. 5), entworfen, synthetisiert und getestet (Abb. 15). In Abb. 17 ist das Ergebnis der ersten CXCR2-PCR mit den Proben der ersten Transfektion dargestellt. Amplifiziert wurden 8 verschiedene Klone mit jeweils einer nicht-induzierten (-), 4 induzierten Proben (+) und einer Negativkontrolle (N). Das Ergebnis zeigte ein uneinheitliches Bandenmuster mit starken, schwachen und fehlenden Banden (Abb. 17).

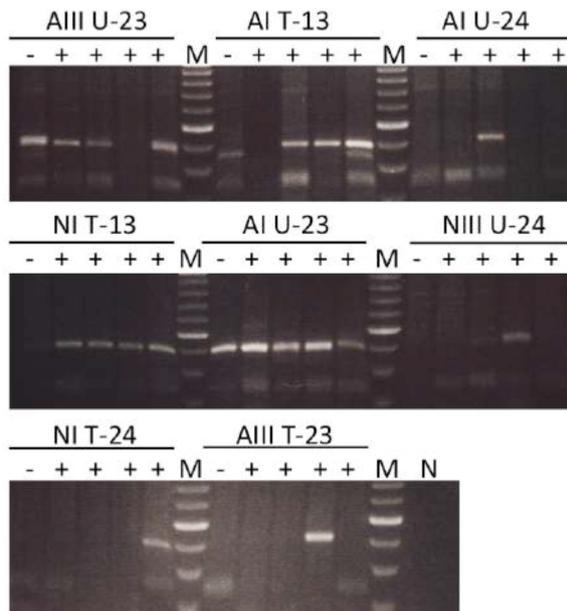


Abb. 17: CXCR2 *kd* Nachweis mittels CXCR2-PCR. Dargestellt ist das Ergebnis der ersten CXCR2-PCR mit den Proben aus der 1. Transfektion, basierend auf der cDNA der *kdCXCR2*-Zellklone. A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Amaxa-Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (-)= nicht induzierte Probe (CXCR2 vorhanden); (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; M= Standardgrößenmarker

Die CXCR2-PCR mit den Proben der ersten Transfektion wurde 2 mal wiederholt, um die Ursache des uneinheitlichen Bandenmusters zu klären (Abb. 18 und 19). Bei der ersten Wiederholungs-PCR wurde nur eine nicht-induzierte und eine induzierte Probe je *kdCXCR2*-Zellklon verwendet.

Das Ergebnis wies erneut ein schwer interpretierbares Bandenmuster ohne Regelmäßigkeiten auf (Abb. 18). In Abb. 19 ist das Ergebnis der zweiten Wiederholung der CXCR2-PCR mit den Proben der ersten Transfektion gezeigt. Wie in den vorangegangenen CXCR2-PCR-Ergebnissen wurde auch bei der zweiten Wiederholung ein variierendes Bandenmuster beobachtet (Abb. 19).

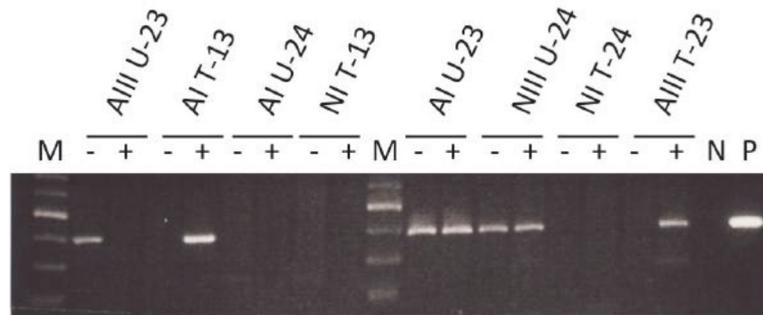


Abb. 18: Erste CXCR2-PCR-Wiederholung mit den Proben auf der 1. Transfektion. Dargestellt ist das Ergebnis der Wiederholungs-CXCR2-PCR mit den Proben aus der 1. Transfektion, basierend auf der cDNA der *KdCXCR2*-Zellklone. A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (-)= nicht induzierte Probe (CXCR2 vorhanden); (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; M= Standardgrößenmarker; P= Positivkontrolle mit cDNA aus MNC.

Für eine bessere Übersicht wurden die Ergebnisse des CXCR2-*kd*-Nachweises der ersten Transfektion mittels CXCR2-PCR und der beiden Wiederholungen in Tab. 14 graphisch zusammengefasst.

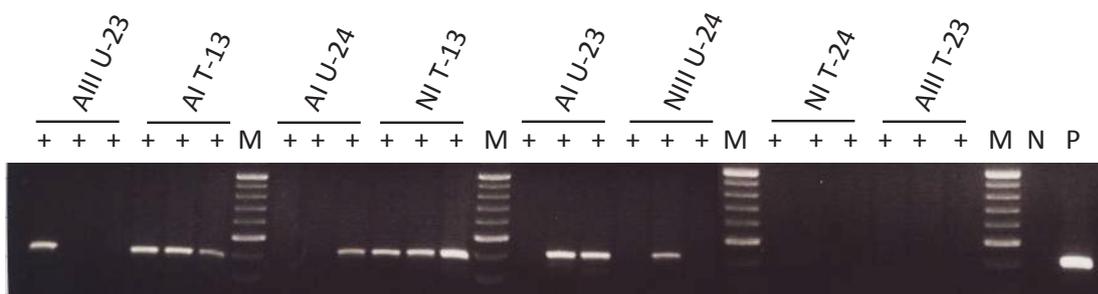


Abb. 19: Zweite CXCR2-PCR-Wiederholung mit den Proben auf der 1. Transfektion. Dargestellt ist das Ergebnis der Wiederholungs-CXCR2-PCR mit den Proben aus der 1. Transfektion, basierend auf der cDNA der *KdCXCR2*-Zellklone. A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; M= Standardgrößenmarker; P= Positivkontrolle mit cDNA aus MNC

Das Bandenmuster zeigte keine Regelmäßigkeiten auf und variierte von PCR zu PCR, trotz konstanter Versuchsbedingungen (Tab. 14). Somit konnte an Hand dieser Methodik keine eindeutige Aussage bezüglich der Induktion des *kd* gemacht werden.

Tab.14: Graphische Zusammenfassung der drei durchgeführten CXCR2-PCR mit den Proben der ersten Transfektion. A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (-)= nicht induzierte Probe (CXCR2 vorhanden); (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); ■= CXCR2-Bande sichtbar; ○= keine CXCR2-Bande

P C R	AIII U-23				AI T-13				AI U-24				NI T-13				AI U-23				NIII U-24				NI T-24				AIII T-23							
	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+				
1	■	■	■	○	■	○	■	■	○	○	■	○	○	■	■	■	■	■	■	■	○	○	○	■	○	○	○	○	○	○	○	■	○	○	○	■
2	■	○			○	■			○	○			○	○			■	■			■	■			○	○			○	○			○	■		
3		■	○	○		■	■	■		○	○	■		■	■	■		○	■	■		○	■	○		○	○	○		○	○	○				

Ein Versuch die möglicherweise unspezifischen Oligonukleotid-Primer-Bindungen zu eliminieren war die Durchführung einer TD-PCR. Die initiale *annealing*-Temperatur betrug hierbei 5°C mehr als die zuvor bestimmte optimale *annealing*-Temperatur.

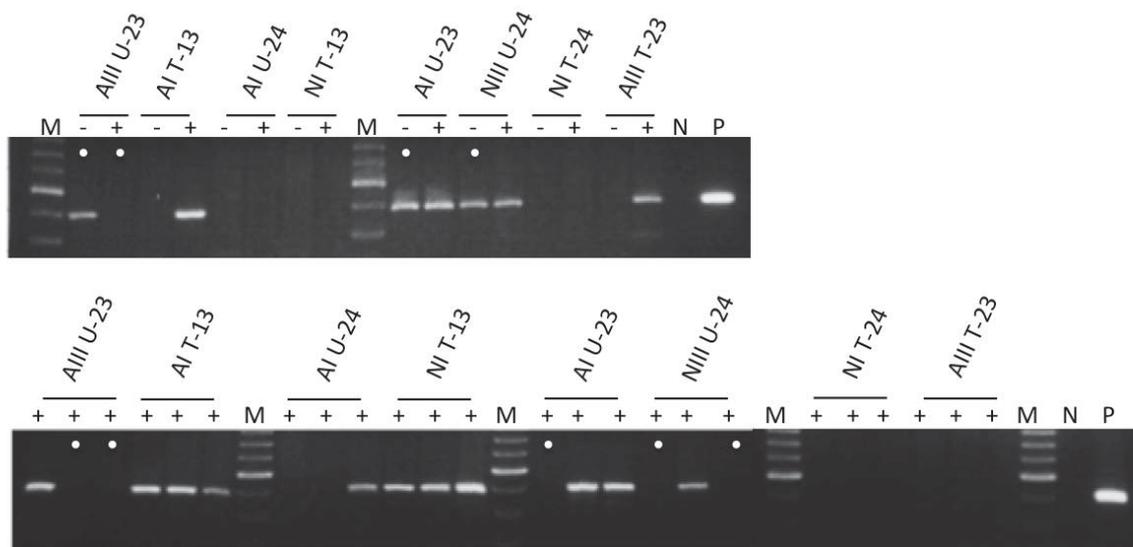


Abb. 20: TD-CXCR2-PCR mit den Proben der ersten Transfektion. Dargestellt ist das Ergebnis der TD-CXCR2-PCR mit A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (-)= nicht induzierte Probe (CXCR2 vorhanden); (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; M= Standardgrößenmarker; P= Positivkontrolle mit cDNA aus MNC. Als Kontrolle diente eine β-Aktin-Amplifikation (Abb. 16). Weiße Punkte markieren die für weitere Untersuchungen ausgewählten Proben.

Diese wurde mit jedem 5. Amplifikationszyklus um 1°C gesenkt bis die optimale *annealing*-Temperatur erreicht war, anschließend wurden mit dieser Temperatur

weitere 25 Zyklen durchgeführt. Abb. 20 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer TD-PCR mit den Proben der ersten Transfektion.

Das Ergebnis der TD-PCR zeigte ein ähnliches Bandenmuster verglichen mit den Standard-CXCR2-PCR-Ansätzen (Abb. 18, 19 und 20). Für eine weiterführende Untersuchung wurden folgende nach der TD-PCR scheinbar erfolgreich transfizierten *KdCXCR2*-Zellklone ausgewählt: Amaxa 893III U-23 (-, +, +, +), Amaxa 1145I U-23 (-, +) und Nano 893III U-24 (-, +, +). Die ausgewählten Proben sind in der Abb. 20 durch einen weißen Punkt markiert.

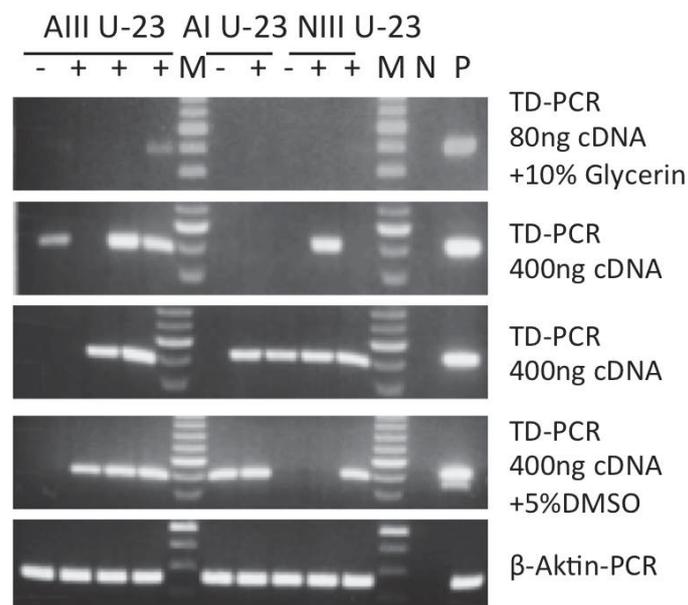


Abb. 21: CXCR2-*kd*-Nachweis mittels TD-CXCR2-PCR mit ausgewählten Proben der ersten Transfektion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen PCR-Läufen mit veränderten Bedingungen (angegeben) und der Amplifikation des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin als Kontrolle. A= Amaxa; N= Nano; III= 893III; I= 1145I; U-23, T-13, U-24, T-24, T-23= Transfektionsprogramme des Amaxa-Nukleofektors; (-)= nicht induzierte Probe (CXCR2 vorhanden); (+)= mit Tet induzierte Probe (CXCR2 herunterreguliert); N= Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; M= Standardgrößenmarker; P= Positivkontrolle mit cDNA aus MNC

Ein weiterer Versuchsansatz mit den zuvor ausgewählten Proben, die in 4 PCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Bedingungen amplifiziert wurden, bestätigte das zuvor festgestellte variierende Bandenmuster (Abb. 21). Hier wurden die Ansätze mit 80ng oder 400ng cDNA angesetzt und mit verschiedenen Substanzen zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (Glycerin) und der Spezifität (DMSO) versetzt.<sup>201</sup>

### 3.1.2.2 CXCR2-*kd*-Nachweis – qRT-PCR

Als weiterer Versuch, den CXCR2 *kd* nachzuweisen, wurde die qRT-PCR verwendet. Das Ansetzen der Reaktionen erfolgte wie bei der Standard-PCR jedoch mit SYBR Green qPCR Master Mix.

Im Nachfolgenden ist als Beispiel das Ergebnis eines PCR-Laufs mit den in Abb. 20 ausgewählten Proben dargestellt.

Tab. 15: Exemplarisches Ergebnis einer qRT-PCR als CXCR2-*kd*-Nachweis. (-)= nicht-induziert (CXCR2 vorhanden); (+)= Tet-induziert (CXCR2 herunterreguliert)

Probe	CXCR2-Cp-Wert [Zyklen]	$\beta$ -Aktin-Cp-Wert [Zyklen]
Amaxa 893III U-23 (-)	>36	14,83
Amaxa 893III U-23 (+)	>36	15,77
Amaxa 893III U-23 (+)	>36	17,52
Amaxa 893III U-23 (+)	>36	16,10
Amaxa 1145I U-23 (-)	>36	14,91
Amaxa 1145I U-23 (+)	>36	15,51
Nano 893III U-24 (-)	>36	15,95
Nano 893III U-24 (+)	>36	16,84
Nano 893III U-24 (+)	>36	17,60
MNC	23,70	15,69
PSZ	>36	16,47
EndoGewebe	32,71	16,61
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	>36	>36
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	>36	>36

Tab. 15 zeigt die Rohwerte der qRT-PCR, die als CXCR2-*kd*-Nachweis mit 3 *kd*CXCR2-Zelllinien der ersten Transfektion durchgeführt wurde. Die *crossing point* (Cp)-Werte der  $\beta$ -Aktin-Amplifikation wiesen leichte Schwankungen auf, waren jedoch charakteristisch für die Amplifikation eines *housekeeping* Gens. Im Gegensatz dazu lagen alle Cp-Werte der CXCR2-Amplifikation mit über 36 Zyklen nicht im optimalen linearen Bereich. Bedingt durch die Lage der Cp-Werte außerhalb des linearen Bereichs war keine statistische Auswertung der Versuche möglich.

Eine fehlerhafte Versuchsdurchführung und den Einsatz eines ungeeigneten Primer-Paars auszuschließen, wurde die qRT-PCR mehrmals mit der cDNA aus MNC (n=6), *in vitro* kultivierten primärem endometrialen Stromazellen (PSZ, n=5) und cDNA aus endometrialen Gewebe einer Patientin (EndoGewebe, n=2) durchgeführt. Dabei zeigten sich Cp-Werte zwischen 23 und 32 Zyklen, die für eine CXCR2-Expression im mittleren bis niedrigen Bereich sprechen. PSZ wiesen, ähnlich den *kd*CXCR2-Zellklonen keine CXCR2-Expression auf.

Folgende Proben wurden mittels qRT-PCR und/oder *touchdown*-qRT-PCR auf CXCR2 getestet ( $n \geq 3$ ): 14 unterschiedliche *kd*CXCR2-Zellklone teilweise mit dezidualisierten Proben, Amaxa und MNC mit je 7 cDNA-Verdünnungen, St-T1, dSt-T1, PS, dPS, dPS+0,3ng/ml IL-1 $\beta$  (2h), dPS+3ng/ml TNF $\alpha$  (2h) und dPS+30ng/ml LPS (2h). Keine der untersuchten Proben wies eine konstant detektierbare CXCR2-Expression auf.

### 3.1.2.3 CXCR2-*kd*-Nachweis – IHC und IF

Nachdem eine konstante CXCR2-Expression und der CXCR2 *kd* auf cDNA-Ebene nicht nachweisbar waren, erfolgte der Versuch des CXCR2-*kd*-Nachweis auf Proteinebenen mittels IHC und IF.

Abb. 22 zeigt das repräsentative Ergebnis einer CXCR2-IHC-Färbung von insgesamt 4 putativen getesteten *kd*CXCR2-Zellklonen. Als Kontrolle dienten gefärbte Zellen ohne den Einsatz des prim. CXCR2-AK (R&D Systems). Der Zellklon zeigte eine moderate bis schwache CXCR2-Färbung, die sich über die gesamte Zelle erstreckte. Dieses Färbemuster ist charakteristisch für einen membranständigen Rezeptor, wie CXCR2. Trotz der, zwar schwachen, aber vorhandenen Färbung, wurde kein Unterschied zwischen den nicht-induzierten Zellen mit CXCR2 und den Tet-induzierten Zellen mit herunterregulierter CXCR2-Expression detektiert.

Tab. 16 zeigt die Auswertung aller IHC-getesteten *kd*CXCR2-Zellklone. Die *kd*CXCR2-Zellklone #4 (Nano 429III U-17), #10 (Nano 452III U-17), #25 (Nano 1015I T-13 und #39 (Amaxa 1015I T-24) wiesen laut der Auswertung durch 3 unabhängige Untersucher eine sehr schwache bis moderate CXCR2-Expression ohne Expressionsunterschiede zwischen Zellen mit inaktivem und aktivem (+Tet) CXCR2 *kd* auf.

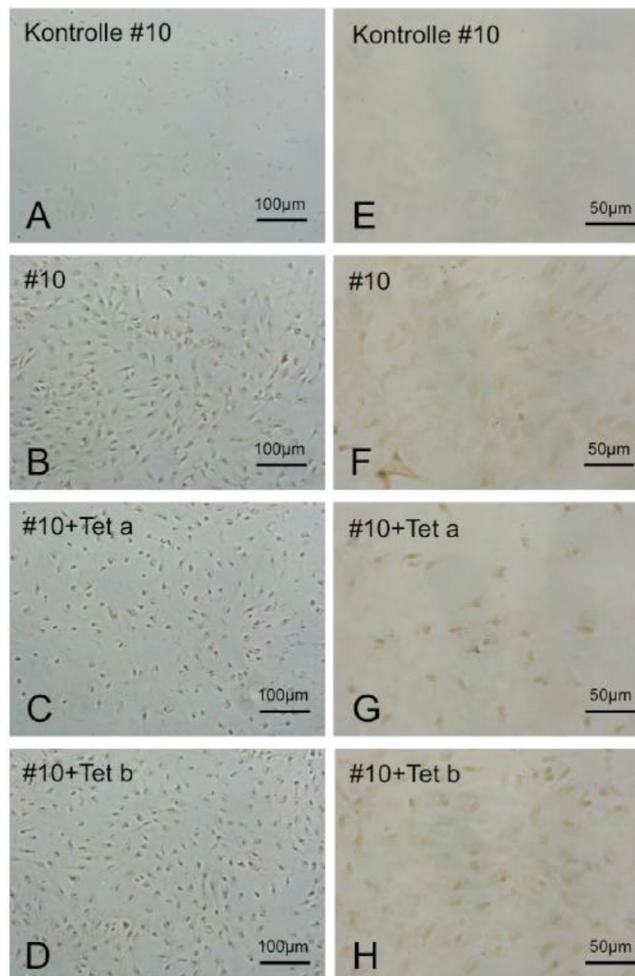


Abb. 22: CXCR2-IHC-Färbung von einem *kdCXCR2*-Zellklon mit und ohne Tet-Induktion des CXCR2 *kd*. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen des *kdCXCR2*-Zellklons #10 (Nano 452III U-17) aus der 4. Transfektionsrunde nach IHC-Anfärbung von CXCR2. Die Färbung der Zellen erfolgte in Chamber-Slides, der prim. CXCR2-AK (R&D Systems) wurde 1:100 verdünnt und für 2h bei RT auf den Zellen inkubiert. Die Inkubation des sek.undären AK dauerte 1h bei RT. (A) #10 Kontrolle ohne prim. AK, 125x vergrößert; (B) #10 mit CXCR2-Färbung, 125x vergrößert; (C+D) #10 mit induziertem CXCR2 *kd* und CXCR2-Färbung, 125x vergrößert; (E) wie A 250x vergrößert; (F) wie B 250x vergrößert; (G+H) wie C+D 250x vergrößert

Die IHC-Färbung von humanem endometrialen Gewebe ergab mehr Aufschluss über die Lokalisation von CXCR2 im Endometrium. Abb. 23 und 24 zeigen 2 repräsentative Ergebnisse der CXCR2-IHC von insgesamt 5 durchgeführten Färbungen.

Tab. 16: CXCR2-IHC-Auswertung. Auswertung aller durchgeführten CXCR2-IHC-Färbungen von potentiellen *KdCXCR2*-Zellklonen durch 3 unabhängige Untersucher. (+)Tet= Tet-induziert (CXCR2 herunterreguliert); -= keine Färbung; += schwache Färbung; +++= moderate Färbung

<b>KdCXCR2-Zellklon</b>	<b>1. Untersucher</b>	<b>2. Untersucher</b>	<b>3. Untersucher</b>
#4 Kontrolle	-	-	-
#4	+	+	+
#4 +Tet a	+	+	+
#4 +Tet b	+	+	+
#10 Kontrolle	-	-	-
#10	++	+	+
#10 +Tet a	++	+	+
#10 +Tet b	++	+	+
#25 Kontrolle	-	-	-
#25	+	+	+
#25 +Tet a	+	+	+
#25 +Tet b	+	+	+
#39 Kontrolle	-	-	-
#39	+	+	+
#39 +Tet a	+	+	+
#39 +Tet b	+	+	+

Die genaue Auswertung aller Aufnahmen inklusive Abb. 23 und 24 ist dem Anhang 6.2 zu entnehmen. Die durchschnittliche Bewertung der epithelialen CXCR2-Färbung lag bei (++) , der Stromalen bei (-/+) und der glandulären bei (++)/+++). Folglich wies das Drüsenepithel die höchste CXCR2-Expression auf, gefolgt vom endometrialen Epithel. Das endometriale Stroma zeigte eine sehr schwache bis keine CXCR2-Färbung, ähnlich den endometrialen Stromazellen (Abb. 22) auf.

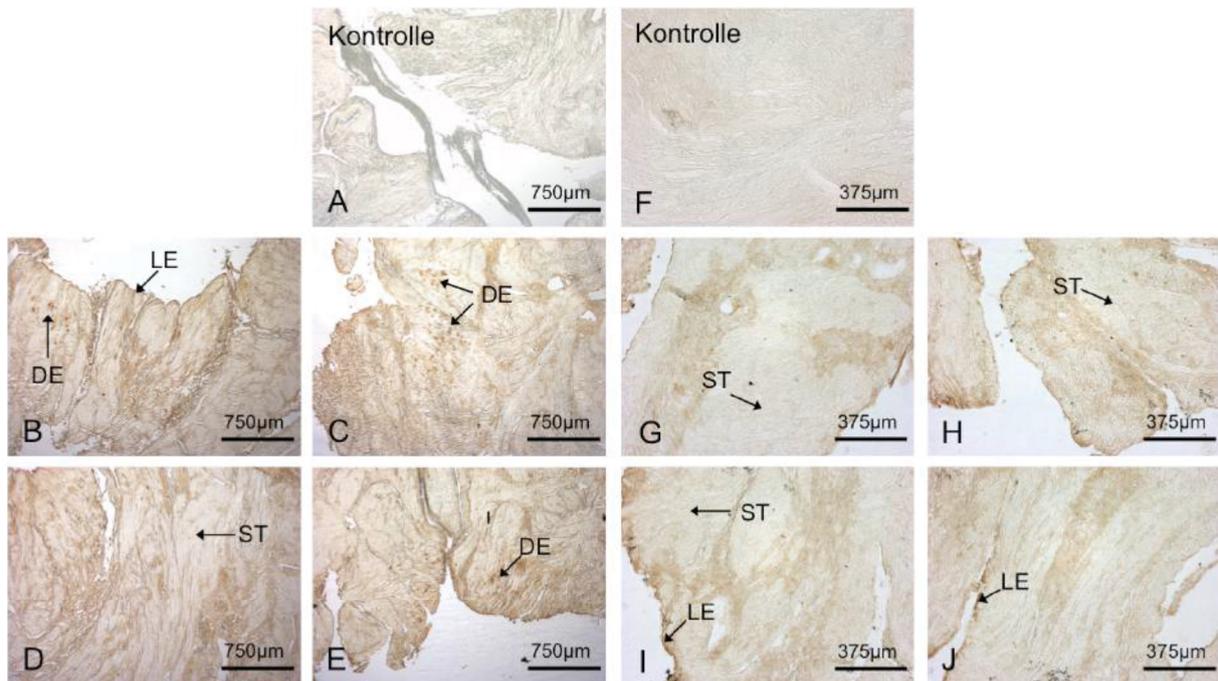


Abb. 23: CXCR2-IHC-Färbung von Endometriumgewebe. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der CXCR2-IHC-Färbung von endometrialem Gewebe einer Patientin. Der prim. CXCR2-AK wurde 1:200 verdünnt und für 2h bei RT auf den Gewebeschnitten inkubiert. (A) Kontrolle ohne prim. AK 100x vergrößert; (B-E) Endometriumgewebe mit CXCR2-Färbung 100x vergrößert; (F) wie A 200x vergrößert; (G-J) wie B-E 200x vergrößert. DE= Drüsenepithel; LE= luminales Epithel; ST= endometriales Stroma

Weitere Gewebeschnitte des in Abb. 23 dargestellten Endometriumgewebes wurden zusätzlich mit einem weiteren CXCR2-AK (Abnova) gefärbt. Die Ergebnisse ergaben das gleiche Färbemuster (Daten nicht gezeigt).

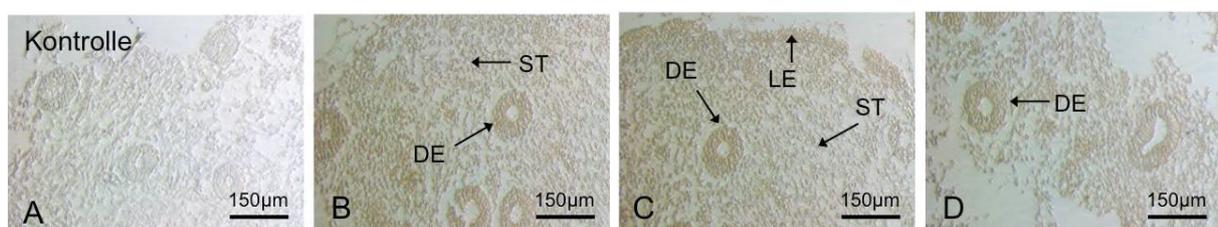


Abb. 24: CXCR2-IHC-Färbung von Endometriumgewebe. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der CXCR2-IHC-Färbung von endometrialem Gewebe einer Patientin. Der prim. CXCR2-AK (R&D Systems) wurde 1:200 verdünnt 2h bei RT auf den Gewebeschnitten inkubiert. (A) Kontrolle ohne prim. AK 400x vergrößert; (B-D) Endometriumgewebe mit CXCR2-Färbung 400x vergrößert. DE= Drüsenepithel; LE= luminales Epithel; ST= endometriales Stroma

Die Ergebnisse der repräsentativen IF-Färbung beruhen auf der CXCR2-Färbung des *kdCXCR2*-Zellklons #25 (Amaxa 1015l T-13) der 5. Transfektion (Abb. 25).

Im Vergleich zu der Kontrolle, die ohne Einsatz des prim. CXCR2-AK (R&D Systems) gefärbt wurde, zeigten die Zellen des CXCR2 *kd* Zellklons eine deutlich ausgeprägte Fluoreszenz.

Tab. 17: CXCR2-IF-Auswertung. Auswertung aller durchgeführten CXCR2-IF-Färbungen von potentiellen *kd*CXCR2-Zellklonen durch 3 unabhängige Untersucher. +Tet= Tet-induziert (CXCR2 herunterreguliert); (-)= keine Färbung; (+)= schwache Färbung; (++)= moderate Färbung

<b>KdCXCR2-Zellklon</b>	<b>1. Untersucher</b>	<b>2. Untersucher</b>	<b>3. Untersucher</b>
#4 Kontrolle	-	-	-
#4	++	++	++
#4 +Tet a	++	++	++
#4 +Tet b	++	++	++
#10 Kontrolle	-	-	-
#10	++	++	++
#10 +Tet a	+	++	+
#10 +Tet b	++	++	++
#25 Kontrolle	-	-	-
#25	++	++	++
#25 +Tet a	++	++	++
#25 +Tet b	++	++	++
#33 Kontrolle	-	-	-
#33	++	++	++
#33 +Tet a	++	++	++
#33 +Tet b	+	++	++

Zwischen den nicht-induzierten und den Tet-induzierten Proben konnte keine Differenz in der Fluoreszenzintensität und somit auch in der CXCR2-Expression nachgewiesen werden. Bei insgesamt 4 Färbeversuchen (n=4) wurden 3 weitere *kd*CXCR2-Zellklone untersucht.

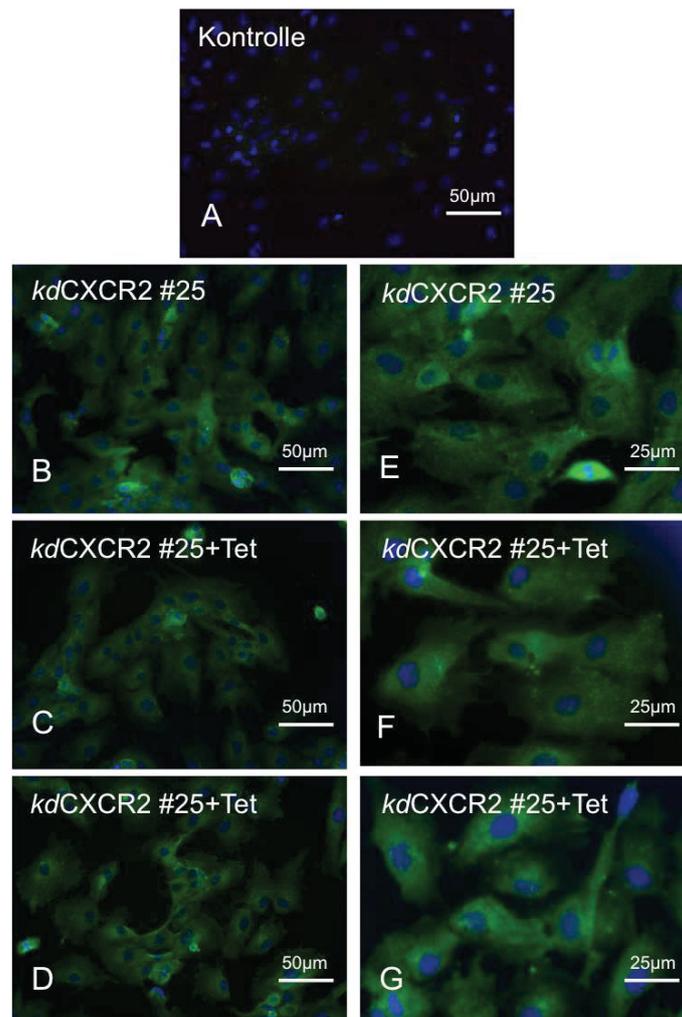


Abb. 25: CXCR2-IF-Färbung einer *KdCXCR2*-Zelllinie mit und ohne Tet-Induktion. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis einer CXCR2-IF-Färbung der CXCR2 *kd* Zelllinie #25 (Amaxa 1015I T-13) mit (+Tet) und ohne Induktion des *kd*. CXCR2-AK-Verdünnung 1:300, Inkubation 2h bei RT. Als Kontrolle dienten IHC-gefärbte Zellen ohne prim. AK.

Die genaue Auswertung aller IF-Färbungen ist in der Tab. 17 aufgeführt. Alle getesteten *kdCXCR2*-Zellklone zeigten eine moderate CXCR2-IF-Färbung ohne Intensitätsunterschiede zwischen nicht-induzierten Zellen mit CXCR2 und Tet-induzierten Zellen mit putativem CXCR2 *kd* (Tab. 17).

#### 3.1.2.4 CXCR2-*kd*-Nachweis – WB

Als weitere Methode für den CXCR2-*kd*-Nachweis wurden CXCR2-WB-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine der putativen *kdCXCR2*-Zellklone #30 (Nano 1015I U-24) und #39 (Amaxa 1015I T-24) isoliert und mittels eines prim. CXCR2-AK und der WB-Methode auf CXCR2 untersucht (Abb. 26).

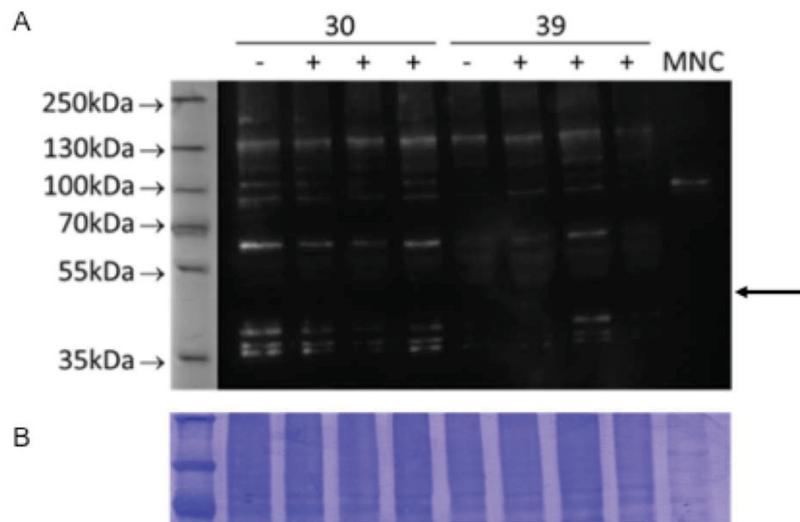


Abb. 26: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-WB-Analyse mit den beiden *kdCXCR2*-Zellklonen #30 und #39 mit jeweils 30µg Protein aus (-) nicht-induzierten Proben (CXCR2 vorhanden) und (+) Tet-induzierten Proben (CXCR2 herunterreguliert) und MNC als Positivkontrolle. (A) Darstellung der WB-Analyse, CXCR2-AK (R&D Systems) 1:100, 4°C ü. N. (B) Coomassie-gefärbte PVDF-Membran nach CXCR2-Detektion als Beladungskontrolle. Schwarzer Pfeil markiert die erwartete Höhe der CXCR2-Proteinbande von 44-50kDa<sup>202</sup>.

Abb. 26 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-WB-Analyse von insgesamt 5 Wiederholungen (n=5) ohne spezifische CXCR2-Detektion im, vom Datenblatt des verwendeten AK angegebenen Bandenbereich. Das resultierte Bandenmuster deutete auf eine unspezifische AK-Bindungen hin, die durch den Einsatz verschiedener Optimierungsansätze nicht eliminiert werden konnte.

Die Verwendung eines weiteren CXCR2-AK (Abnova) zeigte mit dem Protein aus PSZ und endometrialem Gewebe ein zunächst zufriedenstellendes Ergebnis (Abb. 27A). Das repräsentative Ergebnis aus insgesamt 10 Ansätzen (n=10) wies bei allen untersuchten Proben eine klar definierte Proteinbande auf (Abb. 27A). Jedoch war diese Bande mit ca. 28kDa deutlich kleiner als die von Abnova angegebenen 40,7kDa für das CXCR2-Protein.

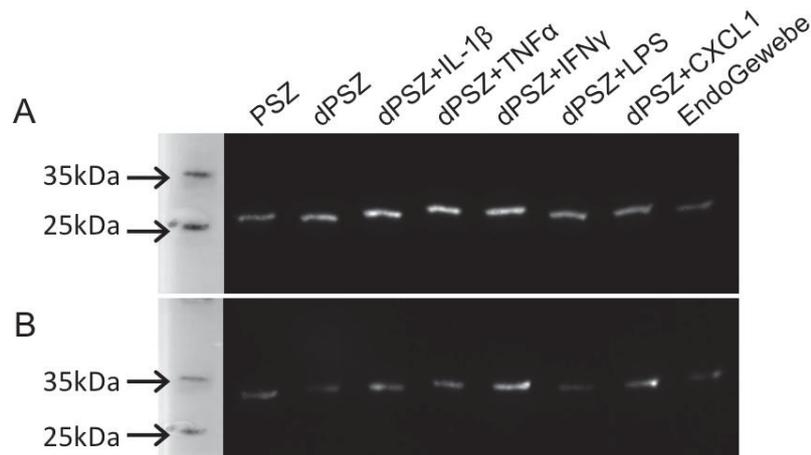


Abb. 27: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-WB-Analyse mit jeweils 30 $\mu$ g Protein aus PSZ, dPSZ mit verschiedenen Stimuli und endometrialem Gewebe (EndoGewebe). (A) Darstellung der WB-Analyse, CXCR2-AK (Abnova) 1:1.000, 4°C ü. N. (B) Detektion des *housekeeping* Proteins GAPDH als Kontrolle.

Aus diesem Grund wurde die detektierte Proteinbande einer Proteinsequenzierung am BMFZ der Heinrich Heine Universität Düsseldorf mittels Massenspektrometrie unterzogen. In den analysierten Proben konnten keine Fragmente des CXCR2-Proteins nachgewiesen werden, so dass auch dieser AK als unspezifisch eingestuft wurde.

### 3.1.3 Steigerung und Optimierung der CXCR2-Expression und -amplifikation

Die vorangegangenen CXCR2-*kd*-Nachweisversuche mittels PCR, qRT-PCR und IHC scheiterten möglicherweise an der niedrigen CXCR2-Expressionsrate in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 und den daraus hervorgegangenen putativen *KdCXCR2*-Zellklonen. Somit wurde im nächsten Schritt versucht, die CXCR2-Amplifikation zu optimieren und die Expression von CXCR2 zu steigern, um den potentiellen CXCR2 *kd* in der St-T1-Zelllinie darzustellen.

#### 3.1.3.1 Nested-PCR

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer für die durchgeführten *nested*-PCR-Ansätze sind der Tab. 5 zu entnehmen. Die *nested*-PCR wurde sowohl als Standard-PCR als auch TD-PCR mehrfach durchgeführt. Durch diese Methode war es nicht möglich die CXCR2-Expression in induzierten und nicht-induzierten *kdCXCR2*-Zelllinien nachzuweisen.

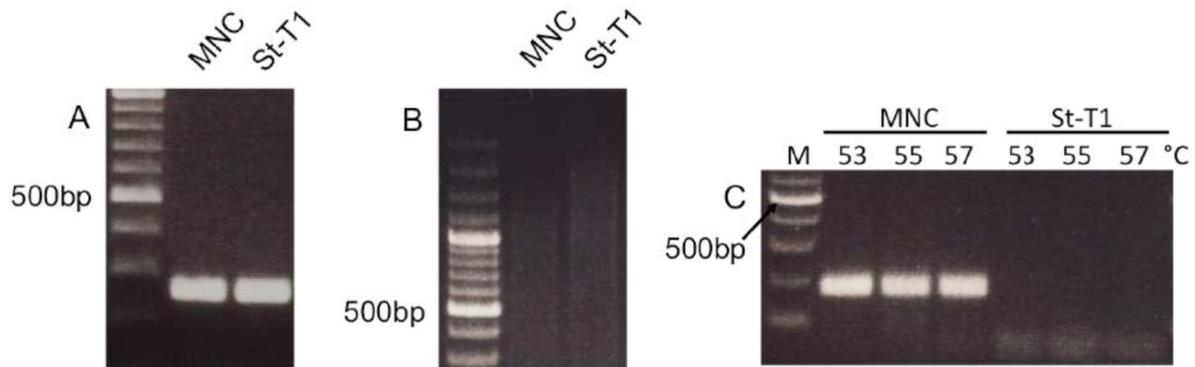


Abb. 28: Repräsentatives Ergebnis einer *nested*-CXCR2-PCR am Beispiel von St-T1-Zellen und MNC als Positivkontrolle. (A) Ergebnis der  $\beta$ -Aktin-Amplifikation (250bp) als *housekeeping* Gen; (B) 1. Teil der *nested*-PCR CXCR2-Amplifikation mit den äußeren Oligonukleotiden (1319bp); (C) 2. Teil der *nested*-PCR CXCR2-Amplifikation mit dem CXCR2-1015-Oligonukleotid-Primerpaar (177bp) als TD-Gradient-PCR mit 53, 55 und 57°C als finale *annealing*-Temperatur

Abb. 28 zeigt ein beispielhaftes Ergebnis für eine durchgeführte *nested*-PCR mit der cDNA aus St-T1-Zellen und MNC als Positivkontrolle. Die fehlende Bande nach der ersten Amplifikation (Abb. 28B) ist möglicherweise auf die geringe Amplifikationszyklenanzahl von 20 zurückzuführen, denn die anschließende zweite PCR mit den CXCR2\_1015-Primern führte zu einem erfolgreichen Ergebnis bei der MNC-Positivkontrolle (Abb. 28C). Es fand keine CXCR2-Amplifikation mit der cDNA aus St-T1-Zellen statt (Abb. 28C).

Dieser Versuchsansatz wurde neben St-T1-Zellen auch mit folgenden *kdCXCR2*-Zellklonen #37, #42, #30, #39 und unter Verwendung von qRT-PCR für den 2. Teil der *nested*-PCR 10x durchgeführt (n=10). Bei jedem Ansatz wurde das *template* aus der 1. PCR mit den äußeren Oligonukleotiden für die 2. PCR mittels einer Verdünnungsreihe 11x verdünnt, um die optimale cDNA-Konzentration für die qRT-PCR zu ermitteln. Bei allen Versuchsansätzen konnte keine CXCR2-Amplifikation beobachtet werden.

### 3.1.3.2 Dezidualisierung und IL-1 $\beta$ -Inkubation

Die Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen ist ein natürlicher Vorgang im Uterus, der bei einer gesunden Frau in jedem Zyklus stattfindet.<sup>203</sup> Dieser Vorgang kann *in vitro* durch die Zugabe von cAMP und P4 zum Zellkulturmedium in Zelllinien induziert werden. Die Verbindung zwischen der für eine

Schwangerschaftsetablierung essentiellen Dezidualisierung des Endometriums, der überaus wichtigen Rolle von CXCL1 bei der Implantation und der Steigerung der CXCL1-Expression nach der Inkubation der endometrialen Stromazellen mit dem Embryosekretionsprodukt IL-1 $\beta$ <sup>111</sup>, führte zu der Hypothese, dass die Expression des einzigen beschriebenen Hauptrezeptors von CXCL1, CXCR2, unter dem Einfluss von Dezidualisierungsfaktoren und IL-1 $\beta$  ebenfalls ansteigt. Hierzu wurden mehrere *kdCXCR2*-Zellklone dezidualisiert, mit IL-1 $\beta$  behandelt und die cDNA anschließend mittels PCR und qRT-PCR untersucht. Die Behandlung der Zellen führte jedoch zu keiner Steigerung der CXCR2-Expression.

Abb. 29 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-PCR mit St-T1-Zellen und dSt-T1-Zellen. Die Dezidualisierung führte zu keiner konstanten CXCR2-Expression, vielmehr zeigte sich wieder ein variierendes Bandenmuster. Die Behandlung der Zellen führte jedoch zu keiner Steigerung der CXCR2-Expression. Eine konstante CXCR2-Amplifikation konnte nur in den MNC-Positivkontrollen beobachtet werden.

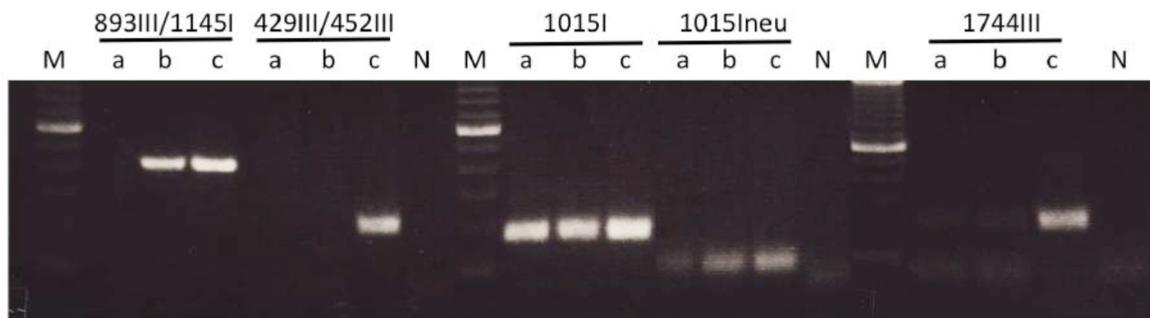


Abb. 29: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR2-PCR mit allen verwendeten Oligonukleotiden (893III/1145I, 429III/452III, 1015I, 1015Ineu, 1744III) mit der cDNA aus St-T1 (a), dSt-T1 (b) und MNC (c) als Positivkontrolle. M= Standardgrößenmarker, N= Negativkontrolle

Die Inkubation der endometrialen Stromazellen mit IL-1 $\beta$  zur Steigerung der CXCR2-Expression ist dem Kapitel 3.1.3.4 zu entnehmen.

### 3.1.3.3 Hypoxie

Die Kultur von dSt-T1-Zellen, *kdCXCR2*-Zellklonen und *dKdS1* als eine weitere endometriale Stromazelllinie, jedoch mit einem *Sdc-1 kd*, unter hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>) stellte den Versuch dar, die CXCR2-Expression durch physiologisch nahe Kulturbedingungen auf ein höheres Level zu steigern. CXCR4

wurde in diesem Versuchsansatz als Positivkontrolle für eine Hypoxie-induzierte Steigerung der Expression verwendet.

Die Reaktion der Zellen auf Hypoxie wurde mittels HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen (Abb. 30A).

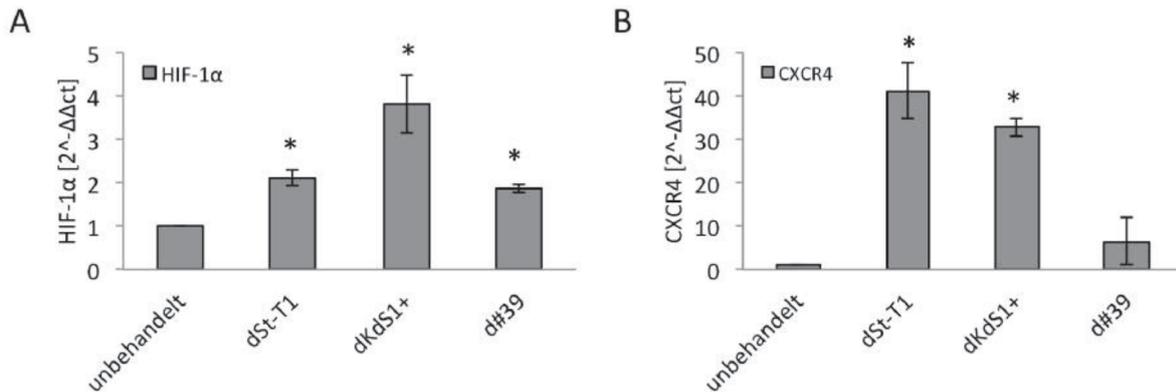


Abb. 30: Repräsentative Ergebnisse für einen Hypoxienachweis und Steigerung der CXCR4-Expression durch Hypoxie in endometrialen Stromazellen. (A) zeigt das Ergebnis einer HIF-1 $\alpha$ -qRT-PCR als Nachweis der Hypoxiewirkung und (B) eine Hypoxie-induzierte Steigerung der CXCR4-Expression in der Stromazelllinie dSt-T1, Tet-induzierten dKdS1-Zellen und eines *dkdCXCR2*-Zellklons #39. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, n=3 +/- STABW, \*p<0,05

Ein positives Beispiel für eine Hypoxie-induzierte Expressionsteigerung zeigte CXCR4 in 3 verschiedenen endometrialen Stromazelllinien (Abb. 30B). Die Expression von CXCR2 konnte dagegen durch Hypoxie in keiner untersuchten Zelllinie induziert werden (Tab. 18).

Tab. 18: Exemplarisches Ergebnis einer CXCR2-qRT-PCR nach Hypoxiebehandlung. (+)= Tet-induziert (CXCR2 herunterreguliert); norm= Zellkultur unter Normoxie, hyp= Zellkultur unter Hypoxie für 18h; MNC= Positivkontrolle; n=3

Probe	CXCR2-Cp-Wert [Zyklen]	$\beta$ -Aktin-Cp-Wert [Zyklen]
dSt-T1 norm	>36	13,66
dKdS1 (+) norm	>36	14,89
d#39 norm	>36	13,59
dSt-T1 hyp	>36	14,48
dKdS1 (+) hyp	>36	15,66
d#39 hyp	>36	15,24
MNC	24,14	15,49
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	>36	>36
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	>36	>36

Der Versuch die Hypoxie-gesteuerte CXCR2-Expressionssteigerung durch Inkubation der Zellen mit Cobaldchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ), einem chemischen Hypoxieinduktor<sup>204</sup> auszulösen, führte ebenfalls zu keiner erfolgreichen Steigerung der CXCR2-Expression. Hierbei wurden dSt-T1-Zellen mit  $\text{CoCl}_2$  inkubiert und anschließend die CXCR2-Expression untersucht.

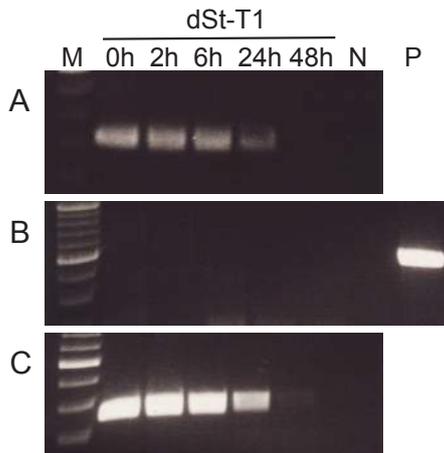


Abb. 31: Repräsentatives Ergebnis des Versuchs der Inkubationszeitbestimmung mit dem Einsatz von 100mM  $\text{CoCl}_2$ . Gezeigt ist das Ergebnis einer (A) HIF-1 $\alpha$ -PCR als Kontrolle der Hypoxieinduzierung, (B) einer TD-CXCR2-PCR mit MNC-Positivkontrolle (P) und (C) die  $\beta$ -Aktin Amplifikation als *housekeeping* Gen ( $\beta$ -Aktin-Kontrolle der MNC-Probe siehe Abb. 27 A); n=3

Abb. 31 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der  $\text{CoCl}_2$ -Inkubationszeitbestimmung mit 100mM  $\text{CoCl}_2$  als Endkonzentration im Zellkulturmedium. Die Abnahme der  $\beta$ -Aktin-Amplifikation ab 24h Inkubation deutet auf eine zelltoxische Wirkung des Hypoxieinduktors (Abb. 31C). Die Amplifikation von HIF-1 $\alpha$  wies auf eine erfolgreiche Hypoxieinduktion mittels  $\text{CoCl}_2$  hin (Abb. 31A). Hier zeigte sich, dass die kurzweilige Zugabe von  $\text{CoCl}_2$  nach sofortiger Entfernung des Zellkulturmediums (0h) bereits zu einer Hypoxieinduktion führte (Abb. 31A). Außer in der MNC-Positivkontrolle konnte jedoch keine CXCR2-Amplifikation beobachtet werden (Abb. 31B). Die  $\text{CoCl}_2$ -Inkubationszeit wurde auf 5h gesetzt.

Der Versuchsansatz wurde neben dSt-T1- auch mit IL-1 $\beta$ -behandelten dSt-T1-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden neben den 100 $\mu\text{M}$ , die in der Literatur als optimale Konzentration angegeben werden<sup>205</sup>, weitere Konzentrationen (0,1-80 $\mu\text{M}$ ) getestet (Daten nicht gezeigt). Alle Versuche führten zu einer Induktion der Hypoxie in den Zellen, zeigten jedoch keine steigernde Wirkung auf die CXCR2-Expression in den endometrialen Stromazellen.

### 3.1.3.4 CXCR2-Expressionssteigerung durch entzündliche Stimuli

Die Expressions-steigernde Wirkung von entzündlichen Stimuli, wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS, die teilweise gleichzeitig auch embryonale Sekretionsprodukte darstellen, auf die beiden CXCR2-Chemokinliganden CXCL1 und CXCL8 wurde bereits gezeigt<sup>111,196</sup>. Die Inkubation von PSZ und dST-T1 mit diesen Stimuli zur Steigerung der CXCR2-Expression wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht.

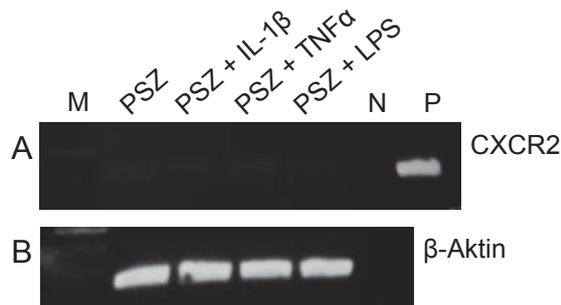


Abb. 32: Detektion der CXCR2-Expression in PSZ nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli mittels TD-PCR. PSZ wurden mit 0,3ng/ml IL-1 $\beta$ , 3ng/ml TNF $\alpha$  und 30ng/ml LPS für 2h inkubiert und anschließend mittels PCR auf CXCR2 untersucht (A); M= Standardgrößenmarker; N= H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle; P= Positivkontrolle mit MNC-cDNA; (B)  $\beta$ -Aktin-Amplifikation diente als Kontrolle ( $\beta$ -Aktin-Kontrolle der MNC-Probe siehe Abb. 27 A)

Durch die Inkubation der Zellen mit verschiedenen entzündlichen Stimuli mit insgesamt 3 Wiederholungen (n=3) konnte die CXCR2-Expression weder in PSZ (Abb. 32A) noch in dSt-T1-Zellen, die neben der TD-PCR (Daten nicht gezeigt) auch in dem QGP Assay auf CXCR2 untersucht wurden, induziert werden.

### 3.1.4 CXCR2-*kd*-Nachweis mittels QGP Assay

Der QGP Assay wurde für den Nachweis des CXCR2 *kd* gewählt, da diese Methode sehr sensitiv ist und bereits eine RNA-Kopie des Zielgens in einer Zelle detektieren kann und alle bereits getesteten Methoden, wie PCR, qRT-PCR, TD-PCR und *nested*-PCR kein CXCR2 auf RNA-Ebenen, möglicherweise wegen einer sehr niedrigen Expression, nachweisen konnten.

#### 3.1.4.1 QGP Assay-Probelauf

In einem Probelauf sollte zunächst die passende Zellzahl ermittelt werden. Hierzu wurden 2.000, 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen eines putativen *kd*CXCR2-Zellklons (#30, Nano 1015l U-24) und der St-T1-Zelllinie für die Probenaufbereitung verwendet. Verschiedene Volumina Probandenvollblut (20, 40 und 80 $\mu$ l) dienten als

Positivkontrollen für CXCR2. Als Zielgene wurden neben CXCR2 auch Sdc-1, CXCL1, VEGFA, MMP7 und MMP9 auf ihre Expression auf RNA-Ebene untersucht.  $\beta$ -Aktin, HPRT1, PPIB und RPL19 dienten als *housekeeping* Gene, wobei HPRT1 und PPIB niedrig exprimierte und  $\beta$ -Aktin und RPL19 hoch exprimierte *housekeeping* Gene darstellten.

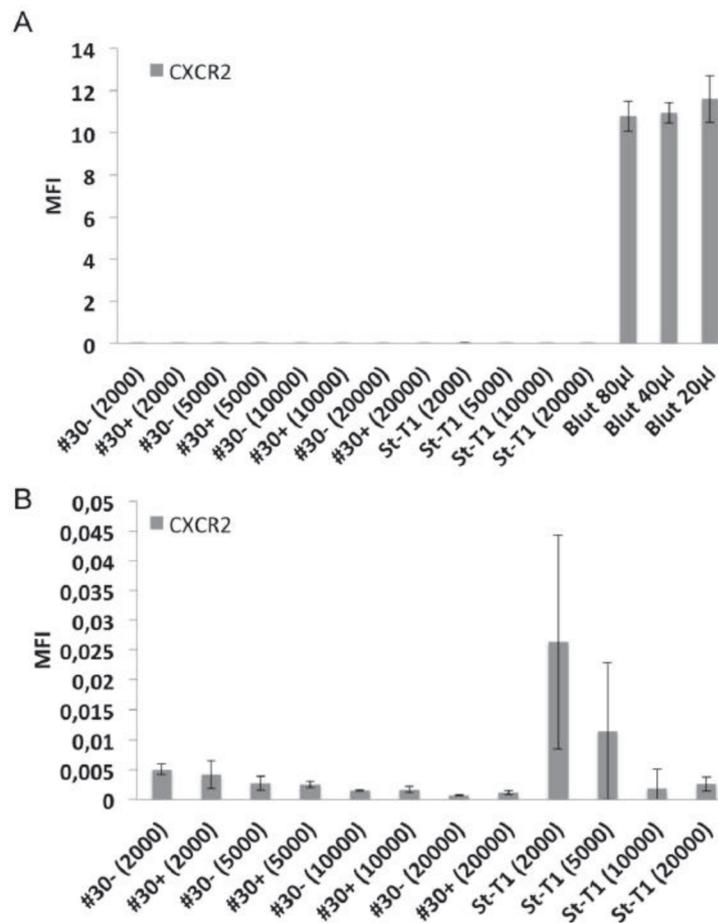


Abb. 33: Graphische Darstellung des CXCR2-Ergebnisses aus dem QGP Assay-Probelauf. #30= Nano 1015l U-24; 2.000, 5.000, 10.000, 20.000= eingesetzte Zellzahl, (+)= +Tet (CXCR2 herunterreguliert); Blutproben eines Probanden dienten als Positivkontrolle für CXCR2; (A) Darstellung aller getesteter Proben mit verschiedenen Zellzahlen; (B) Darstellung aller Proben mit verschiedenen Zellzahlen ohne Blutproben für eine bessere Übersicht; aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/-STABW

Alle nachfolgenden Ergebnisse wurden bei der Auswertung auf das am niedrigsten exprimierte *housekeeping* Gen HPRT1 normiert, da alle untersuchten Gene ebenfalls eine niedrige Expression aufwiesen und so bei der statistischen Auswertung auch

kleine Effekte beobachtet werden konnten, die bei der Normierung auf ein hochexprimiertes Gen verloren gegangen wären.

Die CXCR2-Ergebnisse des QGP Assay-Probelaufs sind in Abb. 33 graphisch aufgetragen dargestellt. Abb. 33A zeigt die CXCR2-RNA-Menge als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) aller Proben. Es zeigte sich deutlich, dass die putativen *kdCXCR2*-Proben sehr wenig CXCR2-RNA im Vergleich zu den Blutproben aufwiesen. Die Blutproben wurden in der Abb. 33B entfernt, um die Expression der restlichen Proben durch eine kleinere Skalierung besser darstellen zu können.

Die Detektions- und Quantifizierungsgrenze liegt laut Hersteller bei <1.000-2.000 bzw. <2.000-4.000 mRNA-Kopien pro Assay well. Daraus ergibt sich bei 2.000 eingesetzten Zellen pro well eine Detektionsgrenze von 0,5-1MFI, bei 5.000 Zellen 0,2-0,4MFI, bei 10.000 Zellen 0,1-0,2MFI und bei 20.000 Zellen 0,05-0,1MFI. Hierbei zeigte sich, dass die CXCR2-RNA-Konzentration der *kdCXCR2*-Zellklonproben, die nur Werte bis 0,005MFI aufwies, unterhalb der Detektionsgrenze lag. Ebenso sind die hohen Standardabweichungen der St-T1-Proben mit den unterschiedlichen Zellzahlen auf die sehr geringe und unter der Detektionsgrenze liegende CXCR2-Konzentration zurückzuführen.

Folglich war eine statistische Auswertung der Werte nicht möglich, sodass kein Unterschied in der CXCR2-RNA-Konzentration zwischen nicht-induzierten und mit Tet induzierten *kdCXCR2*-Proben und somit kein CXCR2 *kd* festgestellt werden konnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für den nachfolgenden kompletten QGP Assay Lauf die höchstmögliche Anzahl von 80.000 Zellen pro Assaywell eingesetzt.

#### **3.1.4.2 QGP Assay**

Für den finalen QGP Assay-Versuch wurde die höchstmögliche Zellzahl von 80.000 Zellen für die einzelnen Proben verwendet, da keine, der im QGP Assay-Probelauf getesteten Zellzahlen sich als ausreichend erwies, um die CXCR2-Expression oberhalb der Detektionsgrenze darzustellen. Bei dem Einsatz von 80.000 Zellen pro well bewegte sich die Detektionsgrenze zwischen 0,0125-0,025MFI und die Quantifizierungsgrenze zwischen 0,025-0,05MFI.

Neben den bereits getesteten Behandlungen der Zellen, wie Inkubation mit Tet für die CXCR2 *kd*-Induktion, wurden im folgenden Versuch zusätzlich weitere

Stimulantien eingesetzt, um die CXCR2-Expression zu steigern und dadurch detektierbar zu machen.

Alle nachfolgenden Ergebnisse wurden, wie bereits beim QGP Assay-Probelauf auf das *housekeeping* Gen HPRT1 normiert.

### 3.1.4.2.1 CXCR2

Die CXCR2-RNA-Konzentration in der Blutprobe, der Positivkontrolle für CXCR2 lag bei 14MFI und somit ca. 9.300x höher als die der St-T1-Probe. Alle in Abb. 34B aufgeführten Proben wiesen eine CXCR2-Konzentration auf, die unterhalb der Detektionsgrenze lag, dadurch war eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich.

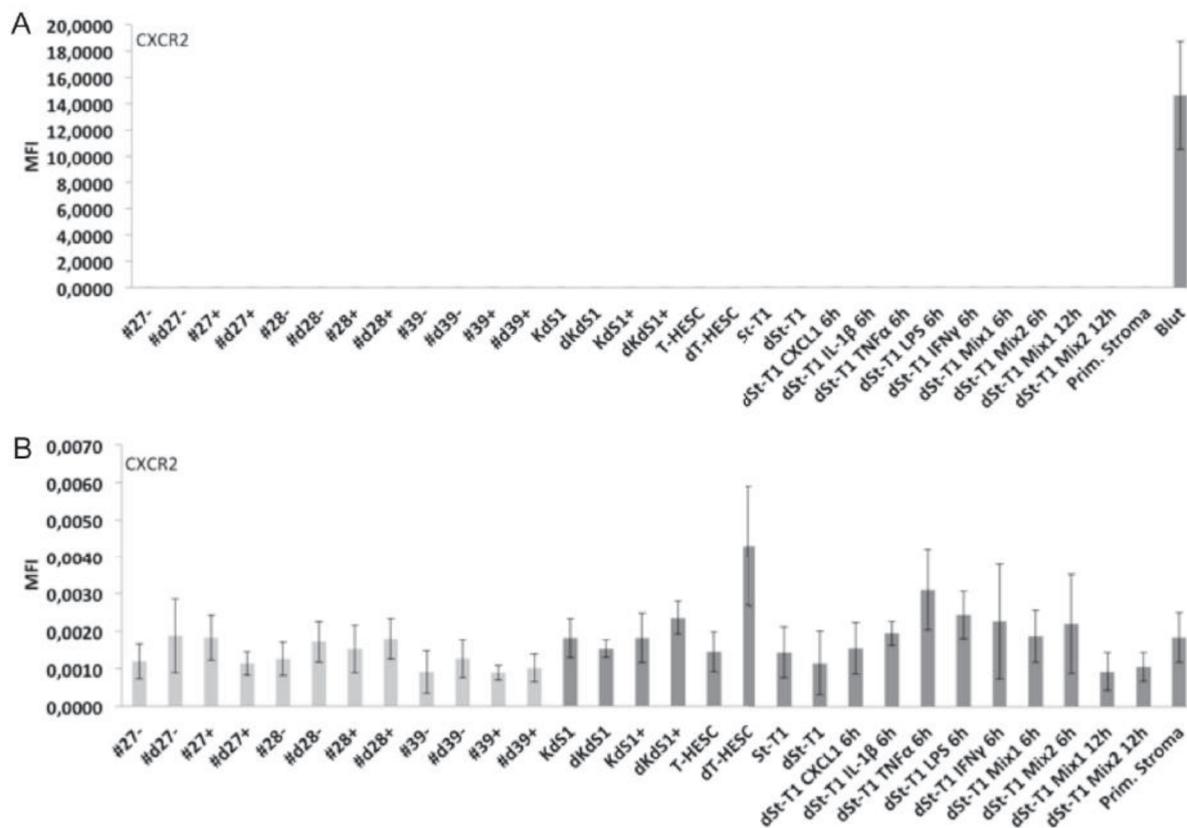


Abb. 34: Graphische Darstellung des CXCR2-Ergebnisses aus dem QGP Assay. 27= #27 (Nano 1015I T-24); 28= #28 (Nano 1015I U-17); 39= #39 (Amaxa 1015 T-24); d= dezidualisiert; (-)= nicht-induziert; (+)= +Tet; Mix 1= LPS+IFN $\gamma$ ; Mix 2= IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ . (A) Darstellung aller getesteten Proben; (B) Darstellung ohne Blutprobe für eine bessere Übersicht durch kleinere Skalierung. Aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/-STABW

### 3.1.4.2.2 Sdc-1

Nach der Messung der Sdc-1-RNA-Expression mit dem QGP Assay konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden: alle nicht-dezidualisierten *kdCXCR2*-Proben wiesen, sowohl mit als auch ohne Tet-Induktion signifikant niedrigere Sdc-1-RNA-Konzentrationen im Vergleich zu den ursprünglichen St-T1-Zellen auf (Abb. 35). Auch die dezidualisierten *kdCXCR2*-Proben zeigten im Gegensatz zu dSt-T1 ein niedrigeres Sdc-1-Expressionsmuster.

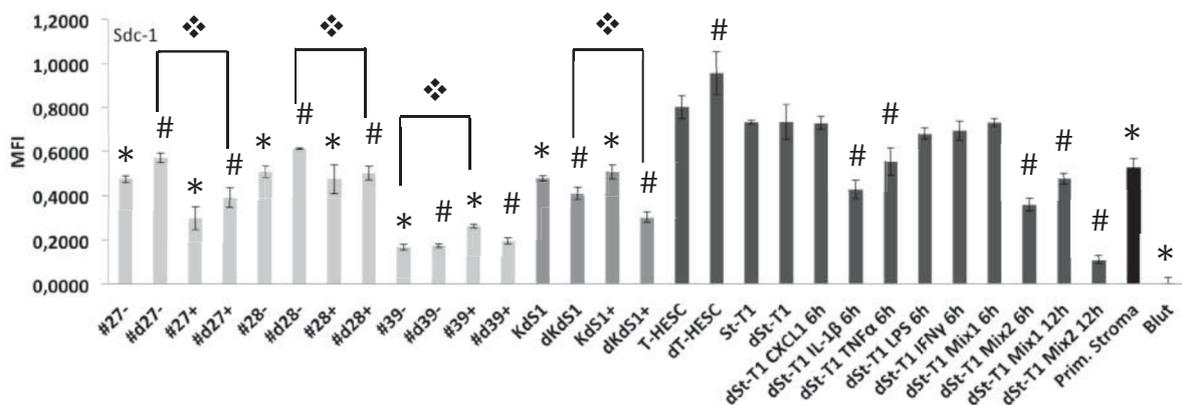


Abb. 35: Graphische Darstellung des Sdc-1-Ergebnisses aus dem QGP Assay. 27 = #27 (Nano 1015I T-24); 28 = #28 (Nano 1015I U-17); 39 = #39 (Amaxa 1015 T-24); d= dezidualisiert; (-)= nicht-induziert; (+)= +Tet; Mix1= LPS+IFN $\gamma$ ; Mix2= IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ . Aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/- STABW, \*p<0,05 für nicht-dezidualisierte Proben vs St-T1, #p<0,05 für dezidualisierte Proben vs dSt-T1, ♠p<0,05 wie angegeben.

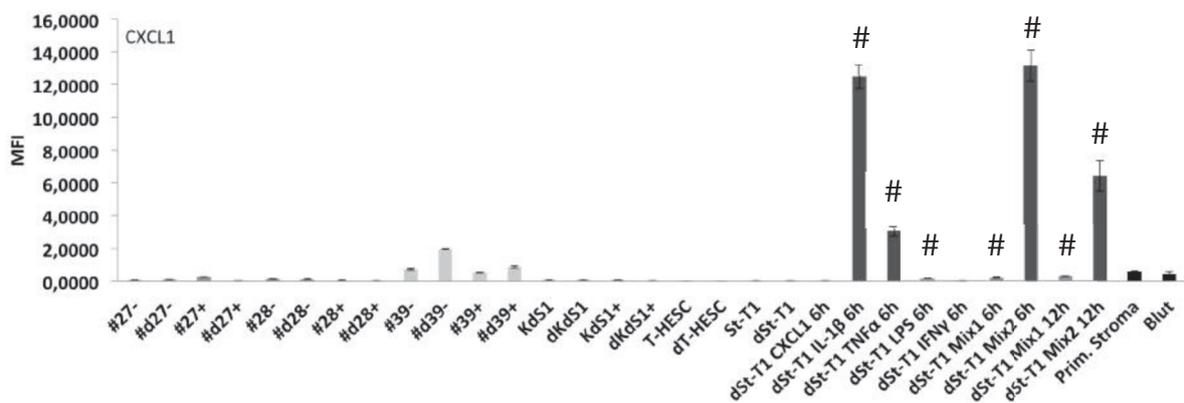
Ebenfalls signifikant weniger Sdc-1-RNA wurde in allen dSt-T1-Proben detektiert, die mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  behandelt wurden im Gegensatz zu der dSt-T1-Probe ohne Stimulantieninkubation. Eine signifikante Sdc-1-RNA-Konzentrationsabnahme fand neben den *kdCXCR2*-Proben #d27+ und #d28+ vs die entsprechenden nicht-induzierten *kdCXCR2*-Proben auch in dKdS1-Zellen nach Tet-Induktion statt. Im Gegensatz dazu zeigte die *kdCXCR2*-Zelllinie #39 eine signifikante Zunahme der Sdc-1-RNA nach Induktion mit Tet (Abb. 35).

### 3.1.4.2.3 CXCL1

Abb. 36A zeigt das CXCL1-Ergebnis des QGP Assay aller getesteter Proben. Die höchste CXCL1-RNA-Expression wiesen einige mit Stimulantien behandelte dSt-T1-Proben auf. Die CXCL1-RNA-Expression von #d27+, T-HESC und dT-HESC lag

unter der Detektionsgrenze von 0,0125MFI, sodass diese Proben nicht in die statistische Auswertung der Ergebnisse einbezogen wurden. Am stärksten wurde die CXCL1-Expression durch den Mix aus dem Embryosekretionsprodukt IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (Mix 2) nach einer 6h-Inkubation stimuliert. Nach weiteren 6h sank die CXCL1-RNA-Konzentration um die Hälfte. Wurde IL-1 $\beta$  als alleinige Stimulationskomponente verwendet, wurden bei der CXCL1-Expression nur minimal kleinere Werte erreicht im Vergleich zum Mix 2 mit TNF $\alpha$ .

A



B

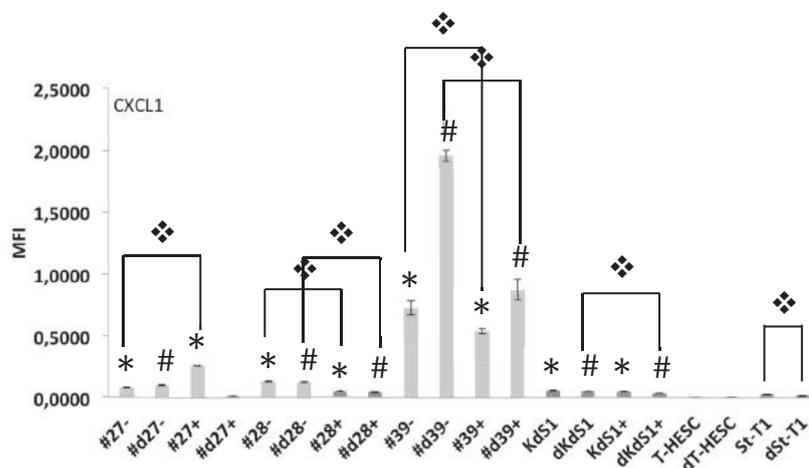


Abb. 36: Graphische Darstellung des CXCL1-Ergebnisses aus dem QGP Assay. 27= #27 (Nano 1015I T-24); 28= #28 (Nano 1015I U-17); 39= #39 (Amaxa 1015 T-24); d= dezidualisiert; (-)= nicht-induziert; (+)= +Tet; Mix 1= LPS+IFN $\gamma$ ; Mix 2= IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ . (A) Darstellung aller getesteten Proben; (B) Darstellung ohne stimulierte dSt-T1-Proben, prim. Stromazellen-Probe und Blut-Probe und für eine bessere Übersicht durch kleinere Skalierung. Aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/-STABW, \*p<0,05 für nicht-dezidualisierte Proben vs St-T1, #p<0,05 für dezidualisierte Proben vs dSt-T1,  $\diamond$ p<0,05 wie angegeben.

Die Behandlungen der dSt-Z1-Zellen nur mit TNF $\alpha$ , LPS oder dem Mix aus LPS und IFN $\gamma$  (Mix 1) erreichten ebenfalls signifikante, jedoch weitaus geringere CXCL1-Expressionzunahmen im Vergleich zu IL-1 $\beta$  (Abb. 36A).

Mit Ausnahme der T-HESC-Zellen wiesen alle getesteten nicht-dezidualisierten Proben eine signifikant höhere CXCL1-RNA-Konzentration im Gegensatz zu St-T1 auf. Auch die dezidualisierten Proben zeigten eine signifikant erhöhte CXCL1-Expression verglichen mit dSt-T1, ausgenommen #d27+ (Abb. 36B).

### 3.1.4.2.4 MMP7

In Abb. 37 ist das MMP7-Ergebnis des QGP Assay dargestellt. Die mit Abstand höchste MMP7-RNA-Konzentration wurde in PSZ detektiert. Hierbei betrug die Konzentration von MMP7 RNA ca. das 450fache der Konzentration in den St-T1-Zellen (Abb. 37A).

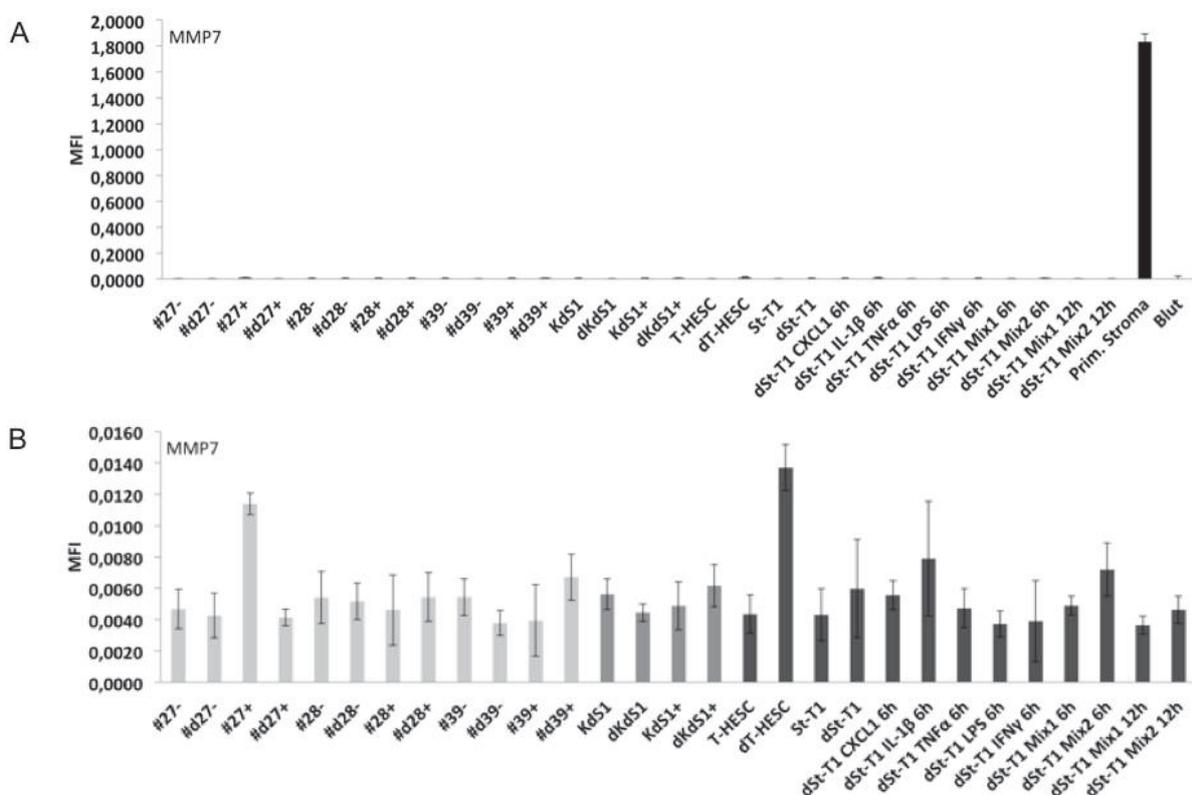


Abb. 37: Graphische Darstellung des MMP7-Ergebnisses aus dem QGP Assay. 27 = #27 (Nano 1015I T-24); 28 = #28 (Nano 1015I U-17); 39 = #39 (Amaxa 1015 T-24); d = dezidualisiert; (-) = nicht-induziert; (+) = +Tet; Mix1 = LPS+IFN $\gamma$ ; Mix2 = IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ . (A) Darstellung aller getesteten Proben; (B) Darstellung ohne PSZ und Blutprobe für eine bessere Übersicht durch kleinere Skalierung. Aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/-STABW.

Beim Betrachten der restlichen Proben ohne die Probe des PSZ fiel deutlich auf, dass die MMP7-RNA-Expression durchgehend niedrig war und mit Ausnahme der dT-HESC-Probe unter der Detektionsgrenze lag (Abb. 37B). Aufgrund der unterschrittenen Detektionsgrenze war keine statistische Auswertung möglich.

### 3.1.4.2.5 MMP9

Das MMP9-Ergebnis des QGP Assay ist in Abb. 38A dargestellt. Eine besonders hohe MMP9 RNA-Konzentration wies die Blutprobe auf. Abb. 38B zeigt die getesteten Proben ohne die Blutprobe für eine bessere Vergleichsmöglichkeit. Hier zeigte sich, dass die detektierten MMP9 MFI-Werte für alle Proben des *kdCXCR2*-Zellklons #27, die #d28- Probe, alle KdS1- und T-HESC-Proben, sowie St-T1, dSt-T1 und dSt-T1+CXCL1 und dSt-T1+Mix 1 (12h) unter der Nachweisgrenze lagen, sodass keine Statistik der Ergebnisse durchgeführt werden konnte.

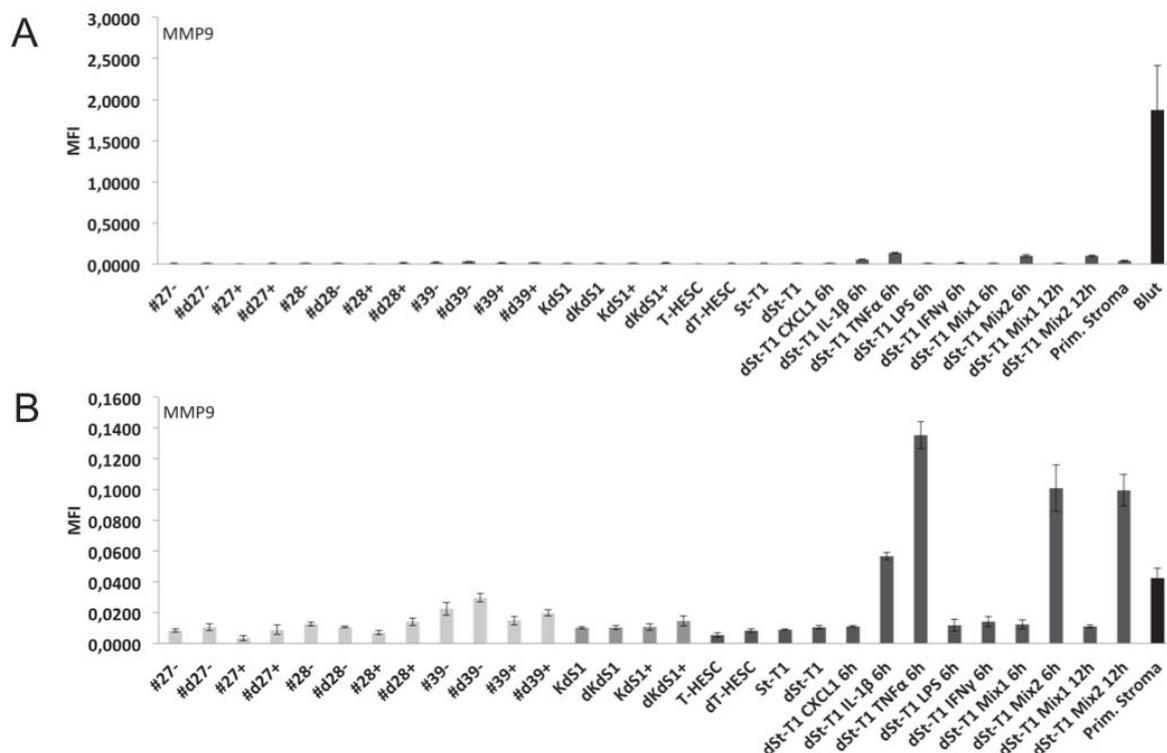


Abb. 38: Graphische Darstellung des MMP9-Ergebnisses aus dem QGP Assay. 27 = #27 (Nano 1015I T-24); 28 = #28 (Nano 1015I U-17); 39 = #39 (Amaxa 1015 T-24); d = dezidualisiert; (-) = nicht-induziert; (+) = +Tet; Mix1 = LPS+IFN $\gamma$ ; Mix2 = IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ . (A) Darstellung aller getesteten Proben; (B) Darstellung ohne Blutprobe für eine bessere Übersicht durch kleinere Skalierung. Aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/-STABW.

Dennoch lässt es sich sagen, dass die Inkubation von dSt-T1-Zellen mit den beiden Stimulantien IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  – sowohl einzeln als auch im Mix - zu einer Expressionszunahme der MMP9 RNA gegenüber der nicht-behandelten dSt-T1-Probe führte (Abb. 38B). Die Probe der PSZ zeigte ebenfalls eine niedrige MMP9 Expression auf, die jedoch im Vergleich zu den endometrialen Stromazelllinien über der Detektionsgrenze lag (Abb. 38B).

### 3.1.4.2.6 VEGFA

Die graphische Darstellung des VEGFA-Ergebnisses ist in Abb. 39 zu finden. Im Vergleich zu der St-T1-Probe zeigten alle nicht-dezidualisierten *kdCXCR2*-Proben, die Tet-induzierte KdS1- und die Blutprobe signifikant niedrigere VEGFA RNA-Konzentrationen auf.

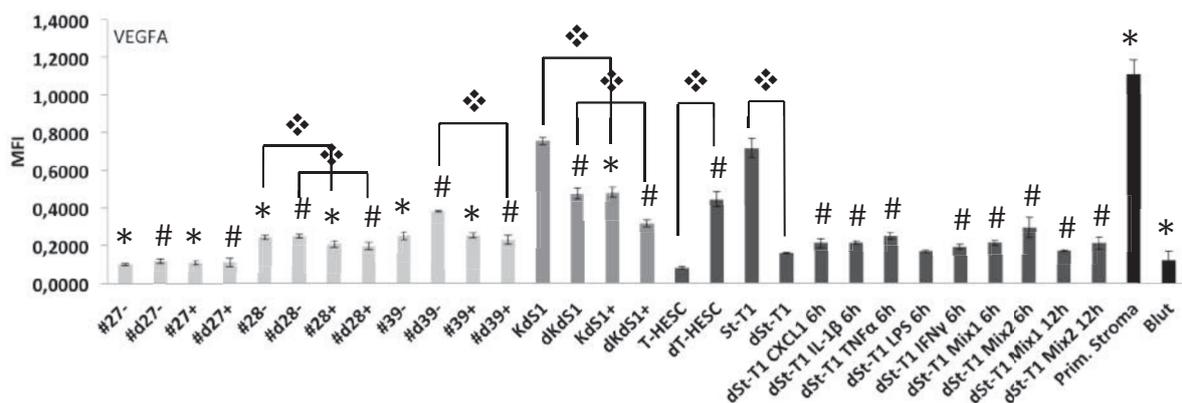


Abb. 39: Graphische Darstellung des VEGFA-Ergebnisses aus dem QGP Assay. 27= #27 (Nano 1015I T-24); 28= #28 (Nano 1015I U-17); 39= #39 (Amaxa 1015 T-24); d= dezidualisiert; (-)= nicht-induziert; (+)= +Tet; Mix 1= LPS+IFN $\gamma$ ; Mix 2= IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ . Aufgetragen sind Mittelwerte aus n=3 +/- STABW, \*p<0,05 für nicht-dezidualisierte Proben vs St-T1, #p<0,05 für dezidualisierte Proben vs dSt-T1, †p<0,05 wie angegeben.

Die PSZ wiesen dagegen eine höhere Expression auf. Die *kdCXCR2*-Proben #28 und #39 und die KdS1-Probe zeigten nach Tet-Induktion und die Proben #d28 und dKdS1 nach Dezidualisierung und Tet-Induktion eine Abnahme der VEGFA RNA-Expression (Abb. 39). Bei den T-HESC-Zellen wurde nach Dezidualisierung eine signifikante Zunahme und bei St-T1 eine signifikante Abnahme der VEGFA RNA-Konzentration beobachtet. Mit Ausnahme des #27-Zellklons und der mit LPS behandelten dSt-T1-Probe wurden bei allen *kdCXCR2*-Proben, allen mit

Stimulantien behandelten dSt-T1-Proben und bei den dezidualisierten KdS1- und T-HESC-Proben eine signifikant höhere VEGFA Expression detektiert (Abb. 39).

Die nicht nachweisbare CXCR2-Expression und der dadurch nicht realisierbare CXCR2 *kd* in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 durch PCR, qRT-PCR, TD-PCR, nested-PCR, IHC, IF, WB und schließlich der sensitivsten Methode des QGP Assay resultierte in einem Abschluss der CXCR2-Studie.

### 3.1.5 Analysen eines putativ weiteren CXCL1-Rezeptors

CXCR2 wird zurzeit in der Literatur noch überwiegend als einziger CXCL1-Hauptrezeptor angegeben, jedoch gibt es mittlerweile auch Studien, die CXCR1 als weiteren CXCL1-Rezeptor angeben.<sup>206,207</sup> Versuche, diesem Hinweis nachzugehen, beinhalteten PCR-Analysen mit unbehandelten und Stimuli-behandelten PSZ und endometrialem Gewebe (Abb. 40) und qRT-PCR-Ansätze mit unbehandelten und Hypoxie-behandelten St-T1-, KdS1- und Zellen eines *kdCXCR2*-Zellklons #39 (Tab. 19).

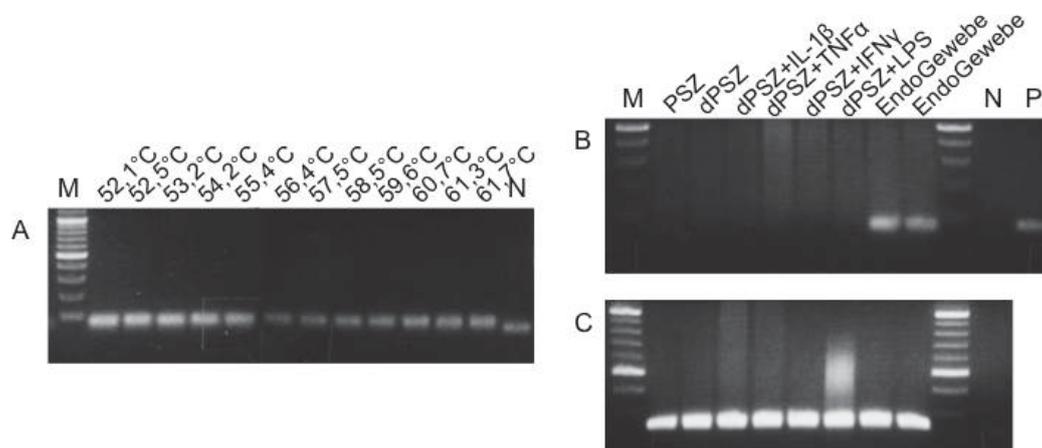


Abb. 40: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR1-PCR mit cDNA aus unbehandelten und Stimuli-behandelten PSZ. (A) dargestellt ist das Ergebnis der Gradienten-PCR zur Feststellung der optimalen *annealing*-Temperatur mit der cDNA aus der MNC-Positivkontrolle (P); (B) zeigt das repräsentative Ergebnis einer CXCR1-PCR aus n=4 mit PSZ, dPSZ, dPSZ mit 0,3ng/ml IL-1 $\beta$ , 3ng/ml TNF $\alpha$ , 20ng/ml IFN $\gamma$  und 30ng/ml LPS (Inkubationszeit 2h), endometrialem Gewebe und MNC-Positivkontrolle (P); als Kontrolle diente die Amplifikation des *housekeeping* Gens  $\beta$ -Aktin (C) ( $\beta$ -Aktin-Kontrolle der MNC-Probe siehe Abb. 27 A)

Die Ermittlung der optimalen *annealing*-Temperatur für die CXCR1-Amplifikation erfolgte mittels Gradient-PCR mit der cDNA aus MNC (Abb. 40A). Nach der

Auswertung der CXCR1-PCR wurde die *annealing*-Temperatur auf 52°C festgelegt (Abb. 40A). Die CXCR1-Amplifikation in PSZ, dPSZ, dPSZ mit Behandlung und endometrialen Gewebe zeigte eine CXCR1-Expression nur im untersuchten Endometriumgewebe einer Patientin und der MNC-Positivkontrolle (Abb. 40B). Die Amplifikation von  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle und ist in Abb. 40C dargestellt.

Tab. 19: Repräsentatives Ergebnis einer CXCR1-qRT-PCR mit St-T1-, KdS1- und Zellen eines *kdCXCR2*-Zellklons #39 ohne (norm) und mit Hypoxiebehandlung (hyp) für 18h; (+)= Tet-Induziert (Sdc-1 herunterreguliert)

Probe	CXCR1-Cp-Wert [Zyklen]	$\beta$ -Aktin-Cp-Wert [Zyklen]
dSt-T1 norm	>36	13,64
dKdS1 (+) norm	>36	15,50
d#39 norm	>36	13,67
dSt-T1 hyp	>36	15,11
dKdS1 (+) hyp	>36	16,03
d#39 hyp	>36	15,29
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	>36	>36
H <sub>2</sub> O-Kontrolle	>36	35,64

Tab. 19 zeigt ein exemplarisches Ergebnis einer CXCR1-qRT-PCR aus 3 Wiederholungen (n=3). Untersucht wurden St-T1-, KdS1- und Zellen eines *kdCXCR2*-Zellklons #39 ohne und mit Hypoxiebehandlung. Hierbei wurden die Zellen für 18h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Der Nachweis der Hypoxiewirkung durch die Expression von HIF-1 $\alpha$  ist der Abb. 30A zu entnehmen. In keiner untersuchten endometrialen Stromazelllinie konnte CXCR1 erfolgreich nachgewiesen werden (Tab. 19). Nur endometriales Gewebe und MNC zeigten eine detektierbare CXCR1-Expression (Abb. 40B). Demnach weist CXCR1 ein CXCR2-ähnliches Expressionsprofil in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 auf.

### 3.2 Signalwege in der humanen endometrialen Stromazelllinie St-T1

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit den Signalwegen in der St-T1-Zelllinie nach Inkubation der Zellen mit dem Embryosurrogatmarker IL-1 $\beta$ . Durch die Behandlung der Zellen mit IL-1 $\beta$  wurde die Anwesenheit eines Embryos imitiert und die während der Implantation aktiven Signalkaskaden induziert. Der Einsatz von verschiedenen Inhibitoren und der Sdc-1 *kd* Zelllinie KdS1 ermöglichte eine Analyse

der beiden, in die Regulation der CXCL1-Expression involvierten MAPK-Signalwege (MEK1/2- und JNK) und der beiden transmembranären Rezeptoren FZD4 und FZD6 des Wnt-Signalwegs in Abhängigkeit von Sdc-1.

Alle Versuche wurden *in vitro* an den beiden endometrialen Stromazelllinien St-T1 und KdS1 durchgeführt.

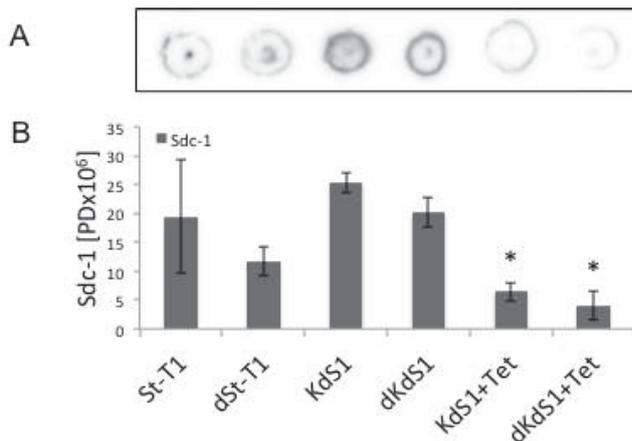


Abb. 41: Sdc-1 *kd* Nachweis auf Proteinebene mittels Dot blot. Dargestellt ist ein repräsentatives Sdc-1-Dot blot-Ergebnis aus n=4 Versuchen (A) und die korrespondierende Auswertung der Pixeldichte (B) mit n=4 und \*p<0,05 für Tet-induzierte Proben vs nicht-induzierte KdS1-Proben

Die densitometrische Auswertung der Pixeldichte wies eine statistisch signifikant niedrigere Sdc-1-Protein-Expression in KdS1- und dKdS1-Zellen nach Tet-Induktion des Sdc-1 *kd* (Abb. 41).

### 3.2.1 MAPK-Signalweg

Für die Untersuchung der MAPK-Signalwege wurden nicht-dezidualisierte und dezidualisierte St-T1- und KdS1-Zellen auf 6-well-Platten ausgesät, mit Tet für 48h induziert (nur KdS1 und dKdS1 und IL-1 $\beta$  (10ng/ml bei nicht-dezidualisierten und 0,1ng/ml bei dezidualisierten Zellen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Expressionsanalysen der Proteine ERK, c-Jun und der korrespondierenden aktivierten Formen, pERK und pc-Jun in St-T1, KdS1, dSt-T1 und dKdS1 sind in Abb. 43 dargestellt. Repräsentative Ergebnisse der WB-Analysen für ERK und pERK sind der Abb. 43A+B und für c-Jun und pcJun der Abb. 43D+E zu entnehmen. ERK wurde unabhängig von Zelltyp und Dezidualisierung konstant in allen untersuchten Zellen nach IL-1 $\beta$ -Inkubation exprimiert (Abb. 43A).

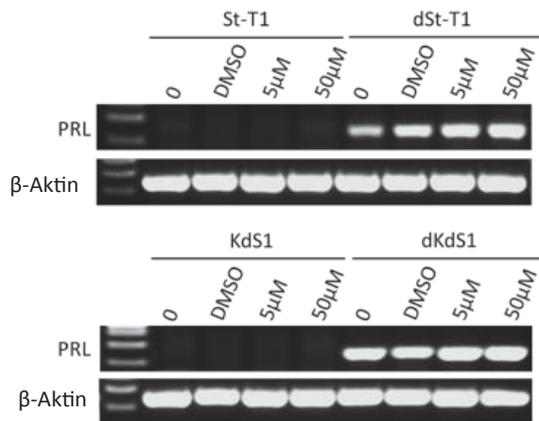


Abb. 42: Dezidualisierungsnachweis mittels PRL-PCR. Dargestellt ist das Ergebnis einer PRL-PCR als Dezidualisierungsnachweis am Beispiel von St-T1, dSt-T1, KdS1 und dKdS1 mit ausgewählten Proben aus dem MEK1/2-Inhibitor-Ansatz (5 und 50µM). β-Aktin-Amplifikation diente als Kontrolle

Die Analyse der phosphorylierten Form von ERK zeigte eine deutlich geringere Expression in dSt-T1 und dKdS1 (Abb. 43B), die sich nach Auswertung der Pixeldichte als signifikant ( $p < 0,05$ ) erwies (Abb. 43C).

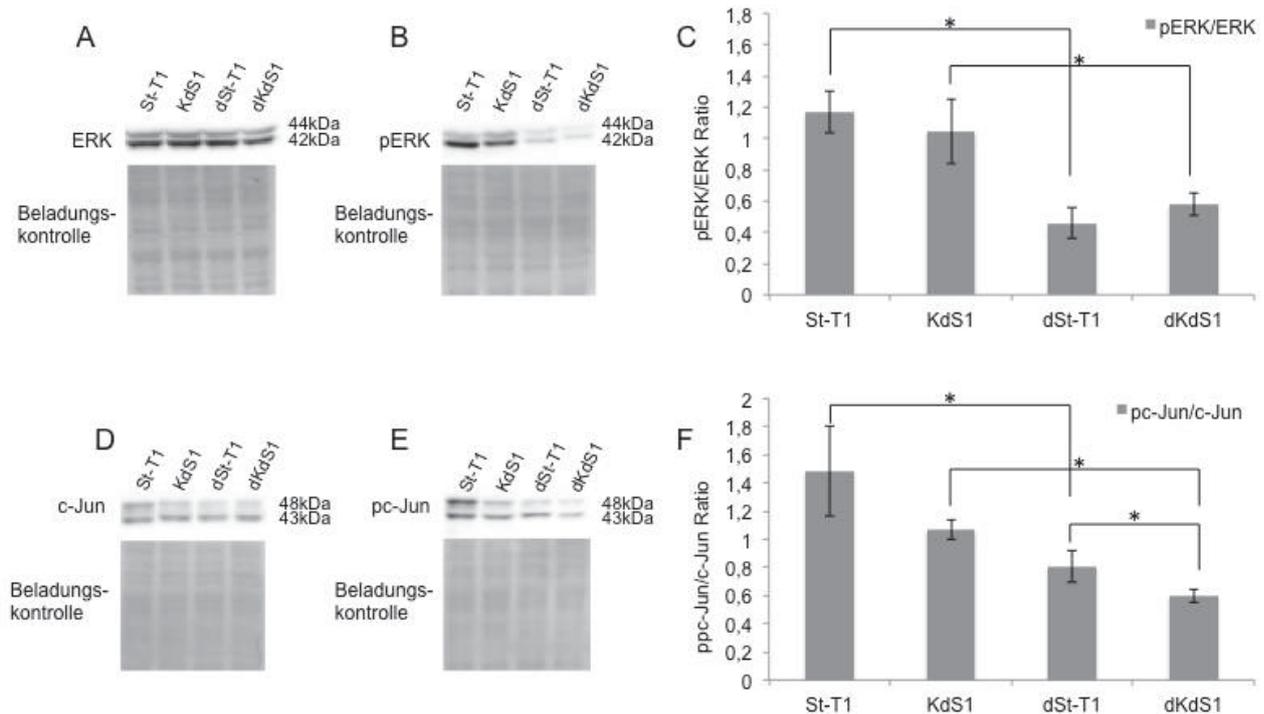


Abb. 43: Proteinexpression-Analyse von ERK und c-Jun und den jeweiligen phosphorylierten Formen, pERK und pc-Jun in St-T1, KdS1, dSt-T1 und dKdS1. A+B) zeigen repräsentative WB-Ergebnisse der Proteinexpression von ERK und pERK in St-T1, KdS1, dSt-T1 und dKdS1 nach Behandlung der Zellen mit 0,1ng/µl bzw. 10ng/µl IL-1β für 6h. Die korrespondierende Auswertung der Pixeldichte als pERK/ERK Ratio ist in C) dargestellt. Beispielhafte WB-Ergebnisse der c-Jun- und pc-Jun-Proteinexpression in St-T1, KdS1, dSt-T1 und dKdS1 ist D+E) zu entnehmen, F) zeigt die korrespondierende Pixeldichten-Auswertung als pc-Jun/c-Jun Ratio. C+F) Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Experimenten +/- STABW mit \* $p < 0,05$ . Als Beladungskontrolle diente das Gesamtprotein der Coomassie-gefärbten PVDF-Membranen.

Die unphosphorylierte Form von c-Jun wurde ebenfalls konstant in alle Zellen exprimiert (Abb. 43D), pc-Jun dagegen wurde hauptsächlich in St-T1 detektiert, sowohl KdS1 als auch dSt-T1 und dKdS1 wiesen laut den WB-Ergebnissen eine schwächere Aktivierung von c-Jun auf (Abb. 43E). Die densitometrische Auswertung der WB ergab eine tendenzielle Abnahme von pc-Jun in KdS1 ( $p=0,08$ ) und eine signifikante Reduktion der c-Jun-Phosphorylierung in dSt-T1 und dKdS1 gegenüber den nicht-dezidualisierten Zellen ( $p<0,05$ ). Des Weiteren gab es einen signifikanten pc-Jun/c-Jun-Unterschied zwischen dSt-T1 und dKdS1, wobei dKdS1-Zellen signifikant weniger c-Jun phosphorylierten (Abb. 43F).

In Abb. 44 ist das Ergebnis der CXCL1-Bestimmung mittels ELISA für die Zelllinien St-T1 und KdS1 nach Dezidualisierung, MEK1/2-Inhibitor-Behandlung und IL-1 $\beta$ -Inkubation gezeigt. Die MEK1/2-Inhibitor-Konzentrationen 5 und 10  $\mu\text{M}$  hatten keine Auswirkungen auf St-T1, dSt-T1, KdS1 und dKdS1 im Hinblick auf die CXCL1-Expression. Eine signifikante Abnahme der CXCL1-Expression fand bei dKdS1 ab 25  $\mu\text{M}$  MEK1/2-Inhibitor-Konzentration statt. Bei Verwendung von 50  $\mu\text{M}$  zeigten KdS1 und dKdS1 eine signifikante Abnahme von CXCL1 im Zellkulturmedium (Abb. 44).

Der Dezidualisierungsnachweis ist Abb. 42 beispielhaft in dSt-T1- und dKdS1-Zellen aus einem der durchgeführten MEK1/2-Inhibitor-Ansätze aufgeführt.

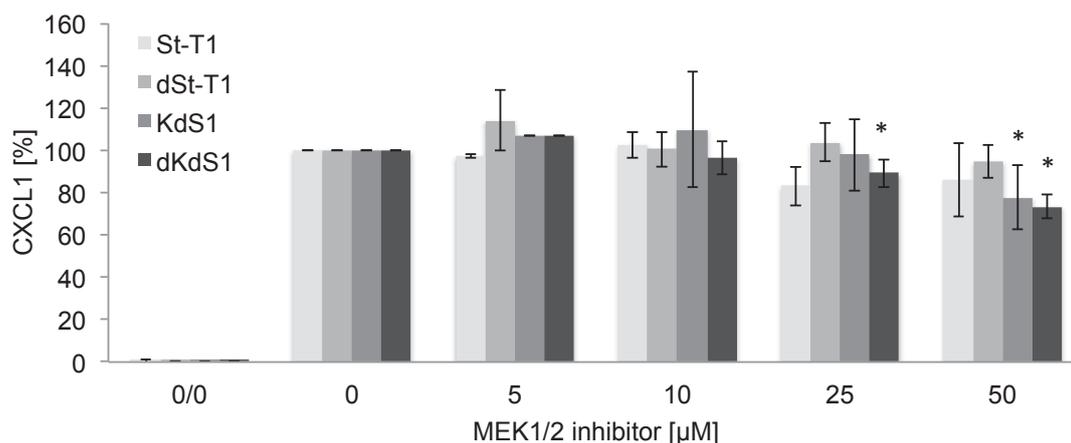


Abb. 44: ELISA-Ergebnis der CXCL1-Expression nach MEK1/2-Inhibitor-Inkubation. Dargestellt ist das Ergebnis der CXCL1-Expression in St-T1, dSt-T1, KdS1 und dKdS1 ohne Inhibitor- und IL-1 $\beta$ -Inkubation (0/0), nur mit IL-1 $\beta$ -Inkubation (0) und nach der Inkubation mit verschiedenen MEK1/2-Inhibitor-Konzentrationen (0-50  $\mu\text{M}$ ) für 2h und 48h IL-1 $\beta$ -Inkubation; Mittelwerte aus  $n=5 \pm$  STABW, \* $p<0,05$

Im Gegensatz zum MEK1/2-Inhibitor zeigte die Inkubation der eingesetzten Zellen mit dem JNK-Inhibitor bereits ab der Konzentration von 5 $\mu$ M eine signifikante CXCL1-Reduktion bei dSt-T1 (Abb. 45). Bei 10 $\mu$ M war die CXCL1-Expression in St-T1, dSt-T1 und dKdS1 durch den Inhibitor reduziert und bei 25 $\mu$ M JNK-Inhibitor-Konzentration war die CXCL1-Expression aller getesteter Zellen signifikant herunter reguliert (Abb. 45).

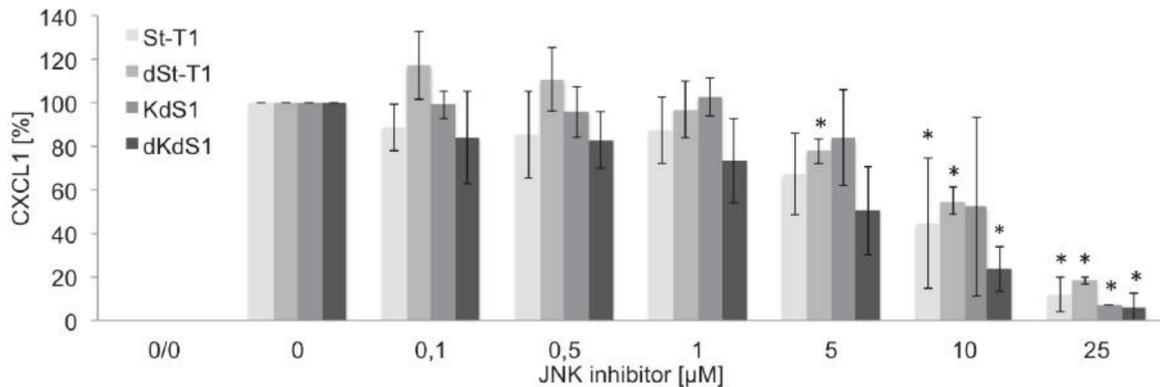


Abb. 45: ELISA-Ergebnis der CXCL1-Expression nach JNK-Inhibitor-Inkubation. Dargestellt ist das Ergebnis der CXCL1-Expression in St-T1, dSt-T1, KdS1 und dKdS1 ohne Inhibitor- und IL-1 $\beta$ -Inkubation (0/0), nur mit IL-1 $\beta$ -Inkubation (0) und nach der Inkubation mit verschiedenen JNK-Inhibitor-Konzentrationen (0-25 $\mu$ M) für 2h und 48h IL-1 $\beta$ -Inkubation; Mittelwerte aus n=3 +/- STABW, \*p<0,05

Abb. 46 zeigt eine graphische Übersicht der in Abb. 44 und 45 dargestellten Ergebnisse der CXCL1-Bestimmung mittels ELISA nach Inkubation der Zellen mit MEK1/2- und JNK-Inhibitor und IL-1 $\beta$ . Beim Inhibieren des MEK1/2-Signalwegs zeigten KdS1 und dKdS1 einen signifikanten Rückgang der CXCL1-Expression und -sezernierung in das Zellkulturmedium. Dezidualisierte St-T1 wiesen dagegen keine Reaktion auf dem MEK1/2-Inhibitor auf. Die Inkubation der Zellen mit dem JNK-Inhibitor zeigte sowohl mit als auch ohne Dezidualisierung eine signifikante Abnahme der CXCL1-Expression (Abb. 46).

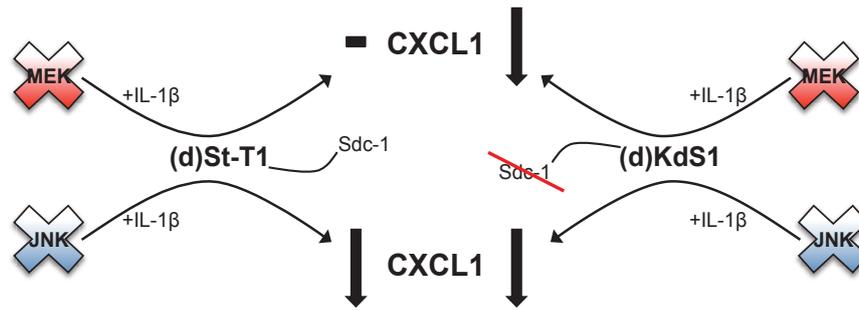


Abb. 46: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der Inhibitorversuche. Sowohl St-T1 als auch dSt-T1 zeigten nach MEK1/2-Inhibitor- (rotes Kreuz) und IL-1 $\beta$ -Inkubation keine Änderung in der CXCL1-Expression (schwarzer Balken). Dagegen wiesen KdS1 und dKdS1 nach Induktion des Sdc-1 *kd* unter gleichen Bedingungen eine Reduktion der CXCL1-Expression auf (schwarzer Pfeil). Die Inhibierung des JNK-Signalwegs (blaues Kreuz) führte bei allen getesteten Zelllinien zu einer Abnahme der CXCL1-Expression (schwarze Pfeile).

### 3.2.2 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten Signalkaskaden während der embryonalen Implantation und vermittelt seine Funktion über die Wnt-Liganden und FZD-Rezeptoren. In diesem Versuchsansatz sollte die Expression der beiden Rezeptoren FZD4 und FZD6 in den dSt-T1 und dKdS1 nach Inkubation der Zellen mit IL-1 $\beta$  und in Abhängigkeit von Sdc-1 proteinbiochemisch untersucht werden. Hierzu wurden die St-T1- und KdS1-Zellen auf 6-well-Platten ausgesät, dezidualisiert und 0 und 48h mit 0,1ng/ml IL-1 $\beta$  inkubiert. Nach der Proteinisolierung erfolgten die WB-Analysen mit den beiden AK für FZD4 und FZD6. Der Dezidualisierungsnachweis wurde mittels PRL-PCR durchgeführt.

Abb. 47 zeigt den Dezidualisierungsnachweis mittels PRL-PCR am Beispiel aller bei den anschließenden FZD4-FZD6-WB-Analysen verwendeten dKdS1-Proben nach 0h IL-1 $\beta$ - (Abb. 47A) und 48h IL-1 $\beta$ -Inkubation (Abb. 47B). Alle verwendeten Proben wurden positiv für PRL-Expression getestet und konnten dadurch als erfolgreich dezidualisiert eingestuft werden (Abb. 47). Der Dezidualisierungsnachweis in den dSt-T1-Zellen verlief analog und wies ebenfalls in allen Proben eine PRL-Expression auf (Daten nicht gezeigt).

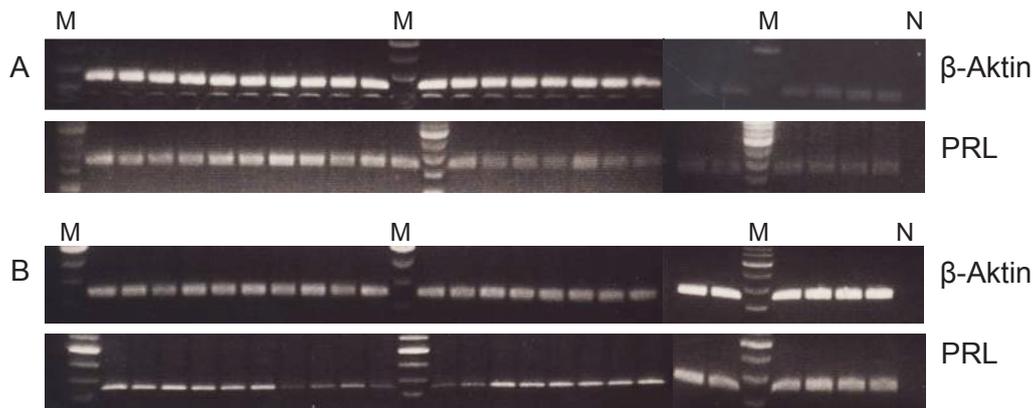


Abb. 47: Dezidualisierungsnachweis mittels PRL-PCR in dKdS1+Tet. Dargestellt ist das Ergebnis der PRL-PCR in 24 Tet-induzierten dKdS1-Proben als Dezidualisierungsnachweis nach 0h IL-1 $\beta$ - (A) und 48h IL-1 $\beta$ -Inkubation (B). M= Standardgrößenmarker; N= Negativkontrolle;  $\beta$ -Aktin-PCR diente als Kontrolle

Die Inkubation der dSt-T1-Zellen mit IL-1 $\beta$  für 48h führte zu einer statistisch signifikanten Zunahme der FZD4-Expression (Abb. 48A). Nach Herunterregulation von Sdc-1 durch Tet-Induktion war die Expression von FZD4 nach IL-1 $\beta$ -Inkubation signifikant niedriger im Vergleich zu der Expression in dKdS1-Zellen ohne IL-1 $\beta$  Zugabe (Abb. 48B). Die Expression von FZD6 wurde in dSt-T1 durch die Inkubation mit dem Embryoimitationsprodukt IL-1 $\beta$  signifikant hochreguliert (Abb. 48C). Der Sdc-1 *kd* hatte keinen signifikanten Einfluss auf die FZD6-Expression in der endometrialen Stromazelllinie (Abb. 48D).

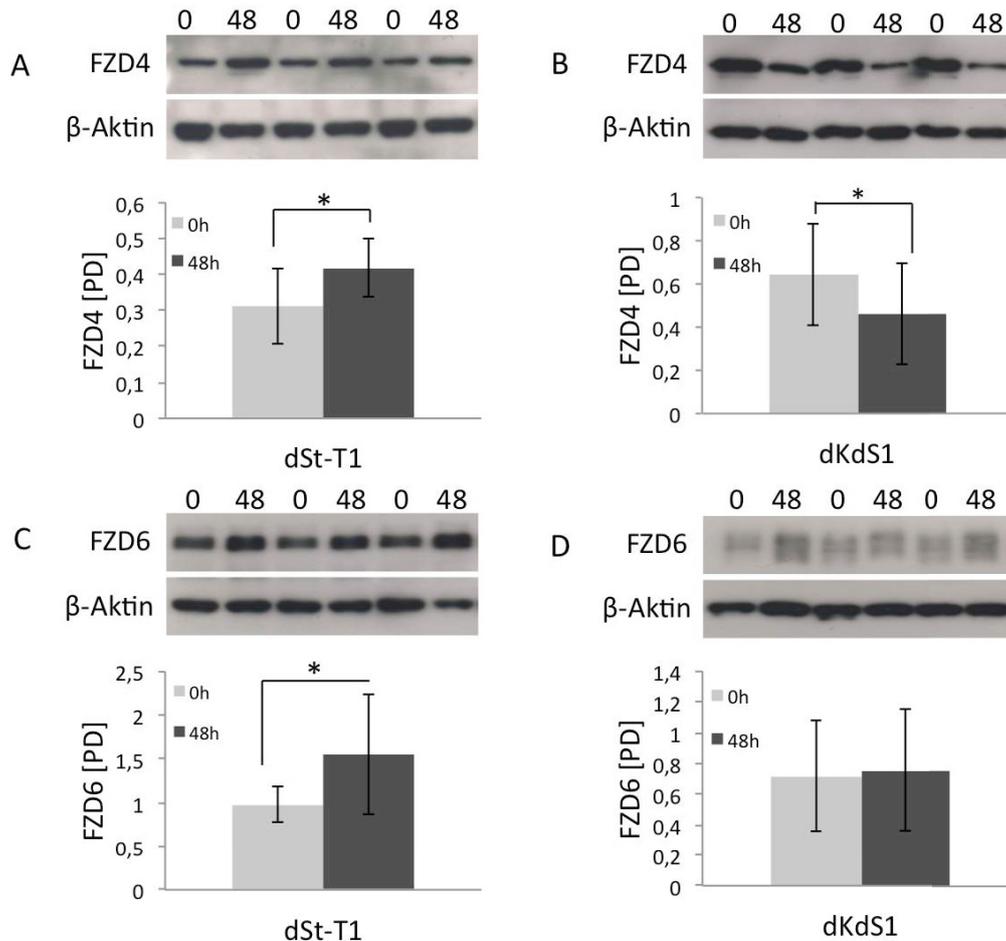


Abb 48: Proteinexpressionsanalyse von FZD4 und FZD6 in dSt-T1 und dKdS1. Dargestellt sind exemplarische WB-Ergebnisse und die korrespondierenden densitometrischen Auswertungen dieser Expressionsanalysen für (A) FZD4 in dSt-T1, (B) FZD4 in dKdS1, (C) FZD6 in dSt-T1 und (D) FZD6 in dKdS1 nach 0 und 48h IL-1 $\beta$ . Aufgetragen wurden 30 $\mu$ g Protein. Aufgezeigt sind die Mittelwerte aus n= 24 +/- STABW, \*p<0,05.

Abb. 49 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der Expressionsanalysen von FZD4 und FZD6 in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 in Abhängigkeit von Sdc-1 schematisch zusammengefasst. IL-1 $\beta$  hatte sowohl die Expression von FZD4 als auch FZD6 in dSt-T1 gesteigert. In dKdS1-Zellen führte der Sdc-1 *kd* zu einer signifikanten Abnahme der FZD4- und zu keiner Änderung in der FZD6-Expression (Abb. 49).

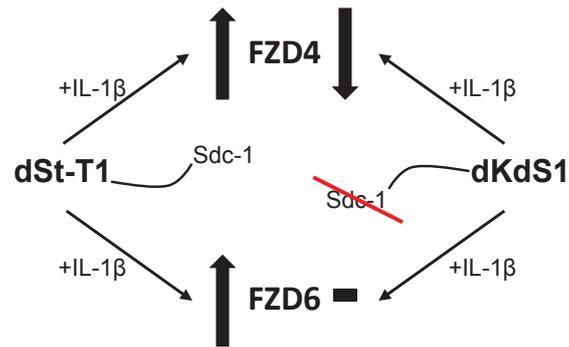


Abb 49: Graphische Zusammenfassung der FZD4- und FZD6- Expressionsanalysen in dSt-T1 und dKdS1 nach 48h IL-1 $\beta$ -Inkubation.

### 3.3 Sphäroide – 3D-Ko-Kultur als Modell für die embryonale Implantation

Die Etablierung eines neuen Implantationsmodells in Form einer 3D-Ko-Kultur aus endometrialen Stromazellsphäroiden und Sphäroiden aus trophoblastären HTR8/SVneo-Zellen in einem hängenden Tropfen stellte den dritten Teil dieser Arbeit dar. Untersuchungen an der embryo-maternalen Schnittstelle sind *in vivo* aus ethischen und rechtlichen Gründen nicht durchführbar, sodass im Laufe der Zeit viele verschiedene Implantationsmodelle für die Erforschung dieses Prozesses etabliert und angewandt wurden. Die meisten dieser Modelle bedienen sich Zellen, Zellaggregaten, in Form von Sphäroiden als Embryosurrogate und zweidimensionalen Zellschichten oder Gelatine-Zell-Gemischen als Anheftungs- und Invasionsmatrix. Das dreidimensionale Modell aus zwei Sphäroiden und ohne zusätzliche Hilfsmittel sollte eine Physiologie-nahe Methode zur Untersuchung der humanen Implantation darstellen.

Eine definierte Zellzahl (20.000 für HTR8/SVneo und 30.000 für St-T1 und KdS1) wurde in 30 $\mu$ l Zellkulturmedium auf die Innenseite eines Petrischalendeckels als Tropfen pipettiert, auf die mit PBS gefüllte Schale gesetzt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48-72h inkubiert. Nach der Sphäroidbildung wurden diese mittels MitoTrackern gefärbt und in verschiedenen Konstellationen miteinander für bestimmte Zeiträume konfrontiert oder ohne Färbung miteinander inkubiert, in Paraffin eingebettet und einer IHC-Färbung unterzogen.

#### 3.3.1 Fluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskop-Aufnahmen

Als Negativkontrollen dienten Konfrontationsversuche mit 2 St-T1-Sphäroiden (Abb. 50), 2 KdS1-Sphäroiden (Anhang 6.3, Abb. 62) und einem St-T1- und einem KdS1-

Sphäroid (Anhang 6.3, Abb. 63). Für die Versuchsdurchführung wurden die Negativkontroll-Ansätze und die Versuchsansätze mit St-T1- und HTR8/SVneo-Sphäroiden und Tet-induzierte KdS1- und HTR8/SVneo-Sphäroiden in einem Tropfen Zellkulturmedium bis zu 48h kultiviert. Die Bildung von Sphäroiden aus dSt-T1 und dKdS1 war nicht möglich.

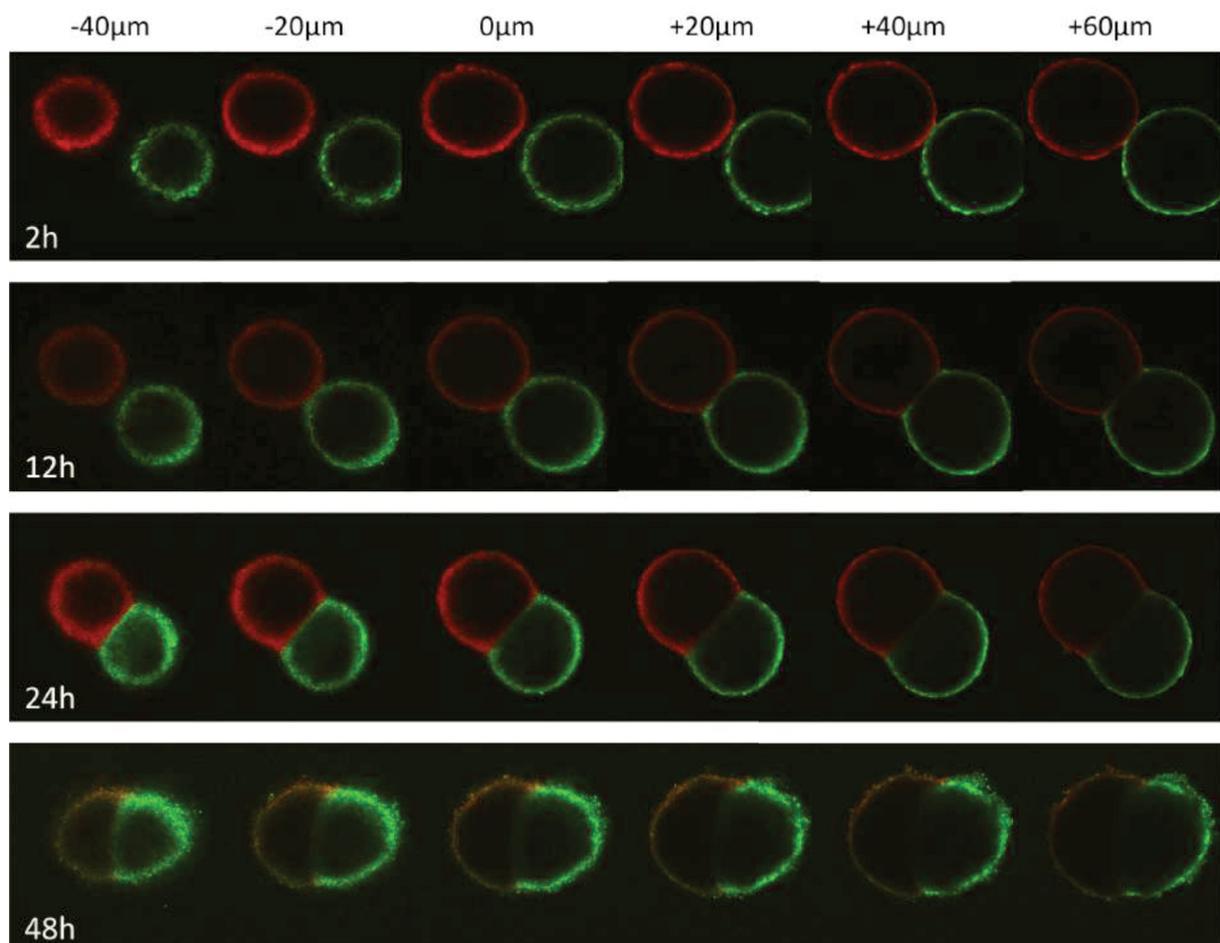


Abb. 50: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit zwei St-T1-Sphäroiden als Kontrolle. Dargestellt sind die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen eines St-T1-St-T1-Sphäroidansatzes bei dem ein St-T1-Sphäroid mit MitoTracker® Green (grün) und ein St-T1-Sphäroid mit MitoTracker® Orange (rot) gefärbt wurde. Gezeigt sind jeweils Serienaufnahmen aus 6 Ebenen (20µm Abstand) und 4 Zeitpunkten (2h, 12h, 24h, 48h). Alle Aufnahmen wurden mit einer 100x Vergrößerung aufgenommen.

Bei der Negativkontrolle St-T1+St-T1, konnte nach 2h Inkubationszeit eine instabile Anlagerung der beiden Sphäroide beobachtet werden (Abb. 50, 1. Reihe). 10 Stunden später wurde die zuvor festgestellte erste Anlagerung bereits zu einer festen Verwachsung der beiden mit verschiedenen MitoTrackern gefärbten Sphäroiden mit

einer deutlich ausgeprägten Grenze an der Schnittstelle (Abb. 50, 2. Reihe). Deutlicher konnte diese Grenze mit einer 400x Vergrößerung des Konfokalmikroskops dargestellt werden (Abb. 52C+E). Diese eindeutige Grenze zwischen den zusammenwachsenden Sphäroiden der Kontrolle blieb trotz voranschreitender Interaktion auch bis nach 48h Kultur bestehen (Abb. 50, 51 und 52G). Die repräsentativen Ergebnisse der Kontrollen aus 2 KdS1-Sphäroiden und einem St-T1- und einem KdS1-Sphäroid sind dem Anhang 6.3 Abb. 62 und 63 zu entnehmen.

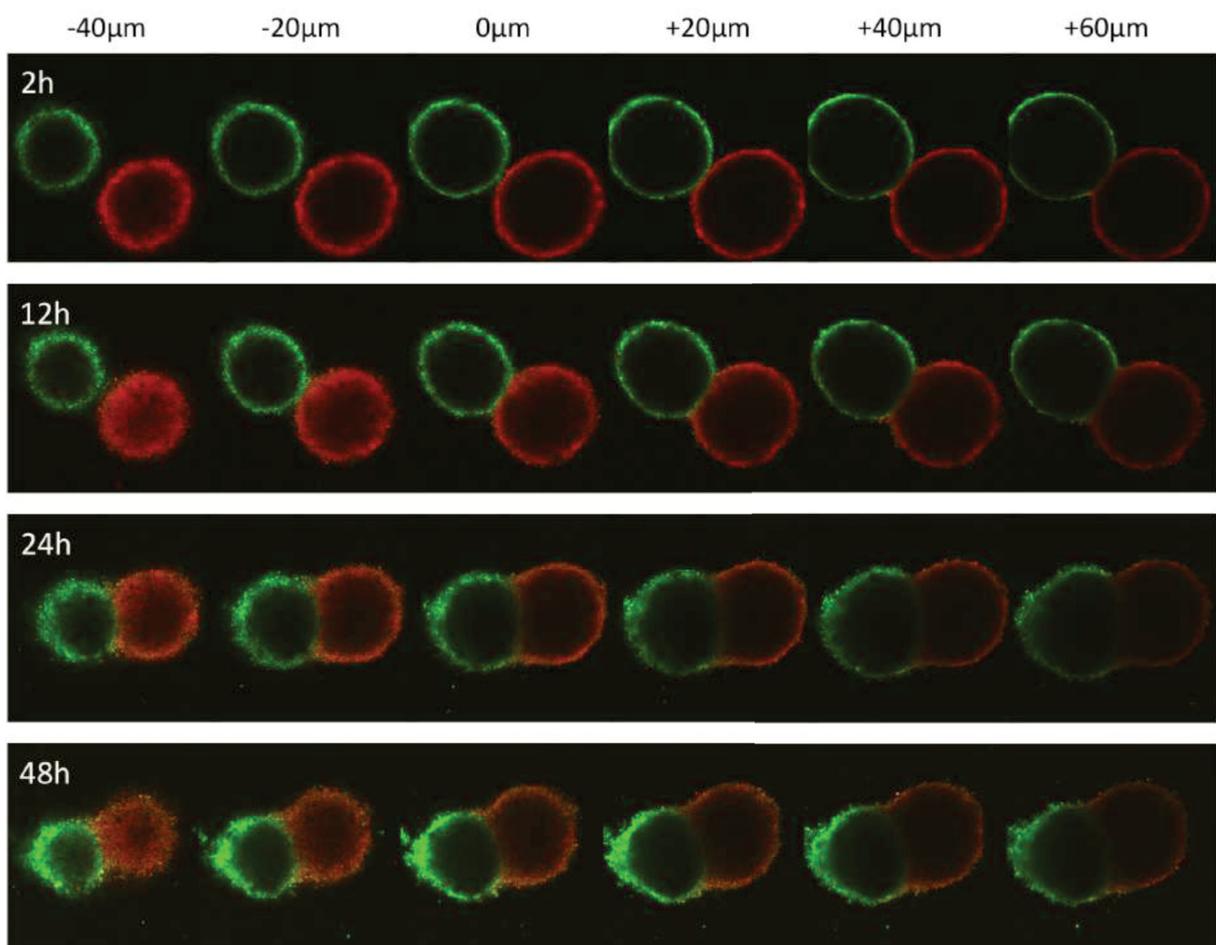


Abb. 51: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuchen mit HTR8/SVneo- und St-T1-Sphäroiden. Dargestellt sind die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen eines HTR8/SVneo-St-T1-Sphäroidansatzes gefärbt mit MitoTracker® Green (St-T1, grün) und MitoTracker® Orange (HTR8/SVneo, rot) in Serienaufnahmen aus 6 Ebenen (20µm Abstand) und 4 Zeitpunkten (2h, 12h, 24h, 48h); Aufnahmen mit 100x Vergrößerung

Abb. 51 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines HTR8/SVneo-St-T1-Konfrontationsversuchs aus insgesamt 3 Versuchen (n=3). Die

Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine Annäherung der Sphäroide nach 2h, die nach 12h bereits in eine leichte Anlagerung überging (Abb. 51, 1. und 2. Reihe). Feste Verwachsungen zwischen dem St-T1-Sphäroid (grün) und dem HTR8/SVneo-Sphäroid (rot) konnten nach 24h Kultur in einem Tropfen Zellkulturmedium beobachtet werden (Abb. 51, 3. Reihe). Die Aufnahmen der Sphäroide nach 48h Konfrontationskultur zeigten ein leichtes Auswandern der HTR8/SVneo-Zellen an der Schnittstelle zum St-T1-Sphäroiden, und ein Wandern um den St-T1-Sphäroid (Abb. 51, 4. Reihe).

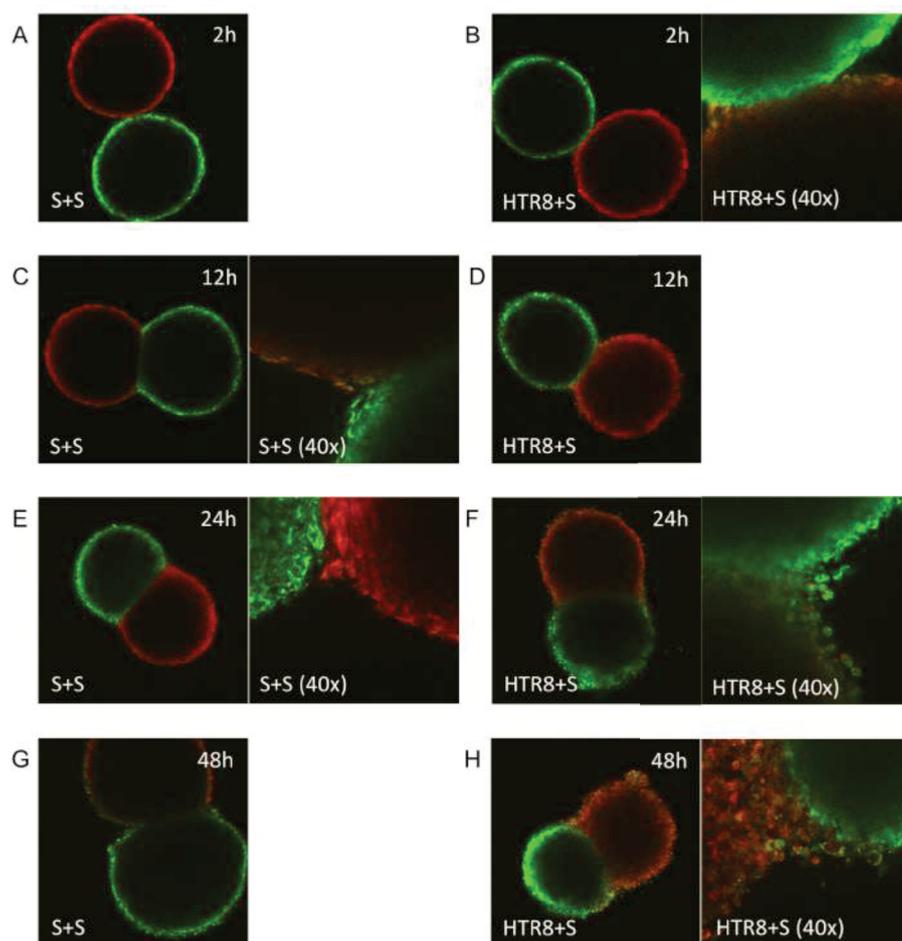


Abb. 52: Gegenüberstellung von repräsentativen Ergebnissen der St-T1+St-T1-Negativkontrolle und der HTR8/SVneo+St-T1-Konfrontationskultur. Dargestellt sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrolle St-T1+St-T1 und des Versuchsansatzes HTR8/SVneo (rot)+St-T1 (grün) der mittleren Schnittebene nach (A+B) 2h, (C+D) 12h, (E+F) 24h und (G+H) 48h mit 100x bzw. 400x Vergrößerung (als 40x Vergrößerung des Objektivs angegeben)

Besonders deutlich konnte dieses Auswandern der Zellen mit einer 400x Vergrößerung dargestellt werden (Abb. 52F+H). Hierbei schienen die HTR8/SVneo-

Zellen einen deutlich aktiveren Part zu spielen im Vergleich zu den St-T1- und KdS1-Zellen, indem sie sich nach der Mobilisierung um den Sphäroiden aus endometrialen Stromazellen anlagerten bzw. sich auf dessen Oberfläche ausbreiteten (Abb. 52H). Jedoch wurden auch freie St-T1-Zellen beobachtet, die sich mit den HTR8/SVneo-Zellen vermischten (Abb. 52F+H).

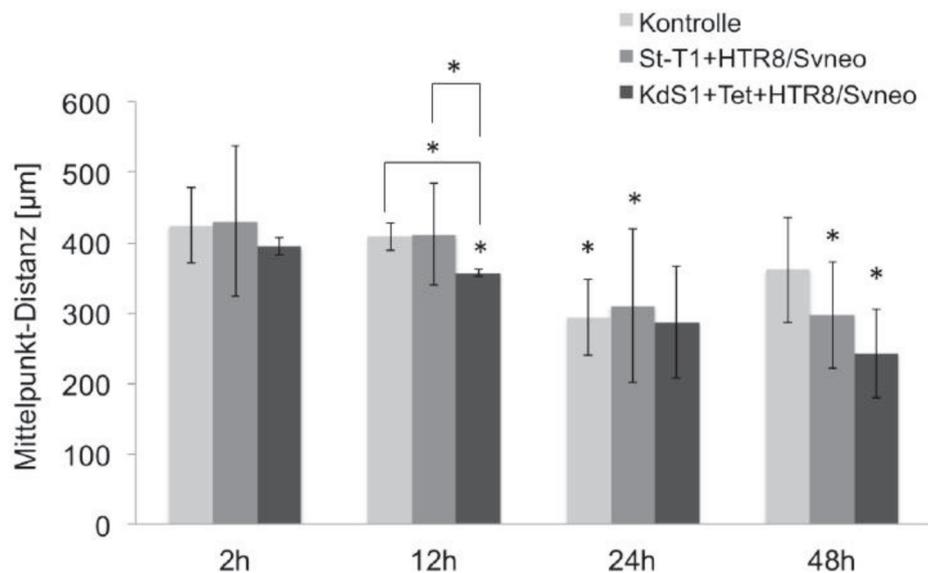


Abb. 53: Ergebnis der Mittelpunkt-Distanzmessungen von Sphäroiden nach Ko-Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte der Mittelpunkt-Distanzen von St-T1+HTR8/SVneo, KdS1+Tet+HTR8/SVneo und Kontrollen, aus 2 St-T1-, 2 Tet-induzierten KdS1-Sphäroiden und einem St-T1- und einem Tet-induzierten KdS1-Sphäroid, nach 2, 12, 24 und 48h Ko-Kultur aus  $n=3 \pm$  STABW mit  $*p<0,05$  für Zeitproben vs. korrespondierenden 2h-Proben bzw. wie angegeben..

Abb. 52 zeigt eine Gegenüberstellung einer Kontrolle aus 2 St-T1-Sphäroiden und eines Versuchsansatzes aus HTR8/SVneo (rot) und St-T1 (grün). Beim direkten Vergleich zeigen sich bis 12h Konfrontationskultur keine Anlagerungs- und Verwachsungsunterschiede zwischen der Negativkontrolle und dem HTR8/SVneo+St-T1-Ansatz (Abb. 52A-D). Ab 24h begann das Auswandern der HTR8/SVneo-Zellen (Abb. 52F+H). Im Gegensatz dazu konnte bei der Kontrolle ein solches Ereignis nicht beobachtet werden (Abb. 52E+G). Die Grenze zwischen den beiden St-T1-Sphäroiden war auch nach 48h deutlich zu erkennen (Abb. 52G). Die Gegenüberstellung der KdS1+KdS1-Negativkontrolle und eines HTR8/SVneo+KdS1-Konfrontationsversuchs ist dem Anhang 6.3 Abb. 63 zu entnehmen.

Die statistische Auswertung der Konfrontationsversuche erfolgte mittels Distanzmessung zwischen den Sphäroidenmittelpunkten. Die Auswertung dieser Messungen ist in Abb. 53 dargestellt. Eine statistisch signifikante Abnahme der Mittelpunkt-Distanz wurde bei der Kontrolle nach 24h Konfrontationskultur im Vergleich zu den 2h-Ergebnissen beobachtet (Abb. 53). Der 48h-Wert zeigte wiederum keine signifikante Änderung der Mittelpunkt-Distanz. Die Ansätze mit St-T1- und HTR8/SVneo-Sphäroiden wiesen ab der Inkubationsdauer von 24h eine signifikante Reduktion der Entfernung der Sphäroidmittelpunkte (Abb. 53). Im Vergleich dazu zeigten KdS1-HTR8/SVneo-Ansätze mit dem *Sdc-1 kd* bereits bei 12h und bei 48h eine signifikante Abnahme der Mittelpunkt-Distanz. Des Weiteren wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und dem KdS1-HTR8/SVneo-Ansatz und dem St-T1-HTR8/SVneo und KdS1-HTR8/SVneo-Ansatz nach 12h Ko-Kultur beobachtet (Abb. 53). Die KdS1-HTR8/SVneo-Ansätze mit aktivem *Sdc-1 kd* wiesen eine signifikant kleinere Mittelpunkt-Distanz zwischen den konfrontierten Sphäroiden, im Vergleich zu der Kontrolle und den St-T1-HTR8/SVneo-Ansätzen auf.

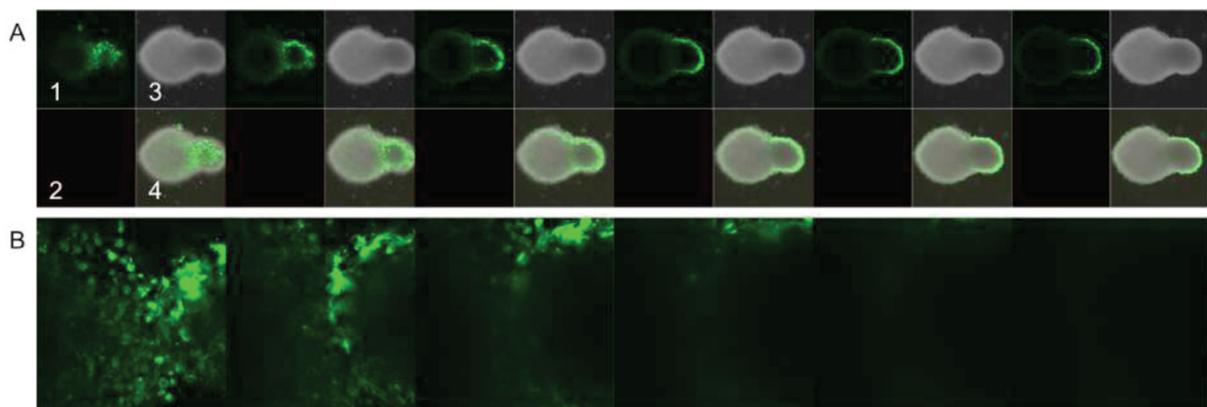


Abb. 54: Ergebnis eines Konfrontationsversuchs mit einem HTR8/SVneo-Sphäroid und einem St-T1-Sphäroid nach 24h. (A) die Fluoreszenzaufnahmen zeigen den Ansatz mit einem ungefärbten HTR8/SVneo-Sphäroiden (großer Sphäroid im Durchlichtbild (3)) und einem gefärbten St-T1-Sphäroiden (grün) und 100x Vergrößerung. 1= Fluoreszenzaufnahme des St-T1-Sphäroiden; 2= Fluoreszenzaufnahme des HTR8/SVneo-Sphäroiden; 3= Durchlichtaufnahme; 4= Abbildungen 1, 2 und 3 überlagert. (B) zeigt die 400x vergrößerte Schnittstelle der beiden Sphäroide.

Das Auswandern der St-T1-Zellen aus dem St-T1-Sphäroiden nach 24h Kultur konnte unter Verwendung nur eines gefärbten Sphäroiden deutlicher dargestellt werden (Abb. 54). Abb. 54 zeigt das Ergebnis einer Konfrontationskultur mit einem

gefärbten St-T1-Sphäroiden (grün) und einem ungefärbten HTR8/SVneo-Sphäroiden (n=2). Hier konnte das Wandern der St-T1-Zellen besonders gut bei der 400x Vergrößerung beobachtet werden (Abb. 54B).

Die Fluoreszenzaufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop waren bedingt durch das Verblässen der MitoTracker® auf 48h begrenzt. Des Weiteren war die oberflächliche Fluoreszenzanregung, die nicht bis in das Innere der Sphäroide durchdrang, ein limitierender Faktor für die Analysen an der Sphäroidschnittstelle. Aus diesen Gründen wurde eine 3D-Sphäroidkultur mit IHC-Detektion statt mikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen etabliert.

### 3.3.2 IHC und Lichtmikroskop-Aufnahmen

Eine deutlich längere Beobachtungszeit der Sphäroid-Konfrontationskultur wurde durch die Kultur der Sphäroide ohne Fluoreszenzfärbung und die anschließende IHC-Färbung der Sphäroide mit anti-Vimentin-AK ausgeführt. Neben der längeren Beobachtungszeit konnte außerdem die Schnittstelle der beiden untersuchten Sphäroide im Innern der Sphäroide mit der Anfertigung von Serienschnitten genauer analysiert werden.

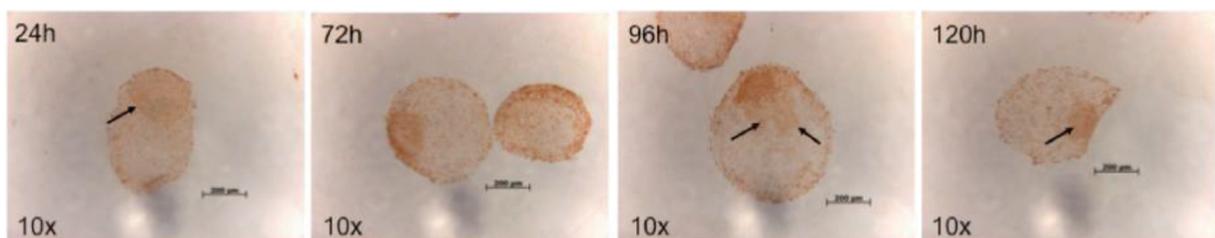


Abb. 55: Repräsentative Ergebnisse der IHC-Färbung von St-T1+HTR8/SVneo-Sphäroiden aus einem Konfrontationsversuch. Die Abb. zeigt die Vimentin-IHC-Färbung nach Konfrontation von St-T1 (klein)- und HTR8/SVneo (groß)-Sphäroid nach 24, 72, 96 und 120h in 100x-Vergrößerung (als 10x Vergrößerung des Objektivs angegeben); die Artefakte in der Mitte des unteren Bildrands sind höchstwahrscheinlich auf Verunreinigungen im Innern des Okulars zurückzuführen, diese konnten weder durch Wechsel der Objektive noch durch andere Einstellungen eliminiert werden.

Abb. 55 und 56 zeigen repräsentative Ergebnisse der Vimentin-IHC-Färbung von St-T1- und HTR/SVneo-Sphäroiden (Abb. 55) und von KdS1- und HTR8/SVneo-Sphäroiden (Abb. 56).

Abb. 55 zeigt das repräsentative Ergebnis einer Vimentin-IHC-Färbung von insgesamt 2 Ansätzen mit jeweils 4-6 Sphäroiden je Zeitpunkt. Nach 24h in der Konfrontationskultur erfolgte das Zusammenwachsen der Sphäroide mit klarer Abgrenzung zwischen St-T1- und HTR8SVneo-Sphäroid (Abb. 55, 24h Pfeil). Weitere 48h später konnte bereits ein leichtes Einwandern des St-T1-Sphäroides in den HTR/SVneo-Sphäroid durch Auswandern der HTR8/SVneo-Zellen, die sich um den St-T1-Sphäroiden anordneten, beobachtet werden (Abb. 55, 72h). Die leichte Einwanderung nahm mit steigender Inkubationszeit deutlich zu, sodass nach 96 und 120h ein, durch HTR8/SVneo-Zellen komplett eingeschlossener St-T1-Sphäroid vorlag (Abb. 55, 96h, 120h, Pfeile). Trotz der leichten unspezifischen Färbung der epithelialen HTR8/SVneo-Zellen durch den Stromamarker Vimentin, konnten die Sphäroide durch ihre Beschaffenheit gut voneinander unterschieden werden.

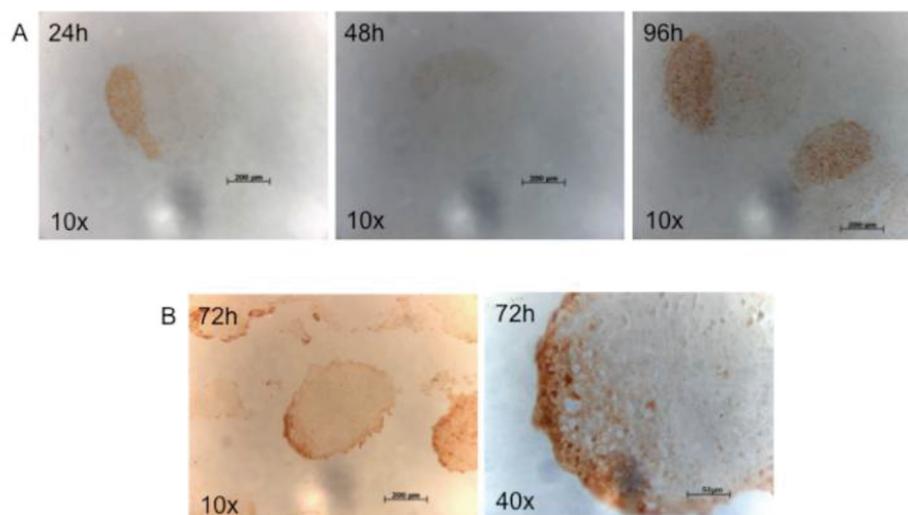


Abb. 56: Repräsentative Ergebnisse der Vimentin-IHC-Färbung von Sphäroiden nach einem Konfrontationsversuch. Dargestellt sind die Ergebnisse der Vimentin-IHC-Färbung nach Konfrontation von KdS1+Tet- und HTR8/SVneo-Sphäroid mit 100x (A+B) und 400x Vergrößerung (B) (als 10x und 40x Vergrößerung des Objektivs angegeben) nach 24, 48, 72 und 96h Inkubation; Beschreibung der Artefakte am unteren Bildrand siehe Abb. 48

St-T1-Sphäroide bildeten eine deutlich kompaktere Struktur aus, sodass sie trotz einer höheren Anzahl an eingesetzten Zellen (30.000) deutlich kleiner waren als die HTR8SVneo-Sphäroide, die aus 20.000 Zellen bestanden. Letztere wiesen eine aufgelockerte Zellstruktur im Innern der Sphäroide auf.

Beim direkten Vergleich der Konfrontationskulturen mit St-T1-+HTR8/SVneo-Zellen und Tet-induzierten KdS1-+HTR8/SVneo-Zellen fiel auf, dass nach 96h Kultur die St-T1-Sphäroide eine deutlich tiefere Invasionstiefe aufwiesen als die KdS1-Zellen (Abb. 55, 96h, Abb. 56A, 96h). Abb. 54B zeigt deutlich, vor allem durch die 40x Vergrößerung, dass kein Umwandern des KdS1-Sphäroiden durch HTR8/SVneo-Zellen erfolgte.

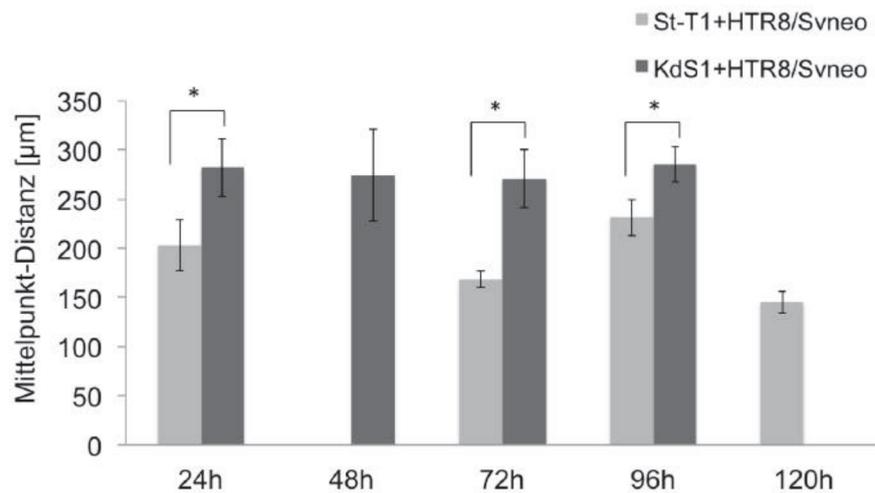


Abb. 57 Auswertung der Mittelpunkt-Distanzmessung der Sphäroid-Ko-Kultur nach IHC-Färbung. Gezeigt sind die mittleren Werte der Messung von Mittelpunkt-Distanzen von St-T1-HTR8/SVneo- und KdS1+Tet+HTR8/SVneo-Ansätzen mit aktivem *Sdc-1 kd* nach 24, 72 und 96h Inkubation aus  $n = 3 \pm$  STABW mit  $*p < 0,05$

Die statistische Auswertung der durchgeführten Konfrontationsversuche mit anschließender IHC-Färbung ist in Abb. 57 gezeigt. Nach 24h Ko-Kultur wurde keine Abnahme der Mittelpunkt-Distanzen gemessen, jedoch wiesen die KdS1+Tet+HTR8/SVneo-Ansätze mit abwesendem *Sdc-1* statistisch signifikant größere Distanzen zwischen den Sphäroidmittelpunkten im Gegensatz zu den St-T1-HTR8/Svneo-Proben auf.

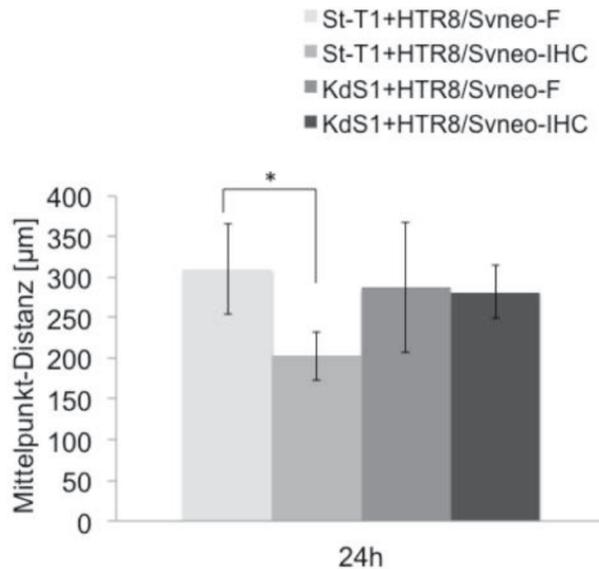


Abb. 58: Gegenüberstellung von Fluoreszenz (F)- und IHC-gefärbten Sphäroid-Ko-Kulturen nach 24h. Dargestellt sind die Mittelpunktdistanzen von St-T1-HTR8/SVneo- und KdS1+Tet-HTR8/SVneo-Ansätzen nach Färbung mit MitoTracker® und IHC-Färbung nach 24h; Mittelwerte aus  $n=3$  +/- STABW mit  $*p<0,05$

Bei der Gegenüberstellung von Fluoreszenz- und IHC-gefärbten Konfrontationskulturen wurde eine statistisch signifikante kleinere Distanz der Mittelpunkte zwischen St-T1- und HTR8/SVneo-Sphäroiden nach IHC-Färbung im Gegensatz zu MitoTracker®-gefärbten Sphäroiden beobachtet (Abb. 58). Keinen Unterschied zwischen den Mittelpunktdistanzen wiesen KdS1-HTR8/SVneo-Ansätze mit vorheriger Fluoreszenz- im Vergleich zu den KdS1-HTR8/SVneo-Ansätzen mit nachträglicher IHC-Färbung auf.

Eine Kontrolle in Form von Konfrontation von 2 St-T1-, 2 KdS1-Sphäroiden oder einem St-T1- und einem KdS1-Sphäroid war bei den IHC-Ansätzen nicht möglich, da die Unterscheidung der beiden Sphäroide durch Vimentin-Expression nicht gegeben war.

### 3.4 Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus

Mit der Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus beschäftigt sich der vierte und letzte Teil der Arbeit. Die für diese Arbeit vorgesehenen initialen Charakterisierungsversuche sollten einen ersten Überblick über den Phänotyp und das reproduktive Verhalten der Sdc-1-defizienten Mäuse verschaffen und damit die Basis für eine tiefgreifende Analyse der Sdc-1-Funktionen in der Maus legen.

Hierzu wurden 5 Verpaarungsversuche durchgeführt, bei denen ko-Weibchen mit ko-Männchen und WT (C57Bl/6)-Weibchen mit WT (C57Bl/6)-Männchen ü. N. verpaart

wurden (Tab. 20). Das Gewicht der Weibchen wurde vor der Verpaarung und jeden vierten Tag nach der Verpaarung kontrolliert und protokolliert (Abb. 60).

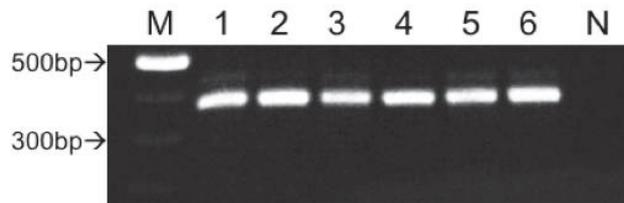


Abb. 59: Sdc-1-ko-Nachweis mittels PCR aller zu Beginn der Zucht vorhandenen Sdc-1-ko-Mäuse; 1-3 Sdc-1-ko-Weibchen; 4-6 Sdc-1-ko-Männchen; N= H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle

Vor Beginn der Verpaarungsversuche wurden alle Sdc-1-ko-Tiere einem Sdc-1-ko-Nachweis unterzogen (Abb. 59). Alle untersuchten Tiere wiesen einen Sdc-1 ko auf. Dies zeigte sich durch das Auftreten einer 450bp großen Bande nach der gelelektrophoretischen Auswertung der PCR-Produkte.

Tab. 20: Übersicht über die verpaarte Tieranzahl, Trächtigkeitsraten, Anzahl der Jungtiere und die Durchschnittswurfgröße

	<b>Sdc-1-ko</b>	<b>C57Bl/6</b>
Gesamtzahl verpaarter Weibchen	47	32
davon trächtig	8 (17,02%)	6 (18,75%)
Jungtiere	51	36
verstorbene Jungtiere (7d post partum (pp))	17 (33,3%)	6 (16,7%)
Durchschnittswurfgröße	7,3	7,2

Die Gesamtzahl der verpaarten Sdc-1-ko-Weibchen betrug 47 und 32 bei den WT-Weibchen. Die Trächtigkeitsrate betrug bei den Sdc-1-ko-Tieren 17,02%, somit wurden 8 von 47 Weibchen innerhalb von 5 Verpaarungsversuchen trächtig. Bei den WT-Tieren wurden 6 Weibchen von 32 verpaarten trächtig. Hier lag die Trächtigkeitsrate bei 18,75% (Tab. 20). Von den 51 geworfenen Jungtieren in der Sdc-1-ko-Gruppe verstarben 17 (33,3%) innerhalb der ersten 7 Tage pp. Auf der WT-Seite wurden 36 Jungtiere geworfen und 6 (16,7%) tote Tiere wurden in den ersten 7 Tagen pp detektiert. Damit lag die Rate der gestorbenen Jungtiere bei den WT-Mäusen deutlich niedriger im Vergleich zu den Sdc-1-ko-Mäusen. Die Durchschnittswurfgröße war bei beiden Mausstämmen ähnlich und betrug 7,3 Jungtiere/Wurf bei den Sdc-1-ko-Tieren und 7,2 Jungtiere/Wurf bei den WT-Tieren (Tab. 20).

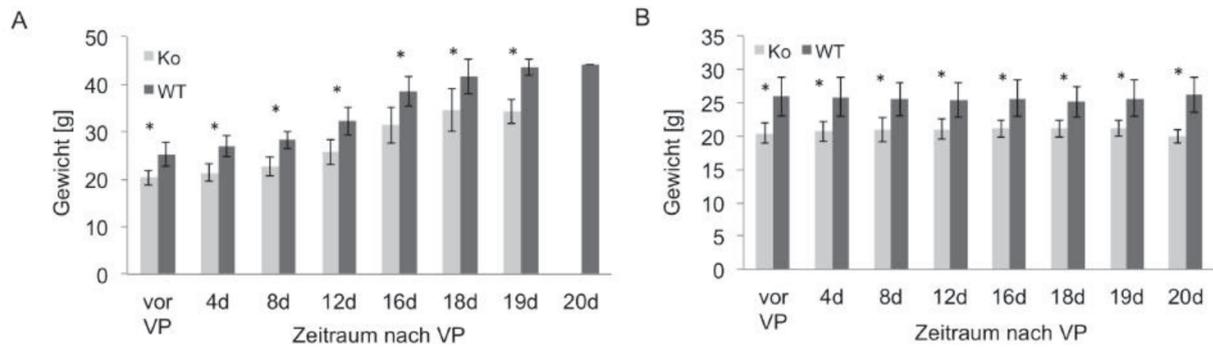


Abb. 60: Ergebnis der Gewichtsbestimmung der Weibchen vor und nach der Verpaarung (VP). Dargestellt sind die Mittelwerte der Gewichtsbestimmung für (A) trächtige Weibchen aus  $n=7$  (*Sdc-1-ko*, hellgraue Säulen) und  $n=5$  (WT, dunkelgraue Säulen)  $\pm$  STABW und für (B) nicht-trächtige Weibchen aus  $n=27$  (*Sdc-1-ko*, hellgraue Säulen) und  $n=19$  (WT, dunkelgraue Säulen)  $\pm$  STABW,  $*p<0,05$

Die Ergebnisse der Gewichtsbestimmung der Weibchen vor und nach der Verpaarung sind in Abb. 60 dargestellt. Sowohl die Gewichtszunahmen der trächtigen als auch die Gewichte der nicht-trächtigen *Sdc-1-ko*-Weibchen waren signifikant niedriger als die Gewichte der WT-Tiere (Abb. 60). Der Gewichtsunterschied betrug 16,1-25,7%.

Neben der Bestimmung der Wurfgröße (Tab. 20) wurden die Jungtiere ab dem ersten Tag *pp* einer Gewichtskontrolle unterzogen. Die Gewichtsbestimmung erfolgte jeden 3. Tag bis Tag 100. Beim Betrachten der Ergebnisse der Jungtiere fiel auf, dass sich der bei den Muttertieren bereits dokumentierte Gewichtsunterschied auf die Jungtiere übertrug (Abb. 60A).

Der signifikante Gewichtsunterschied zwischen *Sdc-1-ko*- und WT-Tieren am ersten Tag *pp* betrug 6,7% und stieg bis einschließlich Tag 21 auf 23-24,5% (Abb. 61A). Ab Tag 24 erfolgte die Gewichtsbestimmung geschlechtsspezifisch (Abb. 61B). *Sdc-1-ko*-Weibchen blieben bis Tag 100 signifikant leichter als die altersgleichen WT-Tiere mit einem Gewichtsunterschied von 21,5-13,7% mit abnehmender Tendenz bis Tag 48 und ab Tag 48 11,1-16,3% mit wieder leicht steigender Tendenz (Abb. 61B). Bei den *Sdc-1-ko*-Männchen gab es keine Schwankungen in der Gewichtsdivergenz zu den WT-Männchen wie bei den Weibchen. Hier nahm der Gewichtsunterschied von Tag 24 bis Tag 100 kontinuierlich ab und betrug 24,8-14,6% (Abb. 61B).

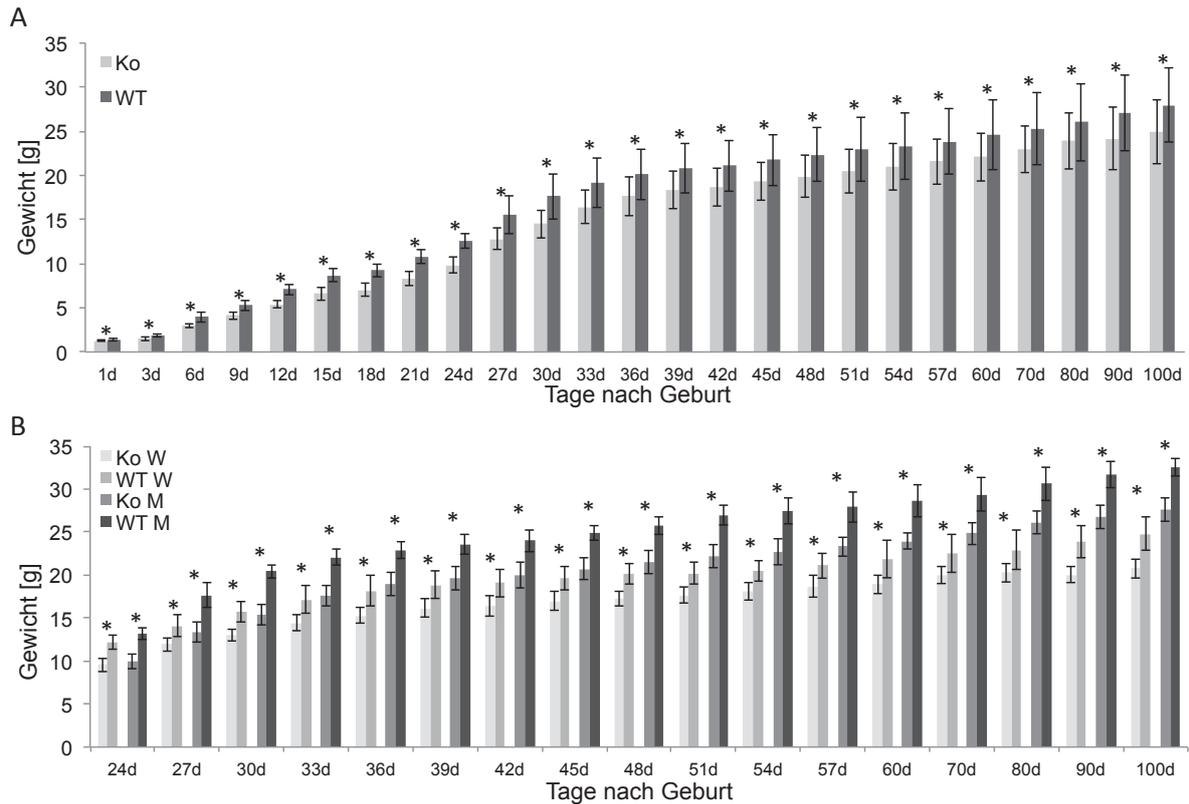


Abb. 61: Gewichtsbestimmung der *Sdc-1-ko*- und WT-Jungtiere. Gezeigt sind die Mittelwerte der Gewichtsbestimmung von *Sdc-1-ko*-Jungtieren aus  $n= 51 \pm$  STABW und WT-Jungtieren aus  $n= 25 \pm$  STABW ab der (A) Geburt bis 100d (*Sdc-1-ko* hellgraue Säulen, WT dunkelgraue Säulen) und (B) ab dem 24. d bis 100. d mit Geschlechtertrennung (*Sdc-1-ko*-Weibchen schwach hellgraue Säulen, WT-Weibchen hellgraue Säulen, *Sdc-1-ko*- Männchen mittelgraue Säulen, WT-Männchen dunkelgraue Säulen),  $*p < 0,05$

Folglich wiesen *Sdc-1-ko*- und WT-Tiere ähnliche Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen auf, jedoch starben während der ersten 7 Tage *pp* signifikant mehr *Sdc-1-ko*-Jungtiere als WT-Jungtiere. Der *Sdc-1 ko*-bedingte Gewichtsunterschied von *Sdc-1-ko*-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren wurde auf die Jungtiere übertragen und blieb die ersten 100 Tage bestehen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Generierung einer stabilen induzierbaren CXCR2-*kd*-Zelllinie

Die erfolgreiche Implantation eines Embryos in das mütterliche Endometrium ist von einem sensiblen embryo-maternalen Dialog abhängig. Dieser Dialog besteht aus einem Netzwerk diverser Faktoren, wie Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und deren Rezeptoren.<sup>9,11,12</sup> Ein besonders wichtiges Chemokin aus der Familie der Zytokine ist CXCL1.<sup>54,61</sup> Laut Literatur besitzt CXCL1 einen Chemokin-Hauptrezeptor, CXCR2 und einen Ko-Rezeptor Sdc-1.<sup>30,43</sup> Die CXCR2-Expression im Endometrium wurde in der Literatur bereits mehrfach gezeigt<sup>50,71,208</sup> und auch in der Dezidua nachgewiesen.<sup>209</sup> Speziell im endometrialen Stroma schwankt dabei das angegebene Expressionslevel von CXCR2 stark.<sup>69,70,208</sup> Ein CXCR2 *kd* wurde bereits in Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*), humanen Melanomzellen (A375-SM), Mammakarzinomzellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (*human microvascular endothelial cells, HMEC-1*) mit Folgen wie Zytoskelettremodellierung, Hemmung der Metastasierung, Inhibierung der Zellproliferation, Migration und Invasivität von Melanomzellen und Endothelzellen erfolgreich durchgeführt.<sup>195,210,211</sup> In dieser Arbeit wurde versucht, einen stabilen und induzierbaren CXCR2 *kd* in der immortalisierten endometrialen Stromazelllinie St-T1 zu generieren. Die dezidualisierbare Zelllinie ging aus humanen endometrialen Fibroblasten hervor, die mit einem Simianvirus-40 *large T*-Antigen transfiziert und folglich immortalisiert wurden.<sup>167</sup> Die Transfizierbarkeit dieser Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits durch die Generierung der Sdc-1-*kd*-Zelllinie KdS1 erfolgreich getestet.<sup>43</sup> Das dabei angewandte Verfahren der RNA-Interferenz wurde auch zum Generieren der *kd* CXCR2-Zelllinien benutzt. Die bereits für den Sdc-1 *kd* auf der Basis der St-T1-Zellen hergestellten Tet-Repressor-exprimierenden Zelllinien Nano und Amaxa<sup>43</sup> wurden mit 6 verschiedenen CXCR2*sh*RNA mittels Nukleofektion transfiziert und die erfolgreich transfizierten Zellklone mit Hilfe von Zeocin selektiert. Aus den 5 durchgeführten Transfektionen sind insgesamt 89 *kd*CXCR2-Zellklone hervorgegangen. Alle generierten Zellklone konnten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgreich in Kultur gehalten werden und wurden nach Tet-Induktion auf den CXCR2 *kd* untersucht. Standard-PCR, qRT-PCR, IHC- und IF-Färbungen waren die initial eingesetzten Methoden zum *kd* Nachweis. Die Analyse aller

*kdCXCR2*-Zellklone mittels PCR und qRT-PCR brachte keinen Aufschluss darüber, ob der *kd* erfolgreich durchgeführt wurde, denn alle PCR-Ergebnisse zeigten ein variierendes Bandenmuster ohne Reproduzierbarkeit. Trotz standardisierter Versuchsdurchführung fiel in individuell ausgesuchten, mehrfach hintereinander untersuchten Proben die CXCR2-Amplifikation von Ansatz zu Ansatz unterschiedlich aus. Auch der *kdCXCR2*-Nachweis mittels qRT-PCR und *nested* PCR – einer Kombination aus Standard-PCR und qRT-PCR – brachte kein zufriedenstellendes Ergebnis. Hierbei konnte CXCR2 nur in den Positivkontrollen mit der cDNA aus MNC amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die IHC- und IF-Färbungen eine niedrige CXCR2-Expression in allen getesteten Zellklonen ohne signifikanten Unterschied zwischen Tet-induzierten und nicht induzierten putativen *kdCXCR2*-Zellen. Die IHC-Färbungen von endometrialem Gewebe wiesen eine schwache stromale und eine moderate epitheliale und vor allem glanduläre Expression auf. Die WB-Analyse mehrerer *kdCXCR2*-Zellklone zeigte keine CXCR2-Detektion mit dem in den IHC-Versuchen eingesetzten AK. Das beobachtete Bandenmuster wies auf eine unspezifische Bindung des AK hin. Jedoch deutete die ca. 100 kDa große Bande, die die einzige Bande in der MNC-Kontrolle darstellte und auch in den untersuchten *kdCXCR2*-Klonen neben weiteren Banden auftrat, auf eine Dimerisierung der CXCR2-Moleküle hin. Die Homo- und Heterodimerbildung ist eine Eigenschaft von mehreren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die vor allem bei Abwesenheit eines Liganden auftritt.<sup>39,212</sup> Die Verwendung eines weiteren anti-CXCR2-AK und Protein aus PSZ führte zu einer auf den ersten Blick erfolgreichen Detektion von CXCR2. Die massenspektrometrische Sequenzierung der bei der WB-Analyse detektierten Proteinbande wies jedoch keine CXCR2-Proteinfragmente auf, sodass sich die WB-Analyse hier als ungeeignete Methode für den CXCR2-*kd*-Nachweis erwies. Diese stark variierenden Ergebnisse decken sich mit den recherchierten, konträren CXCR2-Expressionen im humanen Endometrium.<sup>69,208,209</sup> Dies könnte zum einen auf das Verwenden von Zelllinien und primärem endometrialen Gewebe, unspezifischen AK-Bindungen und/oder unterschiedlichen Versuchsdurchführungen zwischen den Studien zurück zu führen sein. Eine Hochregulation der CXCR2-Expression in der verwendeten St-T1 Stromazelllinie konnte weder durch Dezidualisierung noch durch Inkubation mit dem Embryosekretionsprodukt IL-1 $\beta$ , wie unsere Arbeitsgruppe für den CXCR2-Liganden CXCL1 bereits zeigen konnte, induziert werden.<sup>111</sup> Ebenfalls ohne positive Wirkung auf die CXCR2-Expression blieb die Kultur der Stromazellen

unter hypoxischen Bedingungen und nach Inkubation mit der chemischen Hypoxiechemikalie  $\text{CoCl}_2$ .<sup>205</sup> Die Hypoxie-regulierte Expressionssteigerung konnte neben CXCR2 auch für CXCR1 und CXCR4 in Melanom- und Prostatakrebszellen beobachtet werden.<sup>68,213</sup> In dieser Arbeit konnte die CXCR4-Expression auch in St-T1-Zellen erfolgreich durch Hypoxiebehandlung induziert werden. Im Gegensatz dazu konnte die CXCR2-Expression in der St-T1-Zelllinie nicht durch Hypoxie reguliert werden trotz der im humanen Uterus physiologisch vorherrschenden sauerstoffarmen Atmosphäre.<sup>2</sup> Hierbei scheint die Induktion der Expression von CXCR4 und CXCR2 über verschiedene Signalwege abzulaufen oder es handelt sich um eine zelltypspezifische Expression. HIF aktiviert eine extensive Transkriptionskaskade, die 500 direkte Transkriptions-*targets* besitzt und mit anderen Signalwegen und RNA-Protein-Transkriptionskontrollsystemen interagieren kann.<sup>214</sup> CXCR2 gehört entweder nicht zu den HIF-1 $\alpha$  regulierten Genen oder wird in der St-T1-Zelllinie gar nicht exprimiert, sodass die Inkubation von St-T1-Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu keiner Expressionssteigerung von CXCR2 führen konnte.

Trotz vielfältiger Methoden und einer Vielzahl an Wiederholungen der durchgeführten Versuche konnte keine konkrete Aussage weder über die CXCR2-Basisexpression in der St-T1-Zelllinie noch über den CXCR2 *kd* gemacht werden. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die CXCR2-Expression in der St-T1- und den *kd*CXCR2-Zellklonen mit Hilfe einer noch sensitiveren Methode bestimmt. Der QGP Assay ist ein Hybridisierungs-basiertes Verfahren, das sich der magnetischen xMAP<sup>®</sup>-Luminex<sup>®</sup>-Beads-Technologie bedient, um simultan bis zu 80 mRNA-Ziele quantitativ auswerten zu können. Hierbei kann bereits eine mRNA-Kopie in der Zelle durch eine 2.400x Signalamplifikation detektiert werden. Mittels eines Vorversuchs, bei dem Zellzahlen zwischen 2.000 und 20.000 getestet wurden, wurde die Zellzahl auf die höchstmögliche Zellzahl von 80.000 pro Probe festgesetzt, da der Vorversuch gezeigt hat, dass einige untersuchte Gene ein sehr niedriges Expressionslevel aufwiesen. Neben der Detektion von CXCR2 wurde auch die Expression von Sdc-1, CXCL1, VEGFA, MMP7 und MMP9 in St-T1-, T-HESC-, KdS1-, PSZ-Zellen und 3 *kd*CXCR2-Zellklonen untersucht (Diskussion der neben CXCR2 untersuchten Gene siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2).  $\beta$ -Aktin, HPRT1, PPIB und RPL19 dienten als *housekeeping* Gene und wurden bei der Auswertung des Assay für die Normierung der Werte eingesetzt. Sowohl bei dem Probelauf als auch bei dem anschließenden

Hauptversuch wurde in allen Proben, mit Ausnahme der Positivkontrolle (MNC), ein CXCR2-Level beobachtet, das sich unter der Detektionsgrenze von 0,0125MFI des QGP Assay befand. Bei 80.000 eingesetzten Zellen pro Probe wurden MFI-Werte von etwa 0,001 bis 0,0045 erreicht, das entspricht ca. 80 bis 360 CXCR2 mRNA-Kopien pro Gesamtprobe. Damit wies im Durchschnitt jede 200.-1.000. eingesetzte Zelle eine CXCR2 mRNA-Kopie auf. Im Vergleich dazu wurden beim *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin rechnerisch zwischen 5 und 9 mRNA-Kopien pro Zelle detektiert. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass die endometriale Stromazelllinie St-T1 eine äußerst niedrige bis keine CXCR2-Expression aufweist. An dieser Stelle stellt sich die Frage: Warum hat ein in der St-T1-Zelllinie detektierbarer Ligand wie CXCL1, dessen Expression durch IL-1 $\beta$  stark hochreguliert werden kann, keinen korrespondierenden Rezeptor auf der gleichen Zelllinie? Und welche Bedeutung hat das für den Implantationsprozess? In die humane embryonale Implantation sind neben diversen Faktoren, Rezeptoren und Signalwegen auch eine Reihe verschiedener Zelltypen involviert. Neben Stromazellen ist das humane Endometrium aus Epithel- und Drüsenzellen aufgebaut, die miteinander interagieren. Des Weiteren sind am Implantationsprozess verschiedene Zellen des Embryos und zirkulierende Leukozytenzellen, wie uNK-Zellen, beteiligt. Alle diese Zelltypen können miteinander molekular kommunizieren und ein Netzwerk, das die embryonale Implantation reguliert, ausbilden, sodass einzelne Zelltypen nicht isoliert betrachtet werden dürfen. Das im Stroma exprimierte CXCL1 könnte keinen direkten Einfluss auf das Stroma haben, sondern als ein Kommunikationsmolekül zwischen Embryo und Endometrium fungieren. Hinweise darauf gibt die Lokalisation von CXCR2 auf nahezu allen Immunzellen, Leukozyten, Monozyten, Mastzellen, Neutrophilen, T- und NK- und auch auf Trophoblastzellen.<sup>38,209</sup> Auch endometriale Epithel- und Drüsenzellen könnten das Ziel des im Stroma exprimierten CXCL1 sein, denn auch diese Zellen weisen eine CXCR2-Expression auf. Möglicherweise könnte der Prozess folgendermaßen ablaufen: Nach der erfolgreichen Fertilisation der Oozyte und dem Transport in die Uterushöhle sezerniert der Embryo unter anderem IL-1 $\beta$ , das anschließend im endometrialen Stroma eine Antwort in Form einer Hochregulation der CXCL1-Expression induziert. Die sezernierten CXCL1-Moleküle könnten im Anschluss durch die Bindung an CXCR2 Signalwege aktivieren, die essentielle Implantationsprozesse regulieren, wie z. B. die Rekrutierung von Immunzellen. Die Migration von Leukozyten – hauptsächlich uNK-Zellen - an die embryo-maternale

Schnittstelle ist ein überaus wichtiger Prozess bei der Implantation.<sup>27</sup> Hierbei steigert die hohe Anzahl an Immunzellen das mütterliche Toleranzpotential gegenüber dem semi-allogenen Embryo und ermöglicht ihm dadurch die Invasion in die Dezidua ohne Aktivierung einer Embryo-feindlichen Immunabwehr. Die größte Dichte an uNK-Zellen und Makrophagen wurde im Menschen genau an der Appositionsstelle des Trophoblasten und in 20µm Umkreis gefunden.<sup>215</sup> Ein atypisches Leukozytenlevel ist häufig mit Implantationsversagen und habituellen Aborten assoziiert<sup>74,216</sup> und ist Bestandteil der diagnostischen Untersuchung bei ART-Patientinnen nach mehreren fehlgeschlagenen Behandlungen.<sup>217</sup> Neben der chemoattraktiven Wirkung auf Zellen kann die ELR<sup>+</sup>-CXCL1-CXCR2-Interaktion auch Vorgänge wie Angiogenese und Vaskulogenese modulieren.<sup>23</sup> Störungen beim Etablieren einer adäquaten Blutversorgung können zu ernsten klinischen Konsequenzen, wie einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) führen.<sup>218</sup> Präeklampsie, Anämie und andere Hypoxie-bedingte Umstände konnten ebenfalls mit einer unzureichenden Angiogenese in Verbindung gebracht werden.<sup>219</sup> Die Regulation der Angiogenese durch CXCL1 könnte über die uNK-Zellen ablaufen, die möglicherweise mit Hilfe ihres an der Zelloberfläche exprimierten CXCR2 an ihren Zielort rekrutiert werden und dort Angiogenese-induzierende Zytokine sezernieren.<sup>220</sup> In der Dezidua aber auch im nicht-schwangeren Endometrium konnte die Angiogenese-Regulation über uNK-Zellen nachgewiesen werden.<sup>221</sup> Eine zu hohe uNK-Zellkonzentration kann zu einer verstärkten Angiogenese und dadurch zu einer überdurchschnittlichen Durchblutung des Endometriums führen, die als Folge eines oxidativen Stresses in einem Verlust der Schwangerschaft enden kann.<sup>221</sup>

Neben der Hypothese, dass das im endometrialen Stroma exprimierte CXCL1 seine Funktionen wegen des fehlenden Rezeptors nicht im Stroma, sondern den umliegenden Zellen induziert, wäre es außerdem denkbar, dass es mindestens einen weiteren CXCL1-Rezeptor im Stroma gibt. Hinweise darauf geben Untersuchungen am viralen Chemokinliganden 1 (vCXCL1). Calciummobilisierungsanalysen haben gezeigt, dass vCXCL1 zwar mit einer deutlich höheren Affinität an den humanen CXCR2 bindet, jedoch auch in der Lage ist, CXCR1 zu aktivieren. Weitere 16 humane Chemokinrezeptoren wurden durch vCXCL1 weder aktiviert noch geblockt.<sup>222</sup> Neuste Studien geben CXCR1 daher bereits als zusätzlichen klassischen CXCL1-Rezeptor in Mensch und Maus an<sup>206,207</sup>, wobei Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt haben, dass CXCR1, ähnlich CXCR2, kaum bis gar nicht in der

endometrialen Stromazelllinie St-T1 exprimiert wird. Eine detektierbare CXCR1-Expression konnte nur in endometrialem Gewebe und der MNC-Positivkontrolle nachgewiesen werden. Jedoch wurde die CXCR1-Expression in dieser Studie nicht unter der Inkubation mit Stimulantien, wie IL-1 $\beta$  und entzündlichen Faktoren in St-T1-Zellen untersucht, sodass hier noch die Möglichkeit besteht, CXCR1 als allgemein weiteren CXCL1-Rezeptor, oder einzigen CXCL1-Rezeptor in endometrialen Stroma zu identifizieren. In humanen polymorphnukleären Zellen wurde CXCR1 neben CXCR2 bereits als CXCL1-Rezeptor beschrieben<sup>206</sup>, daneben wurde eine Involvierung von CXCR1 in pro-angiogenetischen Vorgängen in humanen primären Endothelzellen und chemoattraktiven Prozessen mit humanen Monozyten und B-Zellen gezeigt.<sup>223</sup> Aktuelle Studien zeigen eine CXCR1-Expression auf Neutrophilen und Knorpelzellen und eine Rolle von CXCR1 im Pankreaskarzinom und bei Bluthochdruck.<sup>224–227</sup> Diese starke Diversität deutet auf eine zell- bzw. organspezifische Funktion von CXCR1 hin. Ähnlich dem Sdc-1 bei CXCR2 könnte auch die Aktivität von CXCR1 durch Ko-Rezeptoren, möglicherweise Syndecane unterstützt werden.<sup>228</sup>

Die Expression von CXCR2 auf der Oberfläche von Granulozyten, Leukozyten, Monozyten, Mastzellen, T-, NK-Zellen und Neutrophilen<sup>38</sup> sowie die große Vielfalt an CXCR2-gesteuerten Vorgängen wie Inflammation, Wundheilung, Angiogenese, Karzinomprogression, Metastasierung<sup>229</sup>, Neutrophilenrekrutierung<sup>230</sup> und die Rolle bei Autoimmunerkrankungen<sup>231</sup> deuten auf viele unterschiedliche organspezifische Funktionen des Rezeptors CXCR2 hin. Die aktuellsten Studien analysierten die Bedeutung von CXCR2 in Atherosklerose<sup>231</sup>, Leberkarzinom<sup>232</sup>, Inflammation<sup>233</sup>, Rückenmark<sup>234</sup>, pluripotenten Stammzellen<sup>235</sup>, Lungen- und Darmkarzinom<sup>236,237</sup> und belegen noch mal die vielfältigen Funktionen von CXCR2. Die endometrialen Stromazellen scheinen zu den wenigen Zelltypen zu gehören, die kein CXCR2 exprimieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 keine CXCR2-Expression detektiert werden konnten und somit das im Stroma exprimierte CXCL1 nicht direkt auf das Stroma Einfluss nehmen kann, sondern vielmehr andere bei der Implantation anwesende Zelltypen und Prozesse reguliert. Hierbei übernimmt das endometriale Stroma vermutlich die Funktion eines Vermittlers, der das Signal des Embryos empfängt und weiterleitet. Interessanterweise haben qualitativ hochwertige Embryonen einen deutlich kleineren

Einfluss auf die Sekretionsprodukte des dezidualisierten Endometriums im Gegensatz zu morphologisch auffälligen Embryonen, die eine starke endometriale Antwort induzieren.<sup>238</sup> Das humane Endometrium stellt demnach eine Signalschnittstelle dar und entscheidet je nach Qualität des Embryos über den Ausgang des Implantationsprozesses. Folglich spielt das maternale dezidualisierte Endometrium gegenüber dem Embryo einen deutlich aktiveren Part bei der Implantation und ist somit die Hauptdeterminante bei der Etablierung einer regelrechten Schwangerschaft.<sup>238</sup> Die besondere Wichtigkeit des rezeptiven Endometriums bei der Implantation wird dadurch verdeutlicht, dass es bei ART selbst bei sehr guter Embryonenqualität nicht immer zu einer erfolgreichen Implantation kommt. Hier wird durch die Gabe von P<sub>4</sub> nach der Ovulation bzw. der Punktion der Eizellen versucht, dass Endometrium so gut wie möglich auf eine Implantation vorzubereiten. Ein besonderes Verfahren, die Implantationswahrscheinlichkeit zu erhöhen, ist das *endometrial-scratching*. Hierbei wird in dem Vorzyklus der IVF-Behandlung dem Endometrium eine kleine Verletzung in Form einer oberflächlichen Biopsie (*scratch*) zugefügt. Diese Prozedur wird vor allem bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen angewendet und kann die Chancen auf eine klinische Schwangerschaft steigern.<sup>239</sup> Die durch das *scratching* induzierten Implantations-fördernden Vorgänge sind bislang noch nicht bekannt, jedoch zeigt dieses Verfahren und die dadurch steigende Implantationswahrscheinlichkeit wie essentiell ein reguliertes rezeptives Endometrium für eine erfolgreiche Implantation ist.

#### 4.1.1 Die Rolle von CXCL1 und Sdc-1 in der Implantation

Die Expression von CXCL1 im Endometrium wurde bereits mehrfach nachgewiesen.<sup>54,60,61</sup> Hierbei konnte auch eine Hochregulation der CXCL1-Expression durch inflammatorische Faktoren und Steroidhormone wie Dezidualisierungshormone, LPS, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Trophoblast-konditioniertes Medium und Ko-Kultur mit Trophoblastzellen gezeigt werden.<sup>54,60,61</sup> Eine besonders hohe CXCL1-Expression wurde *in vivo* in der Dezidua in der frühen Schwangerschaft gefunden.<sup>54</sup> Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass die CXCL1-Expression nach imitiertem Embryokontakt durch IL-1 $\beta$ <sup>111</sup> und Trophoblast-konditioniertem Medium<sup>54</sup> in endometrialen Stromazellen induziert wird, zeigen dass CXCL1 für die embryonale Implantation von großer Bedeutung zu sein scheint. Im Gegensatz dazu weisen

Trophoblasten selbst keine CXCL1-Expression auf.<sup>54</sup> Im QGP Assay wurde neben CXCR2 auch die CXCL1-Expression in verschiedenen endometrialen Stromazellen mit und ohne Behandlung, PSZ und humanem Blut untersucht. Zwei der 3 untersuchten *kdCXCR2*-Zellklone wiesen eine signifikant niedrigere CXCL1-Expression nach Induktion des putativen CXCR2 *kd* mittels Tet auf. Da weder der CXCR2 *kd* noch die Basisexpression von CXCR2 in St-T1-Zellen nachgewiesen wurde, konnten die Änderungen in der CXCL1-Expression nicht durch den CXCR2 *kd* verursacht worden sein. Eine Herunterregulation von CXCL1 durch Tet wurde in der Literatur für HMEC-1-Zellen bereits beschrieben.<sup>240</sup> Die starken anti-inflammatorischen Eigenschaften könnten auch die Expression des inflammatorischen Chemokins CXCL1 in St-T1-Zellen hemmen. Die statistisch signifikant niedrigere CXCL1-Konzentration in dKdS1-Zellen nach Induktion des *Sdc-1 kd* durch Tet könnte ebenfalls auf die Wirkung des eingesetzten Antibiotikums zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch die Hemmung des *Sdc-1*-abhängigen ERK1/2-Signalwegs, der neben anderen Signalwegen die Expression von CXCL1 vermittelt. Die mit Abstand höchste CXCL1-Expression wurde in dSt-T1-Zellen mittels einer 6h Inkubation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (Mix 2) erreicht. Nach 12h mit den gleichen Stimuli fiel die Expression von CXCL1 um die Hälfte, lag jedoch weiterhin signifikant höher als in unbehandelten dSt-T1-Zellen. Auch die Behandlung der dSt-T1-Zellen mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , LPS und dem Mix aus LPS und IFN $\gamma$  (Mix 1) führte zu einer statistisch signifikant höheren CXCL1-Expression gegenüber dSt-T1. Es wurde keine Expressionssteigerung von CXCL1 in dSt-T1-Zellen durch IFN $\gamma$  erreicht. Diese Ergebnisse belegen die Expressions-steigernde Wirkung von entzündlichen Stimuli, die im Fall von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auch embryonale Sekretionsprodukte darstellen. Das vom Embryo sezernierte IL-1 $\beta$  bewirkt eine Hochregulation von CXCL1 im endometrialen Stroma und induziert dadurch immunologische und angiogenetische Vorgänge, die für dessen Implantation wichtig sind. Auch TNF $\alpha$  unterliegt starken Veränderungen im Präimplantationszeitraum wie eine Studie an Primaten gezeigt hat.<sup>241</sup> Hohe, vom Embryo sezernierte TNF $\alpha$ -Konzentrationen konnten mit Implantationsversagen in Verbindung gebracht werden.<sup>242</sup> Hier wäre es denkbar, dass eine starke TNF $\alpha$ -Expression zu einer sehr hohen CXCL1-Konzentration an der embryo-maternalen Schnittstelle führt, die wiederum durch fehlerhafte Regulation der Angiogenese oder auch Leukozytenrekrutierung eine erfolgreiche Implantation verhindert. Die Steigerung der CXCL1-Expression durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stellt

zusätzlich ein schönes Beispiel für die Regulation von Zytokinen durch andere Zytokine dar. Die Expression von CXCL1 in einer weiteren untersuchten endometrialen Stromazelllinie, T-HESC, lag unter der Detektionsgrenze und konnte durch die Dezidualisierung der Zellen nicht gesteigert werden.

CXCL1 agiert neben dem Rezeptor CXCR2, der in der St-T1-Zelllinie nicht vorhanden zu sein scheint, auch über seinen Ko-Rezeptor Sdc-1. Der QGP Assay konnte neben einer Sdc-1-Basisexpression auch einige Veränderungen in der Sdc-1-Expression durch verschiedene Behandlungen der endometrialen Stromazellen aufdecken. Die beobachtete signifikant niedrigere Sdc-1-Expression in allen transfizierten Zellen, (d)KdS1 und (d)kdCXCR2-Zellklonen, gegenüber den unbehandelten St-T1- und dSt-T1-Zellen könnte möglicherweise auf die 2x Transfektion der endometrialen Stromazellen mittels Elektroporation und die eventuell dadurch entstandenen genetischen Veränderungen der Zellen zurück zu führen sein. Durch den Vorgang der Dezidualisierung konnte die Sdc-1-Expression in T-HESC-Zellen signifikant gesteigert werden, dagegen wiesen dSt-T1-Zellen keine erhöhte Expression von Sdc-1 im Gegensatz zu St-T1 auf. Diese konträren Antworten zweier endometrialer Stromazelllinien auf die Zugabe von Dezidualisierungshormonen ist möglicherweise eine Folge der Immortalisierung, die zu einer Differenzierung der Zellen führen könnte. Beide Zelllinie wurden mit Hilfe von verschiedenen Genen, Simian Virus (SV) 40 *large T* Antigen bei St-T1<sup>167</sup> und humane Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT) bei T-HESC<sup>168</sup>, und deren Transduktion in das Zellgenom immortalisiert. Eine weitere Folge der Immortalisierung könnte auch die signifikant höhere Sdc-1-Konzentration in St-T1-Zellen gegenüber PSZ darstellen. Die Blutprobe, die als Positivkontrolle für die Expression von CXCR2 fungierte, wies eine sehr geringe Expression von Sdc-1 auf. Im Gegensatz zu CXCL1 wurde die Expression des CXCL1-Ko-Rezeptors Sdc-1 durch die Wirkung von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in dSt-T1 statistisch signifikant herunterreguliert. Hierbei hatte die Inkubation der Zellen mit beiden Zytokinen (Mix 2) eine deutlich stärkere Wirkung auf die Sdc-1-Expression gegenüber der Behandlung mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  alleine. Die Inkubation der dSt-T1-Zellen mit Mix 2 zeigte nach 6h eine Expressionsabnahme von Sdc-1 um ca. 50% und nach 12h ging die Sdc-1-Expression auf ca. 13% der ursprünglichen in dSt-T1 detektierten Sdc-1-Konzentration zurück. Die Abnahme der Sdc-1-Expression durch IL-1 $\beta$  und TNF $\beta$ , Stimuli, die die CXCL1-Expression in St-T1-Zellen steigern, könnte möglicherweise

eine Rückkopplungsregulation der Zellen darstellen, die bei hohen CXCL1-Konzentrationen die Expression des Ko-Rezeptors herunterregulieren, da dessen unterstützende Funktion bei einem Ligandenüberschuss nicht benötigt wird. Da der CXCL1-Rezeptor, CXCR2, jedoch in der St-T1-Zelle scheinbar nicht exprimiert wird, ist die Ko-Rezeptorfunktion wahrscheinlich nicht die einzige Hauptaufgabe von Sdc-1 in endometrialen Stromazellen. Die zeitgleiche Hochregulation von MMP9 durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  könnte einen Hinweis auf eine weitere Funktion von Sdc-1 in St-T1-Zellen liefern. MMP9 ist dafür bekannt, Sdc-1 von einer Membran-gebundenen in eine lösliche Form durch den Vorgang des *sheddings* zu überführen.<sup>78</sup> In löslicher Form ist Sdc-1 anschließend in der Lage, Chemokine wie CXCL1 zu binden und dadurch einen chemoattraktiven Gradienten aufzubauen.<sup>243</sup> Solch ein Gradient wurde bisher in Zellmigrationsprozessen bei der Embryogenese, Rekrutierung von Leukozyten bei Inflammation und Invasion von Mammakarzinomzellen detektiert.<sup>244–246</sup> Da auch beim embryonalen Implantationsvorgang ein Zustrom an Leukozyten stattfindet, wäre es möglich, dass dieser Zustrom mit Hilfe eines Chemokingradienten bewerkstelligt wird. Somit würde Sdc-1 eine wichtige Rolle beim Aufbau eines chemoattraktiven Gradienten und damit auch bei der Implantation spielen. Die Sdc-1-herunterregulierende Wirkung von IL-1 $\beta$  wurde neben dSt-T1 auch in parodontalen Fibroblasten und Osteoblasten<sup>247</sup> und 2 Dickdarmkarzinomzelllinien gezeigt.<sup>86</sup> Im Gegensatz dazu hatten CXCL1, LPS und IFN $\gamma$  einzeln eingesetzt keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Sdc-1 mRNA. Im Mix und nach 12h Inkubation zeigten LPS und IFN $\gamma$  jedoch einen Expressions-hemmenden Effekt, der zu einer 33%igen Abnahme der Sdc-1 mRNA-Konzentration in dSt-T1-Zellen führte. Die große Bandbreite der Sdc-1-Liganden wie Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixproteine, Zell-Zell-Adhäsions-Rezeptoren, Proteasen, Proteaseinhibitoren, virale Mantelproteine, Chemokine und andere Zytokine<sup>75–77</sup> und Sdc-1-gesteuerten Prozessen, z. B. Wachstumsregulation, Zytoskelettmodulation, Regulation von Signalwegen, Zellproliferation, Migration Wundheilung, Ko-Rezeptor-Aktivität, Inflammation, Energiemetabolismus und Tumorentwicklung<sup>75,80,81</sup> deutet auf eine große funktionelle Diversität von Sdc-1 hin und dass Sdc-1 in nahezu jedem Zelltyp exprimiert wird. Dabei wird Sdc-1 höchstwahrscheinlich nicht identische Funktionen in jedem Organ ausführen. Während der embryonalen Implantation scheint Sdc-1 in endometrialen Stromazellen mehr die Funktion eines Speichers für CXCL1 für die Bildung eines

Chemokingradienten zu besitzen, da der CXCL1-Rezeptor CXCR2 auf diesen Zellen scheinbar nicht expremiert wird und die Ko-Rezeptorfunktion für die Aktivierung von CXCR2 durch CXCL1 nicht gefördert werden muss. Hingegen könnte die Anwesenheit von Sdc-1 auf CXCR2-exprimierenden Zellen, wie z. B. Leukozyten, uNK- und Trophoblastzellen<sup>38,209</sup> mit der Ko-Rezeptorfunktion von Sdc-1 verbunden sein. Studien unserer Arbeitsgruppe und Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Sdc-1 die Expression von Chemokinen und anderen Zytokinen in St-T1-Zellen reguliert<sup>43</sup> und im Gegenzug selbst durch Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , reguliert werden kann.

Die Expression von Sdc-1 in nahezu allen reproduktiven Organen, Vagina, Cervix, endometrialem Epithel und Stroma, Myometrium und Placenta<sup>88,248–250</sup>, die zyklusabhängige Regulation der Sdc-1-Expression<sup>87</sup> und die Detektion des Heparansulfat-Proteoglycans in Trophoblasten<sup>89</sup> belegen die besonders wichtige Bedeutung von Sdc-1 für die Regulation des Menstruationszyklus, der embryo-maternalen Schnittstelle während der Implantation und der anschließenden Schwangerschaft. Diese Arbeit zeigte Verringerungen der Sdc-1-Expression nach Inkubation der dSt-T1-Zellen mit embryonalen Sekretionsprodukten. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Involvierung von Sdc-1 in den embryonalen Implantationsprozess. Weitere Implantations-relevante Funktionen von Sdc-1 und die Auswirkungen des *kd* in endometrialen Stromazellen auf Implantations-relevante Signalwege werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

#### **4.1.2 Die Rolle von VEGFA, MMP7 und MMP9 in der Implantation**

Neben den bereits besprochenen Implantationsfaktoren CXCL1, CXCR2 und Sdc-1 wurden mit dem QGP Assay auch die Expressionen von VEGFA, MMP7 und MMP9 in der behandelten und unbehandelten endometrialen Stromazelllinie St-T1 bestimmt. Diese Faktoren sind in wichtige Vorgänge der Implantation wie Angiogenese und Matrix-Remodellierung involviert und sollten in den endometrialen Stromazelllinie untersucht werden.

VEGFA ist ein Mitglied der VEGF-Familie, die aus den einflussreichsten Faktoren für das vaskuläre Wachstum besteht. Neben VEGFA gehören VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF und *placental growth factor* (PlGF) zu dieser Familie.<sup>251</sup> VEGFA besitzt Implantations-relevante Funktionen wie die chemoattraktive Wirkung, die Regulation von Zytokin- und Wachstumsfaktoren und ist in Prozesse wie

Plazentation, Angiogenese, Chemotaxis von Basophilen, Differenzierung von Epithelzellen, Wachstum und Embryogenese involviert.<sup>252–254</sup> Während der Embryonalentwicklung wurde VEGF bereits wenige Tage nach der Implantation in Trophoblastriesenzellen detektiert.<sup>255</sup> Des Weiteren spielt VEGF eine wichtige Rolle im humanen Endometrium während des Menstruationszyklus. Hierbei reguliert VEGF vor allem die physiologische Angiogenese und unterliegt zyklischen Schwankungen mit Zunahme der Expression ab der proliferativen Phase und höchster Konzentration in der sekretorischen Phase.<sup>256</sup> Eine weitere Funktion von VEGF stellt die Formation des *Corpus luteum* dar. Hier wird VEGF in den ovariellen Granulosa- und Thekazellen während der späten Follikulogenese und nach der Ovulation von Granulosa- und Theka-Luteinzellen exprimiert. Die letzteren beiden Zelltypen bilden das *Corpus luteum*. VEGF induziert eine Steigerung der Permeabilität der thekalen Gefäße, die nach der Ovulation gebildet werden und trägt zur Angiogenese und Generierung von Stromagewebe bei, die mit der Formation des *Corpus luteum* einhergehen.<sup>257</sup> Diese und weitere Funktionen führt VEGFA mit Hilfe der beiden Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 aus.<sup>251,258</sup> Die Detektion von VEGF-mRNA in Blastozysten-konditioniertem Medium und im Endometrium zeigen die besondere Bedeutung von VEGF für die Implantation und die Etablierung einer gesunden Schwangerschaft.<sup>258</sup> Des Weiteren spielt VEGF auch in der murinen Reproduktion eine wichtige Rolle. Mausembryonen mit einem inaktivierten VEGF-Allel starben bereits am Schwangerschaftstag 11/12.<sup>259</sup> Im Plazentagewebe wird die VEGF-Expression durch die dort herrschende physiologische Hypoxie hochreguliert und ist in Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie reduziert.<sup>258</sup> Dies würde bedeuten, dass das Plazentagewebe beim Entwickeln einer Präeklampsie nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, da angiogenetische Vorgänge wie die Neubildung von Blutgefäßen durch eine niedrige VEGF-Konzentration möglicherweise gedrosselt werden. Eine unterversorgte Plazenta könnte anschließend zu einer Unterversorgung des Kindes führen, sein Wachstum und auch die Entwicklung hemmen.

Die Ergebnisse des QGP Assay zeigten, die mit Abstand höchste VEGFA-Konzentration in der Probe mit PSZ. Die VEGFA-Expression war hierbei statistisch signifikant höher als in den beiden endometrialen Stromazelllinien St-T1 und T-HESC. Nach Dezidualisierung stieg die Expression in T-HESC-Zellen signifikant an. Im Gegensatz dazu fiel sie bei dSt-T1, dKdS1, dKdS1+Tet und bei 2 untersuchten

*kdCXCR2*-Zellklonen, #28 und #39, nach Dezidualisierung mit und ohne Tet-Induktion im Vergleich zu den jeweiligen nicht-dezidualisierten Proben ab. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die VEGFA-Expression in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 durch Dezidualisierung signifikant herunterreguliert wurde. *In vivo* wurde ein konträres Ergebnis beobachtet. Hier zeigten Shifren *et al.* eine Steigerung der VEGF-Konzentration in PSZ durch die Zugabe von E<sub>2</sub> und Medroxyprogesteronacetat (MPA), einem synthetischen P<sub>4</sub>-Derivat das zu den Dezidualisierungshormonen gehört.<sup>256</sup> Deziduales Gewebe aus der 7./8. SSW zeigte ebenfalls eine statistisch signifikant höhere VEGF-Konzentrationen im Gegensatz zum undifferenzierten Endometriumgewebe aus Hysterektomien und Deziduagewebe aus der 38.-40. SSW.<sup>260</sup> Möglicherweise werden hierbei jedoch andere VEGF-Faktoren signifikant hochreguliert, denn zum einen wurde VEGFA in St-T1 nach Dezidualisierung herunter reguliert und zum anderen scheint VEGFA keine große Rolle im endometrialen Stroma zu spielen, da dessen Expression *in vivo* in der Dezidua, im Vergleich zu Plazenta und Plazentabett am niedrigsten war.<sup>261</sup> Das Plazentabett wies die höchste VEGFA-Expression auf, VEGFR1 wurde in der Plazenta und VEGFR2 ebenfalls im Plazentabett exprimiert<sup>261</sup>, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Angiogenese während der Implantation und Plazentation auf der embryonalen Seite über den VEGFA-VEGFR2-Komplex reguliert wird. Des Weiteren wurde eine signifikant niedrigere VEGFA-Expression nach Induktion des *Sdc-1 kd* und des potentiellen *CXCR2 kd*, in 2 der 3 getesteten *kdCXCR2*-Zellklone detektiert. Hohe *Sdc-1*-Level in löslicher Form (*Sdc-1-shedding*) konnten im Myelomzellen mit gesteigerter Tumorangio-genese in Verbindung gebracht werden. Der Prozess der Endothelinvasion wurde hierbei durch die Bindung von VEGF an *Sdc-1* an der extrazellulären Matrix stimuliert.<sup>262</sup> Die Verbindung von VEGF und *Sdc-1* bei angiogenetischen Vorgängen könnte die herunter regulierte VEGFA-Expression bei Abwesenheit von *Sdc-1* erklären, jedoch ist dieser Effekt möglicherweise auch auf die Behandlung der Zellen mit Tet zurückzuführen, da auch die *kdCXCR2*-Zellklone nach Induktion des *kd* mit Tet eine signifikant niedrigere VEGFA-Expression aufwiesen. Für Doxycyclin, einem semisynthetischen Tetracyclin-Derivat, konnte eine allgemeine VEGF-senkende Wirkung in kornealen Neovaskularisations- und Wundheilungsversuchen in Ratten und eine VEGFA-senkende Wirkung in humanem Blutplasma von Hydrozelepatienten gezeigt werden.<sup>263,264</sup> Demnach wäre es möglich, dass die

Senkung der VEGFA-Expression in dezidualisierten und nicht-dezidualisierten KdS1 und putativen *kdCXCR2*-Zellen auf die 48h-Inkubation der Zellen mit Tet zurückzuführen ist. Die Inkubation von dSt-T1 mit dem Chemokin CXCL1, dem Embryosurrogat IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  führte zu einer erhöhten VEGFA-Expression im Gegensatz zu unbehandelten dSt-T1. In dezidualen Stromazellen aus Plazenten konnte ebenfalls ein Anstieg der VEGF-Expression nach IL-1 $\beta$ -Inkubation beobachtet werden.<sup>265</sup> Diese Hochregulation der Expression ist möglicherweise eine Antwort des Endometriums auf einen Embryo. Der Embryo sezerniert IL-1 $\beta$ , das im endometrialen Stroma die Expression von CXCL1 hochreguliert und mit Hilfe von CXCR2 und Sdc-1 Leukozyten, wie NK-Zellen, an die Implantationsstelle rekrutiert. Deziduale NK-Zellen sind anschließend in der Lage, VEGF zu exprimieren und dadurch angiogenetische Prozesse, die essentiell für eine erfolgreiche Implantation und Plazentation sind, zu induzieren. Die Expression von VEGF durch uNK-Zellen wurde bereits 2008 durch Vacca und Mitarbeiter nachgewiesen.<sup>266</sup> Neben uNK-Zellen wurde die Expression von VEGF auch in Blastozysten während der Präimplantationsentwicklung lokalisiert.<sup>258,267</sup> Dabei kann das VEGF als frei sezerniertes oder an Heparansulfat-Proteoglycane gebundenes Protein vorliegen. Die mRNA die für das frei sezernierte VEGF-Protein kodiert ermöglicht dem implantierenden Embryo die Angiogenese an der Implantationsstelle zu induzieren.<sup>267</sup> Die Hochregulation der VEGFA-Expression durch TNF $\alpha$  konnte in primären dezidualen Stromazellen möglicherweise nicht nachgewiesen werden<sup>265</sup>, da nur 1ng/ml TNF $\alpha$  für die Inkubation der Zellen eingesetzt wurde. Die in dieser Studie mittels QGP Assay gemessenen Proben wurden mit 10ng/ml TNF $\alpha$ <sup>190</sup> stimuliert, sodass die in der zuvor genannten Studie eingesetzte TNF $\alpha$ -Konzentration möglicherweise zu gering war, um eine Antwort in den dezidualen Stromazellen zu induzieren. Trophoblastzelllinien hingegen reagierten erst mit einer deutlichen Steigerung der VEGF-Expression nach Inkubation mit 100ng/ml TNF $\alpha$ .<sup>259</sup> Neben den angiogenetischen Funktionen im Endometrium, spielt VEGFA auch eine Rolle in weiteren humanen Reproduktions-abhängigen Prozessen wie der Follikelentwicklung. Hierbei wurden diverse VEGFA-Isoformen entdeckt, die durch proangiogenetische Effekte die Follikelrekrutierung und frühe Follikelentwicklung stimulieren und durch antiangiogenetische Funktionen diese Prozesse inhibieren können. Ein wohlreguliertes Gleichgewicht zwischen den proangiogenetischen und antiangiogenetischen VEGFA-Isoformen ist demnach essentiell für eine erfolgreiche

Follikelentwicklung.<sup>268</sup> Des Weiteren ist VEGF in die ersten Schritte der endothelialen und hämatopoetischen Entwicklung des murinen Dottersacks und die Etablierung des embryonalen kardiovaskulären Systems in Mäusen involviert.<sup>269,270</sup> In pathologischen Schwangerschaftsverläufen, wie z. B. der Präeklampsie, ist die VEGF-Expression reduziert.<sup>259</sup> Eine Studie mit 175 singhalesischen Präeklampsie-Patientinnen zeigte jedoch keine Assoziation von VEGFA-Polymorphismen mit dieser schwangerschaftsbedingten Erkrankung.<sup>271</sup> Ebenso wurde kein Zusammenhang zwischen VEGFA und intrauteriner Wachstumsretardierung gefunden.<sup>272</sup> Jedoch zeigten Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie einen 4x Anstieg der VEGFR1-Expression.<sup>273</sup> Eine weitere Studien wies wiederum neben einer erhöhten VEGFR1-Expression im Blut auch ein 10x niedrigeres VEGF-Level in der Plazenta, dem Plazentabett und dem Blut von Patientinnen mit Präeklampsie auf.<sup>274</sup> Demnach scheint VEGF nicht der dominanteste Faktor bei der Ausbildung einer Präeklampsie zu sein, dennoch scheint VEGF zusammen mit dem VEGFR1 eine Rolle zu spielen. Durch eine Interaktion mit VEGF ist auch MMP9 in der Lage, indirekt auf die Angiogenese Einfluss zu nehmen.<sup>275</sup> MMP9 und MMP7 sind 2 der 23 Mitglieder der humanen MMP-Familie, die aus sezernierten und an der Zelloberfläche lokalisierten Enzymen besteht.<sup>276,277</sup> MMP sind in nahezu alle biologischen Prozesse mit Matrix-Remodellierung des gesamten Säugetierlebens involviert, angefangen mit der embryonalen Implantation bis zu Zelltod und Nekrose.<sup>276</sup> MMP-gesteuerte Proteolyse spielt in Vorgängen, wie Knochenossifikation, Gewebemorphogenese und Remodellierung von Blutgefäßen eine wichtige Rolle. Außerdem sind MMP bei der Embryonalentwicklung, inflammatorischen Erkrankungen, Karzinomen, Wundheilungsvorgängen, Menstruation, reproduktiven Prozessen und Aktivierung des angeborenen Immunsystems beteiligt.<sup>276,277</sup> Zu den reproduktiven Vorgängen mit MMP-Beteiligung zählen vor allem ovarielle und uterine Physiologieprozesse wie Wachstum und Expansion des Follikels, Durchbruch der Follikelwand während der Ovulation, Transformation des postovulatorischen Follikels zum *Corpus luteum*, strukturelle Degradierung des *Corpus luteum* während der lutealen Rückbildung, extensive Uterusremodellierung während der Plazentation und die postpartale Uterus- und Brustrückbildung.<sup>278,279</sup> Eine besonders wichtige Aufgabe von MMP liegt in der Mobilisierung von Wachstumsfaktoren durch Spaltung von Zytokinen und die anschließende Freigabe von versteckten Carrierproteinen.<sup>276</sup> Diese und viele weitere Funktionen führen MMP durch die Degradierung ihrer zahlreichen Substrate, wie

Proteinase, Proteinaseinhibitoren, Gerinnungsfaktoren, chemotaktischen Molekülen, Wachstumsfaktoren, Oberflächenrezeptoren, Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen und allen strukturellen extrazellulären Matrixproteinen aus. Die katalytische Aktivität der MMP ist von Metallionen abhängig und wird durch Selbstregulation oder Modulation durch andere MMP und Inhibitoren (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP) gesteuert.<sup>277</sup> Die Expression von MMP9 in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 (0,01MFI) war signifikant niedriger als in prim. Stromazellen (0,04MFI) und deutlich niedriger als das MMP9-Level im Blut (2,0MFI). Durch die Dezidualisierung der Zellen konnte keine Änderung in der MMP9-Expression beobachtet werden, jedoch wurde sie durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  signifikant gesteigert, wobei TNF $\alpha$  eine doppelt so hohe Steigerung erzielte im Vergleich zu IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  ist ein Substrat für MMP9 und neben weiteren Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen bekannt für die Regulation der MMP9-Transkription.<sup>277,280</sup> Die Steigerung der MMP9-Expression durch das Embryo-sezernierte IL-1 $\beta$  könnte mehrere Implantations-relevante Vorgänge in Gang setzen. Zusammen mit VEGF, dessen Expression durch IL-1 $\beta$  ebenfalls hochreguliert wurde, könnte MMP9 angiogenetische Prozesse induzieren und/oder regulieren.<sup>275</sup> Des Weiteren wäre es denkbar, dass MMP9 die Zytokinaktivität an der embryo-maternalen Schnittstelle moduliert und damit Einfluss z. B. auf die Chemotaxis von Leukozyten, die Zytotrophoblastdifferenzierung und ebenfalls Angiogenese nimmt.<sup>27,62,281</sup> Auch TNF $\alpha$  ist ein Zytokin und damit ein potentieller MMP9-Transkriptionsaktivator. In Choriontrophoblastzellen erfolgt die Hochregulation der MMP9-Expression durch TNF $\alpha$  mit Hilfe des ERK-Signalweges und wurde daneben auch in extravillösen Trophoblastzellen und präeklampsischen Deziduazellen nachgewiesen.<sup>282–284</sup> Die Steigerung der MMP9-Expression durch inflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , fördert möglicherweise die Ausbildung von Präeklampsie durch Degradieren der dezidualen extrazellulären Matrix und die damit einhergehende insuffiziente Trophoblastinvasion.<sup>284</sup> Es ist bekannt, dass Sdc-1 neben MMP2 und MMP7 auch durch MMP9 in seine lösliche Form überführt werden kann.<sup>78</sup> Sowohl die Dezidualisierung von St-T1-Zellen als auch die Induktion des Sdc-1 *kd* in KdS1 und dKdS1 zeigten keinen Einfluss auf die MMP9-Expression. Eine Studie an der Endometriosezelllinie 12Z wies eine reduzierte MMP9-Expression und einen Verlust der Invasionsaktivität um mehr als 60% nach *kd* von Sdc-1 auf.<sup>285</sup> Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass MMP9 bei Endometriose stark hochreguliert ist.<sup>286</sup> In nicht-pathologischen endometrialen

Stromazellen der Linie St-T1 scheint Sdc-1 keinen Einfluss auf die MMP9-Expression, die signifikant niedriger als die MMP9-Expression in primären Stromazellen ist, auszuüben. Die signifikante Herabregulation der MMP9-Expression in dem *kdCXC2*-Zellklon #28 und dem dezidualisierten #39 nach Tet-Inkubation ist auf die inhomogenen MMP9-Expressionsergebnisse der untersuchten *kdCXCR2*-Zellklone zurückzuführen ist. Trotz der niedrigen Expression von MMP9 in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 scheint das zur Gelatinasen-Familie zählende Enzym eine wichtige Rolle bei der Implantation und Invasion des Embryos in die Dezidua zu spielen. Gestützt wird diese Hypothese durch die Lokalisation und Sekretion von MMP9 sowohl im Endometrium als auch in Trophoblastriesenzellen und Implantations-assoziierten Immunzellen, Monozyten und Neutrophilen.<sup>282,283,287–</sup>

<sup>290</sup> Daneben haben Studien gezeigt, dass MMP9 in die Invasivität von trophoblastären Zelllinien, wie HTR-8/SVneo, JEG-3, ACH-3P, JAR und primären plazentaren extravillösen Trophoblastzellen, z. B. durch die Hochregulation der Expression von Präimplantationsfaktor (PIF) oder CXCL12, involviert ist<sup>287,291–294</sup> und zusammen mit MMP2 scheinbar die bedeutendste, von extravillösen Trophoblastenzellen sezernierte und für das invasive Verhalten des Trophoblasten verantwortliche MMP während der Implantation darstellt.<sup>95</sup> MMP9-defiziente Mäuse zeigen neben verspäteter epiphysärer Vaskularisierung, endochondraler Ossifikation und anderen Pathologien auch fehlerhafte deziduale Implantationstellen.<sup>277</sup> Abnormale MMP9-Expression ist mit Pathologien, wie Endometriumkarzinom, Endometriose und habituellen Aborten assoziiert.<sup>286,295–300</sup> MMP7 ist ein weiteres, auch als Matrilysin oder uterine Metalloprotease (MP)<sup>301</sup> bezeichnetes Enzym der MMP-Familie mit potentiellen Funktionen während der humanen Implantation. Die Bezeichnung als uterine MP ist auf die initiale Entdeckung von MMP7 im Rattenuterus zurückzuführen.<sup>302</sup> Abweichend zu anderen MMP wird MMP7 konstitutiv von vielen Epithelzelltypen, wie z. B. dem Epithel reproduktiver Organe, exprimiert und besitzt eine große Substratspezifität.<sup>302</sup> Verschiedene Studien deckten MMP7-Beteiligung bei der Rekrutierung von Neutrophilen, Reepithelisation, Zellmigration, Wundheilung, Angiogenese und Apoptose sowie bei pathologischen Prozessen wie Tumorgenese und Metastasierung auf.<sup>243,276,302</sup> Eine überaus wichtige Funktion von MMP7 ist die Spaltung der löslichen von der membranständigen Einheit von Sdc-1. Die löslichen Sdc-1-Moleküle sind in der Lage, große Konzentrationen an CXCL1, die bei Inflammationsprozessen nach Verletzung von Endothelzellen oder

von endometrialen Stroma während des Implantationsprozesses exprimiert werden, zu binden. Dadurch wird ein Sdc-1-CXCL1-Gradient erzeugt, der anschließend von Neutrophilen oder anderen Immunzellen für deren Migration verwendet wird.<sup>276</sup> Dieser Mechanismus der chemotaktischen Migration könnte neben der Wundheilung<sup>243</sup> auch der Anreicherung von Leukozyten an der embryo-maternalen Schnittstelle zur Steigerung des maternalen Toleranzpotentials gegenüber dem semi-allogenen Embryo dienen. Die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 werden ebenfalls von MMP7 degradiert.<sup>276</sup> Neben der Leukozytenrekrutierung ist MMP7 auch in weitere implantationsrelevante Prozesse, wie Angiogenese, durch Aktivierung der angiogenetisch aktiven MMP9<sup>302</sup> und Apoptose involviert. In Epithelzellen ist MMP7 in der Lage, die Freisetzung des löslichen Fas-Liganden (*soluble* sFasL) durch Abspaltung von FasL von der Zelloberfläche zu regulieren und dadurch den Apoptosevorgang zu induzieren. Gleichzeitig kann MMP7 die proapoptotische Fas/FasL-Signalachse und folglich auch die Apoptose, durch Spaltung von Fas in Karzinomzellen inhibieren.<sup>276</sup> Eine fein abgestimmte Apoptose im endometrialen Epithel und Stroma an der embryo-maternalen Schnittstelle ist entscheidend für eine regelrechte Invasion des Trophoblasten und einen gesunden Schwangerschaftsverlauf.<sup>303,304</sup> Signalwege wie ERK1/2 und NF- $\kappa$ B sind als Regulatoren der Sensitivität von ES Zellen gegenüber der Apoptose bekannt und eine Dysregulation dieses Vorgangs kann zu Störungen der Implantation und Komplikationen während der Schwangerschaft führen.<sup>305</sup> Ergebnisse des QGP Assay zeigten eine, ähnlich CXCR2, sehr niedrige MMP7-Expression in der endometrialen Stromazelllinie St-T1, die sich unter der Detektionsgrenze des Assay befand. Die im humanen Endometrium nachgewiesene MMP7-Expression<sup>306</sup> ist wahrscheinlich auf die überwiegende Lokalisierung von MMP7 in endometrialen Epithelzellen zurück zu führen.<sup>307</sup> Die höchste MMP7-Expression wurde hierbei in der sekretorischen Phase des weiblichen Zyklus beobachtet.<sup>306</sup> Der Sdc-1 *kd* in KdS1-Zellen führte zu keinen Veränderungen in der MMP7-Expression. Allein die endometriale Stromazelllinie T-HESC wies eine signifikant erhöhte MMP7-mRNA Expression nach Dezidualisierung auf. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie eine sinkende MMP7-Expression im dezidualisierten Gewebe aus ektopen Tubenschwangerschaften und normalen Schwangerschaften gegenüber nicht-dezidualisiertem Gewebe ohne Differenzierung der einzelnen Zelltypen.<sup>308</sup> Die mit Abstand höchste Expression von MMP7 wurde in prim. Stromazellen beobachtet.

Hier könnte eine Verunreinigung mit endometrialen epithelialen Zellen der Grund für das hohe MMP7-Level sein. MMP7-ko-Mäuse zeigen eine reduzierte Tumorgenese, insuffiziente Ausbildung des angeborenen Immunsystems und beeinträchtigte Wundheilung.<sup>277,302</sup> Im Gegensatz zu MMP9 sind Krankheiten, wie die Präeklampsie mit intrauteriner fetaler Wachstumsretardierung, vor allem mit niedrigen MMP7-Konzentrationen assoziiert und eine Studie an Pavianen hat gezeigt, dass bei Endometriose die Expression aller MMP, mit Ausnahme von MMP7, erhöht ist.<sup>309,310</sup> Ebenfalls ist MMP7 in endometrialen Biopsien von Frauen mit rezidivierendem Implantationsversagen herunter reguliert.<sup>311</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle mittels QGP Assay untersuchten Faktoren in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 von moderat (VEGFA) über niedrig (MMP9) bis sehr niedrig (MMP7) exprimiert wurden und die Expression durch Dezidualisierung, Sdc-1 *kd* und verschiedene Stimuli reguliert werden konnte. VEGFA, MMP9 und MMP7 spielen eine wichtige Rolle bei der humanen Implantation und die akkurate Regulation ihrer Expression ist für die Etablierung einer gesunden Schwangerschaft von großer Bedeutung. Dysregulierte Expressionen dieser Faktoren sind mit pathologischen Schwangerschaftsverläufen und Krankheiten, wie Präeklampsie, fetaler Wachstumsretardierung, Endometriose, habituellen Aborten und Implantationsversagen verbunden.

#### **4.2 Signalwege in der humanen endometrialen Stromazelllinie St-T1**

Wie bereits erwähnt spielt der Chemokinligand CXCL1 eine essentielle Rolle an der embryo-maternalen Schnittstelle. Die Expression von CXCL1 wurde im Endometrium allgemein und explizit im endometrialem Stroma mehrfach beschrieben.<sup>54,60,61</sup> Die höchste CXCL1-Konzentration weist das Stroma in der sekretorischen Phase des Zyklus auf und auch *in vitro* kann die Dezidualisierung von Stromazellen die CXCL1-Expression steigern.<sup>60</sup> Die Inkubation von endometrialen Stromazellen sowohl mit Trophoblast-konditioniertem als auch mit uNK-Zellen-konditioniertem Medium führte zu einer signifikanten Hochregulation von CXCL1.<sup>54,312</sup> Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch eine einzelne Komponente des embryonalen Sekretionsgemisches in Form von IL-1 $\beta$  ausreicht, um die CXCL1-Expression in der endometrialen Stromazelllinie St-T1 markant zu steigern.<sup>111</sup> Der Ko-Rezeptor des CXCL1-Chemokinrezeptors CXCR2, ist ein Mitglied der humanen Sdc-Familie (Sdc-1 bis -4). Sdc-1 ist ein Oberflächenmolekül, bestehend aus einem Proteoglycan und mehreren

Heparansulfatketten und wurde im nicht-schwangeren Uterus im Endometrium und der Cervix und im Myometrium, der Plazenta und dem amniotischen Epithel unter einer Schwangerschaft lokalisiert<sup>249,250</sup> Neben der Funktion als Ko-Rezeptor, die in der Bindung des Chemokinliganden für eine effizientere Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptors besteht, ist Sdc-1 auch in Prozesse wie der Modulation des Synzytiotrophoblasten, Hemmung der Blutgerinnung im intervillösen Zwischenraum, dem embryo-maternalen Dialog und der Signaltransduktion während der Implantation involviert.<sup>75,91,250,313,314</sup> Unter anderem ist Sdc-1 in der Lage, den Wnt-Signalweg während der Implantation zu aktivieren.<sup>114,315-317</sup> Wnt-Liganden vermitteln ihre Funktion über G-Protein-gekoppelte FZD-Rezeptoren und spielen eine Rolle bei der Dezidualisierung, Implantation, Plazentation und Embryogenese.<sup>122,318</sup> Weiterere für die Prozesse der Implantation entscheidende Signaltransduktionskaskaden, gehören zur MAPK Signalweg-Familie und vermitteln Vorgänge, wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose.<sup>103,319</sup> Zwei MAPK Signalwege, ERK1/2 und JNK, sind für die Regulation der CXCL1-Expression in verschiedenen Zellen, Decidua, HeLa und Atemwegsmuskulatur bereits bekannt.<sup>111,320,321</sup>

In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss von Sdc-1 auf den ERK1/2- und JNK-Signalweg und folglich auch auf die CXCL1-Expression untersucht werden. Des Weiteren sollte analysiert werden, inwieweit Sdc-1 die Expression der beiden FZD-Rezeptoren, FZD4 und FZD6, beeinflusst, um dadurch Rückschlüsse auf die Bedeutung von Sdc-1 auf den Wnt-Signalweg und auf die Implantation ziehen zu können.

Vor der Versuchsdurchführung wurde sowohl die spezifische Induktion der CXCL1-Expression durch IL-1 $\beta$  als auch der Sdc-1 *kd* auf RNA und Proteinebene nachgewiesen. Der Verlust von Sdc-1 in St-T1-Zellen scheint keinen Einfluss auf die Signalweiterleitung in dem ERK1/2-Signalkaskade auszuüben, denn die Phosphorylierung von ERK zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen St-T1- und KdS1-Zellen. Jedoch zeigten beide Zelllinie eine reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung nach Dezidualisierung, so dass der Differenzierungsstatus der Zellen einen Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität hat. Ähnliche Ergebnisse, die diese Hypothese unterstützen, hat die Arbeitsgruppe um Yoshino publiziert. Hier konnte eine schwächere p38-Phosphorylierung nach Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen gezeigt werden.<sup>322</sup> Die im folgenden Abschnitt

diskutierte signifikante Abnahme von CXCL1 im ELISA in KdS1- gegenüber St-T1-Zellen nach Inhibierung des ERK1/2-Signalwegs, deutet auf eine Involvierung von Sdc-1 in die Aktivierung des Signalwegs hin. Dagegen wiesen die Proteinexpressionsstudien von c-Jun eine signifikant niedrigere Phosphorylierungsrate in KdS1- im Vergleich zu St-T1-Zellen nach Dezidualisierung auf. Demnach scheint der Verlust von Sdc-1 nur in endometrialen Stromazellen mit morphologischen und biochemischen Veränderungen, die eine Dezidualisierung mit sich bringt, einen Effekt auf die Phosphorylierung von c-Jun und damit auf die Signalweiterleitung zu haben. Der Dezidualisierungsprozess hat *in vivo* unter anderem folgende Konsequenzen auf das endometriale Stromagewebe: Transformation der sekretorischen uterinen Drüsen, Zustrom von uNK-Zellen und vaskuläre Remodelierung der endometrialen stromalen Kompartimente.<sup>203</sup> Die mit dieser strukturellen Umgestaltung einhergehenden Änderungen in der Gentranskription könnten möglicherweise eine Auswirkung auf die Modulierung der Signaltransduktion durch Sdc-1 und damit auf die Phosphorylierung von c-Jun haben. Hierbei wären die direkten Regulatoren von c-Jun, MKK4/7 und JNK denkbare Ziele für Sdc-1. Es ist bekannt, dass ein weiteres Mitglied der Sdc-Familie, Sdc-2, eine wichtige Rolle in der Transduktion des Signals zu dem MKK-JNK-Signalweg in kultivierten hippokampalen Neuronen spielt. Dabei übernimmt Sdc-2 die Funktion einer Dockingstation für das *sterile  $\alpha$  and TIR motif-containing 1 protein* (Sarm1). Sarm1 ist anschließend in der Lage das ankommende Signal zu empfangen und zum MKK/JNK-Signalweg weiterzuleiten.<sup>323</sup> Es wäre denkbar, dass Sdc-1 in dSt-T1-Zellen eine ähnliche Funktion besitzt und sich damit als wichtiger Faktor bei der c-Jun-Phosphorylierung und damit des JNK-Signalwegs darstellt.

Weitere Untersuchungen des ERK1/2-Signalwegs zeigten eine Sensibilisierung der Stromazellen gegenüber dem Inhibitor bei Verlust von Sdc-1. Die zuvor diskutierte ERK-Phosphorylierungsstudie zeigte keinen Einfluss von Sdc-1 auf die Signalweiterleitung, da jedoch der Verlust von Sdc-1 eine signifikante Auswirkung auf die CXCL1-Sezernierung hat, scheint hier die Aktivierung der Signalkaskade eine Rolle zu spielen. Hierbei könnte Sdc-1 eine Ko-Rezeptorfunktion, wie bei der Aktivierung von CXCR2 durch CXCL1, übernehmen und dadurch die Aktivierung des Signalwegs durch IL-1 $\beta$  fördern. Diese Hypothese wird durch die Studie von Ha und Kim, die die Sdc-1-Abhängigkeit der ERK1/2-Signalwegsaktivierung in Osteoblastzellen durch Insulin gezeigt haben, unterstützt.<sup>324</sup> Des Weiteren wurde

bereits gezeigt, dass Sdc-1 als Ko-Rezeptor an der Aktivierung von MAPK-Signalwegen beteiligt ist.<sup>325</sup> Die gehemmte Aktivierung des Signalwegs und die Wirkung des Inhibitors auf die Signalweiterleitung könnten der Grund für die signifikant niedrigere CXCL1-Expression in den KdS1-Zellen gegenüber den St-T1-Zellen, die die Inhibitorwirkung möglicherweise durch eine Verstärkte Aktivierung des Signalwegs mit Hilfe von Sdc-1 abpuffern, sein. Die Annahme, dass Sdc-1 als Ko-Rezeptor für das Cytokin IL-1 $\beta$  agieren könnte, bekräftigt die Ko-Rezeptorfunktion von Sdc für weitere Zytokine, wie Sdc-1 für CXCL1<sup>43</sup> oder Sdc-4 für CCL5.<sup>326</sup> Im Gegensatz dazu findet die Regulation der CXCL1-Expression über den JNK-Signalweg Sdc-1-unabhängig statt. Alle getesteten Zelllinien wiesen nach Inhibitorinkubation mit und ohne Dezidualisierung eine signifikant niedrigere CXCL1-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit einer gut regulierten Signaltransduktion, die zumindest im Fall von ERK1/2 auf einer regulierten Sdc-1-Expression beruht, um die CXCL1-Expression zu steuern, die essentiell für eine erfolgreiche Implantation ist. Eine unzureichende CXCL1-Expression könnte mit einer gestörten Leukozytenrekrutierung und Angiogenese, gefolgt von einer inadäquaten Implantation eingehen und zu Infertilität, Aborten im ersten Schwangerschaftstrimester oder Plazentainsuffizienz führen.<sup>327</sup> Die CXCL1-Expression durch den ERK1/2-Signalweg scheint Sdc-1-abhängig zu sein, sodass eine geregelte Sdc-1-Expression sehr wichtig für eine adäquate CXCL1-Konzentration während der Implantation ist. Somit spielt Sdc-1 eine wichtige Rolle bei der embryonalen Implantation als Regulator der CXCL1-Expression und möglicherweise als Ko-Rezeptor für einen noch unbekanntem CXCL1-Rezeptor.

Die Expression von FZD-Rezeptoren ist essentiell für eine funktionierende Wnt-Signalkaskade. Aufgrund der immensen Bedeutung des Wnt-Signalwegs für den Implantationsprozess<sup>122</sup> ist eine regulierte FZD-Expression auch für die Implantation essenziell. Aufgrund dessen wurde in diesem Teil der Arbeit die Expression der beiden humanen Wnt-Rezeptoren FZD4 und FZD6, die in Mäusen während der Implantation detektiert wurden und demnach eine wichtige Rolle in diesem Prozess einnehmen<sup>126</sup>, in Abhängigkeit von Sdc-1 untersucht. Höchstwahrscheinlich ist der Wnt Signalweg, mitsamt Wnt-Liganden und –Rezeptoren, in den Sdc-1-vermittelten Zellentwicklungsprozessen involviert, wie Untersuchungen an Sdc-1-ko-Mausembryos mit eingeschränkter kortikaler Entwicklung zeigen.<sup>328</sup>

Das Embryosekretionsprodukt IL-1 $\beta$  induzierte eine signifikante Hochregulation der Expression von sowohl FZD4 als auch FZD6 in dSt-T1. Den entgegengesetzten Effekt hatte die IL-1 $\beta$ -Inkubation auf die FZD4-Expression in dKdS1-Zellen mit aktivem *Sdc-1 kd*. Wohingegen dKdS1-Zellen keine Änderungen im Expressionsprofil von FZD6 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  aufwiesen. Die signifikante Zunahme der FZD4- und FZD6-Expression in endometrialen Stromazellen nach Imitation eines Embryos durch IL-1 $\beta$ -Inkubation könnte eine Vorbereitung der Zellen auf eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs darstellen und bestätigt die wichtige Rolle dieser, in Säugetierembryos scheinbar konservierten Signalkaskade, die das maternale Endometrium mit dem Embryotrophoblasten verknüpft.<sup>127,329</sup>

Diese Arbeit zeigte zum ersten Mal eine Expression von FZD4 in einer humanen endometrialen Stromazelllinie. Bisher weist die Literatur keine Studie auf, die die Expression von FZD4 in humanem Stroma untersucht. Das einzige reproduktive Organ mit nachgewiesener FZD4-Expression stellt das humane Ovar dar.<sup>124</sup> Die zyklusunabhängige FZD6-Expression wurde bereits im endometrialen Epithel und Stroma gezeigt<sup>127</sup>. Des Weiteren wurden beide Rezeptoren im reproduktiven Gewebe im Maus- und Schafsmodell während der Implantation gefunden.<sup>126,329</sup> FZD4 wurde hierbei hauptsächlich von uterinen Gefäßen und dem Embryo-umgebenden Stroma während der murinen Dezidualisierung exprimiert. Das Expressionsmuster von FZD6 beschränkte sich auf das murine endometriale Epithel, Stroma und einige Myometriumgefäße. Behandlung der Mäuse mit E<sub>2</sub> führte zu einer Abnahme der Expression von FZD4 und FZD6. P<sub>4</sub> hatte hingegen keinen Einfluss auf die Expression der beiden Wnt-Rezeptoren.<sup>126</sup> Die hypothetische Annahme, dass die Expression von FZD4 und FZD6 auch im Menschen durch E<sub>2</sub> herunterreguliert wird und durch P<sub>4</sub> nicht reguliert werden kann, würde darauf hindeuten, dass die beiden FZD-Rezeptoren und möglicherweise auch der komplette Wnt-Signalweg keine große Rolle während der proliferativen und sekretorischen Zyklusphasen spielt. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Hochregulation der Rezeptorexpression nach Inkubation der dSt-T1-Zellen mit IL-1 $\beta$ , als Imitation eines Embryokontakts, zeigen, entsteht der Verdacht, dass der Wnt-Signalweg nur vor und während der Implantation und möglicherweise auch in der Frühschwangerschaft aktiv ist. Die Wichtigkeit des Wnt-Signalwegs bei der Implantation und der anschließenden Schwangerschaft wird durch die erhöhte Expression des Wnt-Signalweg-Antagonisten, Dkk1, bei Patientinnen mit ungeklärten habituellen

Spontanaborten untermauert.<sup>330</sup> Welche Wnt-Signalwege FZD4 und FZD6 im endometrialen Stroma aktivieren ist bisher noch nicht bekannt. Jedoch wurde für FZD6 gezeigt, dass dieser Rezeptor durch keinen Wnt-Liganden den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren kann. Vielmehr agiert FZD6 als negativer Regulator des  $\beta$ -Catenin-abhängigen kanonischen Signalwegs.<sup>121</sup> Auf der anderen Seite wiesen Tulac und Mitarbeiter neben der Expression von FZD6 im endometrialen Epithel und Stroma auch die Expression von  $\beta$ -Catenin nach.<sup>127</sup> Da die Studie jedoch keinen weiteren FZD-Rezeptor untersucht hat, wäre es denkbar, dass das Vorhandensein von  $\beta$ -Catenin auf die Anwesenheit eines anderen aktiven FZD-Rezeptors hinweist. FZD4 könnte z. B. einer der Rezeptoren im endometrialen Stroma sein, der die möglicherweise implantationswichtigen Vorgänge über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt. Zur Untermauerung dieser Hypothese wäre es notwendig neben der gezeigten FZD4-Expression auch die Expression von  $\beta$ -Catenin in St-T1-Zellen zu zeigen. Wie wichtig der kanonische Wnt-Signalweg für die Etablierung einer gesunden Schwangerschaft ist, zeigt eine Studie, die diesen Weg inaktiviert hat und als Folge eine limitierte Implantationskompetenz von murinen Blastozysten beobachten konnte.<sup>117</sup> Da FZD6 scheinbar über den nicht-kanonischen Signalweg agiert, wäre es hier interessant zu erfahren welchen nicht-kanonischen Signalweg FZD6 aktiviert. Die Expressionsregulation von FZD4 und FZD6 scheint Sdc-1-abhängig abzulaufen, so dass eine inadäquate Sdc-1-Synthese zu einer unzureichenden FZD-Expression führen könnte, die mit einer mangelhaften Aktivierung des Wnt-Signalweges einhergeht. Diese Vermutung wird gestützt durch Studien die zeigen, dass Dysregulationen in der Expression diverser Wnt-Liganden und Rezeptoren, die z. B. in Endometriose- und endometrialem Karzinomgewebe gefunden wurden<sup>122</sup>, möglicherweise zu Pathologien der weiblichen Reproduktionsorgane und Infertilität führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Sdc-1 ein scheinbar wichtiges Mitglied des komplexen Implantationsnetzwerkes aus Chemokinen, Rezeptoren und Signalwegen darstellt. Sdc-1 ist in der Lage, die CXCL1-Expression in endometrialen Stromazellen mit Hilfe des ERK1/2-Signalweges zu modulieren und ist außerdem für eine adäquate FZD-Expression verantwortlich, die für eine Aktivierung des Wnt-Signalweges wichtig ist. Störungen in der Sdc-1-Expression zeigten in allen untersuchten Fragestellungen einen Effekt auf die untersuchten *targets* in Form von einer Expressionsabnahme oder fehlender Expressionssteigerung. Die abnormalen

Expressionen von CXCL1, FZD4 und FZD6 bei Abwesenheit von Sdc-1 und nach Imitation eines Embryokontakts mittels IL-1 $\beta$  könnten eine negative Auswirkung auf die embryonale Implantation und die anschließende Schwangerschaft haben. Niedrige Sdc-1-Level wurden in Blutseren von Patientinnen, die an Präeklampsie und dem HELLP-Syndrom leiden, gefunden.<sup>91</sup> Beide Krankheitsbilder sind dafür bekannt, teilweise schwere Komplikationen sowohl für die Mutter als auch für das Kind hervorzurufen.<sup>331,332</sup> Des Weiteren ist der Krankheitsverlauf der uterinen Wachstumsretardierung ebenfalls mit niedrigen Sdc-1-Konzentrationen im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften assoziiert.<sup>90</sup>

Auf der Basis dieser Ergebnisse wäre die Einführung von Sdc-1 als ein Marker für Implantationskompetenz des Endometriums denkbar. Insbesondere Frauen und Paare, die sich einer IVF-Therapie unterziehen und unter Implantationsversagen oder habituellen Aborten im ersten Schwangerschaftstrimester leiden könnten von solch einem diagnostischen Werkzeug profitieren. Obwohl zu gegebenem Zeitpunkt noch keine Therapieoptionen für die Behandlung von verringerter Sdc-1-Expression zur Verfügung stehen, könnte eine Diagnose zu einem besseren Verständnis der Vorgänge und darauf aufbauend zur Entwicklung entsprechender Therapeutika führen.

#### **4.3 Sphäroide – 3D-Ko-Kultur als Model für die embryonale Implantation**

Aus ethischen und rechtlichen Gründen ist die Untersuchung der humanen embryonalen Implantation *in vivo* nicht möglich. Die Wichtigkeit der Erforschung dieses Vorgangs führte zur Entwicklung verschiedener Implantationsmodelle. In dieser Arbeit sollte ein 3D-Ko-Kultursystem mit Sphäroiden als neues und Physiologie-nahes Implantationsmodell etabliert werden.

Nach einer anfänglich instabilen Adhäsion wurde sowohl bei Kontrollen, die aus jeweils 2 St-T1-, 2 Tet-induzierten KdS1-Sphäroiden oder einem St-T1- und einem KdS1-Sphäroid bestanden, als auch den Versuchsansätzen mit fortschreitender Inkubation eine Interaktion in Form von Anwachsen der beiden Sphäroide beobachtet. Die erwartete Interaktion der Kontrollen beruht auf der Tatsache, dass es sich bei allen Kontrollansätzen um 2 Sphäroide der gleichen Zelllinie handelte. Die Interaktion zwischen endometrialen, stromalen St-T1- bzw. KdS1-Sphäroiden und trophoblastären HTR8/SVneo-Sphäroiden als Embryoimitat diente der Untersuchung der ersten Schritte der embryonalen Implantation. Im Gegensatz zu den Kontrollen

wiesen diese Versuchsansätze neben einer Adhäsion der Zellaggregate auch ein Wandern und Ausbreiten der HTR8/SVneo-Zellen auf. Die HTR8/SVneo-Zellen übernahmen einen deutlich aktiveren Part und breiteten sich auf der Oberfläche der Stroma-Sphäroide aus. Dieses zelluläre Wandern ist mit dem radiären Ausbreiten der (Synzytium-) Trophoblastzellen in der Dezidua, bei der labyrinthartige Hohlräume entstehen, die anschließend mit mütterlichem Blut durchströmt werden, zu vergleichen.<sup>92</sup> Dies zeigt deutlich die vorhandene Ähnlichkeit des Implantationsmodells zu den natürlichen physiologischen Prozessen zu Beginn der Implantation. Die beobachtete stärkere Interaktion der trophoblastären Zellen mit den endometrialen Zellen mit *Sdc-1 kd*, die sich in einer stärkeren Anwachsung der Sphäroide äußerte, könnte auf eine dysregulierte Invasionsregulation durch die Abwesenheit von *Sdc-1* hindeuten. Eine Invasion der Trophoblastzellen im Innern der Stromasphäroide konnte wegen der geringen Färbung im Sphäroideninneren und der limitierten Fluoreszenzanregung in tieferen Gewebeschichten nicht nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung der äußeren Interaktion war nach 72h aufgrund der stark verblassten Fluoreszenz nicht mehr möglich. Folglich wurde für die Auswertung der Konfrontationskulturen eine weitere Detektionsmethode auf IHC-Basis etabliert, die die Untersuchung der Interaktion der Sphäroide deutlich länger ermöglichte, und den Prozess der humanen embryonalen Implantation, der 5 Tage dauert<sup>333</sup> besser imitierte. Ein Nachteil der IHC-Methode bestand in der Fixierung der Konfrontationskultur für jeden festgelegten Zeitpunkt, damit konnte im Gegensatz zu den Fluoreszenz-gefärbten Ansätzen ein ko-kultiviertes Sphäroidenpaar nur an einem Zeitpunkt analysiert werden. Diese Tatsache führt jedoch zu deutlich höheren n-Zahlen bei der Versuchsdurchführung, die sich positiv auf die statistische Auswertung der Versuche auswirkt. Die Versuchsansätze mit vorheriger MitoTracker<sup>®</sup>-Färbung wurden dagegen für die Untersuchung mehrerer hintereinander liegender Zeitpunkte verwendet.

Die fibroblastäre endometriale Stromazelllinie St-T1 wurde erfolgreich auf Vimentin-Expression getestet. Dadurch konnten die St-T1- und KdS1-Zellen deutlich von den Zellen des HTR8/SVneo-Sphäroiden nach der IHC unterschieden werden. Die initialen Ergebnisse der IHC-Färbungen zeigten eine deutliche Interaktion der stromalen mit den trophoblastären Sphäroiden, die nicht nur in der Umschließung des Trophoblastsphäroiden durch HTR8/SVneo-Zellen, die bereits in den Fluoreszenzversuchen beobachtet wurde, sondern auch in der Invasion der

HTR8/SVneo-Zellen in den Stromasphäroiden und *vice versa* bestand. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzansätzen schien die Interaktion von KdS1-Zellen mit Sdc-1 *kd* mit dem Embryosurrogat, HTR8/SVneo-Sphäroid, deutlich schwächer zu sein im Vergleich zu den St-T1-Zellen. Die Messung der Mittelpunkt-Distanzen ergab eine tiefere Invasion des St-T1-Sphäroiden in den HTR8/SVneo-Sphäroid gegenüber dem KdS1-Sphäroid. Dieses Ergebnis könnte mit einer geringen Implantationstiefe bei niedrigen Sdc-1-Level assoziiert werden. Eine oberflächliche Implantation des Embryos kann zu einer gestörten Angiogenese führen und wird oft mit pathologischen Schwangerschaftsverläufen wie der Entwicklung einer Präeklampsie und/oder IUGR verbunden.<sup>334,335</sup> Untermuert wird diese Hypothese durch die Detektion von niedrigen Sdc-1-Konzentrationen bei Patientinnen mit Präeklampsie.<sup>91</sup> Beim Vergleichen der beiden Methoden fiel auf, dass die IHC-Methode eine signifikant intensivere Interaktion zwischen St-T1-Sphäroiden und HTR8/SVneo-Sphäroiden ohne vorangegangene MitoTracker®-Färbung im Gegensatz zu den Fluoreszenz-gefärbten Sphäroiden aufwies. Die vorangegangene Färbung der Zellen mit MitoTrackern® scheint eine Wirkung auf die Zellen zu haben, die dazu führt, dass die behandelten Zellen eine signifikant niedrigere Aktivität aufweisen. Hierbei könnten die stattfindenden Prozesse, wie Permeabilisierung der Zellmembran und Anlagerung der Fluoreszenzmoleküle an die Mitochondrien einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausüben. Demnach scheint die Sphäroid-Ko-Kultur ohne MitoTracker®-Färbung und mit anschließender IHC-Untersuchung eine bessere Methode zu sein, die Implantation zu analysieren, da hier keine negativ wirkenden Faktoren, wie die zellinvadierenden Fluoreszenzfarbstoffe auf die Interaktion wirken und diese verfälschen können.

Die Generierung von Sphäroiden aus zuvor dezidualisierten Zellen war durch die morphologischen Veränderungen der endometrialen Stromazellen nicht möglich, sodass die Untersuchung der Sdc-1 *kd* Auswirkung auf das Interaktionsverhalten bei dezidualisierten Sphäroiden nicht durchgeführt werden konnte. Als weitere Maßnahme, um dezidualisierte Sphäroide zu erhalten, wäre es denkbar die Sphäroide nach der Formation für 72h in Dezidualisierungsmedium zu überführen. Der Dezidualisierungsnachweis könnte mittels PRL-ELISA mit dem Zellkulturmedium des hängenden Tropfens durchgeführt werden. Einen Nachteil dieser Methode könnte möglicherweise die lange Verweildauer der Sphäroide im Mediumtropfen vor der eigentlichen Konfrontationskultur darstellen. Je länger ein Sphäroid nach der

Formation kultiviert wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die im Innern des Sphäroiden befindlichen Zellen, aufgrund von Unterversorgung und Sauerstoffmangel, nekrotische Prozesse in Gang setzen, die möglicherweise eine Auswirkung auf die Viabilität des Sphäroiden haben könnten.

Neben der gezeigten Messung der Mittelpunktdistanz ist die Messung des gesamten Durchmessers der beiden konfrontierten Sphäroide, der mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme zeigen sollte, wenn die Sphäroide miteinander in Form von Invasion interagieren, als alternative Auswertmethode möglich.

Damit wurde erfolgreich ein neues Implantationsmodell entwickelt und etabliert, das in Zukunft eine große Bandbreite an Versuchen an der embryo-maternalen Schnittstelle *in vitro*, wie z. B. die Analyse von Implantations-fördernden und/oder – hemmenden Substanzen und Faktoren, ermöglicht. Dieses Ko-Kulturmodell soll die Erforschung der humanen Implantation erleichtern und im weiteren Verlauf auch eventuell neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten, bei der Behandlung von Implantationsversagen und habituellen Aborten bei Patientinnen, die auf natürlichem Weg schwanger werden und auch bei ART-Patientinnen eröffnen.

#### 4.4 Charakterisierung der Sdc-1-ko-Maus

Sdc-1 ist ein Mitglied der Heparansulfat-Proteoglycan-Familie, die dafür bekannt ist die Aktivität vieler verschiedener Liganden zu modulieren und dadurch das Potenzial besitzt eine große Diversität an biologischen Prozessen zu regulieren.<sup>166</sup> Humanes Sdc-1 spielt als Ko-Rezeptor für CXCL1 eine wichtige Rolle bei der Implantation des Embryos in das maternale Endometrium.<sup>43</sup> Daneben ist es außerdem in Prozesse, wie Regulation von Wachstumsfaktoren, Signalwegen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, Modulation von Zytoskelettproteinen, Zellproliferation, Migration, Tumorentwicklung, Energiemetabolismus, Wundheilung und Inflammation involviert.<sup>75,80,81</sup> In Mäusen wurden ebenfalls 4 Sdc gefunden. Jedes Sdc liegt auf einem anderen Chromosom, wobei das Sdc-1 kodierende Gen auf Chromosom 12 zu finden ist.<sup>336</sup> Tumorgenese, Wundheilung, Organentwicklung sind neben der Regulation des Fressverhaltens die Vorgänge bei denen Sdc-1 eine wichtige Rolle spielt.<sup>150–156</sup> Studien an Sdc-1 defiziente Mäuse im Hinblick auf die Tumorgenese und Wundheilung, zeigten dass der *ko*-Mausstamm gesund und fertil ist.<sup>151,153</sup> Jedoch scheint das reproduktive Verhalten dieser Tiere, nach Rücksprache mit Arbeitsgruppen, die die Sdc-1-*ko*-Maus in ihrer Forschung einsetzen, gestört zu sein

und in schlechter Züchtung und kleineren Wurfgrößen resultieren. In diesem Teil der Arbeit sollten initiale Untersuchungen zur Charakterisierung des reproduktiven Phänotyps und reproduktiven Verhaltens der *Sdc-1-ko*-Maus durchgeführt werden. Der *Sdc-1-ko*-Maus-Stamm wurde 2002 von Stepp und Mitarbeitern mit dem genetischen Hintergrund des C57Bl/6-Stammes generiert.<sup>153</sup> Es ist bekannt, dass *Sdc-1-ko*-Mäuse sich normal entwickeln, gesund und grundsätzlich fertil sind, jedoch bilden sie dramatische pathologische Phänotypen unter infektiösen Bedingungen aus, zusätzlich sind sie leichter und kleiner als C57Bl/6-WT-Mäuse.<sup>74,337</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Schwangerschaftsrate und der Wurfgröße auch das Gewicht der verpaarten Weibchen und das Gewicht der Jungtiere bis Tag 100 der Entwicklung bestimmt. Vor der Versuchsdurchführung wurden die *Sdc-1-ko*-Mäuse einem *ko*-Nachweis mittels PCR unterzogen. Die bestimmte Trächtigkeitsrate der *Sdc-1-ko*-Mäuselag lag bei 17,02% und war damit ähnlich der Trächtigkeitsrate der WT-Kontroll-Tiere, die 18,75% betrug. Jedoch wurden die Kontroll-Tiere aufgrund von Platzproblemen in der Tierversuchsanlage nicht im gleichen Raum gehalten und waren einem ständigen Wechsel des Pflegepersonals ausgeliefert. Diese suboptimalen Haltungsbedingungen der Kontroll-Mäuse könnten sich negativ auf die Fertilität der Tiere durch erhöhte Stressbelastung ausgewirkt haben, sodass über die Trächtigkeitsrate keine Schlussfolgerung auf das Züchtungsverhalten der *Sdc-1-ko*-Mäuse geschlossen werden konnte. Der bereits beschriebene Gewichtsunterschied der *Sdc-1-ko*-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen konnte bestätigt und auf 16-25% bestimmt werden. Die zum ersten Mal durchgeführte Gewichtsbestimmung der Jungtiere zeigte, dass der Gewichtsunterschied bereits am Tag der Geburt statistisch signifikant ausgeprägt war. Des Weiteren konnte keine Angleichung des Gewichts trotz identischer Haltungsbedingungen von *Sdc-1-ko*- und WT-Mäusen in den ersten 100d beobachtet werden. Die Wurfgröße war mit 7 Jungtieren sowohl bei *Sdc-1-ko*- als auch bei WT-Mäusen gleich, jedoch wurden in der *Sdc-1-ko*-Gruppe deutlich mehr Jungtiere tot geworfen bzw. sind innerhalb der ersten 7 Lebenstagen verstorben. Hier betrug die Anzahl der toten Jungtiere 33,3% bei den *Sdc-1-ko*-Mäusen und 16,7% bei den Kontrolltieren. Damit war die Anzahl der toten Tiere mit *Sdc-1 ko* doppelt so hoch als ohne *Sdc-1 ko* und könnte auf das statistisch signifikant niedrigere Geburtsgewicht und die mögliche Unterversorgung der Jungtiere während der Trächtigkeit der *Sdc-1-ko*-Mäuse zurückzuführen sein. Der Verlust von *Sdc-1* scheint demnach massive Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung der

Mäuse zu haben, die sich in einem gestörten Wachstum und verminderter Gewichtszunahme der Tiere äußern. Das signifikant niedrigere Gewicht und die nicht gemessene jedoch beobachtete kleinere Länge der Sdc-1-ko-Mäuse blieben während der Beobachtungszeit von 100d bestehen. Eine Studie hat gezeigt, dass eine Sdc-1-Überexpression im Hypothalamus zu einer starken Hyperphagie und Adipositas in Mäusen führt. Die verstärkte Gewichtszunahme wurde hierbei jedoch erst ab einem Alter von 8 Wochen detektiert und auf eine erhöhte Futteraufnahme zurückgeführt. Bei 6 Monate alten Männchen und Weibchen mit einer Sdc-1-Überexpression zeigte sich eine höhere Futteraufnahme gegenüber den WT-Tieren. Neben höheren Organgewichten wurden im Blutplasma ebenfalls erhöhte Level von Leptin, Insulin und Glukose vorgefunden.<sup>156</sup> Überexprimiertes Sdc-1 wurde in nahezu allen epithelialen Geweben und einigen mesenchymalen Geweben wie Nebenniere, Niere, Herz- und Skelettmuskel und Gehirn mittels IHC nachgewiesen. Dabei handelte es sich in allen untersuchten Geweben mit der Ausnahme von Herz- und Skelettmuskel um Oberflächen-gebundenes Sdc-1 und nur in dieser Form hatte Sdc-1 eine Auswirkung auf das Fressverhalten der transgenen Mäuse. In löslicher Form führte eine Überexpression von Sdc-1 zu keiner Gewichtszunahme. Im Gehirn der transgenen Mäuse wurde die Anwesenheit von Sdc-1 Protein und mRNA nur in bestimmten Hypothalamuszellkernen belegt. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse ohne Sdc-1-Überexpression keine Expression von Sdc-1 Protein und mRNA im Gehirn.<sup>156</sup> Demnach spielt Sdc-1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Hunger- und Sättigungsgefühle im Hypothalamus. Da Sdc-1-ko-Mäuse bereits bei der Geburt ein niedrigeres Gewicht aufwiesen und sich dieser Unterschied zu den WT-Mäusen nicht erst im Laufe der Zeit entwickelt, scheint hier die Ursache nicht im Fressverhalten der Tiere zu liegen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine murine Art der intrauterinen Wachstumsretardierung und eventuell auch Präeklampsie.<sup>250</sup> Die in 5-8% aller humanen Schwangerschaften auftretende Bluthochdruckerkrankung tritt in Mäusen nicht spontan auf.<sup>338</sup> Die Notwendigkeit diese Krankheit zu untersuchen führte jedoch zur Entwicklung mehrerer Präeklampsie-Mausmodelle<sup>339</sup> oder Injektion von AK aus Blutserum von Patientinnen mit Präeklampsie in trächtige Mäuse.<sup>340</sup> Die behandelten Mäuse zeigten die gleichen Symptome wie Patientinnen mit Präeklampsie, dazu zählten unter anderem Hypertonie, Proteinurie, plazentare Abnormitäten und kleinere Feten.<sup>339,340</sup> Untersuchungen am Menschen haben die genaue Ursache bisher noch nicht

aufgedeckt, jedoch wird vermutet, dass eine Störung der Plazentation, für die Ausbildung von Präeklampsie verantwortlich ist.<sup>341–343</sup> Hierbei könnte vor allem die inadäquate plazentare Angiogenese bedingt durch eine zu flache, oberflächliche Implantation und die daraus resultierende fehlerhafte Entwicklung von Spiralarterien von großer Bedeutung sein.<sup>94,95</sup> Die Invasion des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua wird unter anderem durch uNK-Zellen und von uNK-Zellen sezernierte Zytokine moduliert.<sup>344,345</sup> Zu den uNK-Zellen-sezernierenden Zytokinen zählen neben Invasions-regulierenden auch Angiogenese-induzierende Zytokine.<sup>220</sup> Sdc-1 ist dafür bekannt Leukozyten, wie uNK-Zellen, an bestimmte Orte zu rekrutieren<sup>74</sup>, sodass ein Verlust von Sdc-1, wie in der *Sdc-1-ko*-Maus, zu einem verminderten Zustrom an uNK-Zellen und dadurch zu einer unzureichenden Expression von Invasions-regulierenden und Angiogenese-induzierenden Zytokinen an der embryo-maternalen Schnittstelle führen könnte. Des Weiteren wäre auch die Beteiligung des Angiogenese-aktiven ELR<sup>+</sup>-Chemokins CXCL1 denkbar.<sup>23</sup> CXCL1 agiert über seinen G-Proteingekoppelten Rezeptor CXCR2 und aktiviert Angiogenese-modulierende Signalwege durch Bindung an den Rezeptor. Diese Bindung wird durch die Ko-Rezeptor-Funktion von Sdc-1 begünstigt, sodass es bei Abwesenheit von Sdc-1 zu einer verminderten Aktivierung des CXCR2 durch CXCL1 kommen könnte, die sich möglicherweise negativ auf den Angiogenese-Prozess auswirkt. Eine inadäquate Implantation und gestörte Angiogenese können anschließend zu der Ausbildung einer Präeklampsie führen. Eine häufige Folge von Präeklampsie ist die fetale intrauterine Wachstumsretardierung.<sup>346</sup> Diese kann jedoch auch ohne das Auftreten einer Präeklampsie durch eine insuffiziente Implantation induziert werden und hat negative Auswirkungen auf das fetale Wachstum, den fetalen Gesundheitszustand und darüberhinaus wahrscheinlich auch auf verschiedene Erkrankungen im Erwachsenenalter<sup>347</sup> wie kardiovaskuläre Erkrankungen, erhöhter BMI, Schizophrenie und andere psychische Störungen.<sup>348–351</sup>

Folglich könnte der *Sdc-1 ko* die murine Implantation stören, die plazentare Angiogenese negativ beeinflussen und zu einer Unterversorgung der Embryonen führen, die anschließend in einer signifikanten Wachstumsretardierung endet, wie in dieser Studie beobachtet.

Durch diese initialen Experimente wurde ein Grundstein für weitere Versuche mit der *Sdc-1-ko*-Maus, die den Einfluss von Sdc-1 auf den Stoffwechsel untersuchen werden, gelegt. Hierzu könnten längere Gewichtsbeobachtungen,

Blutuntersuchungen, Organgewichtsanalysen und Embryotransferversuche gehören. Die Verfolgung des Präeklampsie-Ansatzes würde Analysen des Blutdrucks und der Proteinausscheidung in der *Sdc-1-ko*-Maus nach sich ziehen. Diese Versuche sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit der *Sdc-1 ko* einen Einfluss auf den Metabolismus und die Organentwicklung hat, ob die Gründe für diese Effekte auf der maternalen oder embryonalen Seite liegen und sich durch den Austausch von Embryo bzw. Ammentier aufheben lassen. Zusammengefasst werden die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der *Sdc-1*-Rolle in der murinen Entwicklung und Reproduktion beitragen.

#### **4.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Die humane embryonale Implantation ist ein essentieller Prozess bei der Etablierung einer gesunden Schwangerschaft und unterliegt einer strengen Regulation. Trotz einer Vielzahl an durchgeführten Studien ist das komplexe Implantationsregulierende Netzwerk aus verschiedenen Faktoren, den korrespondierenden Rezeptoren und Signalwegen noch lange nicht ins Detail verstanden.

Die Detektion des CXCL1-Rezeptors CXCR2 in der endometrialen Stromazelllinie St-T1, die Analyse der CXCR2-Funktionen an der embryo-maternalen Schnittstelle, die Untersuchung des *Sdc-1*-Einflusses auf die CXCL1-Expressions-vermittelnden Signalwege, ERK1/2, JNK und Wnt, die Etablierung eines neuen, auf einer Sphäroiden-Ko-Kultur basierenden, 3D-Implantationsmodells und die initialen Charakterisierungsuntersuchungen der *Sdc-1-ko*-Maus, die eine Basis für weiterführende Analysen an dem Mausmodell darstellen sollten, bildeten die Zielsetzung dieser Arbeit. Die Regulation der Angiogenese und die chemoattraktive Wirkung auf Immunzellen sind nur zwei der vielen wichtigen Funktionen von CXCL1, die dessen Anwesenheit an der embryo-maternalen Schnittstelle unverzichtbar machen. Diese Funktionen werden laut Literatur über den Rezeptor CXCR2 und den Ko-Rezeptor *Sdc-1* vermittelt. Nachdem die Expression von CXCL1 und *Sdc-1* bereits mehrmals in den endometrialen Stromazellen nachgewiesen wurde, sollte die Detektion von CXCR2 und dessen Funktionsanalyse einen Teil dieser Arbeit darstellen. Die Realisierung dieser Zielsetzung sollte durch die Generierung eines stabilen induzierbaren CXCR2 *kd* in St-T1 durchgeführt werden. Nach den mehrmals durchgeführten Transfektionen der St-T1-Zellen, der erfolgreichen Isolierung von 89 putativen *kdCXCR2*-Zellklonen und den Versuchen die Basisexpression von CXCR2

und den *kd* durch Standard-PCR, *nested*-PCR, TD-PCR, qRT-PCR, IHC, IF, WB und die besonders sensitive Methode des QGP Assay nachzuweisen, konnte gezeigt werden, dass die St-T1-Zelllinie keine CXCR2-Expression aufweist. Die Expression des CXCR2-Liganden und des Ko-Rezeptors Sdc-1 in St-T1 führte zu der Hypothese, dass das endometrialen Stroma als Vermittler und Signalweiterleiter während der Präimplantations- und Implantationsprozesse fungiert. Hierbei wird das Signal des anwesenden Embryos in Form von sezernierten Faktoren wie IL-1 $\beta$  von endometrialen Stroma aufgenommen und zur Steigerung der CXCL1-Expression verwendet. Die Signalweiterleitung in Form von sezerniertem CXCL1 induziert anschließend mit Hilfe von CXCR2-exprimierende Zellen Implantations-relevante Prozesse, die die Implantation des Embryos in das Endometrium regulieren. Das detektierte Sdc-1 spielt im endometrialen Stroma möglicherweise die Rolle eines Chemokinspeichers, das durch das Binden von CXCL1 einen chemoattraktiven Gradienten aufbaut und damit den Zustrom von Leukozyten an die embryo-maternale Schnittstelle ermöglicht. Daneben reguliert Sdc-1 die CXCL1-Expression in St-T1-Zellen über den ERK1/2-MAPK-Signalweg. Eine Herunterregulation von Sdc-1 führte zu einer statistisch signifikanten Abnahme der CXCL1-Expression nach Aktivierung der ERK1/2-Signalwegs durch IL-1 $\beta$ . Ein weiterer untersuchter MAPK-Signalweg, JNK, schien Sdc-1-unabhängig reguliert zu werden. Die Expression der beiden Wnt-Rezeptoren FZD4 und FZD6 ist ebenfalls von Sdc-1 abhängig und zeigte eine Herunterregulation von FZD4 bei Abwesenheit von Sdc-1 und eine fehlende Hochregulation von FZD6. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse wie wichtig eine regulierte Sdc-1-Expression bei der Implantation ist. Dysregulationen in Form von unzureichender Sdc-1-Expression in endometrialen Stromazellen könnten die Ausbildung eines CXCL1-Gradienten stören und dadurch den essentiellen Zustrom an Leukozyten, die für die Ausbildung des maternalen Toleranzpotenzials gegenüber dem semi-allogenen Embryo unabdingbar sind, hemmen. Des Weiteren könnte eine niedrige Sdc-1-Konzentration zu einer unterdrückten CXCL1-Expression führen, wodurch viele Implantation-essentielle Prozesse nicht aktiviert werden könnten. Auch der untersuchte Wnt-Signalweg wies durch die Inkubation der St-T1-Zellen mit IL-1 $\beta$  eine Zunahme der FZD4- und FZD6-Expression als Hinweis für eine Aktivierung und dadurch auch Beteiligung des Signalwegs bei der embryonalen Implantation auf. Hier störte der Sdc-1 *kd* signifikant die Expression der beiden Rezeptoren *in vitro*, sodass eine erniedrigte Sdc-1-Expression auch *in vivo* die Aktivierung des Wnt-Signalwegs

beeinträchtigen und dadurch einen negativen Einfluss auf die Implantation haben könnte.

Die erfolgreiche Etablierung einer neuen 3D-Ko-Kultur aus einem endometrialen Stromasphäroiden und einem Sphäroiden aus trophoblastären Zellen als ein neues Modell für die humane Implantation ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlicher Versuchsansätze zur Untersuchung dieses Prozesses. Die Besonderheit dieses Modells bildet die Physiologie-nahe dreidimensionale Versuchsdurchführung, die vor allem für Invasionsstudien eingesetzt werden kann und die Möglichkeit besitzt die Auswertung auf Fluoreszenz- oder IHC-Ebenen durchzuführen.

Die initialen Charakterisierungsversuche der Sdc-1-ko-Maus im Hinblick auf die Reproduktion belegten das bereits gezeigte niedrigere Gewicht und die kleinere Größe der Sdc-1-ko-Mäuse, die möglicherweise auf eine Unterversorgung der Embryos, bedingt durch den Sdc-1 *ko*, zurück zu führen ist. Des Weiteren wurde aufgedeckt, dass dieser Gewichtsunterschied bereits bei der Geburt im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant war und in dem Untersuchungszeitraum von 100d keine Gewichtsangleichung stattfand. Zusätzlich wurde eine erhöhte Sterblichkeit der Sdc-1-ko-Jungtiere innerhalb der ersten 7 Lebensstage beobachtet. Diese Ergebnisse bildeten eine Basis für weiterführende Versuche, die sich auf den Stoffwechsel der Sdc-1-ko-Mäuse und der Untersuchung der embryonalen Wachstumsretardierung konzentrieren könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier aufgeführten Ergebnisse sichtlich zum besseren Verständnis einiger komplexer Implantationsprozesse beigetragen haben und zusammen mit dem neuen *in vitro* Implantationsmodell und dem *in vivo*-Mausmodell eine solide Basis für weiterführende Versuche, die Vorgänge an der embryo-maternalen Schnittstelle zu dechiffrieren, gelegt haben. Darüberhinaus könnten aufgrund der gezeigten, besonders wichtigen Bedeutung von Sdc-1 für viele Implantations-relevante Vorgänge neue diagnostische und therapeutische Methoden entwickelt werden, von denen vor allem Patientinnen mit Implantationsversagen, habituellen Aborten und Patientinnen, die sich einer ART-Behandlung unterziehen, profitieren könnten.

## 4.6 Summary and prospects

The human embryonic implantation is an essential process for the establishment of a proper pregnancy and underlies a tight regulation. Despite numerous studies the complex regulation network of the implantation is still not completely understood.

The detection of the CXCL1 receptor CXCR2 in the endometrial stromal cell line St-T1, and the analysis of the CXCR2 functions at the embryonic-maternal interface represented the first aim of the current study. Furthermore the investigations of the 2 signaling pathways, ERK1/2 and JNK, which are known to regulate CXCL1 expression and the Wnt signaling pathway with respect to Sdc-1 expression provided a further important approach. Moreover the establishment of a new 3D implantation model based on a spheroidal co-culture and the initial investigations of the Sdc-1-knockout mouse characterization as a foundation for further research also belonged to the purpose of this work.

The regulation of angiogenesis and the chemo-attractive effect on immune cells are just 2 of various possible CXCL1 functions at the embryonic-maternal interface. According to the literature, CXCL1 acts through the corresponding receptor CXCR2 and the co-receptor Sdc-1. Since the expression of CXCL1 and Sdc-1 was shown in endometrial stromal cells several times before, the detection of CXCR2 and the analysis of its function represented a part of the present study. The realization of this aim should be accomplished by a generation of a stable inducible CXCR2 knockdown in St-T1 cells. After the isolation of 89 putative knockdown CXCR2 cell clones the proof of CXCR2 knockdown was performed by PCR, nested-PCR, TD-PCR, qRT-PCR, IHC, IF, WB and one especially sensitive method, the QGP assay. No CXCR2 expression was shown in St-T1 cells. The expression of the CXCR2 ligand CXCL1 and the co-receptor Sdc-1 led to the hypothesis of endometrial stroma as mediator and signaling redirector during the pre-implantation period. Therefore, the signal of the present embryo in terms of IL-1 $\beta$  could be detected by the stromal cells and used for up-regulating the CXCL1 expression. After secretion of the signaling molecule, CXCL1 would be able to induce processes that are relevant for implantation with the help of CXCR2 expressing cells. The detected Sdc-1 in the endometrial stromal cells may play a role as storage for chemokines that can form a chemo-attractive gradient with the binding of CXCL1. This gradient could be used for leukocyte recruitment to the embryo-maternal interface.

Furthermore, Sdc-1 is regulating the CXCL1 expression in St-T1 cells through the ERK1/2 signaling pathway. The down-regulation of Sdc-1 led to a statistical significant decrease of CXCL1 expression after ERK1/2 signaling activation by IL-1 $\beta$ . The further investigated JNK signaling pathway seemed to act independent of Sdc-1 expression. The expression of 2 Wnt-receptors, FZD4 and FZD6, was also contingent on a proper Sdc-1 expression and was up-regulated in the presence of the embryo secretion product, IL-1 $\beta$  that implies an important role during embryo implantation. With Sdc-1 deficiency the expression of FZD4 was down-regulated. And in case of FZD6, IL-1 $\beta$  had no effect on the expression in absence of Sdc-1. Summarizing, a regulated Sdc-1 expression in endometrial stromal cells seems to be important for the implantation process. Dysregulations in the expression of Sdc-1 could let to an impaired formation of the CXCL1 gradient and therewith to an obstructed leukocyte recruitment to the embryo-maternal interface which is essential for the formation of the maternal immune tolerance towards the semi-allogenic embryo. Furthermore the expression of CXCL1 could also be disturbed by an inadequate activation of the ERK1/2 signaling pathway. An insufficient CXCL1 expression could have an impact on different processes important for embryo implantation. An abnormal Sdc-1 expression may also have an effect on FZD4 and FZD6 expression and so on Wnt signaling activation with a possible negative influence on the implantation process.

The successful establishment of a new 3D co-culture with an endometrial stromal and a trophoblastic spheroid as a new implantation model enables the investigations of many different aspects of the human implantation. The specialty of this implantation model is the 3 dimensional experiment implementation that is especially crucial for invasion studies.

The initial tests for the characterization of the Sdc-1-ko-mouse in respect of the reproduction showed a lower weight versus control mice which was already existing after birth and remained the first 100 days. Furthermore there were a greater number of dead mouse pups with Sdc-1 deficiency. These results indicated a possible shortage of the mice embryos during pregnancy, perhaps in terms of a murine pre-eclampsia or IUGR that could be attributed to the Sdc-1 ko. This outcome provides the base for further investigation on the metabolism of the Sdc-1-ko-mouse and the functions of the murine Sdc-1.

Summarizing, this results contributed to a better understanding of the complex implantation network and built a respectable foundation for additional studies on the embryo-maternal interface for further decryption of the implantation process. In addition to this, the shown essential impact of Sdc-1 on different implantation important processes could provide new diagnostic tools and therapeutical techniques for treating women with implantation failure, habitual miscarriages and women in ART treatment.

## 5 Literatur

1. Encyclopædia Britannica Inc. *Encyclopædia Britannica*. (2008).
2. Rodesch, F., Simon, P., Donner, C. & Jauniaux, E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **80**, 283–285 (1992).
3. Maltepe, E. *et al.* Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development* **132**, 3393–3403 (2005).
4. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3296 (Academic Press, 2006).
5. Henderson, T. A., Saunders, P. T., Moffett-King, A., Groome, N. P. & Critchley, H. O. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 440–449 (2003).
6. Emiliani, S., Delbaere, A., Devreker, F. & Englert, Y. Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive. *Reprod. Biomed. Online* **10**, 527–540 (2005).
7. Dominguez, F., Remohí, J., Pellicer, A. & Simón, C. Human endometrial receptivity: a genomic approach. *Peprod Biomed Online* **6(3)**, 332–8 (2003).
8. Fitzgerald, J. S., Poehlmann, T. G., Schleussner, E. & Markert, U. R. Trophoblast invasion: The role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum. Reprod. Update* **14**, 335–344 (2008).
9. McGowen, M. R., Erez, O., Romero, R. & Wildman, D. E. The evolution of embryo implantation. *Int. J. Dev. Biol.* **58**, 155–161 (2014).
10. Hannan, N. J. *et al.* Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. *Endocrinology* **152**, 4948–4956 (2011).
11. Chan, H.-W., McKirdy, N. C., Peiris, H. N., Rice, G. E. & Mitchell, M. D. The role of endocannabinoids in pregnancy. *Reproduction* **146**, R101–9 (2013).
12. Fritz, R., Jain, C. & Armant, D. R. Cell signaling in trophoblast-uterine communication. *Int. J. Dev. Biol.* **58**, 261–71 (2014).
13. Jose-Miller, A. B., Boyden, J. W. & Frey, K. A. Infertility. *Am. Fam. Physician* **75**, (2007).
14. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung. (2009).

15. Statistisches Bundesamt. (2012).
16. Deutsches IVF Register eV. (DIR). (2012).
17. Fischl, F. & Huber, J. Moderne Sterilitätsbehandlung bei Kinderwunsch. *Schweiz Med Forum* (2003).
18. Steptoe, P. C. & Edwards, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* **2**, 366 (1978).
19. Wang, J. & Sauer, M. V. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2**, 355–64 (2006).
20. *The Cytokine Handbook 4th edition.* (Academic Press, 2003).
21. *Lexikon der Biologie, Cytokine.* (Spektrum Akademischer Verlag, 1999).
22. Segerer, S. & Nelson, P. J. Chemokines in renal diseases. *ScientificWorldJournal.* **5**, 835–844 (2005).
23. Raman, D., Sobolik-Delmaire, T. & Richmond, A. Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.* **317**, 575–589 (2011).
24. Strieter, R. M. *et al.* The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 27348–27357 (1995).
25. Townson, D. H. & Liptak, A. R. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 94 (2003).
26. Thiele, S. & Rosenkilde, M. Interaction of chemokines with their receptors--from initial chemokine binding to receptor activating steps. *Curr Med Chem* **21**, 3594–614 (2014).
27. Drake, P. M., Red-Horse, K. & Fisher, S. J. Chemokine expression and function at the human maternal-fetal interface. *Rev Endocr Metab Disord* **3**, 159–65 (2002).
28. Jin, T., Xu, X. & Hereld, D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* **44**, 1–8 (2008).
29. Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565–568 (1998).
30. *The Chemokine Receptors.* 403 (Humana Press, 2007).
31. Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* **250**, 91–104 (2001).
32. Red-Horse, K., Drake, P. M. & Fisher, S. J. Human pregnancy: the role of chemokine networks at the fetal-maternal interface. *Expert Rev. Mol. Med.* **6**, 1–14 (2004).

33. Hirota, Y. *et al.* Interleukin (IL)-1beta stimulates migration and survival of first-trimester villous cytotrophoblast cells through endometrial epithelial cell-derived IL-8. *Endocrinology* **150**, 350–356 (2009).
34. Jovanović, M., Stefanoska, I., Radojčić, L. & Vićovac, L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction* **139**, 789–798 (2010).
35. He, Y. Y. *et al.* Regulation of C-C motif chemokine ligand 2 and its receptor in human decidual stromal cells by pregnancy-associated hormones in early gestation. *Hum. Reprod.* **22**, 2733–2742 (2007).
36. Roth, I. & Herbert, C. *CXCR1 and CXCR2*. In *Cytokine Reference: a Compendium of Cytokines and other Mediators of Host Defence*. 1982–2002 (Academic Press, 2001).
37. Ai, L. S. & Liao, F. Mutating the four extracellular cysteines in the chemokine receptor CCR6 reveals their differing roles in receptor trafficking, ligand binding, and signaling. *Biochemistry* **41**, 8332–41 (2002).
38. Murdoch, C. & Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95**, 3032–43 (2000).
39. Martínez Muñoz, L. *et al.* Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. *J. Immunol.* **183**, 7337–7346 (2009).
40. Red-Horse, K., Drake, P. M., Gunn, M. D. & Fisher, S. J. Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *Am. J. Pathol.* **159**, 2199–2213 (2001).
41. Iida, N. & Grotendorst, G. R. Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5596–5599 (1990).
42. Becker, S., Quay, J., Koren, H. S. & Haskill, J. S. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* **266**, L278–L286 (1994).
43. Baston-Büst, D. M., Götte, M., Janni, W., Krüssel, J.-S. & Hess, A. P. Syndecan-1 knock-down in decidualized human endometrial stromal cells leads to significant changes in cytokine and angiogenic factor expression patterns. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 133 (2010).

44. Haskill, S. *et al.* Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 7732–7736 (1990).
45. Schroder, J., Stuber, F., Gallati, H., Schade, F. U. & Kremer, B. Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* **23**, 143–148 (1995).
46. Golds, E. E., Mason, P. & Nyirkos, P. Inflammatory cytokines induce synthesis and secretion of gro protein and a neutrophil chemotactic factor but not beta 2-microglobulin in human synovial cells and fibroblasts. *Biochem. J.* **259**, 585–588 (1989).
47. Jaffe, G. J. *et al.* Expression of three forms of melanoma growth stimulating activity (MGSA)/gro in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 2776–2785 (1993).
48. Wen, D. Z., Rowland, A. & Derynck, R. Expression and secretion of gro/MGSA by stimulated human endothelial cells. *EMBO J.* **8**, 1761–1766 (1989).
49. Kawano, Y., Furukawa, Y., Kawano, Y., Nasu, K. & Narahara, H. Thrombin-induced chemokine production in endometrial stromal cells. *Hum. Reprod.* **26**, 407–13 (2011).
50. Wallace, A. E. *et al.* Prostaglandin F<sub>2</sub>α-F-prostanoid receptor signaling promotes neutrophil chemotaxis via chemokine (C-X-C motif) ligand 1 in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res.* **69**, 5726–33 (2009).
51. Sager, R., Anisowicz, A., Pike, M. C., Beckmann, P. & Smith, T. Structural, regulatory and functional studies of the GRO gene and protein. *Cytokines* **4**, 96–116 (1992).
52. Dhawan, P. & Richmond, A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 9–18 (2002).
53. Zaja-Milatovic, S. & Richmond, A. CXC chemokines and their receptors: A case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histol. Histopathol.* **23**, 1399–1407 (2008).
54. Hess, A. P. *et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol. Reprod.* **76**, 102–117 (2007).
55. Acharyya, S. *et al.* A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* **150**, 165–178 (2012).
56. Zhang, K. *et al.* CXCL1 Contributes to β-Amyloid-Induced Transendothelial Migration of Monocytes in Alzheimer’s Disease. *PLoS One* **8**, (2013).

57. Zhou, Z. *et al.* Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab.* **13**, 592–600 (2011).
58. Sajadi, S. M. *et al.* Plasma levels of CXCL1 (GRO-alpha) and CXCL10 (IP-10) are elevated in type 2 diabetic patients: evidence for the involvement of inflammation and angiogenesis/angiostasis in this disease state. *Clin Lab* **59**, 133–137 (2013).
59. Omari, K. M., John, G., Lango, R. & Raine, C. S. Role for CXCR2 and CXCL1 on glia in multiple sclerosis. *Glia* **53**, 24–31 (2006).
60. Nasu, K. *et al.* Expression and regulation of growth-regulated oncogene alpha in human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 741–6 (2001).
61. Popovici, R. M. *et al.* Gene expression profiling of human endometrial-trophoblast interaction in a coculture model. *Endocrinology* **147**, 5662–75 (2006).
62. Scapini, P. *et al.* CXCL1/Macrophage Inflammatory Protein-2-Induced Angiogenesis In Vivo Is Mediated by Neutrophil-Derived Vascular Endothelial Growth Factor-A. *J. Immunol.* **172**, 5034–5040 (2004).
63. Oral, E., Seli, E., Bahtiyar, M. O., Olive, D. L. & Arici, A. Growth-regulated  $\alpha$  expression in the peritoneal environment with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* **88**, 1050–1056 (1996).
64. Kitaya, K. & Yasuo, T. Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod. Pathol.* **23**, 1136–1146 (2010).
65. Ravindran, A., Sawant, K. V., Sarmiento, J., Navarro, J. & Rajarathnam, K. Chemokine CXCL1 dimer is a potent agonist for the CXCR2 receptor. *J. Biol. Chem.* **288**, 12244–12252 (2013).
66. Mustafa, S. *et al.* Identification and Profiling of Novel 1A-Adrenoceptor-CXC Chemokine Receptor 2 Heteromer. *J. Biol. Chem.* **287**, 12952–12965 (2012).
67. Asagoe, K. *et al.* Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha. *J. Immunol.* **160**, 4518–4525 (1998).
68. Schutyser, E. *et al.* Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur. Cytokine Netw.* **18**, 59–70 (2007).

69. Ulukus, M., Ulukus, E. C., Seval, Y., Zheng, W. & Arici, A. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Hum. Reprod.* **20**, 794–801 (2005).
70. Ulukus, M. *et al.* Expression of interleukin-8 receptors in patients with adenomyosis. *Fertil. Steril.* **85**, 714–20 (2006).
71. Mulayim, N., Palter, S. F., Kayisli, U. a, Senturk, L. & Arici, A. Chemokine receptor expression in human endometrium. *Biol. Reprod.* **68**, 1491–5 (2003).
72. Götte, M. *et al.* Changes in heparan sulfate are associated with delayed wound repair, altered cell migration, adhesion and contractility in the galactosyltransferase I ( $\beta$ 4GalT-7) deficient form of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 996–1009 (2008).
73. Rapraeger, a. C. Syndecan-regulated Receptor Signaling. *J. Cell Biol.* **149**, 995–998 (2000).
74. Teng, Y. H. F., Aquino, R. S. & Park, P. W. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol.* **31**, 3–16 (2012).
75. Carey, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327 ( Pt 1)**, 1–16 (1997).
76. Leonova, E. I. & Galzitskaya, O. V. Structure and functions of syndecans in vertebrates. *Biochem. Biokhimiia* **78**, 1071–85 (2013).
77. Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L. & Bernfield, M. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell* **5**, 797–805 (1994).
78. Manon-Jensen, T., Multhaupt, H. A. B. & Couchman, J. R. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J.* **280**, 2320–2331 (2013).
79. Nikolova, V. *et al.* Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* **30**, 397–407 (2009).
80. Bernfield, M. *et al.* Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 729–777 (1999).
81. De Luca, M. *et al.* A conserved role for syndecan family members in the regulation of whole-body energy metabolism. *PLoS One* **5**, (2010).

82. Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: Chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* **100**, 3853–3860 (2002).
83. Parish, C. R. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 633–643 (2006).
84. Watanabe, A. *et al.* Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: Participation of nuclear factor- $\kappa$ B in upregulation of syndecan-1 expression. *J. Neurooncol.* **77**, 25–32 (2006).
85. Brule, S. *et al.* The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* **16**, 488–501 (2006).
86. Day, R. M., Mitchell, T. J., Knight, S. C. & Forbes, A. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine* **21**, 224–233 (2003).
87. Germeyer, A. *et al.* Expression of syndecans, cell-cell interaction regulating heparan sulfate proteoglycans, within the human endometrium and their regulation throughout the menstrual cycle. *Fertil. Steril.* **87**, 657–663 (2007).
88. Lai, T. H., King, J. A., Shih, I. M., Vlahos, N. F. & Zhao, Y. Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil. Steril.* **87**, 121–126 (2007).
89. Jokimaa, V. *et al.* Expression of syndecan-1 in human placenta and decidua. *Placenta* **19**, 157–163 (1998).
90. Chui, A. *et al.* Placental syndecan expression is altered in human idiopathic fetal growth restriction. *Am. J. Pathol.* **180**, 693–702 (2012).
91. Szabo, S. *et al.* Changes of placental syndecan-1 expression in preeclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch.* **463**, 445–458 (2013).
92. *Taschenbuch Embryologie.* (Georg Thieme Verlag, 2014).
93. Abildgaard, U. & Heimdal, K. Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **166**, 117–123 (2013).
94. Chaiworapongsa, T., Chaemsaitong, P., Yeo, L. & Romero, R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* **10**, 466–480 (2014).

95. O'Tierney-Ginn, P. F. & Lash, G. E. Beyond pregnancy: modulation of trophoblast invasion and its consequences for fetal growth and long-term children's health. *J. Reprod. Immunol.* (2014). doi:10.1016/j.jri.2014.04.002
96. Stewart, C. L. & Cullinan, E. B. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev. Genet.* **21**, 91–101 (1997).
97. Dey, S. K. *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* **25**, 341–373 (2004).
98. Chen, S.-U. *et al.* Lysophosphatidic acid mediates interleukin-8 expression in human endometrial stromal cells through its receptor and nuclear factor-kappaB-dependent pathway: a possible role in angiogenesis of endometrium and placenta. *Endocrinology* **149**, 5888–5896 (2008).
99. Suman, P., Malhotra, S. S. & Gupta, S. K. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *JAK-STAT* **2**, e25155 (2013).
100. Burke, S. J. *et al.* NF- $\kappa$ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E131–49 (2014).
101. Zhang, H. *et al.* Endometriotic epithelial cells induce MMPs expression in endometrial stromal cells via an NFkappaB-dependent pathway. *Gynecol. Endocrinol.* **26**, 456–467 (2010).
102. Cecconi, S., Rossi, G., Castellucci, A., D'Andrea, G. & Maccarrone, M. Endocannabinoid signaling in mammalian ovary in the memory of Riccardo Del Gratta (1966-2013). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **178**, 6–11 (2014).
103. Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* **351 Pt 2**, 289–305 (2000).
104. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153–83 (2001).
105. Yang, W., Dolloff, N. G. & El-Deiry, W. S. ERK and MDM2 prey on FOXO3a. *Nat. Cell Biol.* **10**, 125–126 (2008).
106. Weston, C. R. & Davis, R. J. The JNK signal transduction pathway. 14–21 (2002).
107. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807–869 (2001).
108. Karin, M., Liu, Z. G. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240–246 (1997).

109. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390–2400 (2001).
110. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**, E131–E136 (2002).
111. Baston-Büst, D. M. *et al.* CXCL1 expression in human decidua in vitro is mediated via the MAPK signalling cascade. *Cytokine* **64**, 79–85 (2013).
112. Teo, R., Möhrlein, F., Plickert, G., Müller, W. a & Frank, U. An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Dev. Biol.* **289**, 91–9 (2006).
113. Dann, C. E. *et al.* Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**, 86–90 (2001).
114. Van der Horst, P. H., Wang, Y., van der Zee, M., Burger, C. W. & Blok, L. J. Interaction between sex hormones and WNT/??-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **358**, 176–184 (2012).
115. Malbon, C. C. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front. Biosci.* **9**, 1048–1058 (2004).
116. Chen, Q. *et al.* Embryo - Uterine cross-talk during implantation: The role of Wnt signaling. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 215–221 (2009).
117. Xie, H. *et al.* Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development* **135**, 717–727 (2008).
118. Huang, H.-C. & Klein, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* **5**, 234 (2004).
119. Sonderegger, S., Husslein, H., Leisser, C. & Knöfler, M. Complex Expression Pattern of Wnt Ligands and Frizzled Receptors in Human Placenta and its Trophoblast Subtypes. *Placenta* **28**, (2007).
120. Koziński, K. & Dobrzyń, A. [Wnt signaling pathway--its role in regulation of cell metabolism]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **67**, 1098–108 (2013).
121. Golan, T., Yaniv, A., Bafico, A., Liu, G. & Gazit, A. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **279**, 14879–88 (2004).
122. Sonderegger, S., Pollheimer, J. & Knöfler, M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation - Review. *Placenta* **31**, 839–847 (2010).

123. Kimelman, D. & Xu, W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**, 7482–7491 (2006).
124. Kirikoshi, H. *et al.* Molecular cloning and characterization of human Frizzled-4 on chromosome 11q14-q21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 955–961 (1999).
125. Wang, Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2103–9 (2009).
126. Hayashi, K. *et al.* Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biol. Reprod.* **80**, 989–1000 (2009).
127. Tulac, S. *et al.* Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3860–6 (2003).
128. Weimar, C. H. E., Post Uiterweer, E. D., Teklenburg, G., Heijnen, C. J. & Macklon, N. S. In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions. *Reprod. Biomed. Online* **27**, 461–76 (2013).
129. Mueller-Klieser, W. Multicellular spheroids - A review on cellular aggregates in cancer research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **113**, 101–122 (1987).
130. Yuhas, J. M. & Li, A. P. Growth Fraction as the Major Determinant of Multicellular Tumor Spheroid Growth Rates Growth Fraction as the Major Determinant of Multicellular. 1528–1532 (1978).
131. Barone, R. M., Calabro-Jones, P., Thomas, T. N., Sharp, T. R. & Byfield, J. E. Surgical adjuvant therapy in colon carcinoma: A human tumor spheroid model for evaluating radiation sensitizing agents. *Cancer* **47**, 2349–2357 (1981).
132. Xu, S. D. Invasion of spheroid aggregate of mouse lung adenocarcinoma (LA 795) cells into embryonic chick heart fragments. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **13**, 283–286 (1991).
133. Haspel, H. C., Scicli, G. M., McMahon, G. & Scicli, A. G. Inhibition of vascular endothelial growth factor-associated tyrosine kinase activity with SU5416 blocks sprouting in the microvascular endothelial cell spheroid model of angiogenesis. *Microvasc. Res.* **63**, 304–315 (2002).
134. Timmins, N., Dietmair, S. & Nielsen, L. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* **7**, 97–103 (2004).
135. Herr, F. *et al.* hCG in the Regulation of Placental Angiogenesis. Results of an In Vitro Study. *Placenta* **28**, (2007).

136. Baal, N., Widmer-Teske, R., McKinnon, T., Preissner, K. T. & Zygmunt, M. T. In vitro spheroid model of placental vasculogenesis: does it work? *Lab. Invest.* **89**, 152–63 (2009).
137. Finkenzeller, G., Graner, S., Kirkpatrick, C. J., Fuchs, S. & Stark, G. B. Impaired in vivo vasculogenic potential of endothelial progenitor cells in comparison to human umbilical vein endothelial cells in a spheroid-based implantation model. *Cell Prolif.* **42**, 498–505 (2009).
138. Bartholomä, P. *et al.* Three-dimensional in vitro reaggregates of embryonic cardiomyocytes: a potential model system for monitoring effects of bioactive agents. *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.* **10**, 814–822 (2005).
139. John, N. J., Linke, M. & Denker, H. W. Quantitation of human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **29**, 461–468 (1993).
140. Li, H.-Y. *et al.* Induction of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated apoptosis is involved in outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells in a model of human trophoblast-endometrial interactions. *Biol. Reprod.* **69**, 1515–24 (2003).
141. Li, H.-Y. *et al.* Establishment of an efficient method to quantify embryo attachment to endometrial epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **38**, 505–511 (2002).
142. Ho, H., Singh, H., Aljofan, M. & Nie, G. A high-throughput in vitro model of human embryo attachment. *Fertil. Steril.* **97**, 974–8 (2012).
143. Kodithuwakku, S. P. *et al.* Hormonal regulation of endometrial olfactomedin expression and its suppressive effect on spheroid attachment onto endometrial epithelial cells. *Hum. Reprod.* **26**, 167–175 (2011).
144. Uchida, H. *et al.* Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *J. Biol. Chem.* **287**, 4441–50 (2012).
145. Schmitz, C. *et al.* Role for the endometrial epithelial protein MFG-E8 and its receptor integrin  $\alpha\beta 3$  in human implantation: Results of an in vitro trophoblast attachment study using established human cell lines. *Fertil. Steril.* **101**, 874–882 (2014).

146. Liu, Y. *et al.* Excessive ovarian stimulation up-regulates the Wnt-signaling molecule DKK1 in human endometrium and may affect implantation: An in vitro co-culture study. *Hum. Reprod.* **25**, 479–490 (2010).
147. Harun, R. *et al.* Cytotrophoblast stem cell lines derived from human embryonic stem cells and their capacity to mimic invasive implantation events. *Hum. Reprod.* **21**, 1349–58 (2006).
148. Gonzalez, M. *et al.* Expansion of human trophoblastic spheroids is promoted by decidualized endometrial stromal cells and enhanced by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and interleukin-1  $\beta$ . *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 421–33 (2011).
149. Weber, M., Knoefler, I., Schleussner, E., Markert, U. R. & Fitzgerald, J. S. HTR8/SVneo cells display trophoblast progenitor cell-like characteristics indicative of self-renewal, repopulation activity, and expression of 'stemness'-associated transcription factors. *Biomed Res. Int.* **2013**, 243649 (2013).
150. Borgenström, M., Tienhaara, A., Spillmann, D., Salmivirta, M. & Jalkanen, M. Testosterone-induced growth of S115 mouse mammary tumor cells is dependent on heparan sulfate. *Exp. Cell Res.* **264**, 307–314 (2001).
151. Alexander, C. M. *et al.* Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat. Genet.* **25**, 329–332 (2000).
152. Gallo, R., Kim, C., Kokenyesi, R., Adzick, N. S. & Bernfield, M. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol* **107**, 676–83 (1996).
153. Stepp, M. A. *et al.* Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J. Cell Sci.* **115**, 4517–4531 (2002).
154. Götte, M. *et al.* Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1135–1141 (2002).
155. Ford-Perriss, M. *et al.* Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development. *Dev. Dyn.* **227**, 170–184 (2003).
156. Reizes, O. *et al.* Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell* **106**, 105–116 (2001).
157. Ledin, J. *et al.* Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J. Biol. Chem.* **279**, 42732–41 (2004).

158. Wang, W., Haller, C. A., Wen, J., Wang, P. & Chaikof, E. L. Decoupled syndecan 1 mRNA and protein expression is differentially regulated by angiotensin II in macrophages. *J. Cell. Physiol.* **214**, 750–756 (2008).
159. Oksjoki, S., Sallinen, S., Vuorio, E. & Anttila, L. Cyclic expression of mRNA transcripts for connective tissue components in the mouse ovary. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 803–808 (1999).
160. Maeda, T., Desouky, J. & Friedl, A. Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene* **25**, 1408–1412 (2006).
161. Khotskaya, Y. B. *et al.* Syndecan-1 is required for robust growth, vascularization, and metastasis of myeloma tumors in vivo. *J. Biol. Chem.* **284**, 26085–26095 (2009).
162. Stepp, M. A. *et al.* Loss of syndecan-1 is associated with malignant conversion in skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **49**, 363–373 (2010).
163. Linnerth, N. M., Sirbovan, K. & Moorehead, R. A. Use of a transgenic mouse model to identify markers of human lung tumors. *Int. J. Cancer* **114**, 977–982 (2005).
164. Elenius, V., Götte, M., Reizes, O., Elenius, K. & Bernfield, M. Inhibition by the soluble syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 41928–35 (2004).
165. Voyvodic, P. L. *et al.* Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *J. Biol. Chem.* **289**, 9547–9559 (2014).
166. Bellin, R. *et al.* Unlocking the secrets of syndecans: Transgenic organisms as a potential key. *Glycoconj. J.* **19**, 295–304 (2002).
167. Brosens, J. J. *et al.* Human endometrial fibroblasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus. *Endocrinology* **137**, 2225–2231 (1996).
168. Krikun, G. *et al.* A novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progestational response. *Endocrinology* **145**, 2291–2296 (2004).
169. Graham, C. H. *et al.* Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp. Cell Res.* **206**, 204–11 (1993).

170. Kohler, P. O. & Bridson, W. E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **32**, 683–7 (1971).
171. Pattillo, R. A., Ruckert, A., Husa, R., Bernstein, R. & Delfs, E. The Jar cell line -- continuous human multihormone production and controls. *In Vitro* **6**, 398–399 (1971).
172. Pattillo, R. A., Gey, G. O., Delfs, E. & Mattingly, R. F. Human Hormone Production in vitro. *Science (80-. )*. **159**, 1467–1469 (1968).
173. Gey, G. O., Coffman, W. & Kubicek, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264–265 (1952).
174. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74 (1977).
175. Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581–5 (2006).
176. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 2001).
177. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
178. Untergasser, A. *et al.* Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, (2012).
179. Haff, L. A. Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods Appl.* **3**, 332–337 (1994).
180. Hamprecht, K., Mikeler, E. & Jahn, G. Semi-quantitative detection of cytomegalovirus DNA from native serum and plasma by nested PCR: Influence of DNA extraction procedures. *J. Virol. Methods* **69**, 125–135 (1997).
181. Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4008 (1991).
182. Thermo Scientific, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) Product Information. (2011).

183. Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376–379 (1987).
184. Life Technologies, BLOCK-iTTM Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit User Manual. (2010).
185. Hanahan, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
186. Fire, A. Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* **14**, 1998–2012 (2007).
187. Robinson, R. RNAi therapeutics: How likely, how soon? *PLoS Biol.* **2**, (2004).
188. Affymetrix, QuantiGene 2.0 Plex Assay User Manual. (2012).
189. Bolitho, C., Hahn, M. A., Baxter, R. C. & Marsh, D. J. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, 929–940 (2010).
190. Di Simone, N. *et al.* Low-molecular-weight heparins induce decidual heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression and promote survival of decidual cells undergoing apoptosis. *Fertil. Steril.* **97**, (2012).
191. Amsalem, H., Gaiger, A., Mizrahi, S., Yagel, S. & Rachmilewitz, J. Characterization of a lymphocyte subset displaying a unique regulatory activity in human decidua. *Int. Immunol.* **20**, 1147–1154 (2008).
192. Svensson, J. *et al.* Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.* **187**, 3671–82 (2011).
193. Mintz, R. *et al.* Reduced expression of chemoattractant receptors by polymorphonuclear leukocytes in Hyper IgE Syndrome patients. *Immunol. Lett.* **130**, 97–106 (2010).
194. Li, A. *et al.* Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer. *Am. J. Pathol.* **178**, 1340–9 (2011).
195. Singh, S., Nannuru, K. C., Sadanandam, a, Varney, M. L. & Singh, R. K. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. *Br. J. Cancer* **100**, 1638–46 (2009).
196. Himpel, M. Med. Dissertation: Regulation der PAR2 Genexpression durch entzündliche Stimuli im Intestinum. (2009).

197. Kurosawa, H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 389–398 (2007).
198. Jones, M. V. & Calabresi, P. A. Agar-gelatine for embedding tissues prior to paraffin processing. *Biotechniques* **42**, 569–570 (2007).
199. <http://www.lifetechnologies.com>.
200. Invitrogen, MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes Manual. (2008).
201. Chou, Q. Minimizing deletion mutagenesis artifact during Taq DNA polymerase PCR by *E. coli* SSB. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4371 (1992).
202. Addison, C. L. *et al.* The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.* **165**, 5269–5277 (2000).
203. Gellersen, B., Brosens, I. A. & Brosens, J. J. Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 445–453 (2007).
204. Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. & Poellinger, L. CoCl<sub>2</sub>, a Chemical Inducer of Hypoxia-Inducible-Factor-1, and Hypoxia Reduce Apoptotic Ce. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5667–72 (1997).
205. Wu, D. & Yotnda, P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J. Vis. Exp.* (2011). doi:10.3791/2899
206. Maeda, D. Y. *et al.* Discovery of 2-[5-(4-Fluorophenylcarbamoyl)pyridin-2-ylsulfanylmethyl]phenylboronic Acid (SX-517): Noncompetitive Boronic Acid Antagonist of CXCR1 and CXCR2. *J Med Chem* **57**, 8378–97 (2014).
207. Carreira, E. U. *et al.* Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur. J. Pain* **17**, 654–63 (2013).
208. Li, M.-Q. *et al.* CXCL8 enhances proliferation and growth and reduces apoptosis in endometrial stromal cells in an autocrine manner via a CXCR1-triggered PTEN/AKT signal pathway. *Hum. Reprod.* **27**, 2107–16 (2012).
209. Pitman, H., Innes, B. a, Robson, S. C., Bulmer, J. N. & Lash, G. E. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. *Hum. Reprod.* **28**, 2075–86 (2013).
210. Mierke, C. T. *et al.* Breakdown of the endothelial barrier function in tumor cell transmigration. *Biophys. J.* **94**, 2832–46 (2008).

211. Singh, R., Nannuru, K., Sharma, B. & Varney, M. Role of chemokine receptor CXCR2 expression in mammary tumor growth, angiogenesis and metastasis. *J. Carcinog.* **10**, 40 (2011).
212. Trettel, F. *et al.* Ligand-independent CXCR2 Dimerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 40980–40988 (2003).
213. Maxwell, P. J. *et al.* HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene* **26**, 7333–45 (2007).
214. Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J. Physiol.* **591**, 2027–42 (2013).
215. Helige, C. *et al.* Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: A quantitative evaluation. *Hum. Reprod.* **29**, 8–17 (2014).
216. Liu, B. *et al.* The prognostic value of uNK cell count and histological dating in the mid-luteal phase of women with reproductive failure. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **181**, 171–5 (2014).
217. Seshadri, S. & Sunkara, S. K. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* **20**, 429–38 (2014).
218. Sharkey, A. M., Charnock-Jones, D. S., Boocock, C. A., Brown, K. D. & Smith, S. K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 609–615 (1993).
219. Sherer, D. M. & Abulafia, O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* **22**, 1–13 (2001).
220. Quenby, S. & Farquharson, R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod. Biomed. Online* **13**, 24–28 (2006).
221. Quenby, S. *et al.* Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Hum. Reprod.* **24**, 45–54 (2009).
222. Lüttichau, H. R. The cytomegalovirus UL146 gene product vCXCL1 targets both CXCR1 and CXCR2 as an agonist. *J. Biol. Chem.* **285**, 9137–9146 (2010).
223. Caccuri, F. *et al.* Simian Immunodeficiency Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Proteins Specify Different Capabilities To Modulate B Cell Growth. *J. Virol.* **88**, 5706–5717 (2014).

224. Lohri, C. *et al.* Neutrophil expression of ICAM1, CXCR1, and VEGFR1 in patients with breast cancer before and after adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res.* **34**, 4693–9 (2014).
225. Sherwood, J. *et al.* A homeostatic function of CXCR2 signalling in articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **0**, 1–9 (2014).
226. Chen, L. *et al.* The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Sci. Rep.* **4**, 5911 (2014).
227. Martynowicz, H., Janus, A., Nowacki, D. & Mazur, G. The role of chemokines in hypertension. *Adv. Clin. Exp. Med.* **23**, 319–325 (2014).
228. Whittall, C. *et al.* A chemokine self-presentation mechanism involving formation of endothelial surface microstructures. *J. Immunol.* **190**, 1725–36 (2013).
229. Raman, D., Sai, J., Hawkins, O. & Richmond, A. Adaptor protein2 (AP2) orchestrates CXCR2-mediated cell migration. *Traffic* **15**, 451–469 (2014).
230. Ha, H. & Neamati, N. Pyrimidine-based compounds modulate CXCR2-mediated signaling and receptor turnover. *Mol. Pharm.* **11**, 2431–2441 (2014).
231. Sisto, M. & Lisi, S. New Insights Into ADAMs Regulation of the GRO- $\alpha$ /CXCR2 System: Focus on Sjögren's Syndrome. *Int Rev Immunol* (2014).
232. Sueoka, H. *et al.* Blockage of CXCR2 suppresses tumor growth of intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Surg. (United States)* **155**, 640–649 (2014).
233. Mishra, H. K., Long, C., Bahaie, N. S. & Walcheck, B. Regulation of CXCR2 expression and function by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *J Leukoc Biol* (2014).
234. Mandl, M., Schmitz, S., Weber, C. & Hristov, M. Characterization of the CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monocyte Population in Human Bone Marrow. *PLoS One* **9**, (2014).
235. Jung, J. H. *et al.* CXCR2 and its related ligands play a novel role in supporting the pluripotency and proliferation of human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* (2014).
236. Lv, M. *et al.* miR141-CXCL1-CXCR2 Signaling-Induced Treg Recruitment Regulates Metastases and Survival of Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther* **13**, 1–11 (2014).

237. Leon-Cabrera, S. *et al.* Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis. *Int J Biol Sci* **10**, 948–56 (2014).
238. Macklon, N. S. & Brosens, J. J. The Endometrium as a Sensor of Embryo Quality. *Biol. Reprod.* (2014). doi:10.1095/biolreprod.114.122846
239. Potdar, N., Gelbaya, T. & Nardo, L. G. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: A systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* **25**, 561–571 (2012).
240. Bender, A. *et al.* Tetracycline suppresses ATP gamma S-induced CXCL8 and CXCL1 production by the human dermal microvascular endothelial cell-1 (HMEC-1) cell line and primary human dermal microvascular endothelial cells. *Exp. Dermatol.* **17**, 752–760 (2008).
241. Nimbkar-Joshi, S. *et al.* Embryo-induced alterations in the molecular phenotype of primate endometrium. *J. Reprod. Immunol.* **83**, 65–71 (2009).
242. Zollner, U., Bischofs, S., Lalic, I. & Zollner, K.-P. LIF and TNF alpha concentrations in embryo culture media are predictive for embryo implantation in IVF. *Asian Pacific J. Reprod.* **1**, 277–282 (2012).
243. Chen, P. *et al.* MMP7 shedding of syndecan-1 facilitates re-epithelialization by affecting  $\alpha 2\beta 1$  integrin activation. *PLoS One* **4**, (2009).
244. Donà, E. *et al.* Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature* **503**, 285–9 (2013).
245. Peng, Z. Y. *et al.* Modulation of chemokine gradients by apheresis redirects leukocyte trafficking to different compartments during sepsis, studies in a rat model. *Crit Care* **18**, R141 (2014).
246. Boudot, A. *et al.* COUP-TFI modifies CXCL12 and CXCR4 expression by activating EGF signaling and stimulates breast cancer cell migration. *BMC Cancer* **14**, 407 (2014).
247. Worapamorn, W., Tam, S. P., Li, H., Haase, H. R. & Bartold, P. M. Cytokine regulation of syndecan-1 and -2 gene expression in human periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J. Periodontal Res.* **37**, 273–278 (2002).
248. Inki, P. Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 299–305 (1997).
249. Lorenzi, T. *et al.* Syndecan expressions in the human amnion and chorionic plate. *Eur. J. Histochem.* **54**, 197–200 (2010).

250. Kitaya, K. *et al.* Diverse functions of uterine proteoglycans in human reproduction (review). *Mol. Med. Rep.* **5**, 1375–81 (2012).
251. Huusko, J. *et al.* The effects of VEGF-R1 and VEGF-R2 ligands on angiogenic responses and left ventricular function in mice. *Cardiovasc. Res.* **86**, 122–130 (2010).
252. de, P. A. *et al.* Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J.Immunol.* **177**, 7322–7331 (2006).
253. Evans, I. M., Britton, G. & Zachary, I. C. Vascular endothelial growth factor induces heat shock protein (HSP) 27 serine 82 phosphorylation and endothelial tubulogenesis via protein kinase D and independent of p38 kinase. *Cell. Signal.* **20**, 1375–1384 (2008).
254. Murphy, J. F. & Fitzgerald, D. J. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) induces cyclooxygenase (COX)-dependent proliferation of endothelial cells (EC) via the VEGF-2 receptor. (2001).
255. Ferrara, N. & Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **19**, 61–9 (1997).
256. Shifren, J. L. *et al.* Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81**, 3112–3118 (1996).
257. Kamat, B. R., Brown, L. F., Manseau, E. J., Senger, D. R. & Dvorak, H. F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am. J. Pathol.* **146**, 157–165 (1995).
258. Artini, P. G. *et al.* Vascular endothelial growth factor level changes during human embryo development in culture medium. *Gynecol Endocrinol* **24**, 184–187 (2008).
259. Staun-Ram, E. & Shalev, E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**, 56 (2005).
260. Segerer, S., Kämmerer, U., Kapp, M., Dietl, J. & Rieger, L. Upregulation of chemokine and cytokine production during pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* **67**, 145–150 (2009).

261. Matjila, M., Millar, R., van der Spuy, Z. & Katz, A. The Differential Expression of Kiss1, MMP9 and Angiogenic Regulators across the Feto-Maternal Interface of Healthy Human Pregnancies: Implications for Trophoblast Invasion and Vessel Development. *PLoS One* **8**, (2013).
262. Purushothaman, A. *et al.* Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood* **115**, 2449–2457 (2010).
263. Su, W. *et al.* Doxycycline enhances the inhibitory effects of bevacizumab on corneal neovascularization and prevents its side effects. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9108–9115 (2011).
264. Debrah, A. Y. *et al.* Reduction in levels of plasma vascular endothelial growth factor-A and improvement in hydrocele patients by targeting endosymbiotic *Wolbachia* sp. in *Wuchereria bancrofti* with doxycycline. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 956–963 (2009).
265. Snegovskikh, V. V. *et al.* Intra-amniotic infection upregulates decidual cell vascular endothelial growth factor (VEGF) and neuropilin-1 and -2 expression: implications for infection-related preterm birth. *Reprod. Sci.* **16**, 767–780 (2009).
266. Vacca, P. *et al.* Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int Immunol* **20**, 1395–405 (2008).
267. Krüssel, J. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 57–63 (2001).
268. McFee, R. M., Rozell, T. G. & Cupp, A. S. The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development. *Cell Tissue Res.* **349**, 635–647 (2012).
269. Damert, A., Miquerol, L., Gertsenstein, M., Risau, W. & Nagy, A. Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development* **129**, 1881–1892 (2002).
270. Rhee, S. *et al.* Visceral Endoderm Expression of Yin-Yang1 (YY1) Is Required for VEGFA Maintenance and Yolk Sac Development. *PLoS One* **8**, (2013).

271. Andraweera, P. H. *et al.* Vascular endothelial growth factor family gene polymorphisms in preeclampsia in Sinhalese women in Sri-Lanka. *J. Matern. Neonatal Med.* 1–20 (2012). doi:10.3109/14767058.2012.743520
272. Lash, G. *et al.* Abnormal fetal growth is not associated with altered chorionic villous expression of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Hum Reprod* **7**, 1093–1098 (2001).
273. Ahmad, S. & Ahmed, A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ. Res.* **95**, 884–891 (2004).
274. Milovanov, A. P., Sidorova, I. S., Solonitsyn, A. N. & Borovkova, E. I. [Immunohistochemical evaluation of the distribution of vascular endothelial growth factor in the placenta, placental bed in normal pregnancy and in women with preeclampsia]. *Arkh Patol* **70**, 12–15 (2008).
275. Bausch, D. *et al.* Neutrophil granulocyte derived MMP-9 is a VEGF independent functional component of the angiogenic switch in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Angiogenesis* **14**, 235–243 (2011).
276. Rodríguez, D., Morrison, C. J. & Overall, C. M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 39–54 (2010).
277. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516 (2001).
278. Curry, T. E. & Osteen, K. G. The matrix metalloproteinase system: Changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr. Rev.* **24**, 428–465 (2003).
279. Hulboy, D. L., Rudolph, L. A. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 27–45 (1997).
280. Van den Steen, P. E. *et al.* Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 375–536 (2002).
281. Lin, M. *et al.* Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro. *Am. J. Pathol.* **173**, 144–153 (2008).
282. Li, W., Li, H., Bocking, A. D. & Challis, J. R. G. Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic

- trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway. *Biol. Reprod.* **83**, 481–487 (2010).
283. Bauer, S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 812–22 (2004).
284. Lockwood, C. J. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol. Reprod.* **78**, 1064–1072 (2008).
285. Schneider, C. *et al.* Targeting of syndecan-1 by micro-ribonucleic acid miR-10b modulates invasiveness of endometriotic cells via dysregulation of the proteolytic milieu and interleukin-6 secretion. *Fertil. Steril.* **99**, (2013).
286. Jana, S. K., Banerjee, P., Mukherjee, R., Chakravarty, B. & Chaudhury, K. HOXA-11 mediated dysregulation of matrix remodeling during implantation window in women with endometriosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **30**, 1505–1512 (2013).
287. Godbole, G., Suman, P., Gupta, S. K. & Modi, D. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. *Fertil. Steril.* **95**, 1278–1283 (2011).
288. Bischof, P., Meisser, A. & Campana, A. Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface. in *J. Reprod. Immunol.* **55**, 3–10 (2002).
289. Nagase, H. & Woessner, J. F. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491–21494 (1999).
290. Vandooren, J., Van den Steen, P. E. & Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 222–72 (2013).
291. Benaitreau, D. *et al.* Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *J. Endocrinol.* **207**, 45–53 (2010).
292. Kobara, H. *et al.* Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. *Placenta* **34**, 1036–1043 (2013).
293. Moindjie, H. *et al.* No PreImplantation Factor (PIF) Promotes Human Trophoblast Invasion. *Biol Reprod* **114**, (2014).

294. Zhou, W. H., Du, M. R., Dong, L., Yu, J. & Li, D. J. Chemokine CXCL12 promotes the cross-talk between trophoblasts and decidual stromal cells in human first-trimester pregnancy. *Hum. Reprod.* **23**, 2669–2679 (2008).
295. Yu, F. *et al.* Abnormal expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) correlates with clinical course in Chinese patients with endometrial cancer. *Dis Markers* **32**, 321–7 (2012).
296. Karahan, N. *et al.* Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **28**, 184–188 (2007).
297. Pereza, N., Ostojić, S., Volk, M., Kapović, M. & Peterlin, B. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reprod. Biomed. Online* **24**, 567–575 (2012).
298. Mulayim, N., Savlu, A., Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U. A. & Arici, A. Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8. *Fertil. Steril.* **81**, 904–911 (2004).
299. Skrzypczak, J., Wirstlein, P., Mikołajczyk, M., Ludwikowski, G. & Zak, T. TGF superfamily and MMP2, MMP9, TIMP1 genes expression in the endometrium of women with impaired reproduction. in *Folia Histochem. Cytobiol.* **45**, 143–148 (2007).
300. Skrzypczak, J., Wirstlein, P. & Mikołajczyk, M. Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility? *Am. J. Reprod. Immunol.* **57**, 40–48 (2007).
301. Knox, J. D. *et al.* Mapping of the metalloproteinase gene matrilysin (MMP7) to human chromosome 11q21-->q22. *Cytogenet. Cell Genet.* **72**, 179–182 (1996).
302. Yokoyama, Y. *et al.* Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5503–11 (2008).
303. Fluhr, H., Spratte, J., Bredow, M., Heidrich, S. & Zygmunt, M. Constitutive activity of Erk1/2 and NF- $\kappa$ B protects human endometrial stromal cells from death receptor-mediated apoptosis. *Reprod. Biol.* **13**, 113–121 (2013).
304. Boeddeker, S. J., Baston-Buest, D. M., Altergot-Ahmad, O., Kruessel, J. S. & Hess, A. P. Syndecan-1 knockdown in endometrial epithelial cells alters their

- apoptotic protein profile and enhances the inducibility of apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 567–578 (2014).
305. Hu, Y. *et al.* Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* **12**, 826–836 (2010).
306. Amir, M., Romano, S., Goldman, S. & Shalev, E. Plexin-B1, glycodelin and MMP7 expression in the human fallopian tube and in the endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**, 152 (2009).
307. Yanaihara, A. *et al.* Comparison in gene expression of secretory human endometrium using laser microdissection. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 66 (2004).
308. Duncan, W. C. *et al.* Ectopic pregnancy as a model to identify endometrial genes and signaling pathways important in decidualization and regulated by local trophoblast. *PLoS One* **6**, (2011).
309. Reister, F. *et al.* Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR. *J. Perinat. Med.* **34**, 272–279 (2006).
310. Braundmeier, A. G., Fazleabas, A. T. & Nowak, R. A. Extracellular matrix metalloproteinase inducer expression in the baboon endometrium: Menstrual cycle and endometriosis. *Reproduction* **140**, 911–920 (2010).
311. Tapia, A. *et al.* Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy. *Hum. Reprod.* **23**, 340–351 (2008).
312. Germeyer, A. *et al.* Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 39–48 (2009).
313. Prakash, G. J., Suman, P. & Gupta, S. K. Relevance of syndecan-1 in the trophoblastic BeWo cell syncytialization. *Am. J. Reprod. Immunol.* **66**, 385–393 (2011).
314. Schmedt, A. *et al.* Evaluation of placental syndecan-1 expression in early pregnancy as a predictive fetal factor for pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* **32**, 131–7 (2012).
315. O'Connell, M. P. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 28704–28712 (2009).

316. Leocata, P. *et al.* Syndecan-1 and Wingless-type protein-1 in human ameloblastomas. *J. Oral Pathol. Med.* **36**, 394–399 (2007).
317. Robinson, J. F. & Fisher, S. J. Rbpj links uterine transformation and embryo orientation. *Cell Res.* **24**, 1031–1032 (2014).
318. Golan, T., Yaniv, A., Bafico, A., Liu, G. & Gazit, A. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **279**, 14879–88 (2004).
319. Wu, H. M. *et al.* Gonadotrophin-releasing hormone antagonist induces apoptosis in human decidual stromal cells: Effect on GADD45 $\alpha$  and MAPK signaling. *Hum. Reprod.* **27**, 795–804 (2012).
320. Issa, R. *et al.* GRO-alpha regulation in airway smooth muscle by IL-1beta and TNF-alpha: role of NF-kappaB and MAP kinases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, L66–L74 (2006).
321. Yang, H.-T., Cohen, P. & Rousseau, S. IL-1beta-stimulated activation of ERK1/2 and p38alpha MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO-alpha in HeLa cells. *Cell. Signal.* **20**, 375–380 (2008).
322. Yoshino, O. *et al.* Endometrial stromal cells undergoing decidualization down-regulate their properties to produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 beta via reduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2236–2241 (2003).
323. Chen, C. Y., Lin, C. W., Chang, C. Y., Jian, S. T. & Hsueh, Y. P. Sarm1, a negative regulator of innate immunity, interacts with syndecan-2 and regulates neuronal morphology. *J. Cell Biol.* **193**, 769–784 (2011).
324. Ju Ha, H. & Kim, S. Association of insulin receptor and syndecan-1 by insulin with activation of ERK I/II in osteoblast-like UMR-106 cells. *J Recept Signal Transduct Res* **33**, 37–40 (2013).
325. Reijmers, R. M., Spaargaren, M. & Pals, S. T. Heparan sulfate proteoglycans in the control of B cell development and the pathogenesis of multiple myeloma. *FEBS J.* **280**, 2180–93 (2013).
326. Maillard, L. *et al.* RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biol. Open* **3**, 995–1004 (2014).
327. Cuman, C. *et al.* Fetal-maternal communication: the role of Notch signalling in embryo implantation. *Reproduction* **147**, R75–86 (2014).

328. Wang, Q., Yang, L., Alexander, C. & Temple, S. The niche factor syndecan-1 regulates the maintenance and proliferation of neural progenitor cells during mammalian cortical development. *PLoS One* **7**, (2012).
329. Hayashi, K., Burghardt, R. C., Bazer, F. W. & Spencer, T. E. WNTs in the ovine uterus: Potential regulation of periimplantation ovine conceptus development. *Endocrinology* **148**, 3496–3506 (2007).
330. Bao, S. H. *et al.* Increased Dickkopf-1 expression in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Clin Exp Immunol* **172**, 437–43 (2013).
331. Poon, L. C. & Nicolaides, K. H. Early prediction of preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Int.* **2014**, 297397 (2014).
332. Haram, K., Mortensen, J. H. & Nagy, B. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *J. Pregnancy* **2014**, 910751 (2014).
333. Campbell, N. A. & Reece, J. B. *Biologie*. (Pearson Verlag, 2006).
334. Gui, S. *et al.* Inconformity of CXCL3 Plasma Level and Placenta Expression in Preeclampsia and Its Effect on Trophoblast Viability and Invasion. *PLoS One* **9**, e114408 (2014).
335. Cohen, M. & Bischof, P. Coculture of decidua and trophoblast to study proliferation and invasion. *Methods Mol. Biol.* **550**, 63–72 (2009).
336. Spring, J. *et al.* Mapping of the syndecan genes in the mouse: linkage with members of the myc gene family. *Genomics* **21**, 597–601 (1994).
337. McDermott, S. P. *et al.* Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-induced tumor development. *Oncogene* **26**, 1407–1416 (2007).
338. Ahmed, A., Singh, J., Khan, Y., Seshan, S. V. & Girardi, G. A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PLoS One* **5**, (2010).
339. Zenclussen, A. C., Fest, S., Joachim, R., Klapp, B. F. & Arck, P. C. Introduction a mouse model for pre-eclampsia: Adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur. J. Immunol.* **34**, 377–387 (2004).
340. Zhou, C. C. *et al.* Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat. Med.* **14**, 855–862 (2008).
341. Stillman, I. E. & Karumanchi, S. A. The glomerular injury of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2281–4 (2007).
342. Poon, L. C. & Nicolaides, K. H. Review Article Early Prediction of Preeclampsia. **2014**, (2014).

343. Salafia, C. M., Charles, A. K. & Maas, E. M. Placenta and fetal growth restriction. *Clin. Obstet. Gynecol.* **49**, 236–256 (2006).
344. De Oliveira, L. G. *et al.* Role of Interleukin 8 in Uterine Natural Killer Cell Regulation of Extravillous Trophoblast Cell Invasion. *Placenta* **31**, 595–601 (2010).
345. Lash, G. E. *et al.* Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum. Reprod.* **25**, 1137–1145 (2010).
346. Sibai, B., Dekker, G. & Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet* **365**, 785–799 (2005).
347. Huang, Y., Liu, Q. & Yu, Y. Relationship between fetal growth restriction and angiogenesis factors. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **34**, 1068–70 (2014).
348. Rosser, M. L. & Katz, N. T. Preeclampsia: An Obstetrician's Perspective. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **20**, 287–296 (2013).
349. Davis, E. F. *et al.* Cardiovascular risk factors in children and young adults born to preeclamptic pregnancies: a systematic review. *Pediatrics* **129**, e1552–61 (2012).
350. Eide, M. G. *et al.* Degree of fetal growth restriction associated with schizophrenia risk in a national cohort. *Psychol. Med.* **43**, 2057–66 (2013).
351. Tuovinen, S. *et al.* Hypertensive disorders in pregnancy and risk of severe mental disorders in the offspring in adulthood: The Helsinki Birth Cohort Study. *J. Psychiatr. Res.* **17**, 679–691 (2011).

## 5.1 Eigene Publikationen, Poster & Vorträge

**O. Altergot-Ahmad**, D.M. Baston-Buest, S.J. Boeddeker, J.S. Krüssel, T.N. Fehm, A.P. Hess (2015) The impact of Syndecan-1 on MAPK and Wnt signaling in human endometrial stromal cells. (derzeit unter Begutachtung bei Molecular Human Reproduction)

Boeddeker SJ, Baston-Buest DM, **Altergot-Ahmad O**, Kruessel JS, Hess AP (2014) Syndecan-1 knockdown in endometrial epithelial cells alters their apoptotic protein profile and enhances the inducibility of apoptosis. *Molecular Human Reproduction* 20(6):567-78

D.M. Baston-Büst, **O. Altergot-Ahmad**, S.J. Böddeker, T.N. Fehm, J.S. Krüssel, A.P. Hess (2014) Signalwege von CXCL1 im endometrialen Stroma (Vortrag, 60. Kongress der DGGG 2014, München)

**O. Altergot-Ahmad**, S.J. Böddeker, D.M. Baston-Büst, J.S. Krüssel, A.P. Hess (2014) Human endometrial stromal cells express CXCL1 in-vitro through differenz signalling pathways (Poster, 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE, München)

S.J. Böddeker, D.M. Baston-Büst, **O. Altergot-Ahmad**, J.S. Krüssel, A.P. Hess (2014) Syndecan-1 knock-down alters apoptotic susceptibility to embryonic stimuli in the human endometrial epithelial cell line RL95-2 (Poster, 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE, München)

S.J. Böddeker, D.M. Baston-Büst, **O. Altergot-Ahmad**, J.S. Krüssel, A.P. Hess (2014) Apoptosis of endometrial epithelial cells by embryonic stimuli and influence of syndecan-1 (Poster, 61<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting of the Society for Gynecological Investigation 2014, Florenz, Italien)

**Olga Altergot-Ahmad**, Sarah J. Böddeker, Dunja M. Baston-Büst, Jan S. Krüssel, Alexandra P. Hess (2013) Die CXCL1-Expression wird in endometrialen Stromazellen abhängig von Syndecan-1 über den MAPK- und unabhängig von

Syndecan-1 über den JNK-Signalweg reguliert (Poster, DVR Kongress 2013, Münster)

S.J. Bötdeker, **O. Altergot-Ahmad**, D.M. Baston-Büst, J.S. Krüssel, A.P. Hess  
Apoptose endometrialer Epithelzellen durch embryonale Stimuli und Einfluss von  
Syndecan-1 (Poster, DVR Kongress 2013, Münster)

Baston-Büst DM, Schanz A, Bötdeker SJ, **Altergot-Ahmad O**, Krüssel JS, Rein D,  
Hess AP (2013) CXCL1 expression in human decidua in vitro is mediated via the  
MAPK signaling cascade. *Cytokine* 64(1):79-85

**O. Altergot-Ahmad**, S.J. Bötdeker, D.M. Baston-Büst, J.S. Krüssel, A.P. Hess  
(2013) Syndecan-1 controls the expression of CXCL1 through the MAPK signaling  
pathway in human endometrial stromal cells (Poster, Endocrine Society's 95th  
Annual Meeting, San Francisco, USA)

D.M. Baston-Büst, **O. Altergot**, S.J. Bötdeker, D. Fehr, A. Schanz, W. Janni, J.S.  
Krüssel, A.P. Hess (2012) Der knock-down des Heparansulfat-Proteoglycans  
Syndecan-1 modifiziert das Chemokin-Expressionsprofil dezidualisierter  
endometrialen Stromazellen (Poster, 59. Kongress der DGGG 2012, München)

D.M. Baston-Büst, S.J. Bötdeker, **O. Altergot**, D. Fehr, A. Schanz, W. Janni, J.S.  
Krüssel, A.P. Hess (2012) Der Embryosurrogatmarker IL-1 $\beta$  stimuliert die Expression  
des chemokine ligand 1 (CXCL1) in dezidualisierten endometrialen Stromazellen  
(Poster, 59. Kongress der DGGG 2012, München)

D.M. Baston-Büst, S.J. Bötdeker, **O. Altergot**, D.J. Ziegler, J.S. Krüssel, A.P. Hess  
(2012) Angiogenic factor composition of decidualized endometrial stromal cells is  
modified by knock-down of syndecan-1 followed by imitation of embryo contact  
(Poster, Joint International Congress American and European Society for  
Reproductive Immunology 2012, Hamburg)

**O. Altergot**, D.M. Baston-Büst, S.J. Böddeker, D.J. Ziegler, J.-S. Krüssel, W. Janni, A.P. Hess (2011) Evaluation eines Chemokinrezeptor-knock-downs in endometrialen Stromazellen (Vortrag DGGEF 2011, Münster)

D.M. Baston-Büst, D.J. Ziegler, N. Pfeifer, **O. Altergot**, S.J. Böddeker, J.S. Krüssel, A.P. Hess (2011) Veränderte Expression der Hedgehog Gene Sonic und Indian in Mausembryonen in-vitro (Vortrag 4. DVR Kongress 2011, Berlin)

S. J. Böddeker, D. M. Baston-Büst, **O. Altergot**, J. S. Krüssel, W. Janni, A. P. Hess (2010) Einfluss des Ko-Rezeptors Syndecan-1 auf die Expression Apoptose-beteiligter Proteine in humanen dezidualisierten endometrialen Stromazellen (Vortrag DGGEF 2010, Düsseldorf)

## 6 Anhang

### 6.1 Putative *KdCXCR2*-Zellklone

Tab. 21.: Übersicht über die Anzahl der durchgeführten Transfektionen und die Anzahl der daraus resultierten *KdCXCR2*-Zelllinien

Transfektion	Transfizierte Zellen	shRNA-Vektor	Transfektionsprogramm	<i>KdCXCR2</i> -Zelllinie (Bezeichnung)
1. Transfektion (30.06.2010)	Amaxa	893III	T-13	-
			T-23	AIII T-23
			T-24	-
			U-17	-
			U-23	AIII U-23
			U-24	-
		1145I	T-13	AI T-13
			T-23	-
			T-24	-
			U-17	-
			U-23	AI U-23
			U-24	AI U-24
	Nano	893III	T-13	-
			T-23	-
			T-24	-
			U-17	-
			U-23	-
			U-24	NIII U-24
		1145I	T-13	NI T-13
			T-23	-
			T-24	NI T-24

			U-17	-		
			U-23	-		
			U-24	-		
2. Transfektion (14.12.2010)	Amaxa	893III	T-13	-		
			T-23	AIII T-23		
			T-24	-		
			U-17	-		
			U-23	AIII U-23		
				U-24	-	
		1145I	T-13	AI T-13		
			T-23	-		
			T-24	-		
			U-17	-		
	U-23		AI U-23			
			U-24	AI U-24		
3. Transfektion (17.12.2010)	Nano	893III	T-13	2 Zelllinien (1, 2)		
			T-23	-		
			T-24	(3)		
			U-17	-		
			U-23	2 Zelllinien (4, 31)		
			U-24	5 Zelllinien (5, 6, 7, 8, 32)		
		1145I	T-13	2 Zelllinien (9, 10)		
			T-23	3 Zelllinien (11, 12, 13)		
			T-24	-		
			U-17	(14)		
			U-23	2 Zelllinien (15, 16)		
			U-24	2 Zelllinien (17, 18)		
		Amaxa	893III	T-13	2 Zelllinien (19, 20)	
				T-23	3 Zelllinien (21, 22, 23)	
				T-24	(24)	
				U-17	(25)	
				U-23	2 Zelllinien (26, 27)	
				U-24	2 Zelllinien (28)	
	1145I	T-13	-			
		T-23	-			
		T-24	-			
		U-17	(30)			
		U-23	-			
		U-24	-			
4. Transfektion (14.04.2011)	Amaxa	429III	T-13	#13		
			T-23	#14		
			T-24	#15		
			U-17	#16		
			U-23	#17		
			U-24	#18		
				452III	T-13	#19
					T-23	#20
		T-24	#21			
		U-17	#22			
		U-23	#23			
		U-24	#24			
		Nano	429III	T-13	#1	
				T-23	#2	
	T-24			#3		
	U-17			#4		
	U-23			#5		
	U-24			#6		
	452III	T-13	#7			
		T-23	#8			

			T-24	#9
			U-17	#10
			U-23	#11
			U-24	#12
			T-13	#37
			T-23	-
		1015I	T-24	#39
			U-17	-
			U-23	-
			U-24	#42
	Amaxa		T-13	#43
			T-23	#44
		1744III	T-24	#45
			U-17	-
			U-23	#47
			U-24	#48
5. Transfektion (11.05.2011)			T-13	#25
			T-23	#26
		1015I	T-24	#27
			U-17	#28
			U-23	#29
			U-24	#30
	Nano		T-13	#31
			T-23	#32
		1744III	T-24	#33
			U-17	#34
			U-23	#35
			U-24	#36

## 6.2 Auswertung der CXCR2-IF-Aufnahmen

Tab. 22: CXCR2-IHC-Auswertung aller IHC-Abb. mit endometrialem Gewebe von 2 Patientinnen; (-)= keine Färbung; (+)= schwache Färbung; (++)= moderate Färbung

Patientin #	Aufnahme #		1. Untersucher	2. Untersucher	3. Untersucher
1	1	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	+	+
1	2	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	3	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	+
1	4	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	+++	++	+++
		Stroma	+	-	+
1	5	Epithel	x	x	x
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	+
1	6	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	-	-
1	7	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	+++	++

		Stroma	+	+	+
1	8	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	9	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	-	-
1	10	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	11	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	+++	++
		Stroma	-	+	-
1	12	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	13	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	+	+
1	14	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	15	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	-	-
1	16	Epithel	+	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	17	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	+++	++
		Stroma	+	+	+
1	18	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	+	+
1	19	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	20	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	-	-
1	21	Epithel	++	+	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	22	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	+	+
1	23	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	24	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	-	-
1	25	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	+	+
1	26	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	27	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	+++	+++	+++

		Stroma	-	-	+
1	28	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	29	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	+++	++
		Stroma	+	+	+
1	30	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	-	-
1	31	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	x	x	x
		Stroma	-	-	-
1	32	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	-	-	-
1	33	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	x	x	x
		Stroma	-	+	-
2	34	Epithel	x	x	x
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	+	+
2	35	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	+	+
2	36	Epithel	x	x	x
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	+	+
2	37	Epithel	++	++	++
		Drüsenepithel	++	++	++
		Stroma	+	+	+

### 6.3 Sphäroid-Konfrontationsversuche

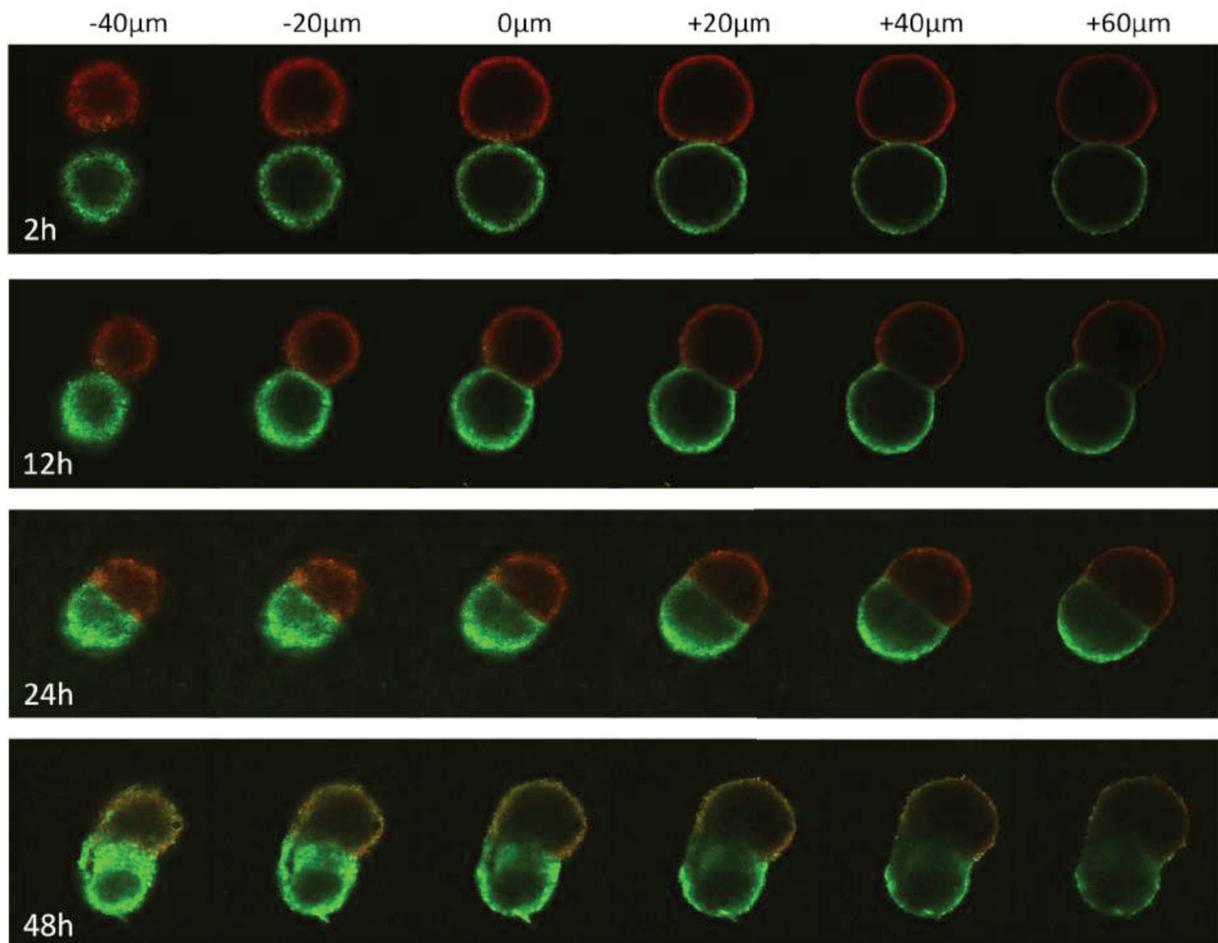


Abb. 62: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit zwei KdS1-Sphäroiden als Negativkontrolle. Dargestellt sind die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen eines KdS1-KdS1-Sphäroidansatzes gefärbt mit MitoTracker® Green und MitoTracker® Orange. Gezeigt sind jeweils Serienaufnahmen aus 6 Ebenen (20µm Abstand) und 4 Zeitpunkten (2h, 12h, 24h, 48h)

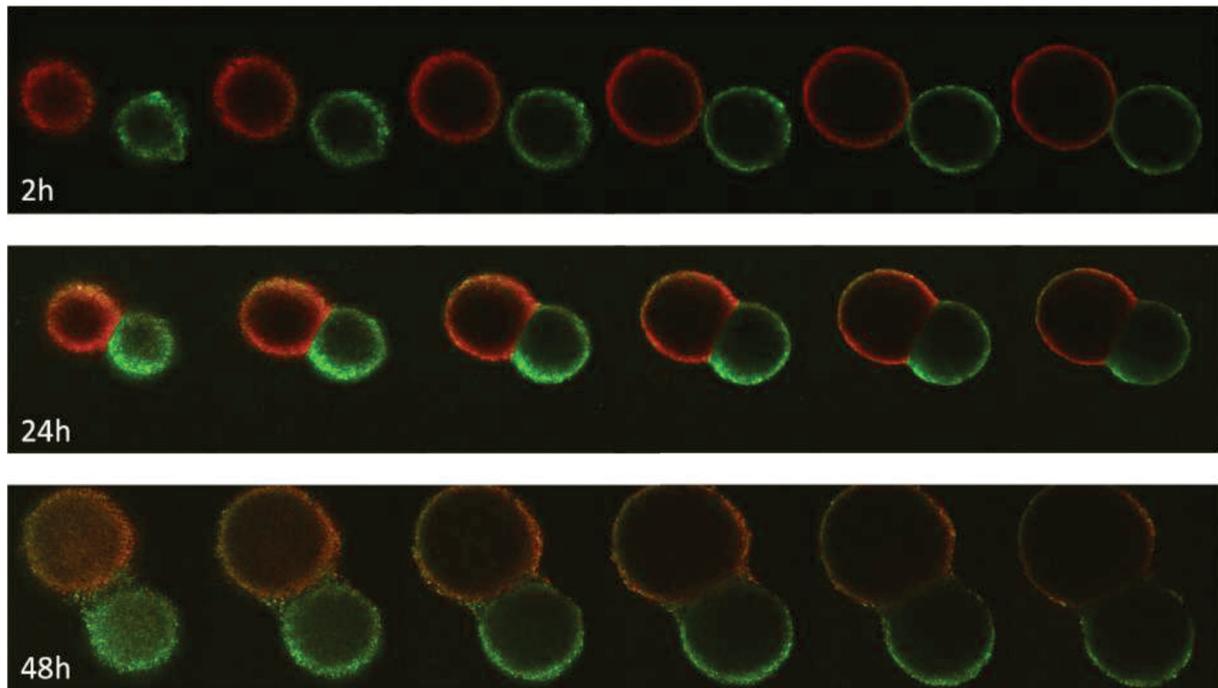


Abb. 63: Repräsentatives Ergebnis eines Konfrontationsversuches mit einem KdS1-Sphäroiden und einem St-T1-Sphäroid als Negativkontrolle. Dargestellt sind die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen eines KdS1-KdS1-Sphäroidansatzes gefärbt mit MitoTracker® Green und MitoTracker® Orange. Gezeigt sind jeweils Serienaufnahmen aus 6 Ebenen (20µm Abstand) und 3 Zeitpunkten (2h, 24h, 48h)

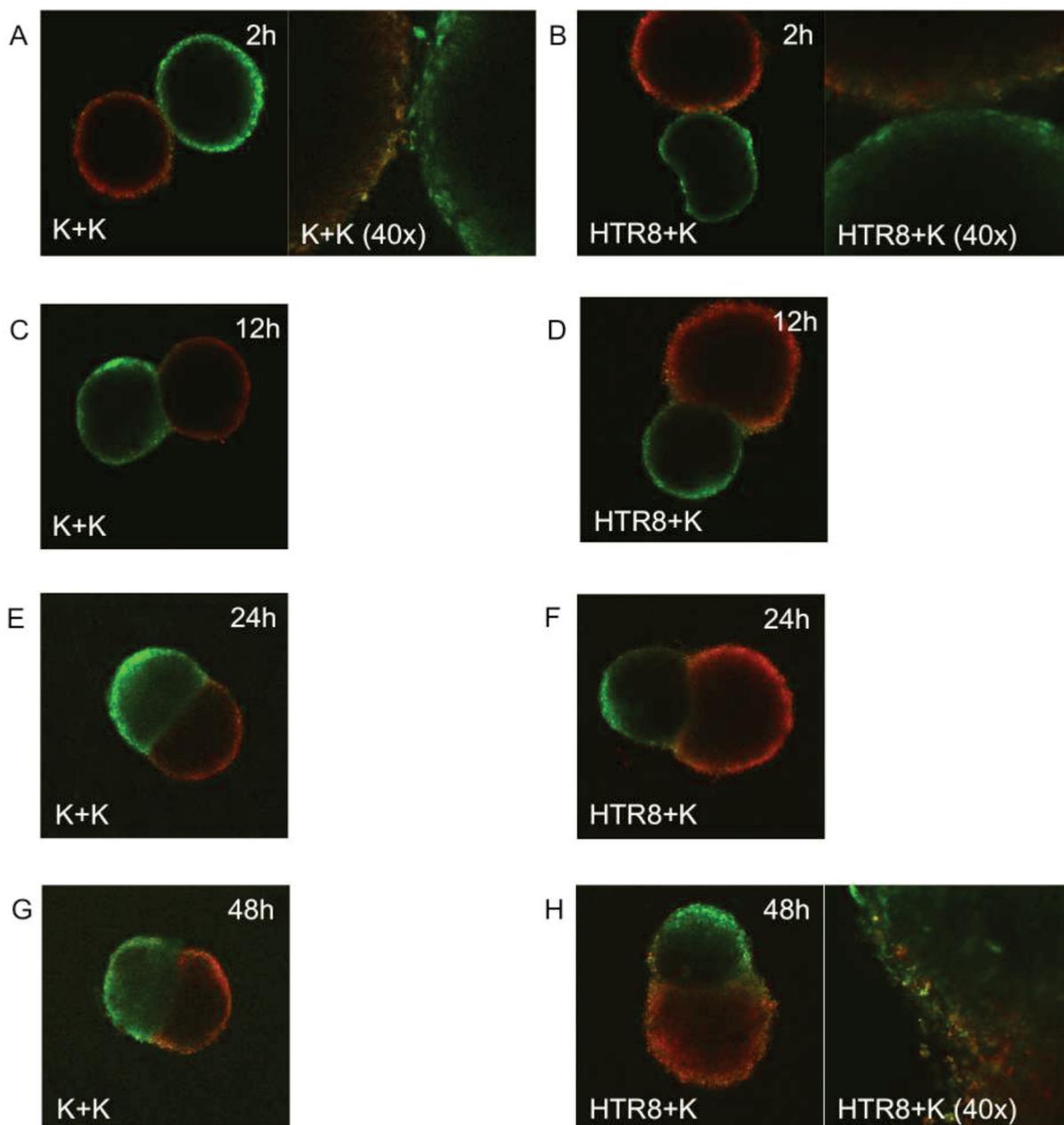


Abb. 64: Gegenüberstellung von repräsentativen Ergebnissen der KdS1+KdS1-Negativkontrolle und der HTR8/SVneo+KdS1-Konfrontationskultur. Dargestellt sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrolle KdS1+KdS1 und des Versuchsansatzes HTR8/SVneo (rot)+KdS1 (grün) der mittleren Schnittebene nach (A+B) 2h, (C+D) 12h, (E+F) 24h und (G+H) 48h mit 100x bzw 400x Vergrößerung (als 40x Vergrößerung des Objektivs angegeben)

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben.

Allen voran geht mein größter Dank an PD Dr. Alexandra P. Hess für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Ausarbeitung der Promotionsthemen, die Diskussion, Beratung und Betreuung, für die Motivation, das Verständnis und das leckere Raclette in der Vorweihnachtszeit.

Bei Dr. Dunja Baston-Büst möchte ich mich für die Laboreinarbeitung, die Beantwortung aller methodischen Fragen, für die kritische Diskussion meiner Ergebnisse und die vielen hilfreichen Vorschläge und Hilfestellungen ganz herzlich bedanken.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Peter Proksch für die Übernahme des Zweitgutachtens und den freundlichen Kontakt.

Danke schön an die gesamte Arbeitsgruppe des UniKiD-Forschungslabors, Dipl.-Biol. Sarah J. Böddeker, cand. med. Daniela J. Ziegler, cand. med. Tizia K. Klibisch und MSc Biotech. Christina Gougoula. Vor allem möchte ich mich bei Sarah und Daniela für die schöne Zeit im Labor, die ich vermissen werde, und die Hilfe in allen Lebenslagen bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. Jan S. Krüssel und das gesamte UniKiD-Team für das schöne Arbeitsklima und an die Arbeitsgruppen von Dr. Dieter Niederacher und Prof. Dr. Hans Neubauer für die freundliche Arbeitsatmosphäre in den letzten eineinhalb Jahren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Mann für ihren Glauben an mich, die Unterstützung, die Motivation und die Geduld, für die aufbauenden Worte und die positiven Gedanken.

