IN VITRO EXPRESSION VON INTEGRINEN UND EXTRAZELLULÄRER MATRIX IN BOVINEN PLAZENTAZELLEN

MARTINA ZEILER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

In vitro Expression von Integrinen und extrazellulärer Matrix in bovinen Plazentazellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
MARTINA ZEILER
Tierärztin aus Calw

Gießen 2006

gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser
2. Berichterstatter: PD Dr. G. Schuler

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2006

Meinen Eltern & Tanja

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

2. ZIELSETZUNG DER DISSERTATION 2

3. LITERATURÜBERSICHT 3

3.1. Aufbau und Histomorphologie der Rinderplazenta 3

3.1.1. Definition und allgemeine Aspekte zur Typisierung und Entwicklung 3

3.1.2. Der Aufbau eines Plazentoms 4

3.1.3. Zelltypen in der Rinderplazenta und die sogenannte eingeschränkte Trophoblastinvasion 5

3.1.4. Klinische Relevanz der plazentaren Besonderheiten beim Rind 6

3.2. Kultur von Zellen aus Endometrium und Plazenta des Rindes 6

3.3. Das Zytoskelett 11

3.4. Allgemeine Aspekte zu Integrinen 13

3.4.1. Definition von Integrinen 13

3.4.2. Vorkommen von Integrinen 14

3.4.3. Struktur und Bindung von Integrinen 14

3.4.4. Redundanz von Integrinen 16

3.4.5. Funktion von Integrinen 17

3.4.6. Aktivitätszustand von Integrinen 19

3.4.7. Integrine und Anoikis 20

3.4.8. Relevante Integrin-Rezeptoren und ihre Liganden 21

3.4.9. Integrine: Krankheiten und therapeutische Anwendung 23

3.5. Die Extrazelluläre Matrix (ECM) 24

3.6. Die Rolle von Integrinen und der ECM in der Reproduktion 29

4. MATERIAL UND METHODEN 34

4.2. Zellkultur 37

4.2.1. Allgemeine Grundlagen der Primärkultur 37

4.2.2. Warum Primärzellen aus dem Rinderplazentom? 38

4.2.3. Wahl der Disaggregationsmethode 38

4.2.4. Wahl des Mediums 39

4.2.5. Einsatz von Antibiotika 40

4.2.6. Protokoll für Primärkulturen aus Karunkeln beziehungsweise Kotyledonen .. 40

4.2.7. Mikroskopische Dokumentation des Zellwachstums ... 43

4.3. Nachweis von Zytoskelettbestandteilen und Integrinrezeptoren mittels Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten und kultivierten Zellen ... 44

4.3.1. Allgemeine Grundlagen ... 44

4.3.2. Immunfluoreszenz (IF) ... 45

4.3.3. Vergleich Immunhistochemie und IF ... 45

4.3.4. Gewebepräparation ... 46

4.3.5. Verwendete Antikörper ... 48

4.3.6. Protokoll für IF an Gefrierschnitten (in vivo) und an kultivierten Zellen (in vitro) ... 49

4.3.7. Kontrollen ... 50

4.3.8. Dokumentation der Fluoreszenzergebnisse ... 50

4.3.9. Auswertung der fluoreszenzimmunologischen Untersuchungen ... 50

4.3.10. Kernfärbung ... 51

4.4. mRNA-Nachweis mittels RT-PCR ... 52

4.4.1. Allgemeine Grundlagen ... 52

4.4.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus Gefriermaterial ... 52

4.4.3. Protokoll für RNA-Extraktion aus Gewebe (TRIzol® Reagenz) ... 52

4.4.4. Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen ... 53

4.4.5. Protokoll für RNA-Extraktion aus Zellen (peqGOLD RNAPure™-Kit) ... 53

4.4.6. Konzentrationsbestimmung und Bestimmung der Reinheit ... 54

4.4.7. Lagerung ... 55

4.5. Nachweis der Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 mRNA-Expression im Gewebe und in Zellen durch RT-PCR ... 56

4.5.1. Allgemeine Grundlagen ... 56

4.5.2. Protokoll Reverse Transkription und PCR ... 56

4.5.3. Primer ... 58

4.5.4. Detektion und Dokumentation ... 59

5. ERGEBNISSE ... 61

5.1. Immunfluoreszenz an ex vivo Rinderplazentomen ... 61

5.2. Untersuchungen an kultivierten Plazentazellen ... 70

5.2.1. Methodische Ergebnisse ... 70

5.2.2. Morphologie der kultivierten Zellen ... 71

5.2.3. Charakterisierung der Uterusepithelzellen ... 72

5.2.4. Charakterisierung der Trophoblastzellen ... 79
5.2.5. Nachweis Integrin-spezifischer mRNA mittels RT-PCR ... 87

6. DISKUSSION ... 89

6.1. Etablierung eines Zellkulturmodells für bovine Plazentazellen ... 89
6.1.1. Spezielle Aspekte zur Wahl der Disaggregationsmethode ... 90
6.1.2. Spezielle Aspekte zur Wahl des Mediums ... 91
6.1.3. Spezielle Aspekte zur Kultivierungsweise ... 92
6.2. Zytoskelettbestandteile zur Charakterisierung der Primärkultur ... 92
6.3. Vergleich in vivo-in vitro Expression von Integrinen und ECM ... 94
6.3.1. Die RT-PCR ... 98
6.4. Ausblick/Weiterführende Aspekte ... 99

7. ZUSAMMENFASSUNG ... 101

8. SUMMARY ... 103

9. LITERATURVERZEICHNIS ... 105

Anhang ... 117

Abkürzungsverzeichnis

α-sm Actin	**α-s**mooth **m**uscle Actin
A	**A**denin
AK	**A**nti**k**örper
Aqua bidest	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
AVP	**A**ntikörper**v**erdünnungs**p**uffer
bp	**B**asen**p**aare
bPL	**b**ovines **p**lazentares **L**aktogen
bIFN-τ	**b**ovines **I**nter**f**ero**n**-**tau**
BSA	**B**ovines **S**erum**a**lbumin
C	**C**ytosin
cDNA	**C**opy-**DNA**
CK	**C**yto**k**eratin
CLS I	**C**o**l**lagena**s**e Typ I
CLS II	**C**o**l**lagena**s**e Typ II
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	**D**ulbecco´s **M**odified **E**agle **M**edium
DM	**D**oppel**m**arkierung
DNS (DNA)	**D**esoxyribo**n**ukleins**ä**ure
DNase	**D**esoxyribo**n**ukle**ase**
dNTP	**D**esoxy-Ribo**n**ukleosid**tri**phosphat
DTT	**Di**thio**t**heitol
E	**E**ndothel
ECM	Extrazelluläre Matrix (**e**xtra**c**ellular **m**atrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (**E**pidermal **G**rowth **F**actor)
EtBr	**Et**hidium**br**omid
EtOH	Ethanol
FITC	**F**luoresceini**s**o**t**hio**c**yanat
FKS	**F**etales **K**älber**s**erum
FM	**F**etales **M**esenchym
FN	**F**ibro**n**ectin
G	**G**uanin
GAG	**G**lycos**a**mino**g**lycan
g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde (hour)
HBSS+	Hanks´ Salzlösung <u>mit</u> Calcium und Magnesium (**H**anks **b**uffered **s**alt **s**olution)
HBSS-	Hanks´ Salzlösung <u>ohne</u> Calcium und Magnesium (**H**anks **b**uffered **s**alt **s**olution)
IF	**I**mmun**f**luoreszenz
Ig	**I**mmun**g**lobulin
kb	**K**ilo**b**asen
kDa	**K**ilo**da**lton (= 1000 Da)
LDV	Aminosäuresequenz Leu-Asp-Val, Erkennungsregion für Integrine
LM	**La**m**i**nin
L/mol	Einheit der Bindungs- oder Affinitätskonstanten
M	100 bp **M**arker

m	männlich
$MgCl_2$	**Mag**nesium**chl**orid
µmol	mikromolar
M199	**M**edium **199**
mRNA (mRNS)	**M**essenger-**R**ibo**n**ukleins**ä**ure
MS	**m**aternales **S**troma
NaCl	**Na**trium**chl**orid
OT	**O**bjekt**t**räger
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaction)
Pen/Strep	**Pen**icillin/**Strep**tomycin
RGD	Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp, Erkennungsregion für Integrine
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
RNA (RNS)	**R**ibo**n**ukleins**ä**ure
RNase	**R**ibo**n**ukle**ase**
RT	**R**aum**t**emperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
R.T.U.	**R**eady **t**o **u**se
SSL	**S**cheitel-**S**teiss-**L**änge (Fadenmaß zwischen der Mitte der Fontanella parietalis (frontalis) und dem kaudalen Ende des Kreuzbeines)
T	**T**hymin
TAE	**T**ris-**A**cetat-**E**DTA-Puffer
Taq	Thermus acquaticus
TGC	Trophoblastriesenzellen (**t**rophoblast **g**iant **c**ells)
U	Enzymeinheiten (**U**nits)
TZ	**T**rophoblast**z**ellen
UE	**U**terus**e**pithel
Vim	**Vim**entin
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
w	weiblich

1. Einleitung

Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die Transmembranrezeptoren bilden. Erst nach der Aktivierung der Integrine findet eine Bindung an die Liganden statt, zu denen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) gehören („inside-out signalling“). Andererseits werden über die Integrin-Ligand-Wechselwirkungen Signalübertragungen in die Zelle hinein, unter anderem durch eine Veränderung des Zytoskeletts, moduliert („outside-in signalling“) (Longhurst & Jennings, 1998). Somit sind Integrine ideale Koordinatoren von dynamischen zellulären Vorgängen. Ihre regulatorische Funktion während der Implantation und der Trophoblastinvasion wurde für die hämochoriale Plazenta des Menschen bereits nachgewiesen (Fisher & Damsky, 1993). Mit Hilfe eines Zellkulturmodells soll nun der Vorgang der Trophoblastinvasion beim Rind studiert werden, da Kühe als Besonderheit die sogenannte eingeschränkte Trophoblastinvasion (Pfarrer *et al.*, 2003) aufweisen, die möglicherweise Modellcharakter für andere invasive Prozesse hat.

Das Rind besitzt eine Placenta epitheliochorialis, in der, im Gegensatz zu anderen epitheliochorialen Plazenten, eine eingeschränkte Trophoblastinvasion stattfindet (Pfarrer *et al.,* 2003). Dies bedeutet, dass nicht polarisierte, meist binukleäre Trophoblastriesenzellen aus dem fetalen Chorionepithel in das maternale Epithel migrieren und dort mit dem Uterusepithel trinukleäre feto-maternale Hybridzellen formieren (Wooding, 1992; Klisch *et al.*, 1999). Bei diesem Prozess werden fetale hormonenthaltende Granula mit plazentarem Laktogen, schwangerschaftsspezifischen (Glyko-) Proteinen und Progesteron in das mütterliche Gewebe geschleust, bevor die Zellen zugrunde gehen (Wooding, 1992). Die Vorgänge zum Zeitpunkt der Implantation wurden bei den dem Rind eng verwandten Ruminanten Schaf in vivo und in vitro (Johnson *et al.*, 1999; 2001) und Ziege in vivo (Guillomot, 1999) untersucht. Allerdings unterscheidet sich der Invasionsprozess in den Endprodukten. Bei Schaf und Ziege kommt es zur Bildung von größeren Synzytien im uterinen Epithel, wohingegen beim Rind durch die Fusion einzelne, meist dreikernige feto-maternale Hybridzellen entstehen (Wooding, 1992). Diese Migration eignet sich aufgrund ihrer Überschaubarkeit als Modell für invasive Prozesse.

2. Zielsetzung der Dissertation

Um die Interaktionen von Integrinen mit der ECM bei dem genannten Migrationsvorgang im bovinen Plazentom aufzeigen zu können, wurden in vorangegangenen Arbeiten immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen von Integrinen und ECM Proteinen an Gewebeschnitten durchgeführt, die zeigten, dass die wandernden Trophoblastriesenzellen, obwohl nicht polarisiert, die Integrinausstattung von polarisierten Epithelzellen aufwiesen und offensichtlich ihre eigene Lamininmatrix produzieren (Pfarrer *et al.,* 2003). Diese Ergebnisse sollen unter der Verwendung der Immunfluoreszenz am Gefrierschnitt reproduziert werden. Um schließlich die Regulierung der Trophoblastriesenzellmigration näher erforschen zu können, soll im Rahmen dieser Arbeit ein Zellkulturmodell mit Primärkulturen etabliert werden, in dem in der Folge durch Modulation einzelner Faktoren Aufschluss über Regulationsmechanismen invasiver Prozesse gewonnen wird. Dabei stehen neben der Isolierung, Etablierung und kontinuierlichen Kultivierung die Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen der Rinderplazentome im Vordergrund, weil die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der Ergebnisse vor der Anwendung von Stimulations- und Hemmungstests beziehungsweise dem Einsatz von unterschiedlichen Medien und verschiedener Wachstumsfaktoren überprüft werden muss.

Die Charakterisierung der isolierten Zellen soll mittels Immunfluoreszenz und Antikörpern gegen die Cytoskelettfilamente α-smooth muscle Actin, Desmin, Vimentin und Zytokeratin erfolgen. Immunhistochemische Untersuchungen der Integrin-Liganden Laminin, Fibronectin und Kollagen IV sollen zeigen, welche Bestandteile der ECM in vitro exprimiert werden. Der Nachweis der Integrinuntereinheiten α_6, α_v, β_1 und β_3 soll auf Proteinebene in der indirekten Immunfluoreszenz geführt werden und auf mRNA-Ebene durch eine RT-PCR abgesichert werden.

3. Literaturübersicht

3.1. Aufbau und Histomorphologie der Rinderplazenta

3.1.1. Definition und allgemeine Aspekte zur Typisierung und Entwicklung

Die Plazenta ist als eine Zusammenlagerung von mütterlichen und fetalen Geweben zum Zwecke des physiologischen Austausches definiert (Mossman, 1937). Noch prägnanter werden sie als eine Anordnung von einem oder mehreren Transportepithelien zwischen fetalem und maternalem Kreislauf beschrieben (Steven, 1975). Es handelt sich um ein charakteristisches Organ von Säugern, welches für die Dauer der Trächtigkeit gebildet wird und das den Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus übernimmt, sowie graviditätserhaltende Hormone produziert (Dantzer & Leiser, 1998; Hoffmann & Schuler, 2002).

Eine Klassifizierung der Plazenten kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen, worin die Vielzahl an Bezeichnungen begründet ist. Nach Art der beteiligten Eihäute oder fetalen Membranen wird bei den Wiederkäuern wie bei den meisten Säugetieren von einer allantochorialen Plazenta gesprochen (Leiser & Kaufmann, 1994).

Beim Rind bleibt die Gebärmutterschleimhaut während der Geburt, wenn sich die Chorionzotten aus den Karunkelkrypten lösen, weitgehend intakt. Somit besitzt das Rind eine *adeziduate Plazenta, Semiplazenta* oder *Halbplazenta* (Strahl, 1906). Grosser (1909) bezieht sich für die *Semiplacenta multiplex sive cotyledonaria* auf die Form und Verteilung der Chorionzotten. Er nannte die in Gruppen angeordneten Chorionzotten Kotyledonen, die von sogenannten „milky patches“ (Hradecký *et al.*, 1988) in das sich ausbildende Kryptensystem der mütterlichen Karunkeln einwachsen (Grosser, 1909) und zusammen das Plazentom bilden (Strahl, 1906). Die Plazentarschranke besteht theoretisch aus sechs Gewebeschichten, dem maternalen Endothel, Bindegewebe und dem maternalen Epithel und auf der fetalen Seite aus Trophoblast, Bindegewebe und fetalem Endothel, allerdings finden tierartlich unterschiedliche Reduktionen und Modifikationen abhängig von der Invasivität des Trophoblasten statt. Die bekannte Einteilung nach Grosser (1927) anhand der trennenden Schichten zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf verwendet für die Wiederkäuerplazenta den heute überholten Begriff *syndesmochorial*, da vor allem beim Hirsch und Schaf sehr ausgiebige „Epithelschädigungen“ im Kryptenbereich auftreten. Die Rinderplazenta wurde dann als *epitheliochorial* klassifiziert, da diese beschriebenen Defekte nicht nachgewiesen werden konnten (Björkman & Bloom, 1957). Diese Einordnung in

epitheliochorial gilt anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen auch für andere Haustiere wie Pferd, Esel, Kamel und Schwein (Leiser & Kaufmann, 1994; Dantzer & Leiser, 1998; Abd-Elnaeim *et al.*, 1999).

Später wurden neuere Erkenntnisse in den Terminus *synepitheliochorial* umgesetzt (Wooding, 1992). Dabei wurde sowohl dem Phänomen des persistierenden Uterusepithels, als auch der Fusion von ins mütterliche Kompartiment migrierenden Trophoblastriesenzellen (TGC) mit einzelnen Uterusepithelzellen zu feto-maternalen Hybridzellen Rechnung getragen. Diese Tatsache wird auch durch die erste Silbe eindeutig dokumentiert, die auf die Beteiligung der TGC an einem Synzytium mit dem maternalen Epithel Bezug nimmt (Wimsatt, 1951; Wooding, 1992).

3.1.2. Der Aufbau eines Plazentoms

Die Plazentome des Rindes sind in der Plazenta in vier Reihen angeordnet und schwanken zahlenmäßig zwischen 70 und 150 (Grosser, 1909; 1927; Björkman & Sollen, 1960; Wooding & Flint, 1994). Hiernach gehört das Rind zu den Polykotyledontophoren (Andresen, 1927). Knötchenförmige Karunkelanlagen im Uterus findet man bereits in der Fetalphase im 4./5. Monat, die Drüsen in internodularen Bereichen und an den Knötchenseiten folgen im letzten Gestationsmonat bis in den ersten sechs Monaten nach der Geburt (Atkinson *et al.*, 1984). Im Rahmen des Implantationsgeschehens schließlich findet um den Tag 30 post inseminationem ein Aussprossen der Chorionzotten und zwei Tage danach ein sehr „fragiles Anheften“ an die mütterlichen Karunkeln statt (Leiser, 1975). Durch eine Vergrößerung der apikalen Oberflächen des maternalen und fetalen Epithels und einer Interdigitation ihrer Mikrovillisäume werden physiologische Austauschprozesse möglich, die Plazentombildung hat begonnen (Leiser, 1975). Die Plazentome erlangen zwischen Tag 80 und 95 der Trächtigkeit ihre endgültige äußere Form (Björkman, 1954): sie sind deutlich konvex, pilz- oder knopfartig (Gebärmutterknöpfe) (Grosser, 1927) und bestehen aus der maternalen Uteruskarunkel und dem eingewachsenen, komplementär interdigitierenden Chorion-zottenbaum. Die Zotten sind astartig in Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten verzweigt, wodurch sich eine große resorbierende Oberfläche bildet (Strahl, 1906; Grosser, 1927; Leiser, 1975; Mossman, 1987).

Beim Schaf ist der Rand der Karunkeln wallartig aufgeworfen und die Zotten dringen nur in der Mitte radiär ein, so dass man von Gebärmutternäpfen spricht (Grosser, 1927). Auch schreitet das Wachstum der Plazentome beim Schaf nicht, wie beim Rind, bis zum Ende der Trächtigkeit fort (Laven & Peters, 2001). Beim Rind wurde eine Vergrößerung und Gewichtszunahme besonders im tragenden Horn und dort vor allem in der Karunkel

festgestellt. Eine aufgrund der fließenden Übergänge künstliche Einteilung unterscheidet beim Schaf vier Plazentomformen (Vatnick *et al.*, 1991) und beim Rind zwei, nämlich normale und flache Plazentome, wobei ein flaches Plazentom in 80 % der Uteri nach dem 100. Trächtigkeitstag und eher im tragenden Horn zu finden ist (Laven & Peters, 2001). Allerdings wurde beim Rind kein Hinweis auf eine Anpassung durch Formänderung gefunden, wie dies beim Schaf der Fall ist. Als Reifungsprozess des Plazentoms wird die Abflachung des zuvor kubischen Kryptenepithels und der Übergang einer kontinuierlichen in eine diskontinuierliche Ausbildung des Epithels und die zunehmende Kollagenisierung des Stromas im letzten Trächtigkeitsstadium interpretiert (Woicke *et al.*, 1986).

3.1.3. Zelltypen in der Rinderplazenta und die sogenannte eingeschränkte Trophoblastinvasion

Schon früh wurde als Besonderheit in der Wiederkäuerplazenta eine Wanderung von fetalen Zellen in das maternale Kompartiment beschrieben. Man fand im Chorionepithel des Rindes zwei Populationen von Trophoblastzellen, die uninukleären, polarisierten, der Basalmembran anliegenden Trophoblastzellen und meist zweikernige, aber auch vielkernige Trophoblastriesenzellen [Trophoblast giant cells, TGC (Klisch *et al.*, 1999), Diplokaryozyten (Andresen, 1927), binucleate cells, BNC], die nicht polarisiert sind (Wimsatt, 1951). Dieser zweite Zelltyp tritt in einem Zeitraum ab dem Tag 16-20 der Gestation bis zur Geburt mit einem Anteil von 15-20 % auf (Greenstein *et al.*, 1958; Williams *et al.*, 1987). TGC entstehen durch azytokinetische Mitosen (Wooding, 1982; Klisch *et al.,* 1999) und besitzen keinen Bürstensaum oder sonstige strukturelle Spezialisierungen, die auf eine adsorptive Funktion hinweisen. Ein Maturitätskriterium ist die Ausbildung der typischen Granula (Wimsatt, 1951), die selektiv mit bestimmten Lektinen darstellbar sind (Jones *et al.*, 1994). Die TGC lösen sich bei ihrer Wanderung aus dem Verband des Trophektoderms, migrieren in Richtung der maternalen Seite und fusionieren dort mit uterinen Epithelzellen (Davies & Wimsatt, 1966; Wooding & Wathes, 1980; Wooding & Flint, 1994). Bei dieser sogenannten eingeschränkten Trophoblastinvasion (Pfarrer *et al.*, 2003) und der Bildung von feto-maternalen Hybridzellen, werden während der gesamten Trächtigkeit Granula, die Hormone wie Progesteron, plazentares Laktogen und graviditätsspezifische Glykoproteine wie PSPB (Pregnancy-specific protein B) enthalten, in das mütterliche Kompartiment eingeschleust (Wooding, 1992; Klisch *et al.,* 1999). Die meist trinukleären Hybridzellen sind das Endprodukt, sie gehen zugrunde, wenn sie ihre Granula in den maternalen Kreislauf entlassen haben (Björkman, 1968; Wooding & Wathes, 1980; Wooding, 1984). Neuere Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass die TGC einem Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose)

unterliegen (Schuler *et al.*, 2000). Beim Schaf und der Ziege hingegen entstehen durch weitere Einwanderung von TGC ins und Fusionen mit Uterusepithel größere Synzytien mit 20-25 Kernen, die das maternale Epithel ganz oder teilweise ersetzen (Wooding, 1984).

3.1.4. Klinische Relevanz der plazentaren Besonderheiten beim Rind

Aufgrund einer sich bis 12 Stunden nach der Geburt nicht lösenden kotyledonären-karunkulären Verzahnung im Plazentom entsteht das Krankheitsbild der Nachgeburtsverhaltung, die sowohl infektiös oder nichtinfektiös (zum Beispiel durch einen Mangel an Selen oder Vitamin E) bedingt sein kann (Bostedt, 2003). Die Ursache dieser Krankheit, die hohe wirtschaftliche Verluste hervorruft, könnte jedoch auch in einer fehlerhaften endokrinen Funktion der TGC liegen, denn bei normalen Kalbungen sind eine Stunde post partum die TGC von ungefähr 20 % auf ein Viertel der vorherigen Zahl gefallen und bei einer Retentio secundinarum bleibt die Zahl der TGC nach sechs Stunden noch auf 75 % und nach 12 Stunden post partum auf 55-60 % (Williams *et al.,* 1987). Diese Autoren machen für die Nachgeburtsverhaltung lysosomale und andere Enzyme verantwortlich, die beim Untergang der TGC frei werden und an der zellulären Grenzfläche durch ihre hydrolytische Aktivität eine Gewebetrennung erleichtern können. Andere Autoren argumentieren, dass durch die Reduktion der TGC Faktoren wie möglicherweise Kollagene und Glykoproteine verloren gehen, die für die Erhaltung des plazentaren Attachments notwendig sind und die TGC so Einfluss auf den Abgang der Nachgeburt haben (Gross *et al.*, 1991).

3.2. Kultur von Zellen aus Endometrium und Plazenta des Rindes

In vitro Studien mit Zellen, die aus der Rinderplazenta gewonnen wurden, werden schon seit mehr als 20 Jahren durchgeführt. Dabei ist allerdings die jeweilige Zielsetzung entscheidend dafür, wie die Zellen gewonnen und wie und für welche Dauer sie anschließend kultiviert wurden. Hierbei fällt auf, dass es fast ausschließlich Arbeiten gibt, die sich mit Zellen aus dem fetalen Teil der Plazenta beschäftigen und ein besonderes Augenmerk galt hierbei den TGC, ihren vielseitigen Synthesefähigkeiten, ihrer außergewöhnlichen Entwicklung und dem einzigartigen Verhalten.

Möchte man auf Erkenntnisse über die Zellen der maternalen Seite zurückgreifen, lassen sich bis auf wenige Ausnahmen während der Trächtigkeit (Shemesh *et al.*, 1984; 1994; Takahashi *et al.*, 2001b) nur Arbeiten finden, für die Endometriumszellen während des Zyklus isoliert wurden (Fortier *et al.*, 1988; Asselin *et al.*, 1996; 1997; Takahashi *et al.*, 2001a; Yamauchi *et al.*, 2003). Eine Ausnahme dazu bildet schließlich eine Studie, für welche

Endometriumszellen aus einem Rinderfetus isoliert und kultiviert wurden (Munson *et al.*, 1990).

Shemesh *et al.* (1984) verfolgten bei ihren Untersuchungen von Plazentomen endokrinologische Fragestellungen und stellten fest, dass in der maternalen Karunkel in der Zeit zwischen dem 120.-250. Tag der Trächtigkeit ein endogener, hitzelabiler Inhibitor der Prostanoidsynthese gebildet wird, der in den letzten 20 Tagen der Gravidität fehlt, was zu dem für die Geburt notwendigen Anstieg der Prostanoidsynthese führt. Sie vollzogen diesen Einfluss mittels Kokultur von fetalen und maternalen Zellen über 24 Tage in vitro nach. Wurden Zellen beider Kompartimente am Tag 260 isoliert und anschließend kokultiviert, sank die Prostazyklin- und $PGF_{2\alpha}$-Synthese im Vergleich zur getrennt durchgeführten Kultur auf die Hälfte. Bei Zellen aus Plazentomen von Tieren, die sich kurz vor der Geburt befanden, blieben die Hormonspiegel auf der gleichen Höhe wie in der reinen Kultur. Weitere Studien erfolgten in Kurzzeitkulturen über bis zu 15 Stunden und mit Zugaben von verschiedenen Substanzen, von welchen Staurosporin, ein Hemmstoff der Proteinkinase C, der cAMP-abhängigen Kinase, der Tyrosinkinase und der epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor Kinase, die Progesteronproduktion der Plazentazellen stimulierte (Shemesh *et al.*, 1994). Eine Kultivierung von Gewebeexplantaten aus Plazenten unterschiedlichen Trächtigkeitsalters (Tag 55, 130, 140, 146, 270) und die Messung von bovinem plazentarem Laktogen (bPL) im 24 Stunden lang konditionierten Medium zeigte, dass die Zellen beider Kompartimente bPL produzierten, wobei die Menge mit fortschreitender Trächtigkeit im fetalen Anteil bis zur Geburt deutlich anstieg, wohingegen sie im maternalen Gewebe von dem Mitte der Trächtigkeit bis zur Geburt konstant blieb (Takahashi *et al.,* 2001b).

Die ersten Zellkulturen aus dem Rinderendometrium stützten sich auf Arbeiten an Kaninchen, bei denen über Ficollgradienten Epithelzellen aufgereinigt wurden und Stromazellkulturen nach 18stündiger Kultur von noch nicht angehefteten Erythrozyten und Epithelzellen befreit wurden (Fortier *et al.,* 1988). Die isolierten Zellen zeigten schließlich folgendes Wachstumsverhalten. Epithelzellen adhärierten nach bis zu 72 Stunden und erreichten nach acht bis 12 Tagen Konfluenz. Fibroblasten hefteten sich schneller an (<18 Stunden) und benötigten nur fünf bis sechs Tage, um einen konfluenten Zellrasen zu bilden (Fortier *et al.,* 1988). An den kultivierten Zellen erfolgten anschließend Messungen zur Prostaglandinsynthese. Um die Aufgaben der Zelltypen des Endometriums und wie sie miteinander und mit dem Konzeptus bei der Implantation und maternaler Erkennung einer Trächtigkeit kommunizieren besser zu verstehen, wurden Epithel- und Stromazellen des

Rindes isoliert, über 10 Tage in Kultur gehalten und der Einfluss von Sexualsteroiden untersucht (Asselin *et al.,* 1996). Polarisierte und nicht polarisierte Epithelzellen produzierten hierbei vor allem $PGF_{2\alpha}$ und Fibroblasten hauptsächlich PGE_2, wobei Östrogen- und Progesterongaben die Syntheseleistung der Epithelzellen beeinflussten. Auch Interferon tau (IFN-τ) hatte regulatorische Eigenschaften auf die Prostaglandinproduktion im Modell mit 12 Tage alten kultivierten Endometriumszellen (Asselin *et al.*, 1997). Erst vor wenigen Jahren wurde der Nachweis geführt, dass bovine epitheliale Endometriumszellen serumfrei und ohne Verlust ihrer typischen Eigenschaften kultiviert werden können (Takahashi *et al.,* 2001a). Nach enzymatischer Isolation mit Ethylendiamintetraessigsäure in Phosphat gepufferter Salzlösung (EDTA-PBS) und Collagenase (CLS) wurden die Zellen in Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit Ham´s F-12 (DMEM/Ham´s F-12) mit verschiedenen Supplementen (Insulin, Transferrin, Natriumselenit, Hydrocortison, Retinol, Ascorbinsäure) auf kollagenbeschichteten Kulturgefäßen ausgesät. Sie erreichten nach fünf bis sieben Tagen Konfluenz, waren Cytokeratin positiv und Vimentin negativ und die Zugabe von Oxytocin stimulierte die $PGF_{2\alpha}$-Produktion, ein weiterer Beweis, dass es sich um funktionelles Epithel handelte. Ein dreidimensionales in vitro Zellkulturmodell für Endometrium, bestehend aus mithilfe von Ascorbat generierten Spheroiden aus bovinen Epithel- und Stromazellen, zeigte eine reichhaltige ECM in den Spheroiden und eine induzierbare Prostaglandinsynthese (Yamauchi *et al.,* 2003). Die $PGF_{2\alpha}$ Produktion als Reaktion auf eine Oxytocin-Zugabe fiel dabei signifikant höher aus als in Monolayerkulturen epithelialer Endometriumszellen. Mit endometrialen epithelialen Zellen aus dem Rinderfetus wurde versucht, polarisierte Zelllinien zu etablieren (Munson *et al.,* 1990). Dafür wurden Explantate von Mukosastücken der Karunkel eingesetzt und die kontaminierenden Fibroblasten wurden mit Hilfe kurzer (30 Sekunden) Trypsininkubationen entfernt. Die so gewonnenen Epithelzellen wurden auf Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ IV, aus Rattenschwänzen gewonnenem Kollagen, Vitrogen und auf bovinen amniotischen Membranen sowie Matrigel beschichteten Substraten kultiviert. Lediglich zwei Kultursubstrate, nämlich das Kollagen aus Rattenschwänzen und die Amnionmembranen, waren als Wachstumsunterlage geeignet und erlaubten für das genannte Kollagen eine Kultur der Zellen über mehrere Wochen beziehungsweise für die Membranen über mindestens 14 Tage. Der Beweis der Zellpolarität erfolgte hier über die ultrastrukturelle Morphologie und den immunhistochemischen Nachweis der Lektinbindung am apikalen Zellpol (Munson *et al.,* 1990).

Wie bereits erwähnt, sind Zellkulturstudien mit Trophoblastzellen und TGC zahlreicher. Es existieren einige Kurzzeitstudien über 30 min (MacIntyre *et al.*, 2002), vier Stunden (Gross &

Williams, 1988), sechs Stunden (Ullmann & Reimers, 1989), circa zehn Stunden (Matamoros *et al.*, 1994), 18 Stunden (Reimers *et al.*, 1985) und 10 Tage (Feng *et al.*, 2000a). Nakano *et al.* (2001) kultivierten die TGC zwar mindestens eine Woche, allerdings behielten die Zellen die Fähigkeit, bPL zu sezernieren nur die ersten vier Tage in Kultur bei. Feng *et al.* (2000b) hielten mononukleäre Zellen aus der Kotyledone über mehr als einen Monat in Kultur, die sich allerdings immunhistochemisch als Endothelzellen erwiesen.

Eine zweite Gruppe von Studien beschäftigt sich mit Zelllinien. So wurden Trophoblastzellen und TGC über mehr als 14 Monate und über 46-48 Passagen in Kultur gehalten (Munson *et al.*, 1988) und die aus dem Trophektoderm von 10-11 Tage alten Blastozysten gewonnenen Zelllinien CT-1 und CT-5 mehr als 2 Jahre und über 76 Passagen. Die von Shimada *et al.* (2001) aus Blastozysten entwickelte Zelllinie BT-1 überdauerte mehr als 18 Monate und mehr als 75 Passagen, ohne ihre typischen Eigenschaften zu verlieren und wurde daraufhin für weitere Arbeiten verwendet (Nakano *et al.*, 2002a; 2002b; 2005; Ushizawa *et al.*, 2005), so dass sie zuletzt mehr als fünf Jahre alt war und über 200 mal passagiert wurde (Ushizawa *et al.,* 2005).

In den genannten Untersuchungen wurden entweder nur mononukleäre Zellen eingesetzt (Feng *et al.,* 2000a; 2000b), Trophoblastzellen und TGC (Gross & Williams, 1988; Munson *et al.,* 1988; Matamoros *et al.,* 1994), ausschließlich TGC (Reimers *et al.,* 1985; Ullmann & Reimers, 1989; Nakano *et al.,* 2001; MacIntyre *et al.,* 2002) oder es dienten in vitro maturierte, fertilisierte und kultivierte Blastozysten als Ausgangsmaterial (Talbot *et al.,* 2000; Nakano *et al.,* 2001; 2002a; 2002b; 2005; Ushizawa *et al.,* 2005).

Bei über einen Ficollgradienten isolierten TGC von einem Tier am Tag 70 der Trächtigkeit gelang eine halbe Stunde nach der Gewinnung der Zellen der immunhistochemische Nachweis der Integrinuntereinheit α_3 (MacIntyre *et al.,* 2002). Es wurde weiterhin gezeigt, dass fetale Plazentazellen in vitro Prostaglandine aus Arachnidonsäure bilden und dass TGC zwar eine geringere Syntheseleistung aufwiesen, dafür aber $PGF_{2\alpha}$ in PGE_2 metabolisieren können (Gross & Williams, 1988). Ebenfalls durch Analyse der Kulturüberstände wurde die Fähigkeit der TGC nachgewiesen, calciumabhängig, zyklische Nukleotide unabhängig und nicht stimuliert durch bovine Serumlipoproteine, Progesteron und Prostanoide (Prostazyklin und Prostaglandin E2) zu produzieren (Reimers *et al.,* 1985; Ullmann & Reimers, 1989). Des weiteren bilden TGC und mononukleäre Trophoblastzellen in vitro Östradiol und Östron (Matamoros *et al.,* 1994). Dies geschieht unabhängig von Cortisol, Progesteron und Pregnenolon, wohingegen Testosteron die Östradiolproduktion von TGC, nicht aber von

uninukleären Trophoblastzellen steigert, was für die Expression einer nicht näher bezeichneten Aromatase, nicht aber der 17α-Hydroxylase, in Trophoblastzellen spricht.
Bei den Kultivierungen über mehrere Tage und den Langzeitstudien treten die endokrinologischen Fragestellungen in den Hintergrund. Vielmehr müssen zweckdienliche Isolationsverfahren, brauchbare Medien und geeignete Substrate als Kulturunterlage gefunden werden und eine Charakterisierung der Zellen erfolgen. So zeigte sich ein Verdau in Collagenase Typ II (CLS II) und eine Kultivierung in DMEM mit Ham´s F-12 mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) oder Insulin, Transferrin und Selenium auf unbeschichteten Kulturschalen als geeignet, denn die uninukleären Trophoblastzellen und TGC exprimierten weiterhin ihre charakteristischen Intermediärfilamente, wobei fetales Kälberserum essentiell für die Zellreplikation war (Munson *et al.,* 1988). Somit wurde ein Modell geschaffen, anhand dessen sowohl die Zellphysiologie als auch Reaktionen auf toxische Agentien untersucht werden können und vielleicht in Kombination mit endometrialen Epithelzellen das Geschehen an der feto-maternalen Kontaktfläche schrittweise nachvollziehbar wird. Auch die Dissoziation der Kotyledone mit Trypsin und die Aussaat der Zellen in M199 mit drei verschiedenen Zusätzen ist dokumentiert, resultierte allerdings in einer unterschiedlichen Zellmorphologie (Feng *et al.,* 2000a). So führte Medium 199 (M199) mit Serum zu polygonalen Zellen, und wenn statt fetalem Kälberserum (FKS) bovines Serumalbumin (BSA) verwendet wurde, waren die Zellen eher fächerförmig und die Kombination von M199 mit BSA, EGF, Insulin und Transferrin schließlich ließ epitheloide Formen entstehen. Die Autoren vermuten deshalb, dass diese Zusätze physiologische Komponenten der Zellregulation darstellen. Als Wachstumsunterlage schienen bei dieser Untersuchung Kollagen I und IV nicht und Matrigel nur bedingt geeignet (Feng *et al.,* 2000a). Gegensätzlich zu diesen Angaben hefteten sich TGC in einer anderen Studie auf kollagenbeschichteten Platten schneller als auf bloßem Plastik an und die Zellen behielten anfangs phänotypische Marker, wie die Produktion von bPL und schwangerschafts-assoziiertem Glykoprotein-1 (PAG-1) bei, allerdings wurde die Ausbildung von Cytokeratin reduziert (Nakano *et al.,* 2001). Die Isolation fand hierbei mit CLS und mechanisch statt und die Zellen wurden in DMEM/Ham´s F-12 kultiviert, mit der Zielsetzung, die Zell-Matrix-Interaktionen besser zu verstehen. Auch der Einsatz von Mäusefibroblasten als Feederzellen ist als Kulturunterlage beschrieben worden (Talbot *et al.,* 2000).
Zelllinien schließlich eröffnen eine Vielzahl an Möglichkeiten, die Zellen genauer und vergleichbar zu charakterisieren und ihre Biologie in vitro zu untersuchen. Die Linie CT-1 aus Trophektoderm produzierte bovines Interferon tau (bIFN-τ) und Transferrin (Talbot *et al.,*

2000). Die schon besser charakterisierte Linie BT-1 aus Blastozystentrophektoderm, die zudem ohne Feederzellen, dafür aber in Fibroblasten konditioniertem Medium entwickelt wurde, zeigt epitheliale Morphologie, ist Cytokeratin positiv, exprimiert bIFN-τ sowie bPL und weist eine kleine Population binukleärer Zellen auf (Shimada *et al.,* 2001). Der Anteil dieser Zellen ließ sich durch eine mindestens zehntägige Kultivierung der BT-1 Zellen auf Kollagen I oder in einem Kollagengel erhöhen, denn Zellen dieser trophoblastischen Linie differenzierten sich zum genannten binukleären Zellphänotyp (Nakano *et al.*, 2002b). Ihre fehlende histochemische Reaktion für das Pflanzenlektin *Dolichos biflorus Agglutinin* (DBA), einem Marker für bovine binukleäre Zellen nach dem 30. Tag der Gestation in vivo, lässt in der Tat vermuten, dass die kultivierten Zellen zu Zellen aus einem früheren Gestationsalter äquivalent sind. Der Nachweis von DBA-Liganden in frisch isolierten, maturen TGC aus Plazenten aus der Trächtigkeitsmitte bis vor der Geburt stellte hingegen keine Schwierigkeit dar (Nakano *et al.,* 2002a). BT-1 Zellen sind E-Cadherin und β-Catenin positiv, allerdings sind Signale nicht nur wie in Epithelzellen in der Plazenta an den Zellgrenzen, sondern auch im Zytoplasma und β-Catenin sogar im Kern zu finden (Nakano *et al.*, 2005). Die Autoren vermuten, dass sowohl E-Cadherin als auch β-Catenin eine Schlüsselrolle bei der Zellmigration und Endoreduplikation binukleärer Zellen spielen. Die Analyse der BT-1 Zellen mittels eines cDNA Mikroarrays und der Vergleich mit in vivo Trophoblasten ergab, dass vor allem bei den Trophoblast-spezifischen Genen wie PLs, PAGs, Prolactin-verwandten Proteinen (PRP) und bIFN-τ eine große Übereinstimmung zwischen den Genexpressionsprofilen herrscht (Ushizawa *et al.,* 2005).

3.3. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen setzt sich aus drei Typen von Filamenten zusammen. Zum einen aus *Mikrotubuli*, die aus Tubulin bestehen, einen Durchmesser von 24 nm aufweisen und vorwiegend in Zentriolen, Kernspindeln und Geißeln vorkommen. Außerdem aus *Mikro- oder Actinfilamenten*, die 6 nm dick sind und häufig mit Proteinen der Zellmembran in Verbindung stehen und so das Actin-Zytoskelett verankern. Und als letztes aus der Gruppe der *Intermediärfilamente*, die einen Durchmesser von 7-11 nm aufweisen und aus verschiedenen Filamenten wie zum Beispiel Keratin bestehen. Mikrofilamente und Mikrotubuli können in der Zelle schnell neu gebildet oder wieder abgebaut werden, wohingegen die Intermediärfilamente sehr stabil sind. Die Funktionen des Zytoskeletts beinhalten die Gestaltgebung, die Fähigkeit gerichtete und koordinierte Bewegungsvorgänge

auszuführen, Organellen innerhalb der Zelle zu transportieren und Signale zu übertragen (Kleinig & Maier, 1999b; Lodish *et al.*, 2001c; Alberts *et al.*, 2004a).

Actinfilamente sind ebenso wie Mikrotubuli strukturgebende Proteine und werden kontinuierlich auf- und abgebaut. Sie sind in Zellen häufig in parallelen Bündeln aus vielen Einzelfilamenten organisiert und werden in außerordentlich starken Ausprägungen als Stressfasern bezeichnet (Alberts *et al.,* 2004a). Actin ist das häufigste Protein einer eukaryontischen Zelle. Bei einer Muskelzelle entfallen etwa 10 % der Proteine auf Actin, ansonsten macht es nur einen Anteil von 1-5 % des zellulären Proteins aus. Bei Wirbeltieren kommen die vier Isoformen von α-Actin in verschiedenen Muskeltypen vor, die beiden β- und γ-Actin Isoformen dagegen in Nichtmuskelzellen. Allerdings unterscheiden sich die genannten Isoformen nur in vier oder fünf Aminosäurepositionen (Kleinig & Maier, 1999b; Lodish *et al.*, 2001b).

Bei den Intermediärfilamenten, die zu einer Superfamilie hochgradig α-helikaler Proteine gehören, findet man die größte Spezifität der Differenzierung und außer bei Laminen eine charakteristische Expression in jeweils bestimmten Geweben und Zellarten (Lodish *et al.,* 2001c). Obwohl alle diese Filamente in den verschiedenen Zellen morphologisch identisch sind, also unlöslich in vielen Salzlösungen und nichtionischen Detergenzien, können sie anhand von Sequenzvergleichen in folgende fünf Klassen eingeteilt werden:

Klasse 1: Saure Keratine (K9-K20, Ha1-Ha4) mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 64 kDa mit Vorkommen in Epithelien, an Desmosomen und Hemidesmosomen.

Klasse 2: Basische Keratine (K1-K8, Hb1-Hb4), die ein Molekulargewicht von 53-67 kDa haben und auch in Epithelien, Desmosomen und Hemidesmosomen zu finden sind.

Klasse 3: Vimentin, das in Zellen mesenchymaler Herkunft gebildet wird und Desminfilamente, die typisch für die meisten myogenen Zellen sind. Weiter gehören fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP) aus Gliazellen und Astrozyten und Peripherin mit Vorkommen in einigen Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems dazu. Des weiteren Nestin aus neuroektodermalen Stammzellen und Plasticin aus dem N. opticus und dem Retinalganglion.

Klasse 4: Die Neurofilamente NF-L, NF-M, NF-H und das Internexin. Als untypische Klasse IV gelten die Faserzellen der Augenlinse, die Filensin und Phakinin enthalten.

Klasse 5: Lamine A, B und C (70, 67 und 67 kDa) kommen im Zellkern aller Zellen vor.

Saure und basische Filamente aus keratinartigen Proteinen werden gewöhnlich in epithelialen Zellen exprimiert. Beide Klassen bilden immer Heterodimere im Verhältnis 1:1 und verbinden sich zu heteropolymeren Keratinfilamenten. Ungefähr zehn Keratine sind für

„harte“ Epithelschichten spezifisch und bilden Haare und Nägel und circa 20 weitere, so genannte „Cytokeratine“ werden in Körperhöhlen auskleidendem Epithel gefunden. Keratine bestehen aus wasserunlöslichen Proteinen, die einen isoelektrischen pH-Wert zwischen fünf und acht besitzen und ein Molekulargewicht von 40 bis 67 kDa. Meist kommen mehrere verschiedene Cytokeratine gleichzeitig in einer Zelle vor und weisen dabei ein für jedes Epithel spezifisches Ausprägungsmuster auf (Moll *et al.*, 1982; Lodish *et al.,* 2001c).
Vimentin kommt von allen Intermediärfilamenten am häufigsten vor und ist in Leukozyten, Endothelzellen der Blutgefäße sowie in einigen Epithelien und in Mesodermabkömmlingen wie Fibroblasten ausgebildet. Vimentin übernimmt in der Zelle eine stützende Funktion für die Plasmamembran und andere zelluläre Membranen und verankert vermutlich mit seinem Netzwerk den Zellkern und Organellen (Lodish *et al.,* 2001c).
Desmin stabilisiert in Muskelzellen die Sarkomere im sich kontrahierenden Muskel. Die Filamente liegen aber außerhalb der Sarkomere, so dass sie nicht an der Entstehung der Kontraktionskräfte des Muskels beteiligt sind (Lodish *et al.,* 2001c).

3.4. Allgemeine Aspekte zu Integrinen

3.4.1. Definition von Integrinen

Integrine gehören neben der Immunglobulin-Superfamilie, den Cadherinen und Selektinen als vierte Klasse zu den Zelladhäsionsmolekülen. Integrine sind Transmembranrezeptoren, die eine heterodimere Struktur als funktionelle Einheit aufweisen. Ihre beiden Untereinheiten, die α-Untereinheit mit 130 bis 210 kDa und die β-Untereinheit mit 95 bis 130 kDa Molekulargewicht, sind nicht kovalent miteinander verbunden (Hynes, 1987; Ruoslahti, 1991; Bosman, 1993; Garratt & Humphries, 1995; Schoenwaelder & Burridge, 1999). Der erste Vertreter dieser Familie homologer Zelloberflächenglykoproteine wurde 1985 als Proteinkomplex in Hühnerfibroblasten, der als Fibronectin-Rezeptor fungiert, beschrieben (Pytela *et al.*, 1985; Hynes, 1987). Inzwischen gelten Integrine als die wichtigsten ECM bindenden Rezeptoren von tierischen Zellen (Alberts *et al.*, 2004c). Ihr Name leitet sich von der angenommenen Aufgabe der Proteine, nämlich das Verbinden des intrazellulären Zytoskeletts mit der ECM, ab (Ruoslahti, 1991). Integrine stellen Transmembran-Kupplungen oder „Integratoren“ dar (Alberts *et al.,* 2004c). Wobei unter Integration in diesem Zusammenhang die angemessene Adhäsion ebenso wie die Kommunikation zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle, die zytoskelettale Organisation und die Transduktion von biochemischen Signalen in einem Knotenpunkt zu verstehen sind (Bosman, 1993; Pozzi & Zent, 2003).

3.4.2. Vorkommen von Integrinen

Alle Metazoen exprimieren während ihrer Ontogenese Adhäsionsrezeptoren aus der Gruppe der Integrine und es wurde nachgewiesen, dass sie für die Entwicklung von Fliegen, Würmern und Vertebraten essentiell sind (Danen & Sonnenberg, 2003). Das Vorkommen der Integrine scheint universell, ist Zelltyp-spezifisch und variiert in unterschiedlichen Zellen stark, wobei jede bisher untersuchte Zelle mindestens ein Integrin aufweist (Albelda & Buck, 1990; Ruoslahti, 1991). Integrine, die nicht an einen Liganden der ECM gebunden sind, sind diffus über die Zelloberfläche verteilt und stehen offenbar nicht in direktem Kontakt mit dem Actin-Zytoskelett (Ruoslahti, 1991). Abhängig vom Status der zytoskelettalen Organisation kann dies zum Zusammenlagern von Integrinen in fokalen Adhäsionen oder Fokalkomplexen führen. Die Enden dieser Integrinaggregate sind an große Bündel von Actinfilamenten (Stressfasern) gebunden (Schoenwaelder & Burridge, 1999; Danen & Sonnenberg, 2003).

3.4.3. Struktur und Bindung von Integrinen

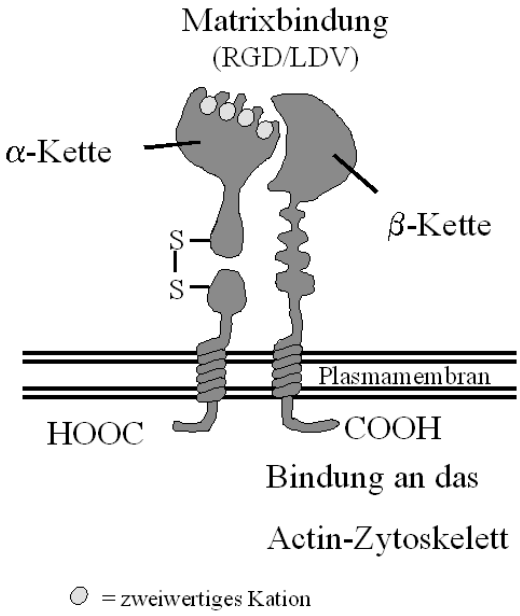


Abbildung 1: Struktur und Bindung von Integrinen.

Bisher sind beim Menschen 24 verschiedene *Heterodimere* aus *18 α- und 8 β-Untereinheiten* bekannt, die jeweils eine funktionelle Einheit ergeben (Danen & Sonnenberg, 2003; Pozzi & Zent, 2003). Elektronenmikroskopische Studien zeigen für die Integrine eine asymmetrische, pilzförmige Extrazellularstruktur und zwei intrazelluläre flexible Schwänze (Longhurst & Jennings, 1998). Die ECM-Komponenten, aber auch Gegenrezeptoren auf anderen Zellen, bakterielle Polysaccharide und virale Hüllproteine, werden an der globulären Kopfdomäne

gebunden und die zytoplasmatischen Domänen können intrazellulär über assoziierte Proteine an das Actin-Zytoskelett binden und mit dem Zytoskelett, Signalmolekülen und anderen zellulären Proteinen interagieren (Danen & Sonnenberg, 2003). Die Carboxylenden beider Untereinheiten sind kurz, mit Ausnahme von β_4 (Longhurst & Jennings, 1998), weshalb diese Untereinheit auch ein deutlich größeres Molekulargewicht besitzt (Albelda & Buck, 1990). Die extrazellulären Enden dagegen umfassen ungefähr 1000 stark variierende Aminosäuren mit verschiedenen Kationenbindungsstellen (α-Untereinheit) oder etwa 750 Aminosäuren mit repetitiven Aminosäurensequenzen, 56 Cysteinresten und weisen eine 40-48%iger Homologie auf (β-Untereinheit) (Albelda & Buck, 1990; Bosman, 1993; Clark & Brugge, 1995; Longhurst & Jennings, 1998). Jede β-Untereinheit kann außerdem mit vielen α-Untereinheiten assoziiert sein. Es gibt aber auch α-Untereinheiten, die mit mehr als einer β-Untereinheit ein Paar bilden können (Danen & Sonnenberg, 2003). Die β-Untereinheit fördert die Ligand-unabhängige Bindung von Integrinen an fokale Adhäsionen, wohingegen über die zytoplasmatische α-Untereinheit eine Regulation der Spezifität der Ligand-abhängigen Interaktionen erreicht wird (Clark & Brugge, 1995). Dadurch, dass die β-Kette meist im Überfluss gebildet wird, und die Heterodimerisierung eine Voraussetzung für das Erscheinen auf der Zelloberfläche ist, wird der α-Kette eine regulatorische Funktion bei der Integrinexpression auf der Plasmamembran zugeschrieben (Bosman, 1993). Auch können Integrine in einigen Zellen in intrazellulären Granula gelagert werden und erst bei Bedarf an die Zelloberfläche gebracht werden (Ruoslahti & Vaheri, 1997). Ein Indiz für die unterschiedlichen intrazellulären Funktionen von individuellen Integrinen liegt in der gewebespezifischen und entwicklungsbedingt regulierten Art und Weise, in der die α-Untereinheiten alternativem Splicing unterworfen sind (Juliano & Haskill, 1993). Über Integrine werden zwei Arten von Adhäsionen vermittelt: die Zell-Zell (in Blutzellen, mit der β_2 Untereinheit) und die Zell-ECM Adhäsion (Hynes, 1987; Ruoslahti, 1991). Integrine werden mit einer 10-100fach höheren Konzentration auf Zelloberflächen exprimiert, als man das von Hormonrezeptoren oder Rezeptoren anderer löslicher Signalmoleküle kennt. Gleichzeitig weisen sie mit 10^6-10^9 L/mol eine viel geringere Bindungsaffinität auf. Dieses „Klettverschlussprinzip“ ermöglicht den Zellen, sich leicht zu lösen, aber gleichzeitig auch stabil verankert zu sein (Alberts *et al.,* 2004c). Die Bindung von divalenten Kationen an der extrazellulären Domäne ist signifikant für die Rezeptoraktivierung und vermutlich sind die Ligandenbindung, die Kationenbindung und die Aktivierung mechanische und funktionelle Einheiten, da die Ligandenbindung eine Kationenbindung erfordert und beide zusammen schließlich eine Aktivierung hervorrufen (Garratt & Humphries, 1995). Die Art des

zweiwertigen Kations beeinflusst dabei die Affinität und die Spezifität der Integrinbindung (Alberts *et al.,* 2004c). Oftmals findet man durch Mg^{2+} eine Stimulierung und durch Ca^{2+} eine Hemmung (Garratt & Humphries, 1995). So erhöht Mg^{2+} die Bindung von $\alpha_5\beta_1$ zu Fibronectin und von $\alpha_6\beta_1$ zu Laminin und eine Anheftung von $\alpha_6\beta_1$ kommt überhaupt nicht zustande, wenn nur Calcium vorhanden ist (Bosman, 1993). Dass Integrine von millimolaren Calciumkonzentrationen abhängig sind, wurde durch Affinitätsexperimente mit Kobaltionen und dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ gezeigt (Longhurst & Jennings, 1998). Der Integrinrezeptor erkennt an seinem Liganden eine bestimmte Sequenz von Aminosäuren. Meist handelt es sich dabei um das Tripeptid Arginin-Glycin-Asparaginsäure, welches im internationalen Einbuchstaben-Code als *RGD* abgekürzt wird (Ruoslahti, 1991; Bosman, 1993; Longhurst & Jennings, 1998). Die genannten Aminosäuren sind somit ein Schlüsselerkennungsmotiv für Integrin-Matrix Bindungen. Da die Sequenz RGD in einer großen Auswahl von Integrinliganden vorkommt, besagt eine erste Hypothese, dass die Gegenwart von RGD-Motiven mit etwas anderer Konformation eine Erklärung für die Redundanz ist, die in Integrin-Ligand Interaktionen besteht (Ruoslahti, 1991). Da die RGD-Sequenz manchmal erst nach proteolytischer Digestion des Liganden detektierbar wird, schreibt man ihr eine Regulierung der Matrix-Integrin Interaktion *in vivo* durch proteolytische Spaltung zu, wie sie bei Entzündung oder an Stellen mit invasivem Wachstum von neoplastischen Zellen vorkommt (Bosman, 1993). In der Natur (zum Beispiel in Schlangengiften) kommen hoch aktive RGD-Peptide vor, die Disintegrine genannt werden und sehr potente Inhibitoren der Plättchenaggregation sind (Ruoslahti, 1991). Ebenfalls häufig wird von Integrinen das Peptid *LDV* (Leucin-Asparaginsäure-Valin) zur Bindung verwendet (Garratt & Humphries, 1995).

3.4.4. Redundanz von Integrinen

Die Ligandenbindung von Integrinen kann durchaus überlappend sein (Albelda & Buck, 1990; Pozzi & Zent, 2003). Dies bedeutet, dass verschiedene Integrine den gleichen Ligand binden, wobei es sowohl vorkommt, dass zwei abweichende Regionen des ECM Liganden erkannt werden (zum Beispiel sind $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_4\beta_1$ Fibronectin Rezeptoren oder $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_1\beta_1$ Lamininrezeptoren) oder dass zwei Integrine an die gleiche Region des Proteins binden. Diese redundante Expression ist verwunderlich, allerdings müssen nicht zwangsläufig die gleichen Reaktionen in der Zelle ausgelöst werden (Juliano & Haskill, 1993). Außerdem kann das gleiche Integrinmolekül in unterschiedlichen Zelltypen andersartige Liganden spezifisch binden, was vermuten lässt, dass noch weitere Faktoren bezüglich der Bindungseigenschaften eine Rolle spielen (Alberts *et al.,* 2004c). Die Heterogenität der Integrinfamilie ist von

immenser Bedeutung in der Embryonalentwicklung. So kann eine Änderung im exprimierten Rezeptorspektrum eine spezifische Modulation im Adhäsionsverhalten zu anderen Zellen und/oder Matrixkomponenten zur Folge haben und damit Änderungen in der Zelladhäsion, der Form und der Migration hervorrufen, die wichtige Funktionen der Morphogenese und Differenzierung sind (Hynes, 1987). Die Beteiligung von Fibronectin und seinen Rezeptoren wurde an vielen Migrationsvorgängen während der Embryonalentwicklung gezeigt (Ruoslahti, 1991).

3.4.5. Funktion von Integrinen

Integrine scheinen Eigenschaften von Mechanorezeptoren zu besitzen, denn sie reagieren auf Kraft, die auf das Zelläußere ausgeübt wird mit der Erzeugung intrazellulärer Signale (Ruoslahti & Vaheri, 1997). Eine lebensnotwendige Rolle kommt Integrinen bei der embryonalen Organmorphogenese und bei der Regulation der Genexpression in Zellen adulter Organismen zu, da sie biologische Funktionen wie Adhäsion, Form, Polarität, Wachstum, Differenzierung und Motilität modulieren und kontrollieren können (Juliano & Haskill, 1993; Longhurst & Jennings, 1998; Pozzi & Zent, 2003). Damit erklärt sich ihre Bedeutung für die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung und die Funktion von Zellen, die Regulierung von vielfältigen Prozessen wie Gewebeentwicklung und -organisation, Entzündung, Leukozytenrückkehr (Homing) und Leukozytenaktivierung, Hämolyse, Angiogenese, Zellwachstum, Zellpolarität, Zellmigration und Metastasierung von Tumoren und dem programmierten Zelltod (Clark & Brugge, 1995; Kumar, 1998; Longhurst & Jennings, 1998; Damsky & Ilic, 2002; Danen & Sonnenberg, 2003; Pozzi & Zent, 2003). Vor allem die Embryogenese erfordert zum Beginn der Gastrulation eine strenge Regulation der morphogenetischen Bewegungen von Zellen, weshalb Moleküle an der Zelloberfläche notwendig sind, die die ECM erkennen und entsprechend reagieren können (Albelda & Buck, 1990). Diese Aufgabe wird von Integrinen übernommen und die Koordination durch den einzigartigen Weg der bidirektionalen Kommunikation zwischen dem Zellinneren und der äußeren zellulären Umgebung ermöglicht spezielle zelluläre Antworten für die einzelnen Zelltypen, die von anderen bisher bekannten Signalwegen abweichen können (Longhurst & Jennings, 1998). Oftmals wird eine Kooperation von Integrinen und konventionellen Signalrezeptoren beobachtet (Alberts *et al.,* 2004c), so fungieren Integrine als Co-Rezeptoren für Wachstumshormonrezeptoren (Damsky & Ilic, 2002). Die Integrin vermittelte Zelladhäsion kann ein Auslöser für Calciumflüsse sein, Serin/Threonin Proteinkinasen aktivieren und die Aktivität der Rho Familie kleiner GTPasen (Rho, Rac und Cdc42) regulieren, die wiederum eine Vielzahl von Effektorproteinen binden und aktivieren und

somit die Organisation des Zytoskeletts modulieren (Danen & Sonnenberg, 2003). Die spezialisierten adhäsiven Strukturen, in denen Integrine oftmals zusammengelagert sind, werden als fokale Adhäsionen und fokale Komplexe bezeichnet. Dort kommen intrazellulär zahlreiche zytoskelettale und katalytische Signalproteine in hoher Konzentration vor, die biochemische Signalwege regulieren (Clark & Brugge, 1995; Schoenwaelder & Burridge, 1999). Bei den actinbindenden Proteinen, die in der Zelle mit Integrinen assoziiert sind, handelt es sich um Talin, Filamin, α-Actinin, Vinculin, Paxillin und Tensin, wobei Talin direkt an die zytoplasmatischen β-Schwänze der Integrine koppelt und Bindungsstellen für Actin, Vinculin, FAK und Phospholipide aufweist (Clark & Brugge, 1995). Die Verbindung mit dem Zytoskelett kann durch eine stärkere Komplexbildung und Einfrieren der Konformation ein lokales Anhäufen (Clustern) der Integrine unterstützen, was schließlich in einer stärkeren Bindung an den Liganden resultieren kann (Miyamoto *et al.*, 1995).

Die zweite wichtige Aufgabe von Integrinen neben der Adhäsion ist die Funktion als *Signalapparat* (Ruoslahti & Vaheri, 1997). Ihre Zwei-Wege Kommunikation zwischen dem Zellinneren und -äußeren macht sie zu idealen Mediatoren für den Informationsaustausch zwischen Zellen und umgebendem Gewebe. Sie reagieren sowohl auf Signale aus dem Zytoplasma als auch der ECM in der Umgebung mit Konformationsänderungen (Garratt & Humphries, 1995). So kann die Ligandenbindung nicht nur durch eine Anhäufung von Integrinen erhöht werden, sondern es findet über das „inside-out signalling“ mit der Ausbreitung von Konformationsänderungen der zytoplasmatischen Schwänzen eine Regulation der Aktivität individueller Integrine statt (Garratt & Humphries, 1995; Damsky & Ilic, 2002; Danen & Sonnenberg, 2003; Pozzi & Zent, 2003). Durch eine veränderte Bindungsaffinität wird schließlich eine Wandlung in der Expression und Zusammensetzung der benachbarten ECM induziert, die wiederum durch Transaktivierung Einfluss auf andere Integrine und Rezeptoren von Wachstumsfaktoren hat. Damit können Integrine als eine physikalische Verbindung zwischen ECM und innerem Filamentsystem angesehen werden (Longhurst & Jennings, 1998; Alberts *et al.,* 2004c). Die Fähigkeit der Zelle, die Integrin-Interaktionen von innen zu steuern, ist vor allem für Blutzellen relevant, es muss lediglich eine Aktivierung und keine de novo Synthese mehr erfolgen, weshalb eine schnelle Reaktion möglich ist (Longhurst & Jennings, 1998).

Beim umgekehrten Weg breiten sich Signale, die durch Ligand-Integrin-Interaktionen entstehen, über die zytoplasmatischen Integrinschwänze innerhalb der Zelle fort und aktivieren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden (Danen & Sonnenberg, 2003; Pozzi & Zent, 2003).

Damit gibt es fünf Möglichkeiten, wie Integrine ihre Signalfunktion ausüben und wo die Signale mit denen anderer Rezeptoren konvergieren können (Frisch & Ruoslahti, 1997; Ruoslahti & Vaheri, 1997):

a) Integrine und Wachstumshormonrezeptoren aktivieren parallel ablaufende Wege und laufen auf der Ebene der Phosphorylierung von *downstream* Signalproteinen (wie Raf und MEK) zusammen.
b) Integrine steigern die Signale von Wachstumshormonrezeptoren, indem sie Kinasen und Substrate in der Nähe konzentrieren. Durch die ECM Bindung sammeln sich Integrine auf der Membranebene an und verursachen eine Reorganisation des Actin-Zytoskeletts. Hierdurch wird die Organisation der Integrine und assoziierten Proteine in großen Multiproteinaggregaten angeregt, was als Zell-Matrix Adhäsion bezeichnet wird.
c) Zell-Matrix-Adhäsionen sind Ankerpunkte für das Actin-Zytoskelett und ermöglichen so Spannungs- und Gestaltänderungen. Über die Verbindung des Zytoskeletts zum Kern findet eine Beeinflussung der Kernform und Chromatinstruktur statt, wodurch sich die Effekte von Integrin-vermittelter Adhäsion auf die Genexpression erklären ließen.
d) Integrin-vermittelte Adhäsion führt zu einer Anhäufung und Transaktivierung von vielfältigen Rezeptortyrosinkinasen (RTK) inklusive des von Thrombozyten gebildeten Wachstumsfaktorrezeptors (PDGFR), des EGF-Rezeptors und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptors (VEGFR).
e) Durch Organisation der ECM regulieren Integrine die RTK Signalübertragung weiter *upstream*. Über Proteoglycane können sie verschiedene Wachstumsfaktoren strukturell verändern und binden und anschließend deren Rezeptoren präsentieren.

3.4.6. Aktivitätszustand von Integrinen

Ihre Anpassungsfähigkeit und die schnelle Modulation der Integrin-Ligand-Interaktionen machen Integrine zu idealen Koordinatoren von dynamischen zellulären Prozessen. Im inaktiven Zustand haben Integrine eine geringe Affinität zu ihren Liganden. Erst nach ihrer Aktivierung entsteht eine hochaffine Bindung, wodurch ein Wechsel der adhäsiven Eigenschaften ohne Änderungen in der Expression von Integrinen möglich ist (Longhurst & Jennings, 1998). Bei einigen Integrinen beeinflusst die Phospholipidkomposition der umgebenden Plasmamembran die Rezeptoraffinität und sowohl eine Glykosylierung als auch eine Phosphorylierung der Integrinmoleküle wirkt sich auf die Affinität aus (Garratt & Humphries, 1995). Aktivierte Integrine können globale Zellantworten auslösen oder zu

Änderungen in der Genexpression führen und sie sind besonders geeignet, örtlich begrenzte Reaktionen im Zytoplasma dicht am Zell/Matrix-Kontakt auszulösen (Longhurst & Jennings, 1998). Sie können im aktivierten Zustand viele Liganden wie Proteine der ECM und bestimmte Plasmaproteine binden, worauf sich die zytoplasmatische Domäne der β-Untereinheit an verschiedene intrazelluläre Ankerproteine wie Talin, α-Actinin und Filamin anheftet. Diese Proteine kommen in allen Zellen vor und eine Modulation der Integrinaffinität ist oft zellspezifisch und abhängig von der stark unterschiedlichen zytoplasmatischen Domäne eines spezifischen Integrins. Studien zur Funktionalität von Integrinen und ihrer anschließenden zytoskelettalen Antwort wurden mit beschichteten Kügelchen (Liganden oder Anti-Integrin-Antikörper) durchgeführt und zeigten, dass eine Aggregation von Integrinrezeptoren sogar ohne Bindung an Liganden, ausreicht, um eine sofortige Akkumulation einer großen Gruppe von mindestens 20 Signaltransduktionsmolekülen zu erreichen (Garratt & Humphries, 1995). Diese Experimente ermöglichen außerdem, die Kräfte einzuschätzen, die für die Manipulation des Zytoskeletts durch Oberflächenintegrine nötig sind (Bosman, 1993). Es ist zudem bekannt, dass eine Mindestmenge intrazellulärer Proteine notwendig ist, damit Integrine einen „high-affinity state“ erlangen können (Longhurst & Jennings, 1998).

3.4.7. Integrine und Anoikis

Anoikis leitet sich von dem griechischen Wort für Obdachlosigkeit ab und mit Anoikis wurde ein neuer Begriff für eine Sonderform der Apoptose geprägt. Nämlich den programmierten Tod von Zellen, der durch fehlende Adhäsion zur Matrix hervorgerufen wird. Den Integrinen kommt dabei eine kritische Rolle zu, da sie in vivo die Hauptrezeptoren für die Matrix darstellen und Beschichtungen mit Fibronectin und Integrin β_1 (aber nicht mit Polylysinen) einen Schutz vor Anoikis gewähren (Kumar, 1998). Bei Verlust der Matrixverbindung wachsen Fibroblasten nur gehemmt und Endothel- und Epithelzellen werden in Suspension apoptotisch (Garratt & Humphries, 1995).

3.4.8. Relevante Integrin-Rezeptoren und ihre Liganden

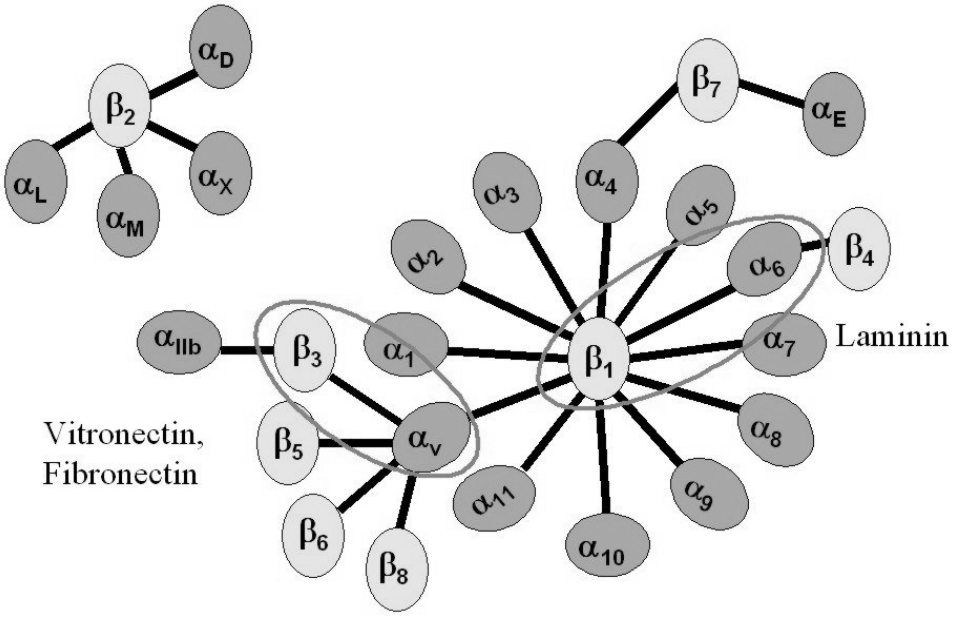


Abbildung 2: Bindungspartner der einzelnen Integrinuntereinheiten. Markiert sind die im Rahmen dieser Studie untersuchten Heterodimere. Für diese sind die wichtigsten Liganden aufgeführt.

Es existieren inzwischen viele Studien über die Verteilung von Integrinen in verschiedenen Zelltypen, aber es ist zu beachten, dass der immunhistochemische Nachweis nicht notwendigerweise auch das Vorhandensein von funktionell aktiven Heterodimeren zeigt. Vor allem auch durch die ubiquitäre Expression von zum Beispiel der β_1 Kette und der buntgewürfelten Affinität von verschiedenen α-Ketten, wird die funktionelle Natur der nachgewiesenen Immunoreaktivität nicht immer klar. Zusätzlich zur Plasmamembranfärbung wird oftmals ein Signal im Zytoplasma beobachtet, dessen Ursache noch unklar ist. Denkbar wäre, dass durch die Abwesenheit einer komplementären Kette, die zu einem Heterodimer führt, das Sichtbarwerden einer α- oder β-Kette auf der Zelloberfläche erschwert wird (Ruoslahti, 1991). Es ist bekannt, dass Zellen ihre Integrinspezifität regulieren können. So ist $\alpha_2\beta_1$ in Thrombozyten ein Kollagenrezeptor und bindet in anderen Zellen zusätzlich an Laminin und Fibronectin (Bosman, 1993). Drei Rezeptoren für scheinbar nur jeweils einen Liganden sind die Integrine $\alpha_6\beta_1$ für Laminin und $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_1$ für Fibronectin. Das Integrin $\alpha_6\beta_4$ hingegen ist spezifisch für Epithelzellen und Tumoren, die von diesen Zellen abstammen. Die Überzahl der Integrine kann an mehrere Liganden binden und sogar eine

Ligandenspezifität abhängig von der Zelle, in der sie exprimiert werden, ausbilden, wobei die Ursache für die Redundanz in der Ligandenspezifität noch nicht sicher geklärt ist. (Albelda & Buck, 1990; Ruoslahti, 1991). Die Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ werden von einer Vielzahl von Epithelien an der basolateralen Oberfläche oder ausschließlich an der basalen Oberfläche, der Basalmembran zugewandt, exprimiert. Dies lässt sich damit erklären, dass sie hauptsächlich mit Kollagenen und Laminin interagieren, die Hauptbestandteile der Basalmembran sind (Albelda & Buck, 1990; Bosman, 1993). Generell findet man die β_1-Untereinheit aber auch in Fibroblasten, Leukozyten, Thrombozyten, Myozyten, Endothelien und den meisten Epithelzellen (Ruoslahti, 1991). Deutlich weniger Zellen dagegen exprimieren den Fibronectinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ (Albelda & Buck, 1990).

Das „v“ im Namen der Untereinheit α_v steht für Vitronectin, den Hauptliganden, wobei die meisten α_v-Heterodimere sowohl an Vitronectin als auch an Fibronectin binden. α_v war die erste Untereinheit, von der bekannt wurde, dass sie mehr als eine β-Untereinheit binden kann (Bosman, 1993). Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft scheint α_v die Untereinheit zu sein, die die vielseitigsten Kombinationen erlaubt, weil sie mindestens fünf Integrine bilden kann (Bosman, 1993). Als Liganden für das RGD spezifische Heterodimer $\alpha_v\beta_3$ kommen neben Vitronectin das Bone sialoprotein 1, Fibrinogen, Osteopontin, Thrombospondin und der von Willebrand Faktor in Frage. Die Expression von α_v in verschiedenen Epithelien ohne den Bindungspartner β_3 steht im Einklang mit der Beobachtung, dass α_v in Verbindung mit der alternativen β_5 Untereinheit aus Tumoren epithelialen Ursprungs isoliert wurde. Die β_3 Subfamilie, auch Zytoadhäsine genannt, besteht aus zwei möglichen Rezeptoren, denn neben dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ kommt noch $\alpha_{IIb}\beta_3$ für das Thrombozytenglykoprotein vor (Ruoslahti, 1991). Entsprechend tritt diese Untereinheit vorwiegend in Endothel, Thrombozyten und Fibroblasten auf (Bosman, 1993).

Von welch großer Bedeutung die Bindung an den Liganden für die Integrine sein kann, zeigt eine Studie, bei der ohne Medium kultivierte primäre Synovialfibroblasten überleben, wenn man ihnen die passende ECM, wie zum Beispiel Fibronectin anbietet, wohingegen sie auf Kollagen I zugrunde gehen (Damsky & Ilic, 2002). Dieses Geschehen ist allerdings bei Epithel- und Endothelzellen komplexer, weil sie zum Überleben sowohl Signale aus der Matrix als auch von Wachstumsfaktoren benötigen. Die Leukozyten-Integrine haben schließlich die β_2-Untereinheit gemeinsam und kommen fast nur in weißen Blutzellen und deren Vorläufern vor (Albelda & Buck, 1990).

3.4.9. Integrine: Krankheiten und therapeutische Anwendung

Es gibt Krankheiten, die von Mutationen in den Integringenen verursacht werden (Hynes, 1987). Beim Menschen kennt man zwei dieser genetischen Erkrankungen, die Thrombasthenie Glanzmann, die in einer Mutation in der β_3 Integrinuntereinheit begründet ist und durch Membranstrukturfehler der Thrombozyten zu hämorrhagischer Diathese führt. Des weiteren die Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (LAD) bei welcher die betroffenen Menschen die β_2-Untereinheit, die ausschließlich auf der Oberfläche von Leukozyten vorkommt, nicht bilden können und demzufolge häufig unter bakteriellen Infektionen leiden (Wehrle-Haller & Imhof, 2003; Alberts *et al.,* 2004c). Das Wissen darüber, wie wichtig Integrine für die Zellen sind, machte sie in der Praxis zu interessanten Zielen für die therapeutische Anwendung. Strategien zum *Interfering* oder der Regulation der Integrinaktivität könnten zur Entwicklung von therapeutisch wirksamen Agentien führen. Die offensichtlichste Möglichkeit ist, kurze Peptidmotive der Liganden in kompetitive Inhibitoren der Ligandenbindung umzuwandeln (Danen & Sonnenberg, 2003). So kann die RGD-Sequenz genutzt werden, um Verbindungen zu generieren, die die Zelladhäsion kontrollieren (Garratt & Humphries, 1995). Mittels eines zyklischen RGD-Peptids gegen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde bei Ratten mit chemisch induziertem Colonkarzinom eine Reduzierung des Tumorwachstums und eine Hemmung der Neoangiogenese erzielt (Haier *et al.*, 2002). Es wurden außerdem Peptide generiert, die spezifisch an Blutgefäße von Tumoren binden. Zwei dieser Peptide (mit dem α_v bindenden Arg-Gly-Asp Motiv und dem Asn-Gly-Arg Motiv) wurden an das Zytostatikum Doxorubicin konjugiert, wodurch ein effizienteres Vorgehen gegen menschliche Brustkrebszellen in Heterotransplantaten in Nacktmäusen erzielt wurde (Ruoslahti, 1991). Über $\alpha_v\beta_3$ könnte auch die Osteoklastenfunktion beeinflusst werden, denn Mäuse mit β_3 defizienten Osteoklasten können beim Abbau den Knochen nicht vollständig resorbieren und haben somit deutlich schwerere Knochen (Bosman, 1993). Auch der Einsatz neuer Disintegrine wie zum Beispiel Salmosin aus einer koreanischen Schlange führt bei B16F10 Melanomzellen zur Hemmung der Metastasierung durch Blockierung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ (Kang *et al.*, 2000). Zusammenfassend steckt in Integrinen ein Potential für therapeutische Interventionen bei der Krebstherapie, der Wundheilung, der Thrombose, der Knochenentwicklung und bei entzündlichen Reaktionen (Alberts *et al.,* 2004c).

3.5. Die Extrazelluläre Matrix (ECM)

Als ECM wird ein komplexes Netzwerk von Makromolekülen bezeichnet, in die Zellen von Lebewesen eingebettet sind. Diese Grundsubstanz bildet nicht nur eine Unterlage (Basallamina) von Zellepithelien oder einen „Klebstoff“, der die Zellen zusammenhält, sondern auch spezialisierte Strukturen wie Sehnen, Knorpel, Knochen, Zähne und Augenlinsen, wobei die Sehnen und Knorpel vor allem unter Zug- beziehungsweise Druckbeanspruchung stehen und Knochen und Zähne zusätzliche Härte zum Beispiel durch Einlagerung von Calcium-Phosphat-Kristallen in die Matrix erlangen. In Bindegewebe und Haut kommt viel ECM vor, während im Nervensystem und in Epithelien wenig ECM vorhanden ist. Im Allgemeinen sind bestimmte Zellen auf die Produktion und Sekretion spezieller Komponenten der ECM spezialisiert, wie zum Beispiel die Fibroblasten in Haut, Sehnen und vielen anderen Bindegewebsstrukturen, die Osteoblasten im Knochen oder die Chondroblasten im Knorpel (Kleinig & Maier, 1999a; Lodish *et al.*, 2001a; Bosman & Stamenkovic, 2003; Alberts *et al.*, 2004b). Außerdem steht die Matrix auch auf direktem oder indirektem Wege mit den intrazellulären Signalübertragungswegen in Kontakt, welche die spezifischen Funktionen von Zellen determinieren. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren und anderen Hormonen kann sie diese Signale aufnehmen oder umgekehrt diese Signale an Zellen übermitteln, wodurch es zu einer Induktion oder Inhibition von Übertragungsprozessen kommt. Die ECM ist demnach kein statisches Gerüst, sondern vielmehr eine dynamische Struktur und spielt eine aktive Rolle in der Entwicklung, Migration, Proliferation, Form und dem Metabolismus der Zellen, die sie umgibt (Garratt & Humphries, 1995). Auch die Morphogenese, das späte Stadium der Embryogenese, wo es durch Lageveränderung von Zellen zur Formausbildung kommt, ist wesentlich von Matrixbestandteilen abhängig. In den sich entwickelnden Lebewesen werden Matrixmoleküle wie Fibronectin, Laminin, Kollagene und andere ECM-Komponenten als Netzwerk um die Zellen örtlich neu begrenzt, ununterbrochen modifiziert, abgebaut und neu synthetisiert. Anschließend können sich die Zellen an die abgeschiedene Matrix anheften oder zur Anheftung die Zelloberflächenintegrine nutzen. Ein gutes Beispiel, wo postnatal ein Abbau und eine Erneuerung der Matrix stattfindet, ist die Wundheilung (Albelda & Buck, 1990; Kleinig & Maier, 1999a; Lodish *et al.,* 2001a; Alberts *et al.,* 2004b). Auch das Wachstum von Tumoren und ihr Metastasieren ist folglich nicht nur davon abhängig, wie die Tumorzellen auf autokrine und parakrine Signale reagieren und proliferieren können und wie sie die Immunabwehr des Wirts umgehen, sondern auch von der Fähigkeit, die Signale der

benachbarten ECM oder von Zell-Zell-Kontakten zu ignorieren. Diese Signale sind dreidimensional für Fibroblasten und glatte Muskelzellen und zweidimensional für Endothel- und Epithelzellen gerichtet (Schuppan *et al.*, 1994).

Die Hauptbestandteile der ECM sind hauptsächlich Proteine und zwar vor allem Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin, die in ein wasserreiches Gel aus Polysacchariden und Proteoglycanen eingebettet sind. Neuerdings werden bei der Definition der ECM sogar Moleküle mit aufgenommen, die biochemisch und funktionell mit der ECM assoziiert sind wie Wachstumsfaktoren, Matrix abbauende Proteasen, insbesondere die Metalloproteasen und ihre Inhibitoren und Matrixrezeptoren (Schuppan *et al.*, 1994).

Kollagene, die ihren Namen aus dem Griechischen haben und so viel wie „Leimsubstanzen" bedeuten, machen bei Säugetieren etwa ein Drittel des gesamten Proteingehalts aus und sind somit die am häufigsten vorkommenden Proteine in Vertebraten. Kennzeichnend für Kollagene ist eine dreifach verdrillte Helix aus linksgängigen α-Ketten, die vor allem aus der Aminosäuren-Sequenz $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$ bestehen. Prolin steht dabei meist an Position X, bei Y handelt es sich häufig um Hydroxyprolin, das zusammen mit Hydroxylysin nur in Kollagenen zu finden ist. Die Synthese der α-Ketten findet am rER statt, anschließend werden die Ketten zur Tripelhelix verdrillt und die Vorform, das Prokollagen, wird über sekretorische Vesikel in den extrazellulären Raum exportiert. Außerhalb der Zellen findet dann durch proteolytische Enzyme eine Abspaltung der Propeptide statt. So kann verhindert werden, dass sich im Inneren von kollagenproduzierenden Zellen große Fasern bilden (Schuppan *et al.,* 1994; Kleinig & Maier, 1999a). Allerdings benötigen die Prohydroxylasen Vitamin C als Cofaktor, welches bei Skorbut fehlt. Aus diesem Grunde kann die Faserbildung nicht stattfinden worauf der Abbau der defekten α-Ketten bereits intrazellulär stattfindet (Alberts *et al.,* 2004b). Mehrere Tripelhelices bilden nach ihrer Vernetzung über kovalente Bindungen (Disulfidbrücken, Aldolquerbrücken) eine Fibrille. Mehrere Fibrillen bilden schließlich eine Faser, die einen Durchmesser von 0,5–3 µm und eine Länge bis zu vielen Mikrometern erreichen kann (Lodish *et al.,* 2001a). Bei den α-Ketten handelt es sich entweder um drei gleiche Kettenstränge oder zwei gleiche und einen davon verschiedenen Strang mit einer Länge von bis zu 1000 Aminosäuren. Bislang sind 34 α-Ketten bekannt, die unterschiedlich kombiniert mehr als 20 verschiedene Kollagentypen bilden (Kollagen I-XX). Kollagen Typ I bis IV sind am häufigsten und die seltener auftretenden anderen Formen sind meist mit einem der vier Hauptfasertypen assoziiert. Die verschiedenen Kollagentypen unterscheiden sich durch die Fähigkeit ihrer helikalen und nichthelikalen Bereiche, sich zu Fibrillen zusammenzulagern, Schichten auszubilden oder unterschiedliche Kollagentypen miteinander

querzuvernetzen. Es gibt Moleküle des fibrillären Typs und fibrillenassoziierte Kollagene. Das in Bindegewebe oft vorhandene Kollagen Typ VI, lagert sich seitlich an Typ I Fibrillen an, wodurch wahrscheinlich ein Zusammenhalt in dickeren Kollagenfasern erreicht wird. Kollagen Typ VI ist untypisch, da es aus relativ kurzen Helices besteht, die durch globuläre Domänen verbunden sind, wodurch Fibrillen aus reinem Typ-VI-Kollagen Perlenketten gleichen. Aus der Reihe fällt auch Kollagen IV, welches ein zweidimensionales Netz ausbildet. Kollagene sind wasserunlöslich und relativ resistent gegen proteolytische Enzyme. In verdünnten Säuren und Laugen quellen Kollagene auf und durch Kochen mit Wasser, schneller noch mit Säure, findet die Bildung von Gelatine (Leim) statt, die noch fibrilläre Einheiten enthält (Lodish *et al.,* 2001a; Bosman & Stamenkovic, 2003; Alberts *et al.,* 2004b).

Elastin hingegen ist die Hauptkomponente von elastischen Fasern. Dieses Protein ist stark hydrophob und nichtglykosiliert und besitzt eine hohe Widerstandsfähigkeit. Elastin bildet auch eine Kreuzvernetzung, allerdings in Form zufälliger Knäule, so dass es sich nach der Streckung wieder gummiartig zusammenziehen kann. Die Wasserstoffbindungen, welche die α-Helix stabilisieren, sind zu stark, um von deformierenden Krafteinwirkungen zerstört zu werden. Elastin ist für die Elastizität von Bändern und Sehnen sowie der Lungen verantwortlich (Alberts *et al.,* 2004b).

Fibronectin und Laminin sind zusammen die wichtigsten Multiadhäsionsproteine der ECM. Fibronectin ist ein von Fibroblasten und Epithelzellen gebildetes, faserbildendes Glykoprotein, welches reichlich in der ECM, mit einer Konzentration von 300 µg/ml im Plasma und auch in anderen Körperflüssigkeiten vorkommt und als Substrat bei der Adhäsion von Zellen an ihre Unterlage beziehungsweise an die ECM dient (Lodish *et al.,* 2001a). Nach der Anheftung beeinflusst Fibronectin die Zellgestalt sowie die Anordnung des Zytoskeletts und ist ferner bei der Zellwanderung (zum Beispiel von Neuralleistenzellen während der Embryonalentwicklung) und Differenzierung multipler Zellarten von Bedeutung (Kurth, 2000). Fibronectin fördert des weiteren die Wundheilung, indem es den Einstrom von Makrophagen und anderen Immunzellen in das geschädigte Gewebe erleichtert. Fibronectin ist ein Dimer aus zwei fast identischen Polypeptidketten von je 220-280 kDa, die über zwei Disulfidbrücken an den C-Termini verbunden sind. Jede Kette ist etwa 60-70 nm lang und zwei bis drei nm dick (Lodish *et al.,* 2001a). Bisher sind mehr als 20 verschiedene Fibronectinketten bekannt, die sich durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts eines einzigen Fibronectingens bilden (Kurth, 2000). Die Zellerkennungsregion auf dem Fibronectinmolekül scheint vor allem aus dem Tetrapeptid Arg-Gly-Asp-Ser zu bestehen. Nach proteolytischem Abbau der zellbindenden Domäne in einer repetitiven Sequenz vom

Typ III erhält man einen rund 100 Aminosäuren langen Abschnitt, der Integrine binden kann. Derartige Abschnitte wurden zum Teil synthetisch als Peptide hergestellt und untersucht, wobei sich das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) als das kleinste von Integrinen erkannte Strukturelement erwies (Lodish *et al.,* 2001a). Diese zentrale Bindungsdomaine von Fibronectin wird von den Integrinen $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_6$ erkannt (Ruoslahti, 1991).

Laminin ist ein in der Basallamina lokalisiertes Multiadhäsionsprotein mit einem Molekulargewicht von 850 kDa. Es besteht aus drei Polypeptiden, welche in Kreuzform angeordnet sind, und deren Länge der Dicke der Basallamina entspricht (Schuppan *et al.,* 1994; Kurth, 2000). Es wurden 12 verschiedene Lamininisoformen identifiziert, deren A-, B1- und B2-Ketten sich aber kaum unterscheiden. Die Isoformen werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert (Lodish *et al.,* 2001a). Praktisch alle Epithelzellen synthetisieren Laminin, ebenso Skelett- und Herzmuskulatur, Nerven, Endothelzellen, Knochenmarkzellen und die Neuroretina. Laminin übt vielfältige Effekte wie Zelladhäsion, Migration und Zelldifferenzierung auf die benachbarten Zellen aus und ist besonders als Mediator für Interaktionen zwischen Zellen und der ECM von Bedeutung (Bosman & Stamenkovic, 2003). Laminin und andere Bestandteile der Basallamina übernehmen wichtige Aufgaben bei der Embryonalentwicklung wie zum Beispiel im Vier- und Achtzellstadium den Zusammenhalt im Blastomer (Lodish *et al.,* 2001a). Außerdem wandern Neuronen bei der Entwicklung des Nervensystems auf bestimmten Bahnen, die Laminin und andere Matrixbestandteile enthalten (Lodish *et al.,* 2001a). Aufgrund der multiplen Aufgaben ist es nicht verwunderlich, dass Laminin bei vielen Krankheitsprozessen wie der Tumorinvasion und Metastasierung sowie bei der Angiogenese involviert ist und der Ausfall aller bisher untersuchten Isoformen zu schwerwiegenden, teils letalen Konsequenzen führt (Schuppan *et al.,* 1994). Laminin enthält globuläre Domänen sowie einen superspiralisierten Abschnitt, in dem die drei Ketten durch mehrere Disulfidbindungen kovalent miteinander verbunden sind. Unterschiedliche Abschnitte des Moleküls gehen Bindungen mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren und verschiedenen Bestandteilen der Matrix wie Heparansulfat und über Nidogen mit Typ-IV-Kollagen ein (Bosman & Stamenkovic, 2003; Alberts *et al.,* 2004b). Hier kommt wie bei Fibronectin die Zellerkennungsregion Arg-Gly-Asp vor (Kleinig & Maier, 1999a).

Ein in der ECM höher entwickelter Tiere reichlich vorkommendes Polysaccharid ist die *Hyaluronsäure* (= Hyaluronan oder Hyaluronat). Ihre Größe, ihr Mangel von Sulfatierung und ihre einfache, sich wiederholende Disaccharidstruktur unterscheiden sie von anderen Glycosaminoglycanen. Die Disaccharidgrundstruktur D-Glucuronsäure β (1-3) N-Acetyl-D-

Glucosamin mit einer β (1 → 4) Verknüpfung wiederholt sich bis zu 50.000 mal in einem Hyaluronsäuremolekül (Lodish *et al.,* 2001a). In gestreckter Form würde ein Molekül bis zu 20 mm lang sein. Allerdings bildet die Hyaluronsäure ein Zufallsknäuel mit einem Durchmesser von rund 500 nm und durch die β-Verbindungen und die vielen Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Zuckerresten innerhalb der Kette falten sich die einzelnen Abschnitte jedes Hyaluronsäuremoleküls zu relativ steifen Stäbchen. Wegen vieler anionischer Reste auf der Moleküloberfläche besitzt Hyaluronsäure eine hohe Wasserbindungsfähigkeit und ist in der Lage, ein visköses, hydratisiertes Gel selbst bei niedrigem Hyaluronsäuregehalt auszubilden (Lodish *et al.,* 2001a). Das Volumen eines Hyaluronsäuremoleküls kann dann 1000fach größer sein als das Volumen des nicht hydratisierten Moleküls. Entsprechend verleiht Hyaluronsäure den Zellen Druckelastizität und erleichtert die Wanderung von Zellen, wenn sie an spezifische Rezeptoren bestimmter Zellen gebunden ist. Andere extrazelluläre Polysaccharide sind das Chitin der Arthropoden oder die Cellulose bei Pflanzen (Lodish *et al.,* 2001a).

Polysaccharide bilden auch das Grundgerüst der *Proteoglycane*, die in der ECM und auf der Oberfläche vieler Zellen vorkommen und eine große Vielfalt an unterschiedlichen Strukturen bilden (Schuppan *et al.,* 1994). Beispielsweise sind an Hyaluronsäure über Verbindungsproteine Polypeptidketten (Coreproteine) gebunden, welche wie alle Proteoglycane Glycosaminoglycanseitenketten tragen. Glycosaminoglycane (GAG) sind lange, unverzweigte repetitive Polysaccharidketten bestimmter Disaccharideinheiten (meist eine der Uronsäuren D-Glucuronsäure und L-Iduronsäure sowie entweder N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) (Kurth, 2000). Ferner enthält mindestens einer der Zuckerreste eine Sulfatgruppe, weshalb jede GAGkette zahlreiche negative Ladungen trägt und stark hydratisiert ist. Hierdurch können sie je nach Struktur und Zusammensetzung bis zum 50fachen ihres Eigengewichtes an Wasser binden und so einen Beitrag zu den mechanischen Eigenschaften zum Beispiel des elastischen Knorpels oder der Bandscheiben leisten und das Volumen der ECM bestimmen (Kurth, 2000). Aggrecan, das Proteoglycan welches den größten Teil des Knorpels bildet, besteht aus einem einzelnen Molekül, das als eines der größten bekannten Makromoleküle mehr als 4 mm lang ist (Lodish *et al.,* 2001a). Proteoglycane bilden eine gelartige Konsistenz und gewährleisten gleichzeitig die Formstabilität. Kleinere Proteoglycane wie das Syndecan liegen an Zelloberflächen insbesondere von Epithelzellen gebunden vor, wo sie Zell-Matrix-Wechselwirkungen erleichtern und bei der Präsentation bestimmter Hormone zu ihren jeweiligen Zelloberflächenrezeptoren mitwirken (Schuppan *et al.,* 1994; Lodish *et al.,* 2001a). So bindet

beispielsweise der Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF) fest an die Heparansulfatketten in extrazellulären Proteoglycanen, wodurch der Wachstumsfaktor nicht von extrazellulären Proteasen abgebaut werden kann und somit die Matrix eine Depotfunktion für Wachstumsfaktoren hat (Lodish *et al.,* 2001a). Versican stimuliert zudem die Proliferation von Fibroblasten und Chondrozyten (Bosman & Stamenkovic, 2003).

Die *Basallamina* ist eine kontinuierliche dünne Schicht spezialisierter ECM, die selten dicker als 60-100 nm ist (Lodish *et al.,* 2001a). Die meisten epithelialen und endothelialen Zellen ruhen auf einer Basallamina und auch einzelne Muskelzellen, Schwann´sche Zellen und Adipocyten sind von einer Basalmembran umgeben (Alberts *et al.,* 2004b). Die Basallamina steht mit spezifischen Rezeptorproteinen der Plasmamembran, Kollagenen und anderen Bestandteilen des lockeren Bindegewebes in Verbindung und alle Bestandteile ihrer Matrix werden von benachbarten Zellen gebildet (Lodish *et al.,* 2001a). Aufgebaut sind die Basallaminae zu mindestens 40 % des Proteins aus Kollagen Typ IV, welches ein flaches Gerüst bildet und der Festigung und als Filter dient. Außerdem besteht die Basallamina aus der zweiten Hauptkomponente Laminin, das für Quervernetzungen zuständig ist, aus Perlecan, einem Proteoglycan mit Heparansulfat als Glycosaminoglycan, welches ein struktureller Bestandteil der Basallaminae ist und auch eine Filterfunktion übernimmt und aus Nidogen (Bosman & Stamenkovic, 2003; Alberts *et al.,* 2004b).

3.6. Die Rolle von Integrinen und der ECM in der Reproduktion

Die Fertilisation und die streng regulierte Morphogenese und Differenzierung in der frühen Embryogenese, die Implantation und die Plazentation bei Säugern aber auch die Entstehung bestimmter Krankheiten (Endometriose, Plazentaabnormalitäten, Placenta accreta) sind stark von koordinierten Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen abhängig (Juliano & Haskill, 1993; Bronson & Fusi, 1996). Dies verdeutlicht die lebensnotwendige Rolle der ECM mit ihren Adhäsionsmolekülen, Rezeptoren, Hormonen, Wachstumshormonen im Gebiet der Reproduktion. Das Anheftungs-abhängige Zellüberleben wird für jeweils spezielle Zwecke bei jedem Stadium der Reproduktion bis zur Geburt genutzt (Vinatier, 1995).

Bei der Fertilisation adhäriert und penetriert das Spermium die Zona pellucida, eine weitere Spezialform der ECM. Anschließend heftet es sich an die Plasmamembran der Eizelle und fusioniert mit dieser (Damsky *et al.*, 1993; Vinatier, 1995; Sueoka *et al.*, 1997). Der präimplantatorische Mäuseembryo bildet eine Vielzahl von ECM Rezeptoren und Liganden aus (Vinatier, 1995). Schon im Zweizellstadium wurden bei Mäusen mittels RT-PCR verschiedene Integrine ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) detektiert (Damsky *et al.,* 1993). Den Proteoglycan

ECM-Rezeptor Syndecan-1 findet man im Mäuseembryo ab dem Vierzellstadium und als erste Matrixbestandteile tauchen die B1 und B2 Ketten des Laminins schon im Zwei- bis Vierzeller auf und die A-Kette lässt sich im 16-Zeller belegen (Damsky *et al.,* 1993; Vinatier, 1995). Fibronectin und Kollagen IV hingegen wurden frühestens in der Blastocyste von Mäusen detektiert und Laminin und die Integrinuntereinheit β_1 wurden in menschlichen Embryonen im Morulastadium aufgezeigt (Damsky *et al.,* 1993). Nach dem Schlupf der Blastozyste vergrößert sich das Integrinrepertoire der Maus deutlich, aber $\alpha_v\beta_3$ ist das einzige Integrin, welches zum Zeitpunkt der Implantation apikal im Trophoblasten zu finden ist (Sutherland *et al.*, 1993).

Die Untereinheit β_3 wird im menschlichen Uterusepithel zyklusabhängig reguliert und zwar so, dass sie nur zwischen Tag 19 und 24 des Menstrualzyklus erscheint, also dem Zeitrahmen der optimalen uterinen Empfänglichkeit, während sie bei den untersuchten unfruchtbaren Frauen in dieser Zeit nicht nachgewiesen werden konnte (Lessey *et al.*, 1992). In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ im endometrialen Epithel des Menschen nur während des Implantationsfensters zwischen Tag 20 und 24 des Zyklus exprimiert werden (Lessey & Arnold, 1998). Beim Menschen und der Maus findet ein Wandel der Integrinexpression („integrin switch“) während der Differenzierung des Trophoblasten und zusammenhängend mit der Migration des Konzeptus ins endometriale Stroma statt (Sutherland *et al.*, 1993; Damsky *et al.*, 1994).

In Zellkulturstudien mit Cytotrophoblastzellen des Makaken aus der frühen Trächtigkeit (Tag 40-100) wurden die Integrinuntereinheiten α_v, β_1 und β_3 an der Oberfläche exprimiert und bei Versuchen mit einer Migrationskammer wanderten die Zellen in Richtung des Vitronectins und nicht zu BSA (Douglas *et al.*, 1999). Hieraus schlossen die Autoren, dass der Vitronectinrezeptor wichtig für die migratorische Aktivität zu sein scheint.

Eine Studie mit Pavianen offenbarte eine Verteilung der Integrine und ECM im Endometrium während des Menstrualzyklus und der frühen Trächtigkeit, die sich mit dem Vorkommen im menschlichen Gewebe vollständig deckte (Fazleabas *et al.*, 1997). Dagegen wurde im caprinen Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation ein reduziertes Signal für die Integrinuntereinheit β_1 festgestellt (Guillomot, 1999). Weiterhin fehlten die Hauptmatrix-komponenten Kollagen I und IV sowie Laminin bei der Implantation insbesondere an den Stellen, wo eine Adhäsion stattgefunden hat. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Forschergruppe nach dem Studium der ECM-Komponenten Kollagen Typ I und IV, Laminin und Fibronectin im Uterus des Rindes vom Tag 0 bis 30 (Yamada *et al.*, 2002). Am Tag 14 wurden die Unterschiede zwischen Tieren mit normalem Zyklus und tragenden Kühen

deutlich. Die Menge der Proteine der ECM wurde weniger und die Proteine veränderten ihre Faserkonsistenz. Vermutlich hat vor allem die Fluktuation von Kollagen Typ I und Fibronectin während der Implantation einen stimulierenden Effekt zur Bildung eines epithelialen Zellkontakts und für die Etablierung einer Trächtigkeit. Eine erhöhte Expression von β_1 findet dagegen im menschlichen Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation statt und das Auswachsen des Embryos, nicht aber das Anheften, wurde von Antikörpern gegen β_1 Integrine gehemmt (Yoshimura *et al.*, 1998). Hieraus lässt sich vermuten, dass β_1 in Deziduazellen hauptsächlich für die Entwicklung und Differenzierung nach dem Anheften verantwortlich ist.

In der epitheliochorialen Plazenta des Schweines, in der das Endometrium nicht vom Trophoblasten invadiert wird, werden hingegen sowohl vom Konzeptus als auch im Uterusepithel eine Vielzahl von Integrinuntereinheiten (α_1, α_3, α_4, α_5, α_v, β_1, β_3 und β_5) exprimiert (Bowen *et al.*, 1996). Bis auf α_1 und α_3 wurden diese an Stellen des anfänglichen Anheftens des Trophoblasten an das Uterusepithel und am Tag 12-15 der Trächtigkeit nachgewiesen und α_4, α_5 und β_1 unterlagen weiterhin Modulationen während des Sexualzyklus. Von den untersuchten ECM-Komponenten waren Fibronectin und Vitronectin im Trophektoderm vorhanden und nur Vitronectin konnte im Uterusepithel nachgewiesen werden. Dagegen wurden Kollagen IV und Laminin nicht detektiert. In der Zellkultur wurden diese Erkenntnisse bezüglich der Integrine in vitro mit gleichen Resultaten nachvollzogen (Bowen *et al.*, 1997). Vermutlich gibt es für die Implantation des Schweines eine spezifische Adhäsionskaskade, die mit einer Veränderung der Integrin- und ECM-Expression einhergeht (Bowen *et al.,* 1996; Burghardt *et al.*, 1997).

Beim Schaf wurden Hinweise auf die Untereinheiten α_4, α_5, α_v, β_1, β_3 und β_5 apikal im Endometrium während des Zyklus und in der Trächtigkeit und ebenfalls apikal im Trophoblasten gefunden (Johnson *et al.*, 2001). Allerdings scheinen sie konstitutiv exprimiert zu werden und sich zur Zeit der Implantation nicht zu erhöhen, also keine Regelfunktion für die Implantation beim Schaf darzustellen. Hier wird eine Interaktion der genannten Integrine mit Osteopontin, welches wiederum als Vermittler bei der Implantation des Schafes fungieren könnte, vermutet (Johnson *et al.,* 2001).

Arbeiten am Rind lassen vermuten, dass die Integrinuntereinheit β_1 eine wichtige Rolle bei der Migration der TGC spielt, da sie ab dem Tag 21 lateral in den mononukleären Trophoblastzellen zu finden ist und ab Tag 24 auch deutlich in den TGC exprimiert wird (MacLaren & Wildeman, 1995), während zum Beispiel beim Menschen im Trophoblasten während des ersten Trimesters der Schwangerschaft nur wenig β_1 im Zytotrophoblast

vorkommt und dieses diffus über die Zelloberfläche verteilt ist (Damsky *et al.*, 1992). Um die Funktion von Integrinen bei der Implantation und bei der Migration der TGC vollkommen zu verstehen, ist es notwendig, herauszufinden, welche α-Untereinheit bei der Dimerisierung beteiligt ist. Vermutlich handelt es sich beim Rind nicht um α_5, denn der zu diesem Heterodimer gehörende Ligand Fibronectin wurde lediglich im Stroma des Uterus nachgewiesen (MacLaren & Wildeman, 1995). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte eine zyklusabhängige zeitliche und räumliche Verteilung von α_6, α_v und β_3 im Rinderendometrium, die mutmaßlich durch ovarielle Steroide, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine reguliert wird (Kimmins & MacLaren, 1999). $\alpha_v\beta_3$ und Fibronectin waren kaum in der Karunkel vorhanden, wohingegen Laminin in epithelialen und vaskulären Basalmembranen und Kollagen IV im subepithelialen Stroma auftrat. Eine Fibronectinreaktion ließ sich nur im Stroma detektieren. Signale für α_6 kamen konzentriert in den Basallaminae vor und waren während des Proöstrus und des Östrus reduziert. Für die Integrinuntereinheit β_1 wurde eine überlappende Reaktion mit α_3, α_4 und α_6, aber keine Regulation während des Zyklus festgestellt (Kimmins & MacLaren, 1999). Da β_1 mit insgesamt 12 verschiedenen α-Untereinheiten ein Heterodimer bilden kann, ist es nicht leicht, eine Auf- beziehungsweise Abregulation festzustellen, allerdings spricht das kolokalisierte Auftreten der drei genannten α-Untereinheiten für die gemeinsame Bildung aktiver Rezeptoren. Aufgrund der eindeutig speziesspezifischen endometrialen Integrinexpression wird vermutet, dass sie Unterschiede in Zyklus und Plazentation widerspiegelt (Kimmins & MacLaren, 1999). Ebenfalls an nicht tragenden Tieren, an Proben vom Tag 18, 21, 24 und 30 und schließlich an einer einzigen Entnahme von TGC am Tag 70 der Trächtigkeit wurden Untersuchungen der Integrinexpression (α_1, α_3, α_6, β_1) und der ECM (Kollagen IV, Laminin) im Kontext der Implantation durchgeführt (MacIntyre *et al.,* 2002). Das Expressionsmuster aller untersuchten α-Untereinheiten deutete auf eine Beteiligung beim Attachment und der Implantation hin und besonderes Augenmerk galt dabei α_6, welches die Migration oder Fusion erleichtern könnte (MacIntyre *et al.,* 2002). Außerdem veränderten die untersuchten ECM-Bestandteile ihre Verteilung zu Beginn der Implantation, so wurde zum Beispiel der ECM Ligand Laminin plötzlich auch im Stroma exprimiert, ebenfalls ein Hinweis darauf, dass auch Laminin und Kollagen IV in das Geschehen involviert sein könnten (MacIntyre *et al.,* 2002). In vitro Untersuchungen an bovinen endometrialen Epithel- und Stromazellen bezüglich des Einflusses von Östrogen und Progesteron auf Prostaglandine und die Integrinuntereinheit β_3 zeigten, dass interkarunkuläre Stromazellen am meisten auf die

Hormonzusätze reagierten, auf Östrogen zum Beispiel mit einer verminderten Expression von β_3 (Kimmins *et al.*, 2003). In der gleichen Studie wurde die Bildung von $PGF_{2\alpha}$ durch die Gaben von Progesteron und 17β-Östradiol in keinem Zelltyp beeinflusst, wohingegen Östrogen PGE_2 in allen Zellen außer dem Karunkelstroma verringerte. Auffallend war, dass eine Regulierung von β_3 nur im Stroma stattfand, wohingegen sich beispielsweise beim Menschen $\alpha_v\beta_3$ im Epithel veränderte (Lessey *et al.*, 1996; Kimmins *et al.,* 2003). Die Autoren vermuten einen parakrinen Einfluss vom Stroma auf das Epithel. Inzwischen wurde für das Rind widerlegt, dass wie bei Mensch, Mäusen, Pavianen und Schafen eine Koexpression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ und Osteopontin im Uterusepithel für das Anheften und/oder für die Invasion des Trophoblasten notwendig ist, denn beide treten beim Rind nicht kolokalisiert an den apikalen Zellmembranen auf (Kimmins *et al.*, 2004). Ein umfangreiches Screening auf Integrinuntereinheiten (α_1, α_2, α_3, α_4, α_5, α_6, α_v, β_1, β_3, β_5) und die ECM Proteine Kollagen Typ I und IV, Fibronectin und Laminin in der bovinen Plazenta in vivo zeigte, dass eine Verschiebung des α_2, α_5 und α_v sowie des β_3 und β_5 Signals von den maternalen Stammsepten in die Wachstumszone der Septenspitzen erfolgte und dass die β_1 Expression, die am Anfang der Trächtigkeit im gesamten maternalen Stroma auftrat, sich ab dem 150. Trächtigkeitstag auf die Basalmembranen der Epithelien und Endothelien konzentrierte (Pfarrer *et al.,* 2003). Als weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen reduzierte sich die Markierung der α-Untereinheit am basalen Zellpol gegen Ende der Trächtigkeit, wobei auch die unpolarisierten TGC ein deutliches Signal entlang der gesamten Plasmamembran aufwiesen. Die Proteine der ECM (Fibronectin, Laminin und Kollagene) konnten in Stroma oder Basalmembranen detektiert werden. Es scheint, dass die TGC sich bei ihrer Migration mit dem Erwerben von Laminin Mechanismen aneignen, die von Tumorzellen bekannt sind (Pfarrer *et al.,* 2003).

4. Material und Methoden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang mit ihren Rezepturen, Produktbeschreibungen und Bezugsquellen aufgelistet.

4.1.1.1. Material

Für diese Arbeit wurden geschlossene Uteri tragender Rinder nach der Schlachtung der Tiere am Gießener Schlachthof entnommen und sofort auf Eis in einer Transporttonne ins Labor befördert. Da der Termin der Begattung beziehungsweise der künstlichen Besamung nicht bekannt war, fand die Bestimmung der Graviditätsstadien anhand der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Feten statt.

Tabelle 1: Wachstum und Altersbeurteilung beim Rinderfetus nach (Habermehl, 1975; Richter & Götze, 1993).

Alter Monats-ende	Gewicht der Frucht [kg]	SSL [cm]	Auftreten der Behaarung	Körperliche Entwicklung	Plazenta
1.	0,002	0,8-2,2	-	Kopf und Gliedmaßen erkennbar	Anlage vorhanden, mikrovilläre Adhäsion ab 20. Tag p.i.
2.	0,01-0,03	5,3	-	Klauenanlagen erkennbar, Gaumenspalte und Brustbein schließen sich	Plazentation im Gange, linsengroße Kotyledonen
3.	0,17-0,30	13	-	Hodensack, Euteranlage, Magenabtei-lungen erkennbar	Plazentare Verankerung vollständig
4.	0,8-1	24,5	feine Haare am Augenbogen	Klauen abgesetzt und gelb gefärbt	Plazentome 6,5 : 3,5 : 2,0 cm
5.	1-3	32,5	an Augenbogen, Kinn, Lippen	Zitzen bilden sich aus, Hoden treten in den Hodensack	Plazentome 7,5 : 4 : 2,5 cm
6.	3-8	45	an Augenbogen, Kinn, Lippen, Augenlidern, Ohrrand, Hornstellen, Schwanzspitze	alle Organe angelegt, fort-schreitendes Wachstum	Plazentome 8,0 : 4,5 : 2,5 cm
7.	8-15	56	an Extremitäten bis an Karpal- und Tarsalgelenke		11 : 5 : 2,8 cm
8.	15-25	69	vollständig, aber kurz behaart, Bauch- und Nabelhaar kurz und dünn		Plazentome 11,0 : 6 : 3,5 cm
9.	20-45	81	Behaarung wird länger und vollständiger, auch an Hautnabel und Bauch		Plazentome 14,0 : 6,5 : 4,5 cm

Unsicherheitsfaktoren bei dieser Art der Altersbeurteilung sind neben Messfehlern auch die Tatsache, dass die Kühe verschiedener Rassen in den Jahren seit Erstellung der Tabelle größer geworden sind und rassebedingte Unterschiede oder durch das Geschlecht des Fetus bestehende Differenzen nicht berücksichtigt werden. Trotzdem bietet sie immer noch gute Anhaltspunkte zur Orientierung.

Die in den Versuchen verwendeten Zellkulturen stammten von 12 einzelnen tragenden Kühen. Die Abkürzungen w = weiblich und m = männlich geben das Geschlecht des Fetus wieder. Aus der folgenden Tabelle ist außerdem der jeweilige Zeitraum der Zellkultivierung zu entnehmen.

Tabelle 2: Auflistung der Versuchstiere

Probe	SSL des Fetus [cm]	Geschlecht des Fetus	Graviditäts-stadium	Dauer der Zellkultivierung [d]
MZ1	21	m	Mitte 4. Monat	70
MZ2	20,5	m	Mitte 4. Monat	59
MZ3	32,5	w	Ende 5. Monat	22
MZ4	83	m	Ende 9. Monat	19
MZ5	85	w	Ende 9. Monat	13
MZ6	18	w	Mitte 4. Monat	18
MZ7	40	w	Anfang 6. Monat	18
MZ8	23	w/w	Ende 4. Monat	14
MZ9	20	w	Anfang 4. Monat	21
MZ10	17	w	Mitte 4. Monat	26
MZ11	40	w	Anfang 6. Monat	22
MZ12	23	m	Ende 4. Monat	35

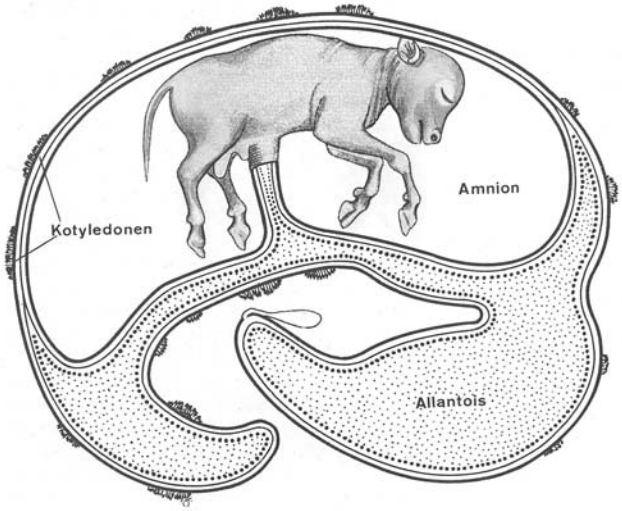


Abbildung 3: Die Plazentaverhältnisse des Rinderfetus und die Anordnung der Kotyledonen mit schematischer Darstellung der Fruchthüllen (Schnorr, 1996).

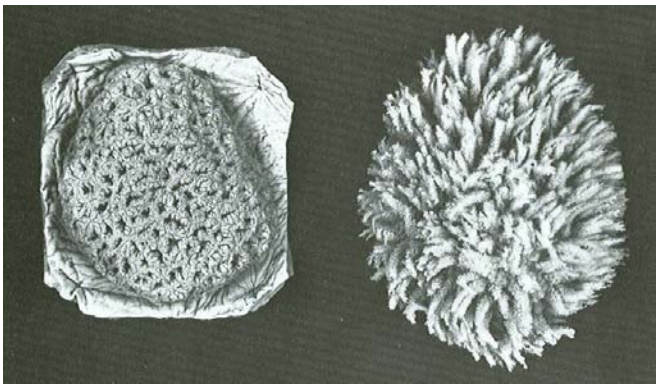


Abbildung 4: Auf diesem Foto ist links die Uteruskarunkel und rechts die Kotyledone des Rindes abgebildet (Schnorr, 1996).

4.2. Zellkultur

4.2.1. Allgemeine Grundlagen der Primärkultur

4.2.1.1. Definitionen

Im Folgenden werden Definitionen von Begriffen aufgeführt, die für das weitere Verständnis wichtig sind (Schaeffer, 1990; Freshney, 2000a):

Adhärenz: Anheftung von Zellen an ein festes Substrat

Disaggregation = Dissoziation: mit Hilfe enzymatischer oder mechanischer Methoden vorgenommene Zerlegung eines Gewebes oder Organs bis hin zu Einzelzellen

Konfluenz: Maß für die Zelldichte einer Kultur; konfluent ist eine Kultur, wenn alle Zellen in Kontakt mit anderen sind und alles verfügbare Substrat (siehe unten) besetzt ist

Medium: gepufferte Lösung, die verschiedene Komponenten enthält, um Zellen das Wachstum außerhalb ihrer normalen Umwelt zu ermöglichen

Monolayer: Wachstum adhärenter Zellen auf einem Substrat, wobei die Zellen einschichtig bleiben

Passage = Subkultivierung: Aufteilen von Kulturen permanenter Zellen auf neue Kulturgefäße, um die Zellen weiterzuführen oder: Transfer von Zellen von einem Kulturgefäß in ein anderes. Im Allgemeinen, aber nicht notwendigerweise, ist mit dem „Umsetzen“ einer proliferierenden Kultur eine Teilung und damit Vermehrung (Propagation) einer Zelllinie oder eines Zellstammes verbunden

Passagennummer: Angabe, zum wievielten Male eine Kultur subkultiviert wurde

Primärkultur: Kultur von Zellen, Geweben oder Organen nach der Entnahme aus dem Organismus und vor der ersten Subkultur

Substrat: Oberfläche des Kulturgefäßes, die den Zellen zur Anheftung zur Verfügung steht

Trypsinierung: Ablösen von Zellen von ihrem Substrat mit Hilfe des Enzyms Trypsin

Well: Vertiefung einer Mikrotiterplatte

Zellkultur: im Allgemeinen die in vitro Kultur von Zellen

Zelllinie: Zellkultur nach der ersten Passage

Kontinuierliche Zellline = „permanente Zelllinie“: Zelllinie (oder Zellstamm) mit unbegrenzter Überlebenskapazität, bislang als „etablierte“ oder „immortale“ Zelllinie bezeichnet

4.2.2. Warum Primärzellen aus dem Rinderplazentom?

Aus den Plazentomen des Modelltieres Rind ist kommerziell keine Zelllinie erhältlich. Oftmals hat man aber auch die Beobachtung gemacht, dass Primärkulturen eher dem in vivo-Zelltyp entsprechen, weil sie weitgehend ihre physiologischen Aktivitäten und Funktionen besitzen. Sie stellen so ein besseres Modell dar, auch wenn sie für jedes Experiment neu isoliert werden müssen und obwohl Primärkulturen anspruchsvoller bezüglich ihrer Kulturbedingungen sind und zunächst einmal näher charakterisiert werden müssen.

Kontinuierliche Zelllinien hätten den Vorzug, dass sie leicht zu handhaben sind und schon vielfältiges Datenmaterial über sie vorhanden ist, welches laborübergreifend verglichen werden kann. Nachteilig wirkt sich dagegen aus, dass im Laufe der Zeit signifikante Unterschiede zur Ausgangskultur auftreten und eine Diskrepanz des Phänotyps ein Vergleichen immer schwieriger macht. Eine Anpassung der Zellen an ihre in vitro Bedingungen, zum Beispiel die Zunahme der Wachstumsrate bei längerer Kultivierung, geht oftmals mit einem Verlust typischer Merkmale der Zellen, wie einer fortschreitenden Veränderung der Chromosomenzahl, einher.

4.2.3. Wahl der Disaggregationsmethode

Um eine Primärkultur zu erhalten, gibt es verschiedene Vorgehensweisen:

- die mechanische Disaggregation
- Gewebeexplantate
- enzymatische Verfahren
- oder Kombinationen dieser Methoden.

Die mechanische Disaggregation wird mit scharfen Instrumenten wie Scheren oder einem Skalpell, mit Sieben oder Nylonnetzen oder durch heftiges Pipettieren durchgeführt. Dieses Vorgehen ist schnell und billig, erfordert allerdings weiches Gewebe, welches meist stark geschädigt wird, wodurch der Ertrag entsprechend verringert und weshalb viel Gewebe benötigt wird.

Gewebeexplantate sind Fragmente aus einem Gewebe, welche zum Wachstum oder zur Erhaltung in ein künstliches Medium überführt wurden. Aus den Explantaten wachsen einzelne Zellen aus. Somit findet ein hoch selektiver Prozess statt, bei dem nur wenige Zellen verloren gehen. Allerdings dauert er lange und die Adhäsion des Explantats stellt eine Schwierigkeit dar. Eventuell wird eine Beschichtung der Flaschen oder die Verwendung von Feederzellen erforderlich. Auch findet eine Selektion der Zellen statt, die eine gute Migrationsfähigkeit besitzen.

Enzymatische Verfahren bieten durch die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Enzyme und den Veränderungsmöglichkeiten bezüglich Temperatur, Zeit und Konzentration gute Voraussetzungen, um eine hohe Ausbeute lebender Zellen zu erhalten. Sie haben sich in den letzten 20 Jahren zur Methode der Wahl entwickelt. Nachteilig sind die hohen Kosten und das arbeitsintensive Verfahren, welches im Vorfeld gut ausgetestet werden muss.

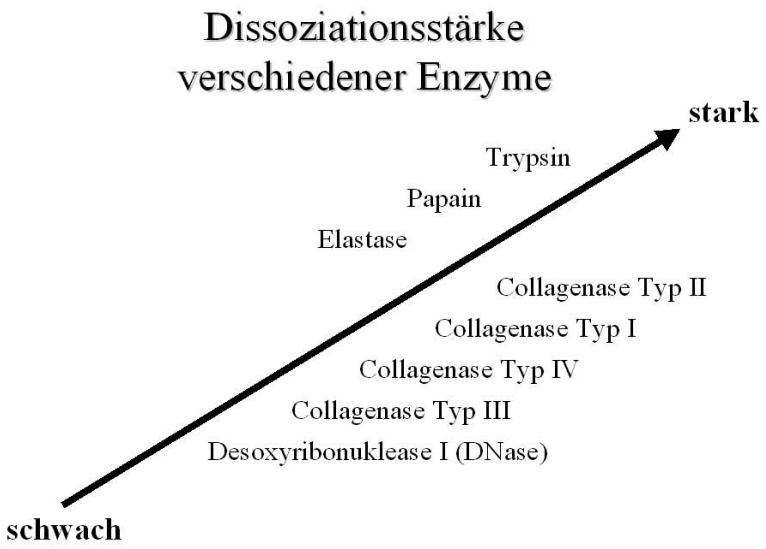


Abbildung 5: Dissoziationsstärken verschiedener Enzyme aufsteigend entsprechend der Dissoziationsstärke angeordnet (modifiziert aus Tissue Dissociation Manual der Worthington Biochemical Corporation, 2003).

Durch die genannten Vorteile der enzymatischen Disaggregation wurde für die Isolierung der Plazentazellen die Collagenase Typ I (CLS I) verwendet. Diese ist ein Enzymgemisch aus CLS, Clostripain sowie Enzymen mit tryptischen und proteolytischen Aktivitäten (Abb. 5). Sie wird zur Isolierung von Zellen aus Epithel-, Leber-, Lungen-, Fett- und Nebennierenzellen empfohlen, da sie den Zellverband der Gewebe schonend und selektiv andaut, ohne die Zelloberfläche zu schädigen. Mit ihr wurden die besten Isolierungsergebnisse nach dem modifizierten Protokoll aus Freshney (2000b) erzielt. Die eingesetzte CLS I Konzentration betrug 200 U/ml und nach einer Inkubationszeit von 60 bis 90 min bei 37 °C im Wasserbad hatten sich ausreichend Zellen gelöst, ohne dass sie dabei erkennbar geschädigt wurden.

4.2.4. Wahl des Mediums

Als Wachstumsmedium für die Zellen aus der Uteruskarunkel wurde DMEM mit Ham´s F-12 ausgewählt. Die Basalmedien nach Eagle eignen sich sehr gut für primäre Säugerzellkulturen. Modifiziert sind sie zu den am häufigsten verwendeten Zellkulturmedien geworden. Im

DMEM sind eine bis zu vierfache Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen sowie noch weitere Zusatzkomponenten enthalten. Diese hohe Nährstoffkonzentration des DMEM wurde Ham´s F-12 Medium ergänzt, welches einen erhöhten Gehalt an Aminosäuren und Zinksulfat enthält und entweder bei geringer Serumzugabe oder für schlecht wachsende primäre Zellen verwendet wird. Die Kultivierung von fetalen Zellen wurde mittels Quantum 286, einem neuen Spezialmedium für Epithelzellen optimiert. Dieses Medium auf der Basis eines modifizierten DMEM enthält ausgewählte Wachstumsfaktoren aus Serum, spezielle Proteinkomponenten aus Hefen und Sojabohnenextrakten und L-Glutamin mit zusätzlichen wachstumsfördernden Spurenelementen. Das Hybridoma-Express-Medium, RPMI 1640 und William´s Medium E haben sich bezüglich des Wachstums der Zellen aus dem Rinderplazentom im Vergleich zu den davor genannten Medien als weniger geeignet erwiesen und wurden daraufhin nicht mehr eingesetzt.

4.2.5. Einsatz von Antibiotika

Da Zellkulturmedien ideale Wachstumsbedingungen für Fremdkeime bieten, empfiehlt sich vor allem für Primärkulturen der Zusatz von Antibiotikalösungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde pro 100 ml Medium 1 ml einer Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) Lösung eingesetzt, die 10.000 IE Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin enthielt. Die empfohlene Konzentration für Pen/Strep liegt auch genau bei dieser Dosierung. Höhere Konzentrationen von Antibiotika können zytotoxisch wirken.

4.2.6. Protokoll für Primärkulturen aus Karunkeln beziehungsweise Kotyledonen

1. Entnahme und Bearbeitung der Proben
   - im Labor den Uterus mit dem Skalpell entlang der Curvatura major eröffnen, drei Plazentome möglichst steril entnehmen und sofort unter die Sterilwerkbank bringen
   - pro Versuch außerdem zwei Plazentome in flüssigem Stickstoff (N_2) schockgefrieren und bis zur Weiterverarbeitung (Gefrierschnitte, RNA-Extraktion) bei -80 °C lagern
   - SSL des Fetus notieren
   - überschüssiges Gewebe wie Gefäße und Amnionreste von den Plazentomen abpräparieren
   - Plazentome manuell in fetale Kotyledonen und maternale Uteruskarunkeln trennen
2. Gewebedisaggregation
   - in vier 50 ml Zentrifugentubes abgewogene CLS I (200 U/ml) geben, CLS I in je 1 ml HBSS+ lösen und 9 ml Medium zugeben

- mit sterilem Baumwollfaden Gewebe so fixieren, dass sich jeweils das Epithel außen befindet und das Gewebe in die Enzymlösung hängen, so dass die äußeren Schichten angedaut werden können
- Tubes 60 bis 90 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren bis sich ein ausreichend großes Zellpellet am Boden abgesetzt hat

3. Aussaat und Kultivierung der Zellen
   - nach Ablauf der Inkubationsdauer Tubes aus dem Wasserbad nehmen, Gewebereste verwerfen und die gewonnene Zellsuspension in 15 ml Zentrifugentubes überführen
   - Zellsuspension 5 min bei 90 x g zentrifugieren
   - Überstand verwerfen
   - Zellen in 5 ml Puffer waschen
   - 5 min bei 90 x g zentrifugieren
   - Überstand verwerfen
   - Zellen in Medium resuspendieren
   - Zellzahl durch Zählung in Neubauer Zählkammer ermitteln und in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml in T-25 Flaschen mit 7 ml Medium aussäen. Dabei für maternale Zellen das Medium DMEM/Ham´s F-12 1:1 und für fetale Zellen Quantum 286 Epithelzellmedium verwenden. Beide Medien enthalten 10 % fetales Kälberserum (FKS) und 1 ml Pen/Strep pro 100 ml Medium
   - die Anfärbung mit Trypanblau (= Ausschlussfarbstoff) dient zur Bestimmung lebender Zellen
   - Zellen in CO_2-Begasungsbrutschrank mit 5 % CO_2 und bei 37 °C inkubieren
   - nach circa drei Tagen wird die Hälfte des Mediums abgenommen und durch neues Medium ersetzt

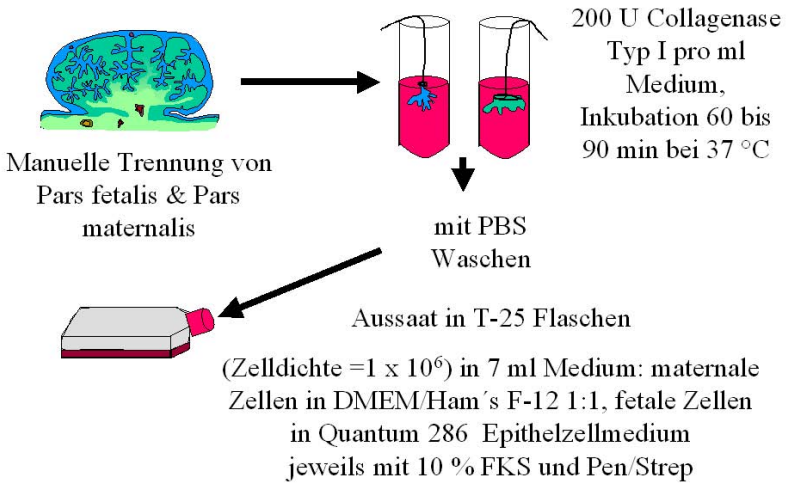


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Methode zur Zellisolierung

Die schematische Abbildung 6 zeigt das Vorgehen bei der Zellisolierung aus dem Rinderplazentom vom Gewebe bis zur Aussaat in die Kulturflasche.

- eine Passagierung wird durchgeführt, wenn einzelne Bereiche des Flaschenbodens oder der gesamte Flaschenboden konfluente Zellrasen aufweisen
- Medium aus der Flasche entfernen und die Zellen mit HBSS- zwei Mal spülen
- 2 ml Trypsin/EDTA zugeben und gleichmäßig verteilen
- Flaschen für 4 bis 5 min im Brutschrank inkubieren, dabei immer wieder unter einem inversen Mikroskop kontrollieren, ob sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen
- fibroblastoide Zellen lösen sich aufgrund der geringeren Adhäsionskraft schneller vom Flaschenboden ab und können dadurch von den epitheloiden Zellen getrennt werden (Abb. 7). Sobald die fibroblastoiden Zellen frei in der Kulturflasche schwimmen, können sie abpipettiert werden. Zu den in der Flasche verbliebenen epitheloiden Zellen wird 1 ml Trypsin/EDTA gegeben und nach kurzer Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst
- zu den Zellsuspensionen wird Medium gegeben, das enthaltene FKS hemmt das Trypsin/EDTA und verhindert, dass die Zellen angegriffen werden, bevor sie in neue Kulturflaschen ausgesät werden
- oder die Zellsuspension 5 min zentrifugieren, Überstand mit Enzym verwerfen und Zellen dann in Inkubationsmedium aussäen
- in den nächsten Tagen Medium kontrollieren; sobald sich die Farbe des Mediums von rot nach orange verfärbt, wird wieder ein halber Medienwechsel durchgeführt

Aufgrund ihres unterschiedlichen Wachstumsverhaltens und ihrer Morphologie können die wachsenden Zellen unter dem Mikroskop als epitheloide oder fibroblastoide Zellen charakterisiert werden. Relativ reine Populationen erhält man durch eine Separation mit Trypsin/EDTA und verschiedenen Inkubationszeiten durch die unterschiedlich starken Adhäsionskräfte der Zellen zum Substrat.

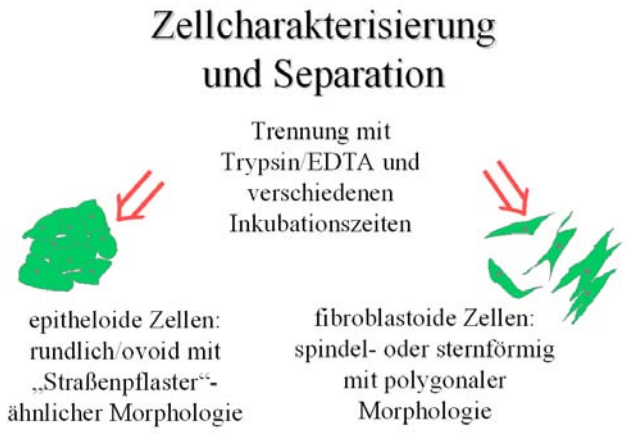


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zellcharakterisierung und Separation

4.2.7. Mikroskopische Dokumentation des Zellwachstums

Die wachsenden Zellen wurden an einem Auflichtmikroskop IX70 mit einer SC 35 Typ 12 Kamera, Inverted System Microscope (beides Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) fotografiert. Es wurde ein 36er Kodak Ektachrome professional EPY64T Diafilm verwendet.

4.3. Nachweis von Zytoskelettbestandteilen und Integrinrezeptoren mittels Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten und kultivierten Zellen

4.3.1. Allgemeine Grundlagen

Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) können Antigene durch Verwendung spezifischer Antikörper in Zellen und Geweben nachgewiesen und lokalisiert werden. Die Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt anschließend durch spezielle Marker.

Die Wahl des Antikörpers wird durch die Verfügbarkeit des speziellen Antikörpers für die entsprechende Spezies und das gesuchte Antigen bestimmt. Man unterscheidet mono- und polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper stammen von einem einzelnen Klon einer Plasmazelle ab und binden im Idealfall nur an ein spezifisches Epitop des Antigens, weshalb die Gefahr besteht, dass ein monoklonaler Antikörper nicht sensitiv genug sein kann, wenn die Bindungsstelle zum Beispiel durch die Fixierung beschädigt wurde. Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt inzwischen vor allem in Kultur. Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen Zellen und reagieren auch mit verschiedenen Epitopen des Antigens, mit dem Risiko von unspezifischen Bindungen (Boenisch, 2003). Marker zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper können entweder fluoreszieren, wenn sie ultraviolettem Licht ausgesetzt werden, oder einen unlöslichen Farbniederschlag bilden. Bei der direkten Antikörpermarkierung ist der erste Antikörper mit Biotin, einem Fluorochrom wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Indocarbocyanin (Cy3), einem Enzym wie Alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase oder Glukoseoxidase, oder mit einem Metall wie elektronendichte Goldpartikel konjugiert. Bei der indirekten Markierung dagegen wird ein unmarkierter Primärantikörper verwendet, der an das Antigen bindet. Erst der Sekundärantikörper, ein gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteter Antikörper, trägt das Konjugat zur Markierung. Somit kann bei der indirekten Methode vielfältig bei der Markierung kombiniert werden, wobei durch die Möglichkeit, dass mehrere Marker an den Primärantikörper binden können, eine Signalverstärkung stattfinden kann. Unerwünschte Reaktionen bei der indirekten Markierung können auftreten, wenn der Sekundärantikörper mit endogenen Immunglobulinen in der Gewebeprobe reagiert (Liddell & Weeks, 1996).

4.3.2. Immunfluoreszenz (IF)

Fluoreszenz ist als Anregung eines Atoms durch Einfang eines Lichtquants (γ-Quant oder schnell fliegendes Elektron) definiert. Bei diesem optischen Phänomen wird erst ein Photon absorbiert und später ein Photon mit niedriger Energie, also größerer Wellenlänge, emittiert. Mittels Immunfluoreszenz können hochspezifisch zelluläre Moleküle nachgewiesen werden. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampflampe, die ultraviolettes, sichtbares Licht aussendet. Im Mikroskop wird durch den Anregungsfilter die geeignete Wellenlänge für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff herausgefiltert. Das vom Fluorochrom ausgesandte Licht fällt schließlich durch den Emissionsfilter, der nur für Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlässig ist (Liddell & Weeks, 1996). Das Fluorochrom FITC hat bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm eine Emissionswellenlänge von 520 nm, wodurch das Fluoreszenzsignal apfelgrün erscheint. Die Cyanine haben eine hohe Fluoreszenzausbeute, Cy3 leuchtet rot (Anregung bei 550 nm und Emission bei 570 nm) und Cy5 infrarot.

4.3.3. Vergleich Immunhistochemie und IF

Ein wichtiger Vorteil der IF Methode ist die Tatsache, dass auch in kleinen Mengen exprimierte Moleküle leicht vor dem dunklen Hintergrund zu identifizieren sind, was bei den enzymatischen Farbreaktionen auf winzigen Flächen und vor diffusem Hintergrund bei der IHC schwer fällt. Außerdem sind Doppelfärbungen leicht durchführbar, da durch die Wahl von geeigneten Filtern eine getrennte oder gemeinsame Darstellung verschiedener Antigene möglich ist und zum Beispiel auch Kolokalisationen bestimmter Moleküle darstellbar werden. Sowohl der spezifische Nachweis und ganz besonders die Möglichkeit der Doppelfärbungen machten für die vorliegende Studie die IF zur Methode der Wahl. Nachteile der IF bestehen vor allem in der Tatsache, dass nicht bei Tageslicht gearbeitet werden kann, dass das Signal bei Exzitation schnell ausbleicht (= Fading oder Quenchen) und dem Verschwinden der Leuchtkraft bei Lagerung bei Raumtemperatur. Beiden Phänomenen konnte durch Verwenden eines speziellen Einbettmediums und einer raschen Dokumentation entgegengewirkt werden. Beim Mikroskopieren von Immunfluoreszenzen tritt teilweise eine Unschärfe auf, die durch Lichtinterferenzen aus Schichten im nicht fokussierten Bereich stammen (Liddell & Weeks, 1996; van der Loos, 1999).

4.3.4. Gewebepräparation

Für die immunhistochemischen Untersuchungen des Gewebes aus dem Rinderplazentom wurden aufgrund der besseren Antikörpergängigkeit Kryostatschnitte den Paraffinschnitten vorgezogen. Außerdem ließen sich hierdurch sowohl die Fixation als auch die ermittelten idealen Bedingungen für die Antikörper leicht auf die in vitro Untersuchungen an den kultivierten Zellen übertragen.

Bei der Präparation von Zellen oder Geweben für die IHC steht im Vordergrund, dass der natürliche Zustand bei der Konservierung erhalten bleibt und das Antigen seine natürliche Konformation nicht verändert. Alle Fixierungen erfordern gewisse Kompromisse und so muss für jede Fragestellung die beste Konservierungsmethode eruiert werden. Gefrierschnitte, auch als Kryostatschnitte bezeichnet, sind leicht herzustellen, erhalten die Antigenität deutlich besser als Paraffinschnitte und erlauben die Verwendung verschiedener Fixantien für einen einzigen Gewebeblock. Allerdings leidet im Vergleich zur Paraffineinbettung meist die Gewebestruktur, der Zellkern kann sich auflösen oder die Membran kann geschädigt werden. Die 1962 zum ersten Mal beschriebene Fixierung mit Alkohol führt zu einer Fixation durch Koagulation und nicht durch Quervernetzung, wodurch die immunreaktiven Determinanten nicht beeinträchtigt werden. Außerdem müssen keine Entwässerung und Einbettung des Gewebes erfolgen, wodurch das Gewebe geschont und Schrumpfungsartefakte eingeschränkt werden können. Die schlechte Fähigkeit von Alkoholen zur Gewebedurchdringung fällt bei der Verwendung von Gefrierschnitten nicht ins Gewicht (Farmilo & Stead, 2003).

4.3.4.1. Protokoll zur Herstellung von Gefrierschnitten:

- Gewebe würfelförmig auf eine Kantenlänge von etwa 0,5 cm zurechtschneiden
- Gewebeblock in Flüssigstickstoff schockgefrieren und bei -80 °C in Aluminiumfolie gewickelt lagern
- mindestens 1 h vor dem Schneiden den Gewebeblock bei -20 °C lagern
- Gewebe mit Tissue-Tek® auf Probenteller aufblocken
- an Gefriermikrotom 10-12 µm dünne Schnitte herstellen, dazu kann die Kühl- und Objekttemperatur für das Gewebe entsprechend individuell variiert werden, für Rinderplazentome waren -20 °C für den Geräteinnenraum und -15 °C für die Probe ideal
- Gefrierschnitte auf Chrom-Alaun beschichtete Glas Objektträger (OT) aufziehen
- Schnitte können in einem geschlossenen Behälter bei -80 °C sechs Monate gelagert werden oder direkt für die IF verwendet werden

4.3.4.2. Protokoll zur Beschichtung von Objektträgern (OT) mit Chrom-Alaun

Die OT werden mit Chrom-Alaun beschichtet, damit die Gewebeschnitte besser an ihnen haften.

- Entfettung und Reinigung der OT 10 min in 80%igem Alkohol, anschließend trocknen
- 5 g Gelatine in 1000 ml Aqua bidest auf 35 °C erwärmen
- 0,5 g Chrom-Alaun zugeben und auf 40 °C erwärmen
- Lösung auf 20 °C abkühlen lassen
- mit Faltenfilter filtrieren
- OT 10 min in Lösung eintauchen
- OT über Nacht bei 37 °C im Brutschrank trocknen lassen
- beschichtete OT in einem geschlossenen Objektträgerkasten bei RT aufbewahren

4.3.4.3. Zellaussaat für IF

- liegt ein konfluenter Zellrasen vor, kann eine erneute Passagierung/Subkultivierung erfolgen, dabei werden die Zellen nicht mehr in Kulturflaschen, sondern auf fettfreie, unbeschichtete, sterile Deckgläser in 6-Wellplatten ausgesät
- nach 3 bis 4 Tagen, sobald die gewünschte Zelldichte erreicht ist, kann eine Immunfluoreszenz durchgeführt werden

4.3.5. Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Primärantikörper

Anti-körper/ Code	Klon	Format	Iso-Typ	Herkunft	Ver-dünnung	Hersteller
Aktin (M0851)	1A4	Gewebe-kultur Überstand	IgG2a, Kappa	Maus	1:50	DAKO
Kollagen IV (M 0785)	CIV 22	Gewebe-kultur Überstand	IgG1, Kappa	Maus	1:50	DAKO
Cytokeratin -Cocktail* (1-8, 10, 13-16, 19) (E020)	AE1, AE3 und Ks13.1	R.T.U.	IgG1	Maus	gebrauchs-fertige Lösung 1:10 verdünnt	Linaris
Desmin (M0760)	D33	Gewebe-kultur Überstand	IgG1, Kappa	Maus	1:100	DAKO
Fibronectin (F0791)	IST-3	Aszites	IgG1	Maus	1:250	Sigma
Integrin α_6 (MAB1378) Human CD49f	NKI-GoH3	gereinigte Immun-globulin-fraktion	IgG2a	Ratte	1:25	Chemicon
Integrin α_v (AB1930)	polyklonal	reines Kaninchen-Antiserum	-	Kaninchen	1:100	Chemicon
Integrin β_1 (AB1952)	polyklonal	Serum	-	Kaninchen	1:100	Chemicon
Integrin β_3 (AB1932)	polyklonal	Kaninchen-Antiserum	-	Kaninchen	1:80	Chemicon
Laminin (078P)	polyklonal	Kaninchen-Antiserum		Kaninchen	1:20	BioGenex
Vimentin (M7020)	Vim3B4		IgG2a, Kappa	Maus	1:100	DAKO

* Der genannte Cocktail enthält ein Primärantikörpergemisch gegen verschiedene Cytokeratinformen.

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Antikörper	Iso-Typ	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
AP192F, Fluoreszein konjugiert	Anti-Maus IgG	Esel	1:100 – 1:200	Chemicon
AP182F, Fluoreszein konjugiert	Anti-Kaninchen IgG	Esel	1:100	Chemicon
AP189C, Cy3 konjugiert	Anti-Ratte IgG	Esel	1:100	Chemicon
AP182C, Cy3 konjugiert	Anti-Kaninchen IgG	Esel	1:300	Chemicon

4.3.6. Protokoll für IF an Gefrierschnitten (in vivo) und an kultivierten Zellen (in vitro)

- Gefrierschnitte direkt nach dem Schneiden oder nach Lagerung bei -80 °C lufttrocknen. Alternativ die Zellen bis zur Konfluenz in 6-Wellplatten auf Deckgläsern wachsen lassen und Medium kurz mit 0,02 molarem PBS abwaschen
- 10 min die Gefrierschnitte/Zellen mit -20 °C kaltem 100%igem Methanol im Gefrierfach fixieren
- Methanol abnehmen, fixierte Schnitte/Zellen auf Deckgläser lufttrocknen
- mit PapPen einkreisen
- kurz in PBS/Tween waschen
- als Proteinblocklösung das Serum oder IgG der Tierart, in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde 1:20 in AVP verdünnen und auf Schnitte geben (70 µl pro Schnitt und 140 µl pro Deckglas)
- 1 h inkubieren bei Raumtemperatur (RT) in feuchter Kammer
- kurz in PBS/Tween spülen (auf Rüttler stellen)
- Primärantikörper mit AVP verdünnen und auf Zellen geben
- bei 4 °C über Nacht oder bei 37 °C 1 h in feuchter Kammer inkubieren
- 3 x 10 min Spülen in PBS/Tween auf Rüttler
- ab jetzt alle Schritte im Dunkeln
- Sekundärantikörper in AVP verdünnen und auftragen
- 1 h in feuchter Kammer bei RT inkubieren
- 3 x 10 min in PBS/Tween auf Rüttler spülen
- 1 x kurz in Aqua bidest spülen
- Verschlusslösung auftragen und eindeckeln
- innerhalb von 4-5 d unter Fluoreszenzmikroskop anschauen
- Lagerung bei 4 °C

4.3.7. Kontrollen

Bei der Immunfluoreszenzmethode wurde für die Kontrollen der Primärantikörper durch Antikörperverdünnungspuffer ersetzt und ansonsten wurden die Schnitte/Zellen wie die anderen Proben weiter bearbeitet.

4.3.8. Dokumentation der Fluoreszenzergebnisse

4.3.8.1. Nass-Fotografie schwarz-weiß

Die Aufnahmen für die Nass-Fotografie wurden an einem Fotomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss AG, D-Oberkochen für Durchlicht und Auflicht-Fluoreszenz aufgenommen (Optovar 1,25, Kamera 2,5). Die dazu verwendeten schwarz-weiß Filme (Spezialfilme: Fujifilm, NEOPAN 1600 Professional, Schwarz-weiß-Bilder) wurden mit Rodinal entwickelt (1 + 25, 6 min, 20 °C). Für die Bildabzüge wurde Papier unterschiedlichen Härtegrades benutzt, welches in Neutol-Entwickler (1:9) entwickelt wurde. Die Abzüge vom Negativ wurden mit einer Vergrößerung von 3,5-fach am Vergrößerungsgerät Facomat IIc (Leitz, D-Wetzlar) hergestellt.

4.3.8.2. Nass-Fotografie in Farbe

Auch die Farbdias wurden an einem Fotomikroskop Axiophot, Durchlicht und Auflicht-Fluoreszenz mit einem Kodak Ektachrome P1600 Professional Tageslichtfilm und Farbumkehrfilm, EPH 135-36, aufgenommen.

4.3.8.3. Digitale Aufnahmen

Die digitale Dokumentation fand an einem mit einer Kamera PCO Typ VC45 ausgestatteten Leitz DMRB Fluoreszenz Mikroskop und mit einer im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelten Software („Entwicklung einer Analysesoftware zur computergestützten Fluoreszenzmikroskopie“, Stefan Kieslich aus Wolfsburg, Mai 1999) statt. Für die anschließende Bearbeitung kam das Computerprogramm AnalySIS zur Anwendung.

4.3.9. Auswertung der fluoreszenzimmunologischen Untersuchungen

Die Auswertung und Beurteilung immunhistochemisch gefärbter Kryostat- oder Gefrierschnitte (GS) erfolgte vorwiegend in einer deskriptiven Art und Weise, da die Signalintensität nur bedingt quantitativ interpretierbar ist. Dagegen wurde eine Aussage über die genaue Lokalisation im Gewebe beziehungsweise über das Auftreten in bestimmten Zelltypen getroffen. Für die Entscheidung, ob Signale zum Kulturflaschenboden oder von ihm

weg auftraten, wurde das Präparat auf verschiedenen Ebenen durchgemustert, der zweidimensionalen Darstellung in den Abbildungen ist dies nicht mehr zu entnehmen.

4.3.10. Kernfärbung

Die im Gewebe enthaltenen Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt, welches mit der Desoxyribonukleinsäure in den Kernen reagiert und sich in der Mikroskopie mit einem geeigneten Filter blau darstellt. Auf diese Weise wurde die Orientierung im Gewebe erleichtert, da die Anwesenheit von Zellen in ansonsten negativen Zellpopulationen nachgewiesen wurde (Abb. 8, 9). In der vorliegenden Studie konnte damit das Vorhandensein von Trophoblastriesenzellen besonders gut demonstriert werden.

4.4. mRNA-Nachweis mittels RT-PCR

4.4.1. Allgemeine Grundlagen

Die Unterschiede bei den verschiedenen Methoden zur Isolierung von RNA liegen vor allem im Aufschluss der Zellen und in der Inaktivierung zellulärer RNAsen (Schrimpf, 2002).
Für das Gewebe wurde die Gesamt-RNA mit TRIzol® Reagenz extrahiert, wohingegen bei der Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen mit dem peqGOLD RNAPure™-Kit eine größere Ausbeute erzielt wurde.

4.4.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus Gefriermaterial

Das TRIzol® Reagenz, eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidinisothiocyanat, ist eine Weiterentwicklung der *single step* RNA-Isolationsmethode von Chomczynski & Sacchi (1987). Während der Homogenisation beziehungsweise Lyse erhält das starke Denaturierungsmittel die Integrität der RNA. Die Zugabe von Chloroform führt nach der Zentrifugation zu einer Trennung in eine obere wässrige, eine mittlere weiße und eine untere organische Phase, wobei sich die RNA in der wässrigen Phase befindet und aus dieser mit Isopropanol gefällt werden kann.

4.4.3. Protokoll für RNA-Extraktion aus Gewebe (TRIzol® Reagenz):

1. Homogenisieren
   - Gefrorenes Gewebe in einer Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff mörsern
   - 100 mg Gewebe in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und 1 ml TRIzol® Reagenz dazugeben
   - Gewebe mit dem Ultra-Turrax auf höchster Geschwindigkeitsstufe homogenisieren
   - 5 min bei RT stehen lassen
2. Phasentrennung
   - 200 µl Trichlormethan (Chloroform) pro ml eingesetztem TRIzol®zugeben
   - Gefäß zusätzlich mit Parafilm verschließen und vortexen
   - 5 min bei RT stehen lassen
   - 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren
3. RNA-Präzipitation
   - es sind drei Phasen erkennbar: die obere wässrige Phase ist farblos (RNA), die mittlere Phase ist weiß (Proteine) und die untere organische Phase ist rot (DNA)

- obere, wässrige Phase ohne Verunreinigung durch Interphase in ein frisches Röhrchen mit Schraubdeckel überführen
- Präzipitation mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter TRIzol®
- Proben 30 min bei -20 °C lagern, anschließend vortexen
- Proben 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren, das Präzipitat soll gelartig sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen

4. Waschen der RNA
   - Isopropanolüberstand vorsichtig abkippen und verwerfen
   - Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser (-20 °C) durch Kippen waschen
   - anschließend Probe 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren
   - Waschschritt wiederholen
5. Lösen der RNA
   - Überstand verwerfen
   - RNA-Pellet kurz bei RT oder bei 37 °C trocknen lassen (nicht vollständig trocknen)
   - Pellet in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendieren, wobei die Lösbarkeit verbessert wird, wenn die RNA-Lösung auf 55-60 °C erhitzt wird

4.4.4. Extraktion von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

RNA-Extraktion mit peqGOLD RNAPure™-Kit, auch einer kombinierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode, die zu einer noch höheren Ausbeute an nicht-degradierter Gesamtzell-RNA führen soll.

4.4.5. Protokoll für RNA-Extraktion aus Zellen (peqGOLD RNAPure™-Kit):

1. Homogenisieren
   - Medium aus der Zellkulturflasche abziehen
   - 1 ml der Lösung aus dem Kit pro 10 cm^2 Kulturfläche (2,5 ml für kleine Zellkulturflaschen und 7,5 ml für große Flaschen) in die Flasche geben und Flüssigkeit mit einer Pipette resuspendieren oder 5 min mit dem Zellschaber Zellen ablösen und lysieren
   - Lysat in konische Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen (jeweils 1,25 ml)
2. Phasentrennung
   - Proben 5 min bei RT stehen lassen

- 0,2 ml Chloroform pro ml eingesetzter Lösung aus dem Kit zu jeder Probe zugeben (= 1,25 x 0,2 ml = 0,25 ml pro Eppendorf-Reaktionsgefäß)
- Proben 15 sec kräftig schütteln
- Proben 3-10 min bei RT stehen lassen
- 5 min bei 12.000 x g zentrifugieren ⇒ Phasentrennung (wässrige Phase = circa 60 % des Probevolumens ist die obere Phase)

3. RNA-Präzipitation
   - obere wässrige Phase ohne Verunreinigung durch Interphase in ein frisches Röhrchen mit Schraubdeckel überführen
   - Präzipitation mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure™ (1,25 x 0,5 ml = 0,625 ml = 625 µl)
   - Proben für 5 bis 15 min bei RT lagern
   - 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren, das Präzipitat soll gelartig sein und an unteren Seite des Röhrchens liegen
4. Waschen der RNA
   - Isopropanolüberstand vorsichtig abkippen und verwerfen
   - Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol in DEPC-behandeltem Wasser (-20 °C) waschen (durch Kippen)
   - anschließend Probe 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugieren
   - Waschschritt wiederholen
5. Lösen der RNA
   - Überstand verwerfen
   - RNA-Pellet kurz bei RT oder bei 37 °C trocknen lassen (nicht vollständig trocknen)
   - Pellet in einer kleinen Menge (10 µl) DEPC-behandeltem Wasser resuspendieren, das Erhitzen der RNA-Lösung auf 55-60 °C verbessert die Lösbarkeit
   - RNA aus den verschiedenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen wieder zusammenführen

4.4.6. Konzentrationsbestimmung und Bestimmung der Reinheit

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte mittels Absorptions-Einstrahlphotometrie (Spektralphotometrie) an einem BioPhotometer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-Hamburg).

Die Extinktion 1 bei der Wellenlänge von 260 nm entspricht einer RNA-Menge von 33 µg/ml. Für die Reinheit wurde die Extinktion von 260 nm und 280 nm ins Verhältnis

gesetzt. Der erhaltene Wert sollte dabei über 1,7 liegen. Für die Messung wurden Kunststoff-Einmalküvetten (UVette®) verwendet. Vor jeder Messung wurde ein Leerwert ermittelt.

- Küvette mit 69 µl Tris-Puffer (0,1 molarem Tris/HCl in DEPC-behandeltem Wasser, pH 7,3) zur Leerwertbestimmung verwenden
- 1 µl RNA-Lösung dazugeben, gut mischen und Probe messen
- Ergebnis wird in µg/ml angezeigt
- Reinheit ablesen ($OD_{260nm/280nm}$)

4.4.7. Lagerung

Die RNA wird in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C gelagert.

4.5. Nachweis der Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 mRNA-Expression im Gewebe und in Zellen durch RT-PCR

4.5.1. Allgemeine Grundlagen

Mit Hilfe der RT-PCR sollen spezifische DNA-Sequenzen für die Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 amplifiziert werden. Hierfür muss zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese (reverse Transkription) aus der isolierten RNA erfolgen, bevor eine Probe dieser Reaktion als Matrize in einer PCR dienen kann.

Ein DNase-I Verdau wird als Nachweis durchgeführt, dass die extrahierte Gesamt-RNA keine Verunreinigungen mit genomischer DNA enthält.

4.5.2. Protokoll Reverse Transkription und PCR:

1. DNase-I Verdau

- 20 µl Ansatz: x µl RNA (Berechnung erfolgt nach Photometerergebnis, so dass circa 15 µg RNA im Ansatz enthalten sind) + y µl DNase-I (1-3 U/1 µg RNA) + 2 µl 10x DNase-I Puffer + z µl DEPC-behandeltes Wasser
- Ansatz 30 min bei 37 °C inkubieren
- 10 min bei 72 °C im Wasserbad erhitzen, danach 5 min in Eiswasser stellen

2. Reverse Transkription = Erststrang-Synthese (cDNA)

20 µl Ansatz:

- x µl RNA (Berechnung erfolgt nach Konzentration der RNA, so dass in diesem Ansatz circa 8 µg RNA enthalten sind)
- + 1 µl Oligo dT-15 Primer
- + z µl DEPC-behandeltes Wasser (z = Differenz zu 12 µl)
- kurz anzentrifugieren, dann 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubieren und 3 min im Eiswasser abkühlen
- + 4 µl 5x first strand buffer
- + 2 µl 0,1 molares DTT
- + 1 µl 10 millimolare dNTP
- 1 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
- 1 µl Superscript-II Reverse Transkriptase hinzufügen und 1 h bei 37 °C inkubieren
- bei der PCR setzt man jeweils ein Tube mit und zur Kontrolle eines ohne Transkriptase (stattdessen 1 µl DEPC-behandeltes Wasser) ein

- dieser Ansatz kann direkt für die PCR verwendet oder aber bei -20 °C gelagert werden

3. PCR-Ansatz

<u>50 µl Ansatz:</u>

- 36,5 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 4 ml 25 millimolare $MgCl_2$-Lösung
- 1 µl 10 millimolare dNTP
- 1 µl 5´ Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl 3´ Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl cDNA
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase oder AmpliTaq Gold®

4. Ablauf der PCR im T3-Thermocycler mit den in Tabelle 5 aufgelisteten Primern und den aus Tabelle 6 zu entnehmenden Bedingungen:

Schritt 1: Initiale Denaturierung, Trennung der Doppelhelix zu Einzelsträngen

Schritt 2: Denaturierung

Schritt 3: Anlagerung/Hybridisierung der Primer mit der cDNA = Annealing

Schritt 4: Verlängerung der Primer = Polymerase-Reaktion = Extension

Die Schritte 2-4 werden wiederholt ⇒ exponentielle Amplifikation der Matrize

Schritt 5: abschließende Polymerisation, um alle Stränge bis zum Ende zu synthetisieren

Schritt 6: Kühlung bei 4 °C

5. Kontrolle der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Gel)

4.5.3. Primer

Tabelle 5: Auflistung der Primer, ihrer Sequenzen, der Schmelz- und Annealing-Temperaturen, des GC-Anteils und der NCBI Zugriffsnummern

Oligo Name	Sequenz des Primers [5´ → 3´]	Schmelz-temperatur T_M [°C]	Annealing-Temperatur [°C]	GC-Anteil [%]	Amplifikat-größe [bp]	Gen Bank Nummer (NCBI Accession)
Integrin α_6 F189	CAG CCT TCA ACT TGG ACA C	56,7	9 x 2 + 10 x 4 = 58 –5 = 53	52,6	285	XM_215984.2[1]
Integrin α_6 R474	CCC ATC CAC TGR TCT TCC T	57,7	(2,5+6) x 2 + (1,5+9) x 4 = 59 – 5 = 54	55,3		
Integrin β_1 forward	AGA TTG GAG ACA CGG TGA GC	59,4	(1+7) x 2 + (7+6) x 4 = 16+52 = 68-5 = 63	55,0	313	AF349461[2]
Integrin β_1 reverse	GTA CTT GCC CGT GAT CTT GC	59,4	(9+2) x 2 + (2+8) x 4 = 22+40 = 62-5 = 57	55,0		
Integrin α_v forward	CTG GTC TTC GTT TCA GTG TG	59,8	10 x 2 + 11 x 4 = 64-5 = 59	52,4	295	AF349464[2]
Integrin α_v reverse	GCC TTG CTG AAT GAA CTT GG	57,3	20+40 = 60-5 = 55	50,0		
Integrin β_3 forward	GAG CTG CCT TGG TGT CTG TG	63,7	(6+3) x 2 + (8+3) x 4 = 62-5 = 57	61,9	392	AF349462[2]
Integrin β_3 reverse	AGC AAC CAC ACC AGC TAC AA	57,9	(2+7) x 2 + (5+6) x 4 = 18+44 = 62-5 = 57	47,6		

[1]Die Primer für die Untereinheit α_6 sind einem homologen Abschnitt des Genoms der Spezies Mensch, Ratte, Maus, Huhn und Xenopus laevis (Krallenfrosch) entnommen, da die Sequenz vom Rind nicht bekannt ist.

Der selbstgewählte Primer R474 enthält an einer Stelle einen sogenannten „Wobble“ (R), das heißt, es wurde ein Primergemisch hergestellt, wodurch an dieser Stelle der Einbau von verschiedenen Basen, nämlich Adenosin oder Guanin, möglich wird. Diese Technik der degenerierten Primer ist notwendig, um über Speziesgrenzen hinweg noch nicht geklonte Gene zu isolieren.

[2] Aus (Johnson *et al.,* 2001) für Untersuchungen am Schaf.

Die Annealing Temperaturen wurden nach der folgenden Faustregel berechnet:

(A + T) x 2 + (G + C) x 4 = x °C – 5 °C

Dabei wurden die Nukleinsäuren folgendermaßen abgekürzt: Adenosin (A), Thymin (T), Guanosin (G) und Cytidin (C). R = Einbau von A oder G.

Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma MWG Biotech GmbH, D-Ebersberg durchgeführt.

Tabelle 6: PCR Bedingungen

	Integrin α_6	**Integrin β_1**	**Integrin α_v**	**Integrin β_3**
Heizdeckel [°C]	104	95	95	104
Schritt 1	95 °C 10 min	95 °C 3 min	95 °C 3 min	95 °C 10 min
Schritt 2	94 °C 45 sec	95 °C 1 min	95 °C 1 min	94 °C 45 sec
Schritt 3	57 °C 45 sec	59 °C 1 min	59 °C 1 min	60 °C 45 sec
Schritt 4	72 °C 45 sec	72 °C 2 min	72 °C 2 min	72 °C 45 sec
Zahl der Zyklen (Schritte 2-4)	39	39	39	44
Schritt 5	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min
Schritt 6	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞
Eingesetzte Polymerase	AmpliTaq Gold®	Taq-DNA-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase	AmpliTaq Gold®
Dauer	2 h 48 min	3 h 50 min	3 h 50 min	2 h 48 min

4.5.4. Detektion und Dokumentation

Die Produkte wurden über die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert. Dazu wurden die Proben in einer horizontalen Gel-Elektrophoresekammer auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Ein 100 bp DNA-Marker diente zur Bestimmung der Amplifikatgrößen.

1. Herstellung des DNA-Agarose-Gels

- 2,4 g Agarose abwiegen
- 120 ml Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) zugeben
- vorsichtiges Aufkochen der Agarose-Lösung in der Mikrowelle bei 800 Watt bis keine Schlieren mehr vorhanden sind
- Zugabe von 12 µl Ethidiumbromid
- auf circa 70 °C abgekühlte Lösung luftblasenfrei in einen Elektrophorese-Schlitten gießen, ein eingesetzter Kamm formt die Taschen (Slots), in die die PCR-Produkte geladen werden können
- Gel bei RT erstarren und abkühlen lassen
- Taschenschablone und Gummi-Endblöcke vorsichtig entfernen

2. Elektrophorese

- Gel in eine Elektrophoresekammer einsetzen und die Kammer mit 1x TAE-Puffer befüllen, bis das Gel circa 0,5 cm mit Puffer überschichtet ist
- jeweils 15-20 µl der vorbereiteten Probe (10 µl PCR-Produkt und 5 µl 5x Blue Run) in ein Slot pipettieren
- 15 µl des angesetzten Markers (Verhältnis: 1 µl Marker, 2 µl 5x Blue Run, 3 µl Aqua bidest oder DEPC-behandeltes Wasser) laden
- Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V so lange durchführen, bis der Marker die entsprechende Trennstrecke zurückgelegt hat (circa 2 h)

3. Gel fotografieren

Die Detektion der aufgetrennten DNA-Proben beziehungsweise der Ethidiumbromid-DNA-Komplexe erfolgte an einem High Performance Ultraviolett Transilluminator mittels UV-Licht.

5. Ergebnisse

5.1. Immunfluoreszenz an ex vivo Rinderplazentomen

5.1.1.1. Zytoskelettbestandteile

Der Cytokeratin-Cocktail detektierte im Plazentom die fetalen und mit einer schwächeren Färbeintensität auch die maternalen Epithelzellen (Abb. 10). Stromazellen, also fetales Zottenmesenchym und maternales Bindegewebe der Krypten, waren zu keiner Zeit positiv. Ein Fluoreszenzsignal für Vimentin wurde vor allem im fetalen Mesenchym sowie dem Bindegewebe des maternalen Kryptenstromas beobachtet. Eine deutliche Fluoreszenz zeigte sich außerdem in den Gefäßwänden, also Endothelien, glatten Muskelzellen und Perizyten, während Trophoblastzellen und maternale Epithelzellen komplett negativ waren (Abb. 11). Auch eine α-smooth muscle Actin-Immunfluoreszenz wurde nur gefäßassoziiert im fetalen Mesenchym und im maternalen Kryptenstroma detektiert. Deutlich positiv waren die Wände der großen Gefäße im Allantochorion, der kleinen Arteriolen wie auch der Perizyten (Abb. 12). Zellen epithelialer Herkunft waren zu jeder Zeit negativ. Die Immunfluoreszenz gegen das Intermediärfilament Desmin führte zu sehr kräftigen Signalen in den glatten Muskelzellen der großen Allantochoriongefäße und der Arterien beziehungsweise Arteriolen der fetalen Stammzotten wie auch der maternalen Krypten (Abb. 13). Generell waren die Signale im fetalen Kompartiment deutlich schwächer. Keine Reaktion wurde im Karunkelepithel, Trophoblast und bindegewebigen Kryptenstroma und Mesenchym der fetalen Zotten beobachtet.

5.1.1.2. Integrinuntereinheiten

Die Integrinuntereinheit α_6 konnte im Gewebeschnitt basolateral an Epithel- und Endothelzellen, quasi als napfförmige Umrandung zur Basalmembran hin, nachgewiesen werden (Abb. 14). Von geringerer Intensität waren weiterhin Fluoreszenzen entlang der gesamten Zellmembran zu sehen, die zu dem Bild einer ringförmigen Zellumrandung führten. Außerdem markierte α_6 einen Teil der Trophoblastriesenzellen.

Das positive Signal der Integrinuntereinheit β_1 war überwiegend kolokalisiert zur Untereinheit α_6 zu finden (Abb. 15). Die Basalmembranen des maternalen Epithels und des fetalen Trophoblasten zeichneten sich deutlich ab, im maternalen Gewebe sogar als kräftige, durchgehende Linie. Auch einige Trophoblastriesenzellen zeigten eine deutliche Immunfluoreszenz. Zusätzlich trat β_1 in den Endothelien der Gefäße im maternalen Stroma

des Karunkelstiels und in den Stammsepten auf und im Stroma entstand ein homogenes Färbemuster. In Gefäßen des fetalen Mesenchyms wiesen die Basalmembranen ebenfalls schwach positive Reaktionen auf. Auch das interkarunkuläre uterine Drüsengewebe zeigte entlang der Basalmembran eine positive Fluoreszenz.

Die Immunreaktion der Integrinuntereinheit α_v blieb im Plazentom auf das Bindegewebe des maternalen Kryptenstromas beschränkt (Abb. 16). Weiterhin trat eine punktuelle Immunfluoreszenz im Bereich der Chorionzotten in Richtung Kontaktlinie zu den mütterlichen Septen auf.

Eine deutliche Fluoreszenz gegen die Integrinuntereinheit β_3 konnte im maternalen Bindegewebe und fetalen Mesenchym des Rinderplazentoms nachgewiesen werden, wobei die Signale vor allem im Stroma der maternalen Krypten zu finden waren (Abb. 17).

5.1.1.3. Bestandteile der ECM

Laminin trat vor allem in der Basalmembran des maternalen Epithels und des Trophoblasten sowie der Endothelien auf (Abb. 18). Besonders auffällig war das positive Immunsignal in den nicht polarisierten Trophoblastriesenzellen. Damit war die Immunfluoreszenz gegen Laminin mit den Untereinheiten des korrespondierenden Integrinrezeptors $\alpha_6\beta_1$ kolokalisiert.

Das Detektionsmuster von Fibronectin im Rinderplazentom war ausschließlich auf bindegewebige Komponenten begrenzt (Abb. 19). Immunfluoreszenzreaktionen konnten sowohl stark im fetalen Mesenchym in den Chorionzotten als auch schwächer im maternalen Karunkelstroma nachgewiesen werden.

Eine Immunreaktion für Kollagen IV zeigte sich im fetalen Mesenchym und mit geringerer Reaktion auch im mütterlichen Stroma des interdigitierenden Gewebes und in den Basallaminae (Abb. 20).

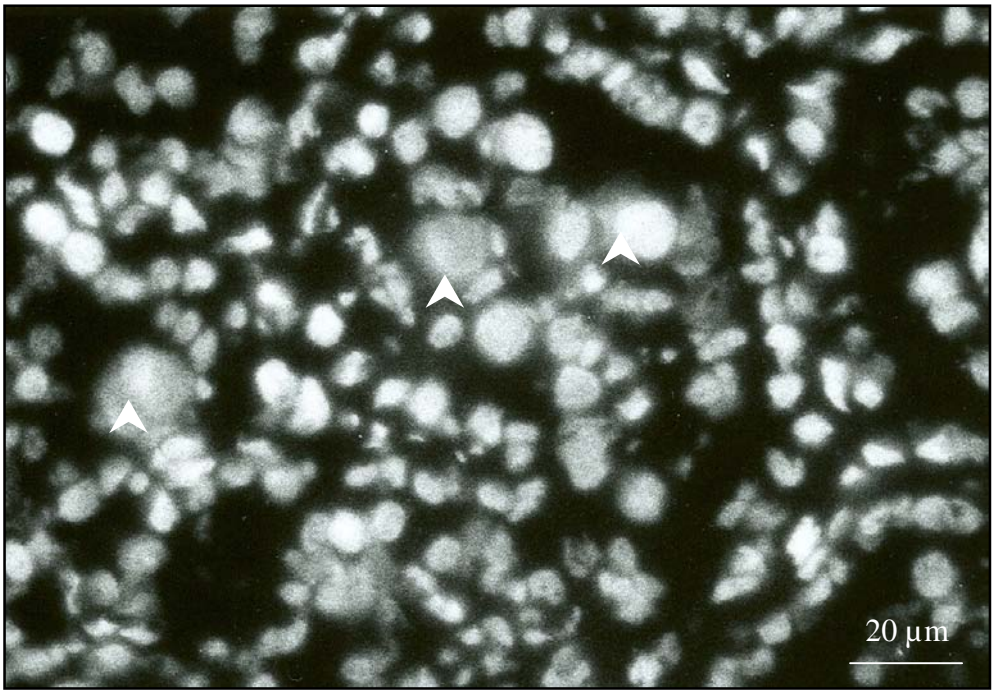


Abbildung 8: DAPI, GS, SSL 48 cm, 6. Monat.

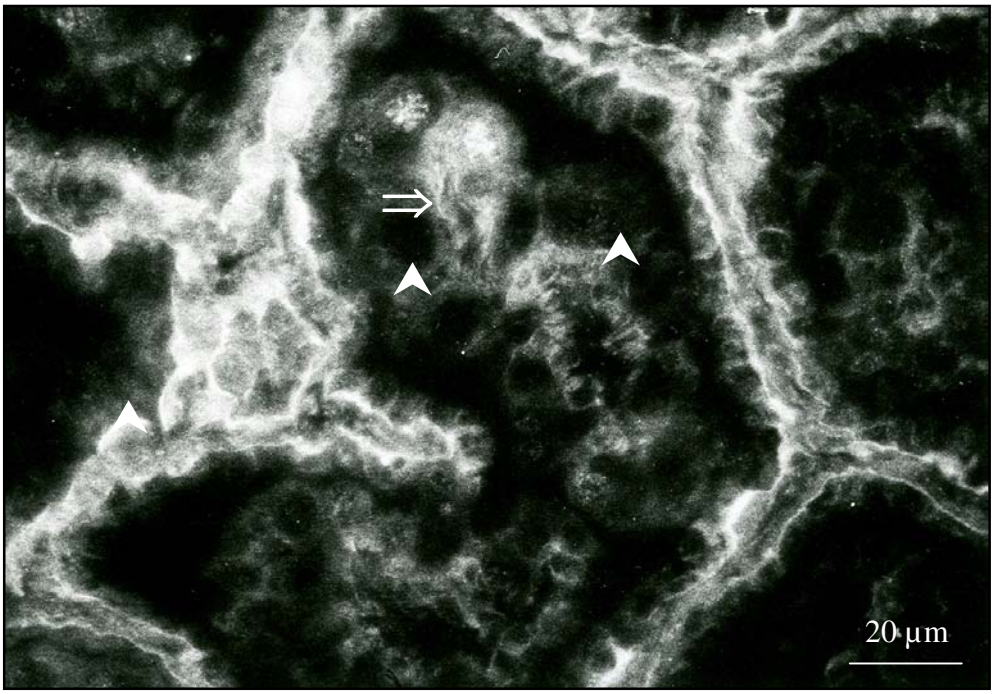


Abbildung 9: Integrin β_1, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Die Abbildungen 8 und 9 sind vergleichend zu betrachten, denn es handelt sich um den identischen Gewebeschnitt und die deckungsgleiche Aufnahmestelle, allerdings angeregt mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge. DAPI (Abb. 8) markiert alle Zellkerne, diejenigen einiger Trophoblastriesenzellen (TGC) sind mit einem Pfeil gekennzeichnet (⋀). Fluoreszenz von Integrin β_1 (Abb. 9) ist basal an maternalen und fetalen Epithel- und Endothelzellen (⇒) lokalisiert, aber ohne Kernfärbung schwer zu identifizieren.

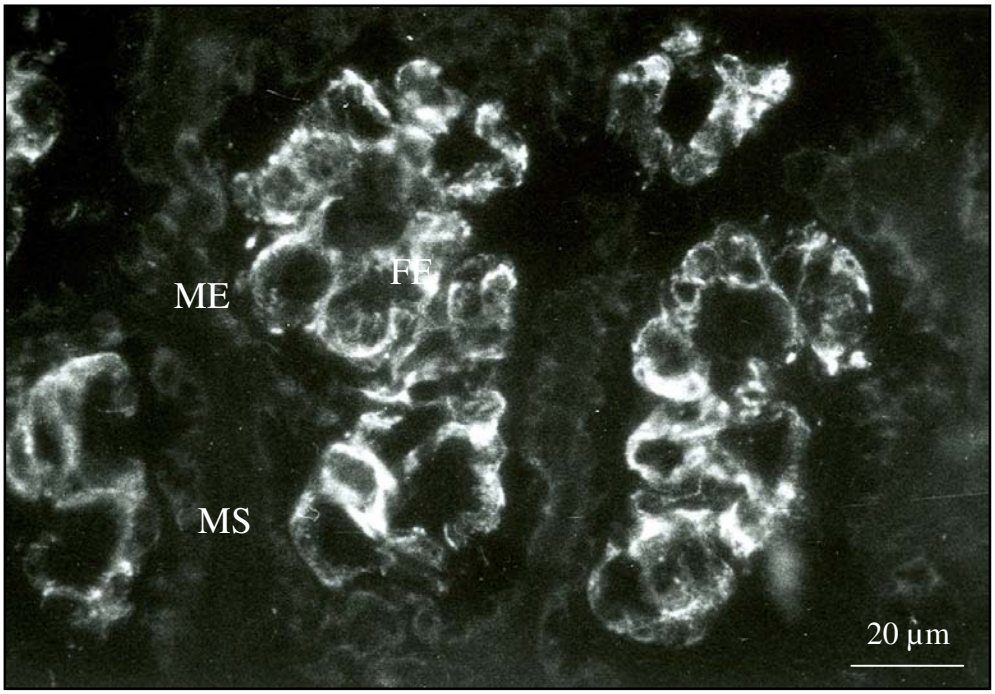


Abbildung 10: Cytokeratin-Cocktail (CK), Klone AE1, AE3, Ks13.1., GS, SSL 7,3 cm, 2. Monat. In quergeschnittenen Zotten ist das fetale Epithel (FE) stark und das maternale Epithel (ME) schwach CK positiv. Das umgebende maternale Stroma (MS) zeigt keine IF.

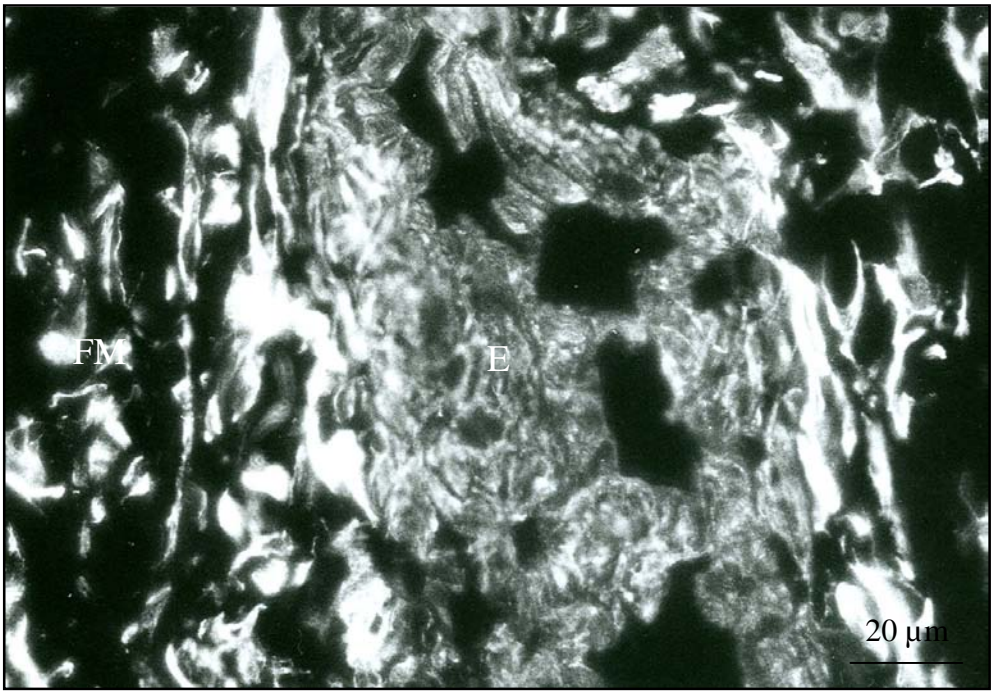


Abbildung 11: Vimentin (Vim), Klon Vim3B4, GS, SSL 24,3 cm, 4. Monat. Das Mesenchym (FM) einer fetalen Terminalzotte weist eine starke IF auf. Auch das Endothel des großen zentralen Gefäßes (E) ist positiv (grau durch hohe Schnittdicke).

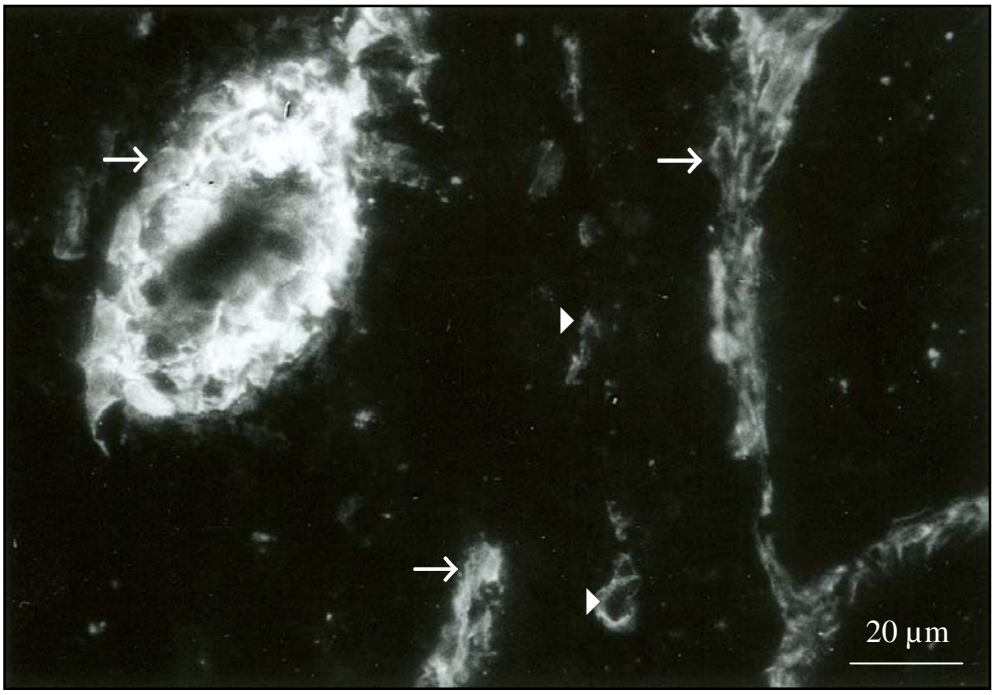


Abbildung 12: α-smooth muscle Actin, Klon 1A4, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Im Plazentom zeigen sich deutliche Reaktionen mit α-smooth muscle Actin in den Endothelien fetaler Zotten (▶) und maternaler Krypten (→). Im MS schwache Reaktion der positiven Perizyten.

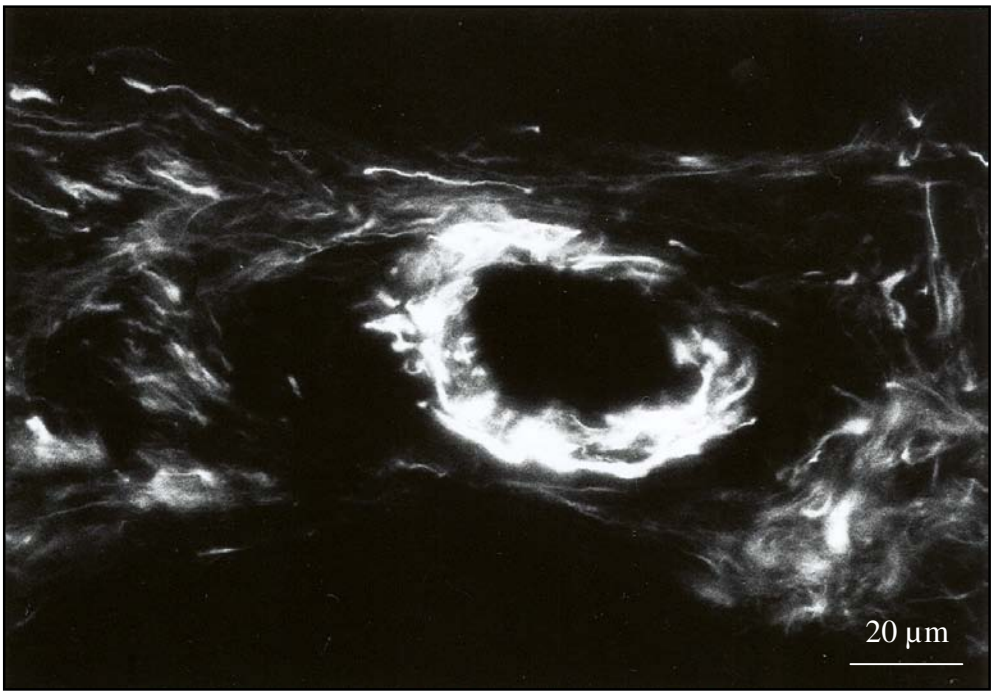


Abbildung 13: Desmin, Klon D33, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Desminpositive Reaktionen treten hier in einem quer getroffenen großen Gefäß und „flöckchenartig“ in den umliegenden kleinen Arteriolen in der Spitze einer maternalen Hauptsepte auf.

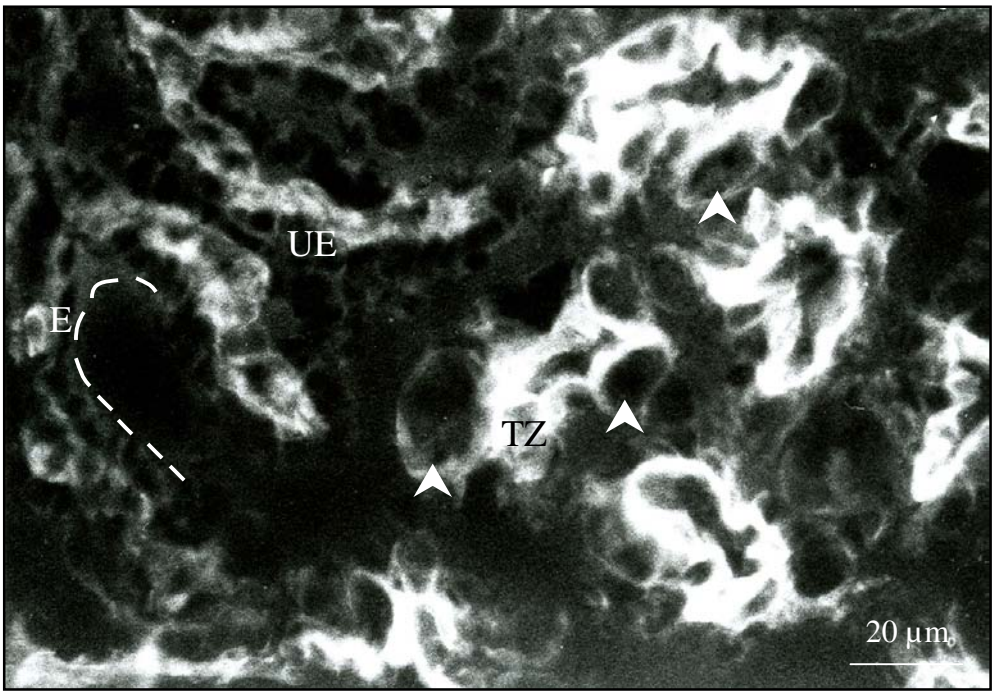


Abbildung 14: Integrin α_6, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Trophoblast (TZ) und Karunkelepithel (UE) (apikales UE-Niveau gestrichelt) sind vor allem im basalen Bereich deutlich positiv. Außerdem zeigen einige TGC (⩓) und Endothelien (E) eine Immunfluoreszenz.

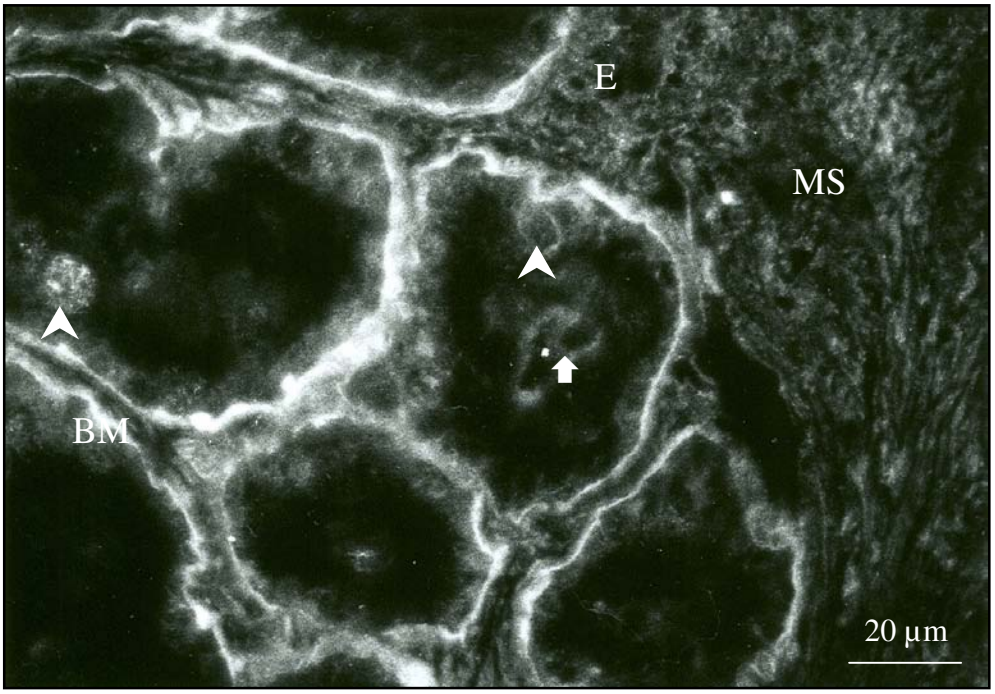


Abbildung 15: Integrin β_1, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Die Basalmembranen (BM) der vom Karunkelstiel (rechts) abgehenden maternalen Septen zeichnen sich deutlich linienartig ab. Die BM quer getroffener Chorionzotten (⬆) und TGC (⩓) zeigen eine schwächere Reaktion.

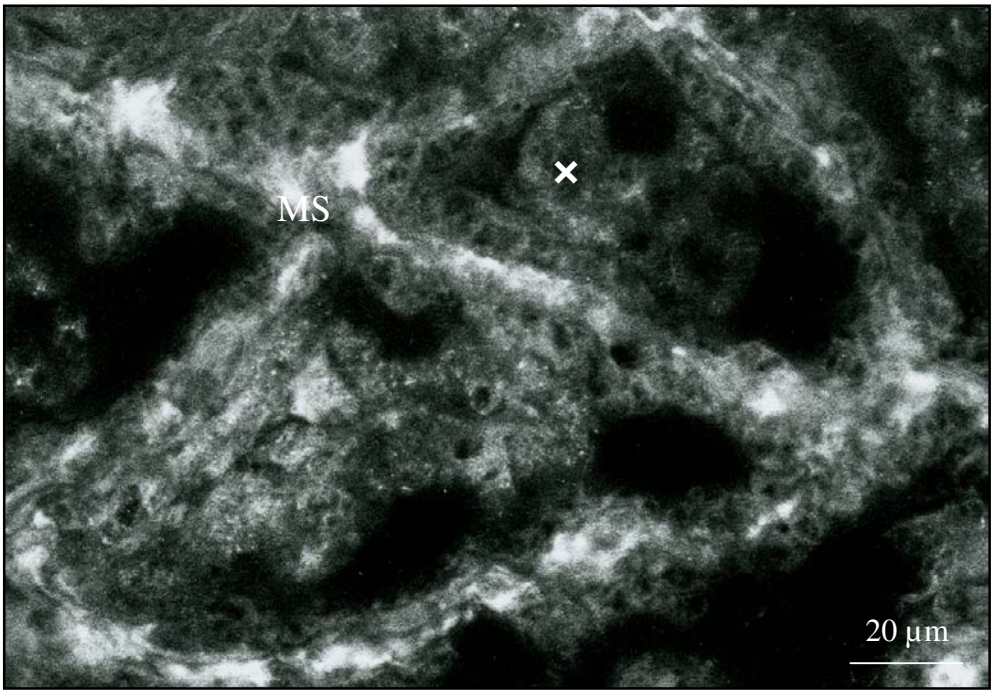


Abbildung 16: Integrin α_v, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Fluoreszenzsignale für α_v treten im MS auf. In den fetalen Zotten zeigt sich ein leichter Hintergrund (✕).

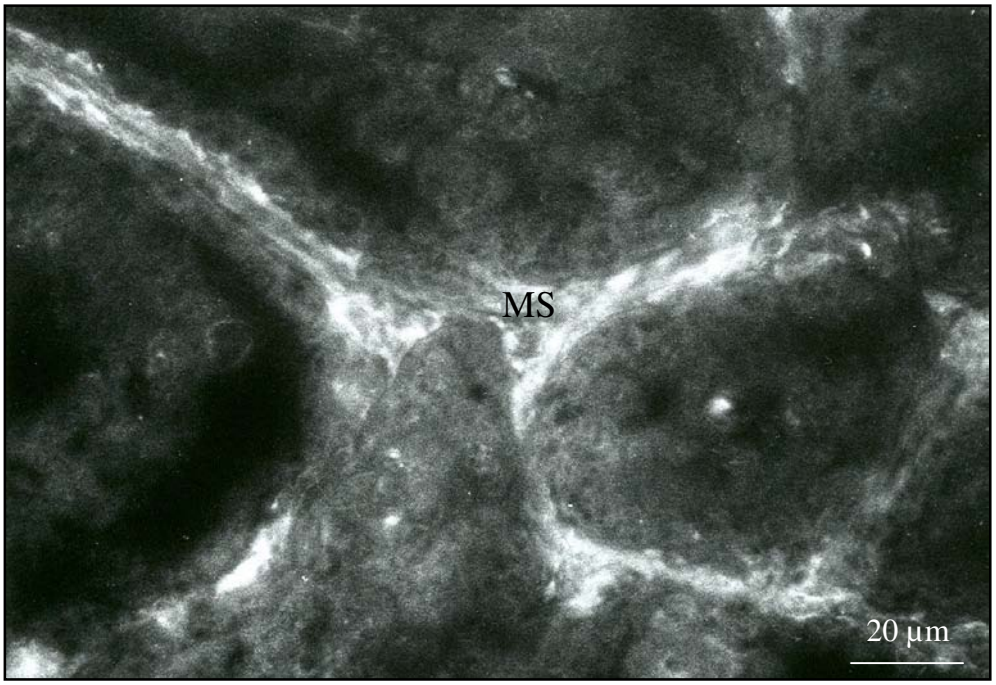


Abbildung 17: Integrin β_3, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Eine deutliche Fluoreszenz, hervorgerufen durch die Integrinuntereinheit β_3, zeigt sich im Stroma der maternalen Septen (MS).

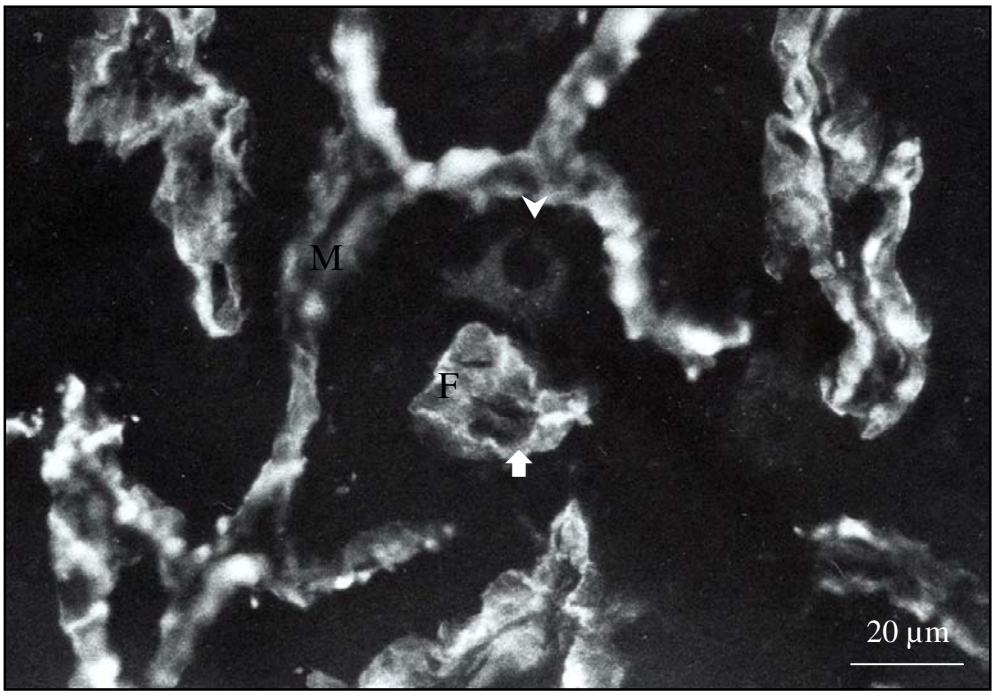


Abbildung 18: Laminin, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Quer getroffene fetale Zotten (F) und maternale Krypten (M). Der Antikörper Laminin zeigt eine Immunfluoreszenz in den BM des fetalen Trophoblasten (⬆) und des maternalen Kryptenepithels ebenso wie in den TGC (⋀).

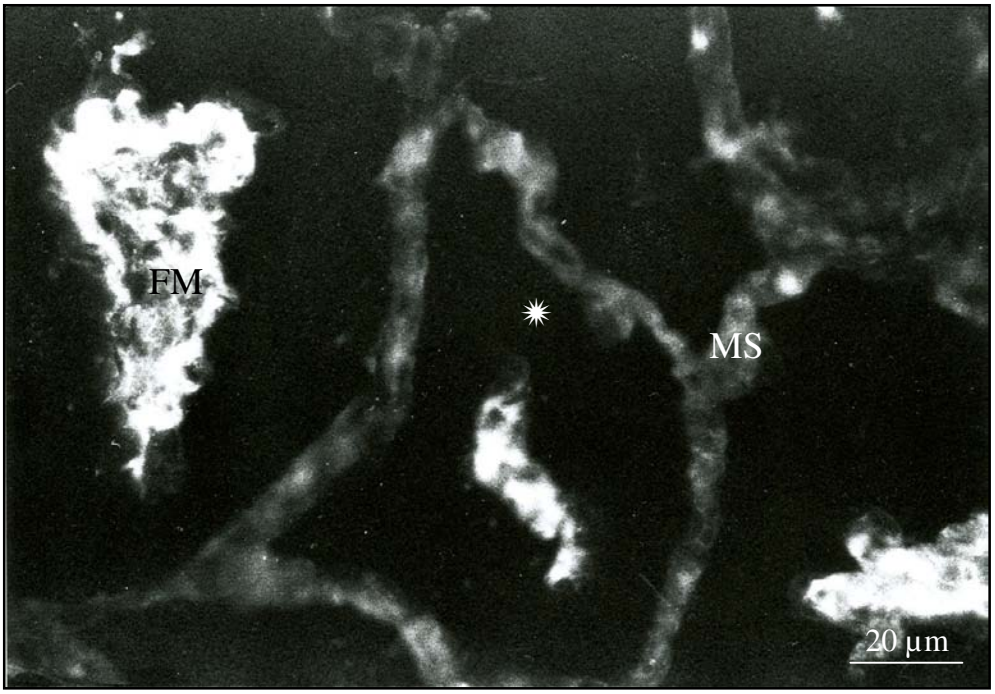


Abbildung 19: Fibronectin, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Fibronectin führt zur einer intensiven Fluoreszenz im fetalen Mesenchym (FM) und einer vergleichsweise schwachen Reaktion im maternalen Stroma (MS). Die aufgelagerten Epithelien sind negativ (✷).

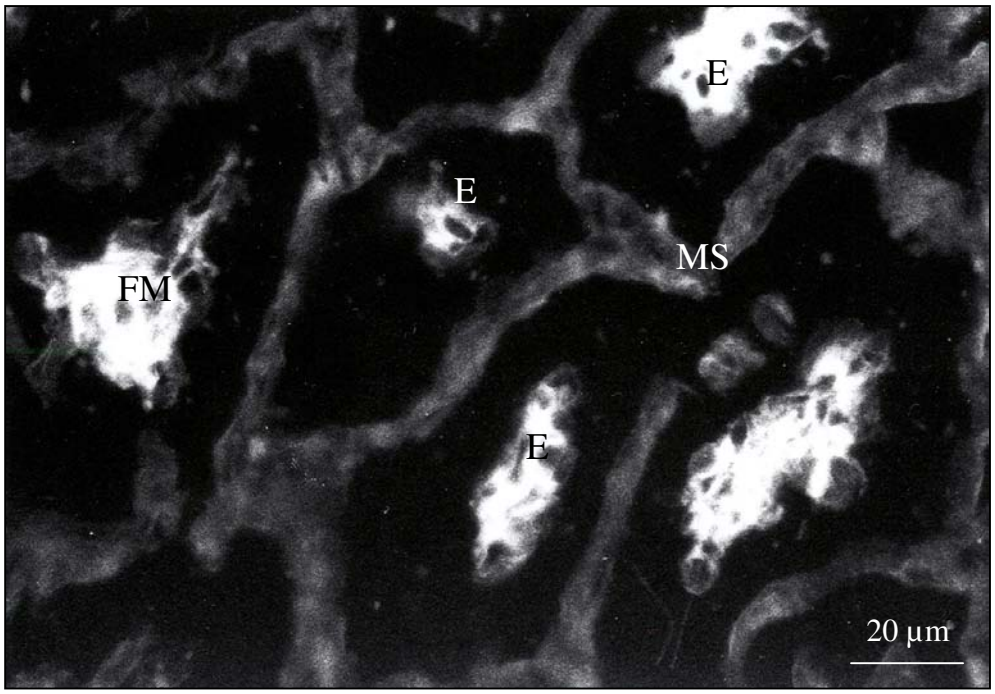


Abbildung 20: Kollagen IV, GS, SSL 48 cm, 6. Monat. Krypten und Zotten quer getroffen. Fluoreszenzreaktionen für Kollagen IV zeigen sich im Mesenchym (FM) sowie den Basalmembranen der fetalen Zotten besonders intensiv und relativ schwächer in den maternalen Krypten (MS). Auch die Basallaminae der Endothelien (E) reagieren positiv.

5.2. Untersuchungen an kultivierten Plazentazellen

5.2.1. Methodische Ergebnisse

Es wurde eine Methode etabliert, mit der Karunkelepithelzellen und Trophoblastzellen isoliert und kultiviert werden konnten. Das am besten geeignete Trächtigkeitsstadium zur Gewinnung der Plazentome war der Zeitraum vom dritten bis zum vierten Monat, zu dieser Zeit waren die Handhabung (speziell die Trennbarkeit des Plazentoms und dessen Größe), die Zellausbeute und das Wachstum der Zellen in Kultur ideal. Die enzymatische Gewebedisaggregation mit CLS I führte zu einer deutlich höheren Zellausbeute und (Über)Lebensfähigkeit der Zellen als die mechanischen Trennverfahren. CLS I wurde in einer Konzentration von 200 U/ml bei 37 °C über 60-90 min verwendet. Eine Anreicherung der gewünschten Epithelzellen schon bei der Gewinnung der Zellen konnte durch ein gezieltes Abbinden des Gewebes (siehe Abb. 6) und anschließendes Hängen in die Enzymlösung erreicht werden. Die erhaltenen Mischkulturen wiesen ein gutes Verhältnis von „kontaminierenden“ Fibroblasten auf, die für das Wachstum der Epithelzellen wichtige Faktoren produzierten, andererseits aber in so geringer Zahl vorhanden waren, dass es nicht zu einem Überwuchern der Epithelzellen kommen konnte. Die allgemein gebräuchliche Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml erwies sich auch für diese Primärkulturen als geeignet. Im Gegensatz zu Zellen maternalen Ursprungs, die das beste Wachstum in DMEM mit Ham´s F-12 mit 10 % FKS zeigten, stellte sich heraus, dass Zellen aus dem fetalen Kompartiment des Plazentoms anspruchsvoller in Bezug auf die Handhabung und die Kultivierungsbedingungen waren. Für sie war das Epithelzellmedium Quantum 286 besser geeignet. Da die Zellen nach der Isolation nur langsam adhärierten, wurden die Kulturschalen in den ersten zwei bis drei Tagen nur von außerhalb des Brutschrankes beobachtet. Anstatt eines kompletten Mediumwechsels wurde jeweils die Hälfte des Mediums belassen und nur die andere Hälfte ersetzt, so dass wichtige, von den Zellen sezernierte Stoffe erhalten blieben und gleichzeitig neue Nährsubstanzen zugeführt wurden. Aufgrund des Wachstums im Verband blieben vor der ersten Passagierung in der Kulturflasche Bereiche zellfrei, obwohl nach circa 10 Tagen von einem konfluenten Zellrasen gesprochen werden konnte. Eine zweite Anreicherung der gewünschten Epithelzellen wurde beim Passagieren durch partielles Trypsinieren aufgrund selektiven Ablösens der Zellen erreicht. Hierzu wurde eine unterschiedlich lange Inkubationsdauer mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA gewählt. Dabei lösten sich erst die fibroblastoiden Zellen von ihrem Substrat und in einem zweiten Schritt konnten die Epithelzellen, zum Teil auch unter zur Hilfenahme eines Zellschabers, gewonnen werden und auf Deckgläser in 6-Well-Platten

ausgesät werden. Die Zellpopulation blieb somit eine Mischkultur, allerdings mit einem sehr hohen Anteil epitheloider Zellen von etwa 90 %. Zum Teil wuchsen beide Zelltypen auf verschiedenen Ebenen, so dass es zu Überlagerungen kam (Abb. 33). Nach der zweiten oder dritten Passage wurden die Zellen den Immunfluoreszenzuntersuchungen zugeführt. Beschichtungen mit Kollagen oder der Zusatz von Hormonen (murines EGF in einer Konzentration von 0,5 µg/ml und Progesteron in einer Konzentration von 20 ng/ml) zeigten bezüglich des Wachstums oder der Generationszeit keine qualititativen Verbesserungen, so dass auf eine Quantifizierung verzichtet wurde. EGF wird aufgrund seines mitogenen Effekts üblicherweise in der Zellkultur zur Stimulation der Zellproliferation von Epithelzellen eingesetzt (Freshney, 2000c). Der Zusatz von EGF zur Kultur von Rinderzellen erscheint auf den ersten Blick unsinnig, da das Rind selbst kein EGF bildet. Allerdings besitzt das Rind einen EGF-Rezeptor, der unter physiologischen Bedingungen den ausschließlichen Rezeptor des Transforming Growth Factors-α, eines EGF-ähnlichen Faktors, darstellt (Kumar *et al.*, 1995) und an diesen Rezeptor kann das zugesetzte EGF binden.

5.2.2. Morphologie der kultivierten Zellen

Unter dem Mikroskop ließen sich die kultivierten Zellen anhand des Phänotyps in „epitheloide“ Zellen, die rundlich-ovoid mit „Straßenpflaster“-ähnlicher Struktur im Verband und oft in Wirbeln in klar umschriebenen Bereichen wuchsen und „fibroblastoide“ Zellen, die ein spindel- oder sternförmig bis polygonales Erscheinungsbild aufwiesen, differenzieren. Bewusst wurde zunächst auf die Verwendung der Begriffe „Epithelzellen“ und „Fibroblasten“ verzichtet. Vielmehr verlangt die Terminologie der Tissue Culture Association, dass zur Definition einer Zelle als Epithelzelle oder Fibroblast die charakteristischen Eigenschaften ausgeprägt sein müssen und die Herkunft der Zellen, die in Kultur genommen wurden, berücksichtig werden muss. In der vorliegenden Arbeit wird bei der morphologischen Zellidentifizierung *in vitro* von epitheloid/epithelähnlich oder fibroblastoid/fibroblastenartig gesprochen (Abb. 21), bis eine eindeutige Charakterisierung anhand der exprimierten Zytoskelettbestandteile durchgeführt wurde.

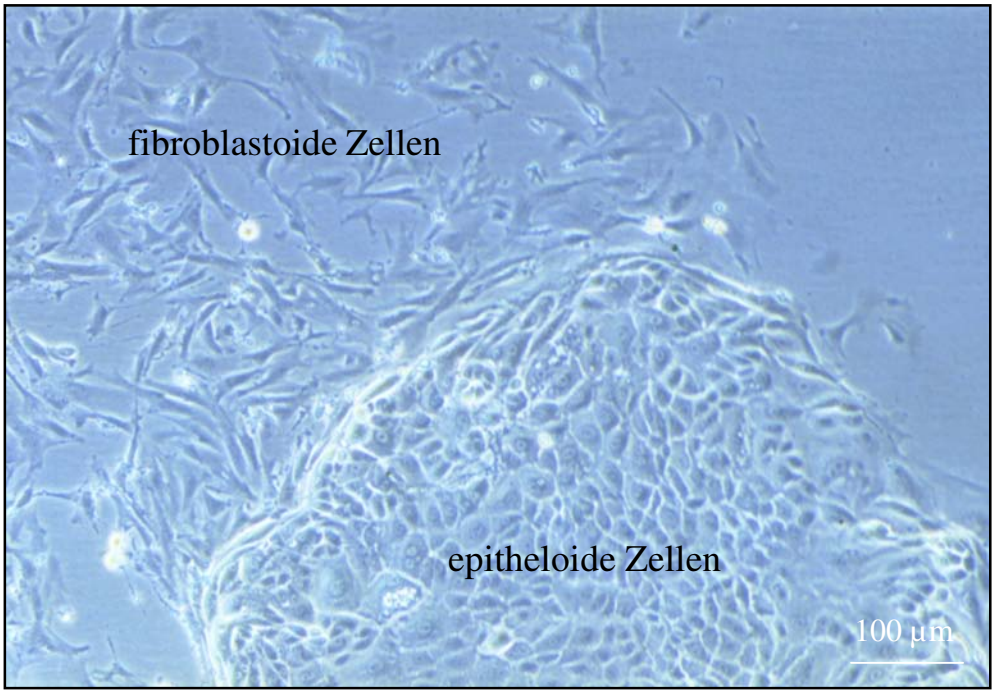


Abbildung 21: Primärkultur aus einem Rinderplazentom am 10. Kulturtag, Inversmikroskop. Die Abbildung zeigt ungefärbte, adhärierte und ihre typischen morphologischen Charakteristika ausbildende Zellen aus einer Uteruskarunkel am 10. Tag ihrer Kultivierung in einer Zellkulturflasche und noch vor dem ersten Passagieren. In der linken oberen Bildhälfte sind vorwiegend einzeln liegende fibroblastoide Zellen dargestellt. Der Zellverband in der rechten unteren Ecke dagegen zeigt die mit gegenseitigem Kontakt und in umschriebenen Bereichen wachsenden epitheloiden Zellen.

5.2.3. Charakterisierung der Uterusepithelzellen

5.2.3.1. Zytoskelettbestandteile

Der verwendete Cytokeratin-Cocktail Antikörper detektierte das Zytoskelett der Uterusepithelzellen. Die jeweiligen Keratinfilamente traten gleichmäßig im Zytoplasma verteilt auf, wobei die Bereiche des Zellkerns ausgespart blieben (Abb. 22). Direkt um den Kern allerdings konnte eine Anhäufung von Cytokeratinen festgestellt werden. Weniger Signal zeigte sich in der Peripherie der einzelnen Zellen, wo der Übergang zu benachbarten Zellen stattfand, so dass je nach Zelldichte eine Abgrenzung der Zellen möglich war.

Vimentin erzeugte stark positive Signale in Fibroblasten wobei die Filamente relativ lang waren und einen geraden Verlauf aufwiesen (Abb. 23). Außerdem zeigten die epitheloiden Zellen ein schwaches Signal für Vimentin, bei welchem die einzelnen Strukturen jedoch weniger deutlich erkennbar waren.

Actinfilamente wurden ausschließlich in fibroblastoiden Zellen beobachtet. Die Filamente durchzogen die Zellen mit einem gerichteten, dichten Geflecht. Zu unbewachsenen Flächen der Kulturgefäße bildeten sie flächige Fortsätze (Lamellipodien) oder spitze Ausläufer (Abb. 24) aus. Epitheloide Zellen zeigten zu keiner Zeit Actinfilamente.

Nur wenige nicht-epitheloide Zellen, die außerdem deutlich größer als die zuvor beschriebenen Zellen waren, wiesen eine starke Immunreaktion für das Intermediärfilamentprotein Desmin auf (Abb. 25). Die kräftig fluoreszierenden Faserstrukturen traten in besonders hohen Konzentrationen in den Zellausläufern auf. Der Bereich des Zellkerns blieb reaktionslos.

5.2.3.2. Integrinuntereinheiten

Kultivierte Epithelzellen aus der Uteruskarunkel exprimierten wie auch in vivo die beiden Integrinuntereinheiten α_6 und β_1 (Abb. 26, 27). Mittels Doppelmarkierungen konnte an Stellen, wo beide Untereinheiten kolokalisiert auftraten, bei der Betrachtung des überlagerten Bildes ein gelb-oranges Signal beobachtet werden (Abb. 28). Besonders dort, wo die Zellmembranen benachbarter Zellen miteinander im Kontakt standen, wurden beide Untereinheiten gebildet. Entsprechend sah man dort durchgezogene, stark fluoreszierende Signallinien. Fluoreszenzen geringerer Intensität traten für beide Integrinuntereinheiten perinukleär zum Anheftungssubstrat hin auf. Die Integrinuntereinheit α_v zeigte im Epithel nur wenig Fluoreszenz, die aber interessanterweise mit FN kolokalisiert war, wohingegen die Untereinheit β_3 im Epithel nicht exprimiert wird (Abb. 30). Allerdings wurde das β_3 Integrin in fibroblastoiden Zellen beobachtet, die vereinzelt zwischen der Epithelpopulation auftraten und bildete punktuelle Akkumulationen zur Unterlage hin (Abb. 31).

5.2.3.3. Bestandteile der ECM

Kultivierte Zellen aus dem maternalen Teil des Plazentoms waren in der Lage, Laminin als Unterlage für die Epithelzellen zu produzieren, welches vor allem in den kernnahen Gebieten der Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 29).

Fibronectin wurde vor allem von fibroblastoiden Zellen gebildet, jedoch in kleinen Mengen, die in Form von fokalen Akkumulationen auch zwischen den Epithelzellen beobachtet wurden (Abb. 30). Kollagen IV konnte im Karunkelepithel nicht nachgewiesen werden, weshalb auf die Darstellung verzichtet wurde.

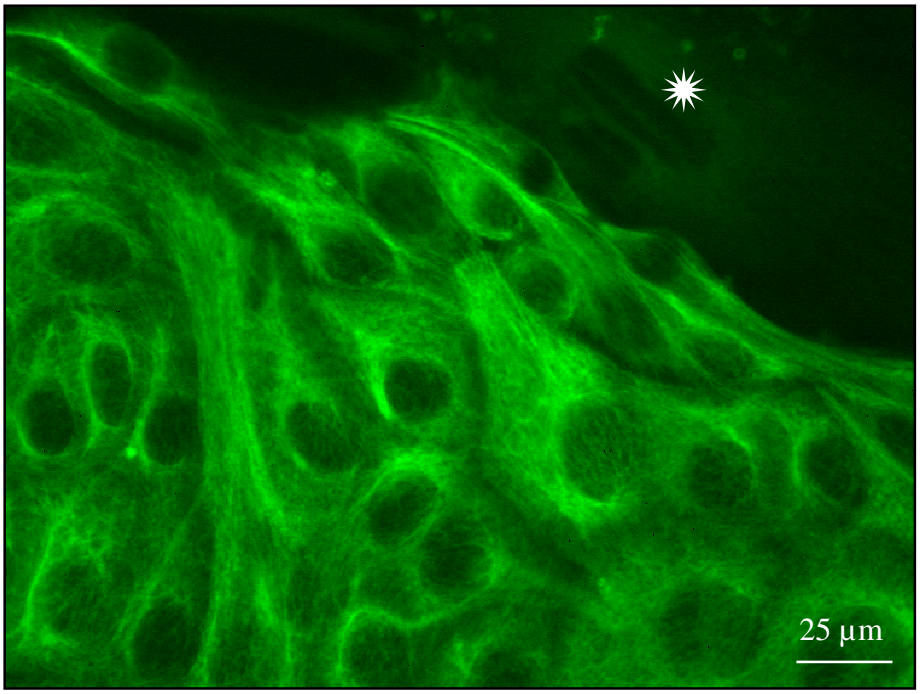


Abbildung 22: Uterusepithel (UE), Cytokeratin-Cocktail (CK). Nur die typischerweise im Verband wachsenden Epithelzellen aus der Uteruskarunkel werden mit dem CK Antikörper markiert. Dagegen sind fibroblastoide Zellen (✷) komplett negativ.

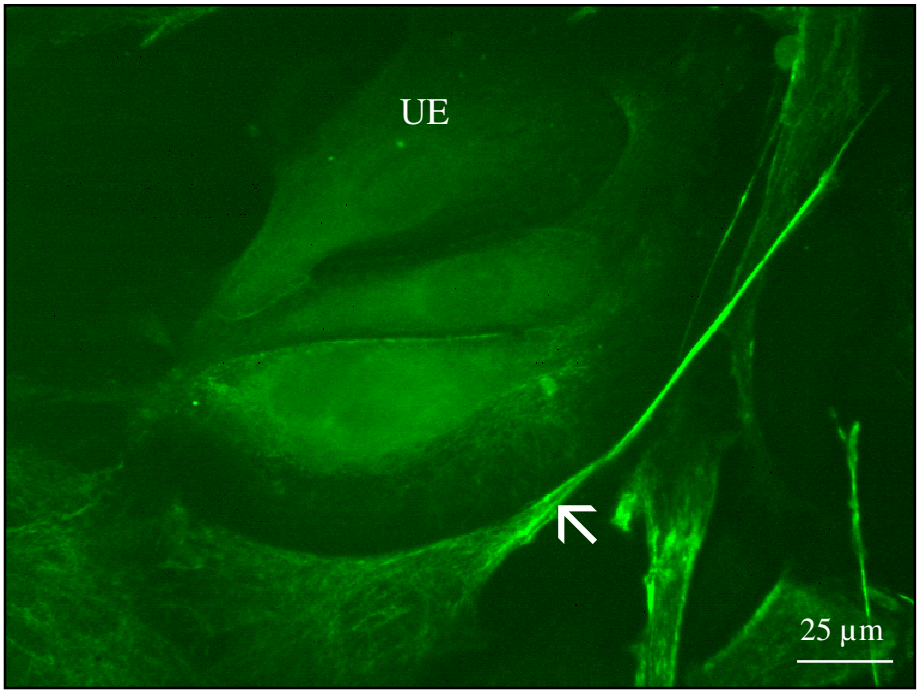


Abbildung 23: UE, Vimentin. UE Zellen sind schwach positiv, während fibroblastoide Zellen (↖) eine deutliche Fluoreszenzreaktion zeigen.

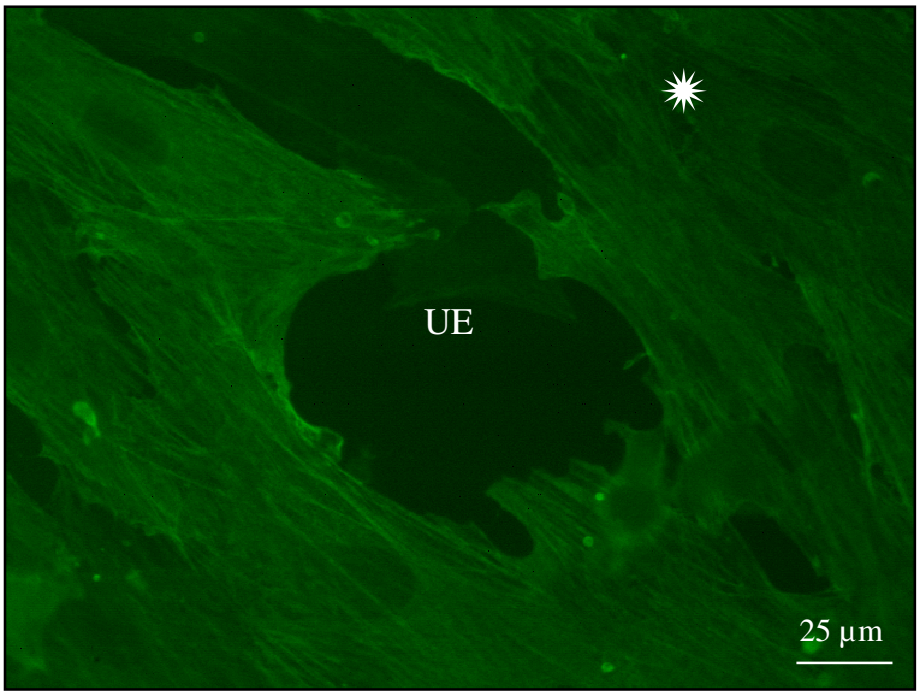


Abbildung 24: UE, α-sm Actin. Nur die fibroblastoiden Zellen, die die negativen UE Zellen (✷) umgeben, sind schwach positiv. Sie zeigen ein gerichtetes Netzwerk von Actinfasern.

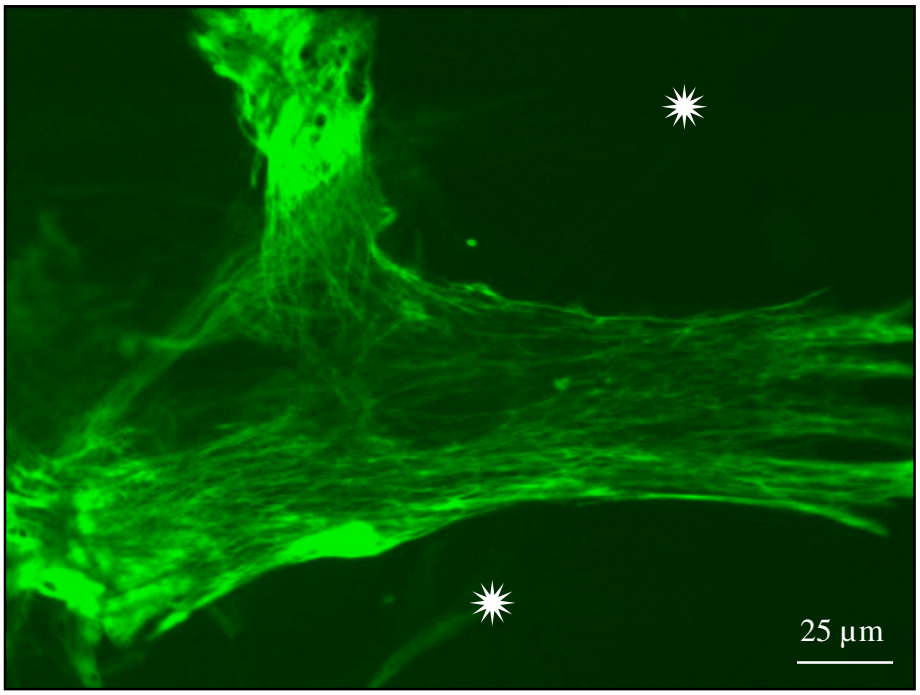


Abbildung 25: UE, Desmin. Desminfilamente kommen nur in glatten Muskelzellen vor, die auch eine deutlich abweichende Morphologie haben. Die benachbarten Epithelzellen (✷) sind Desmin negativ.

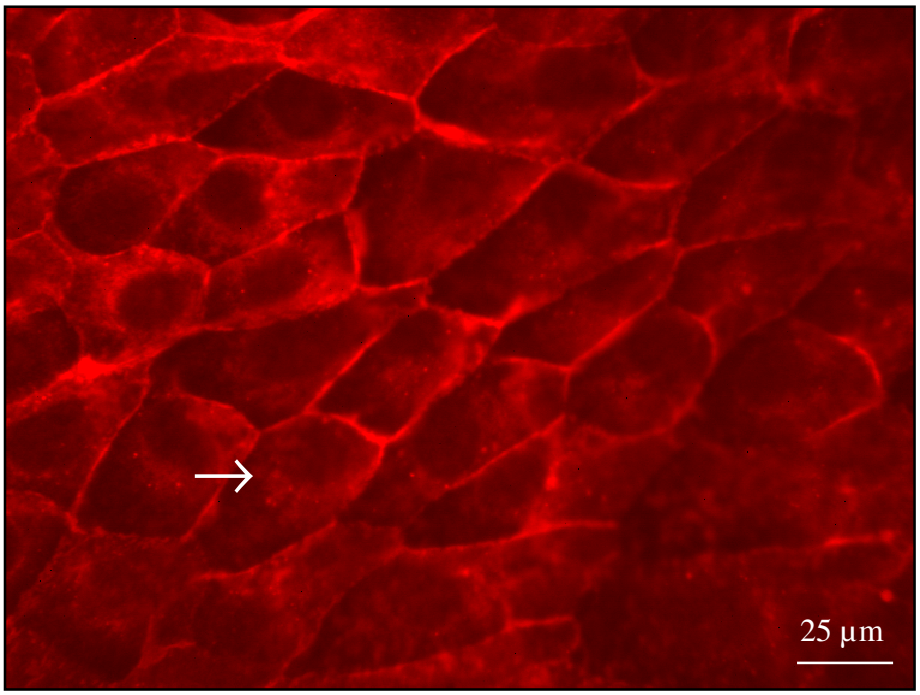


Abbildung 26: UE, Integrin α_6. α6 ist an den Zell-Zellgrenzen epitheloider Zellverbände lokalisiert. Ferner wird die Untereinheit α6 schwächer in Richtung Kulturflaschenboden (→) exprimiert.

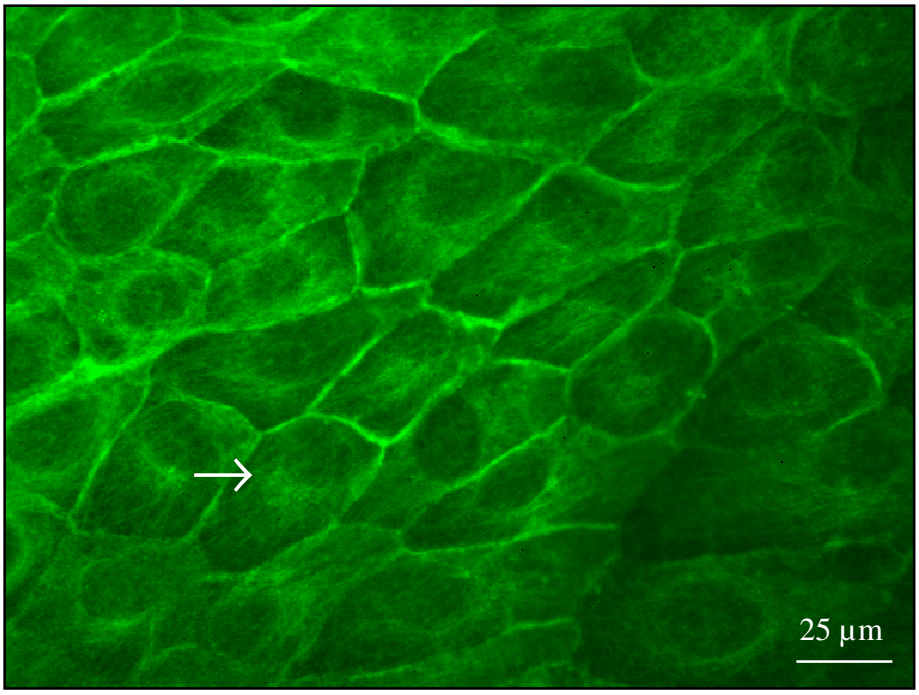


Abbildung 27: UE, Integrin β_1. Das Fluoreszenzsignal für β1 in kultiviertem UE ist an den Zell-Zellgrenzen und zum Substrat hin (→) zu der Integrinuntereinheit α6 kolokalisiert.

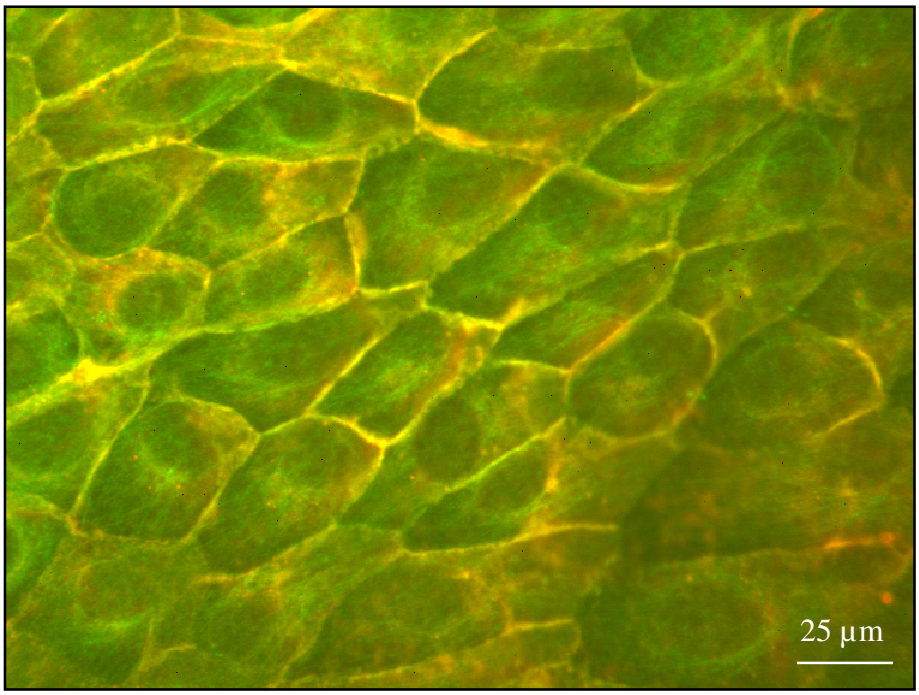


Abbildung 28: UE, Doppelmarkierung Integrin $\alpha_6\beta_1$. Die Untereinheit β_1 fluoresziert grün, während die α_6-Untereinheit rot erscheint. Zu den Zell-Zellgrenzen und zum Substrat hin kolokalisierte Integrinuntereinheiten erscheinen orange-gelb.

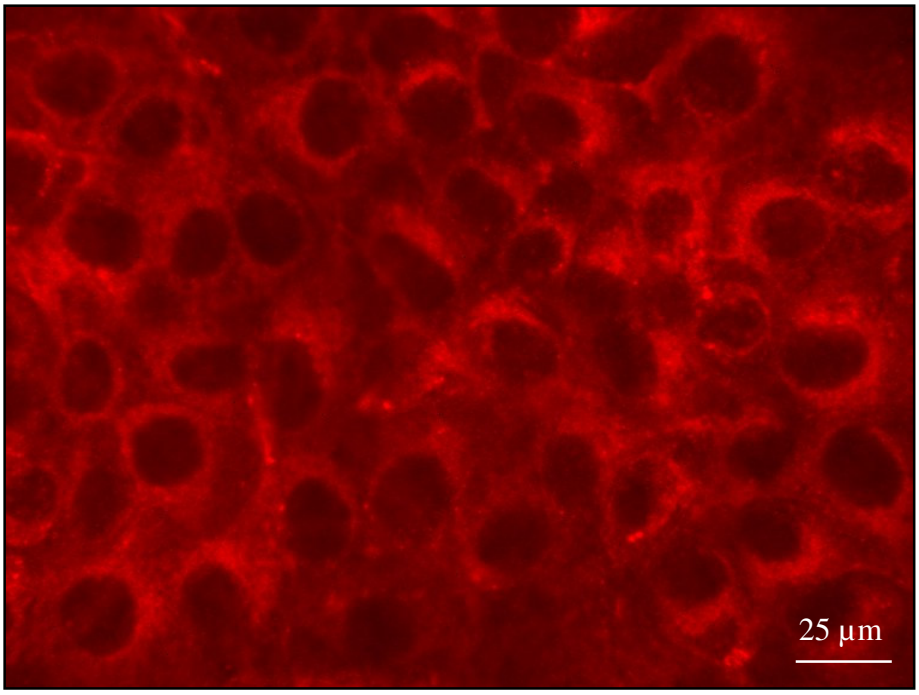


Abbildung 29: UE, Laminin. UE Zellen adhärieren über basal exprimiertes Laminin an das Substrat welches hier zu den Integrinuntereinheiten α_6 und β_1 kolokalisiert ist (vergl. Abb. 28).

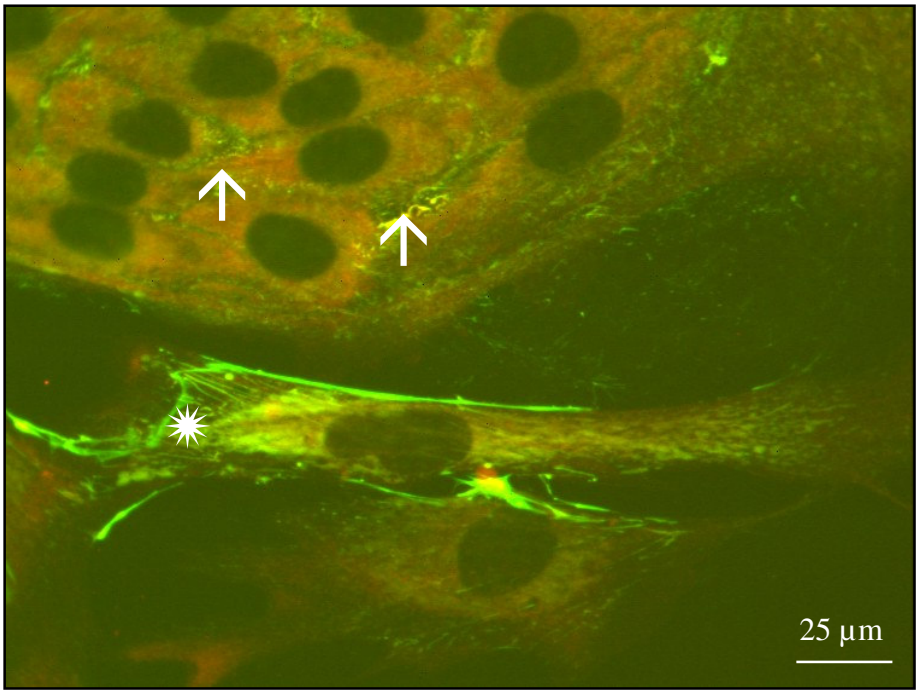


Abbildung 30: UE, Integrin α_v und Fibronectin (FN). Gelbe Signale demonstrieren die Kolokalisation von α_v und FN in einem punktförmigen Färbemuster an den Zellgrenzen des Epithels (↑). Fibroblasten (✷) zeigen dagegen eine starke positive grüne Fluoreszenz.

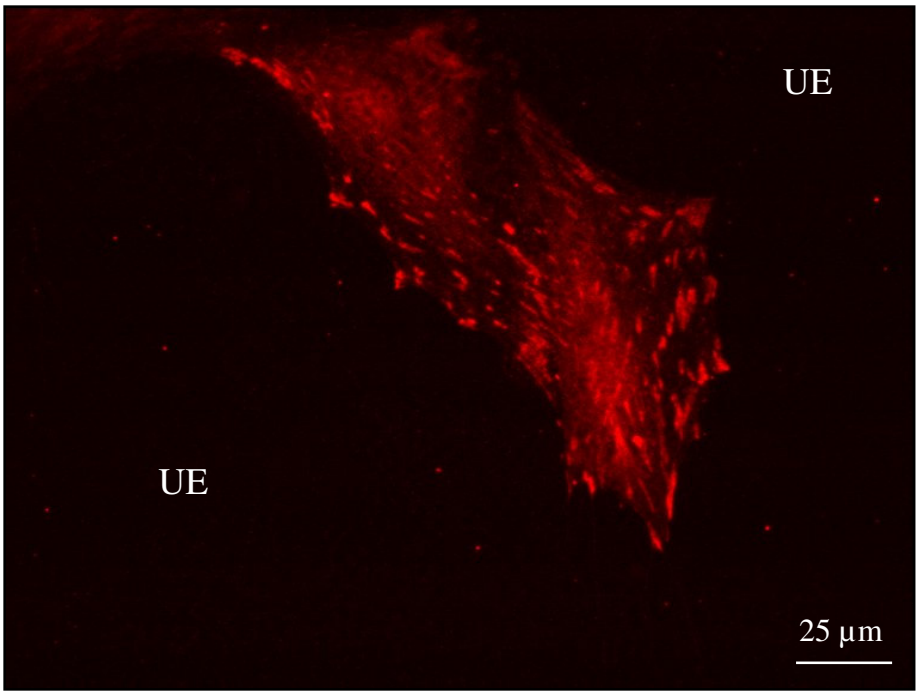


Abbildung 31: UE, Integrin β_3. Die Expression von β_3 findet nicht an den Kontaktstellen von Zellen statt, vielmehr exprimieren fibroblastoide Zellen fokale Akkumulationen zur Unterlage hin. Zu beachten ist, dass umgebende UE Zellen negativ sind.

5.2.4. Charakterisierung der Trophoblastzellen

5.2.4.1. Zytoskelettbestandteile

Wie bei den maternalen Zellen wurde auch bei den fetalen Zellen zuerst eine Charakterisierung anhand der Zytoskelettbestandteile vorgenommen, bevor sie auf ihre Integrinexpression und die von ihnen gebildeten ECM-Bestandteile untersucht wurden. Das Markerprotein Cytokeratin konnte ebenfalls bei den Trophoblastzellen gezeigt und zur Bestätigung des epithelialen Charakters verwendet werden (Abb. 32). Diese Trophoblastzellen wuchsen mit einer "Straßenpflaster"-artigen Morphologie. Uninukleäre Trophoblastzellen wurden nicht von TGC unterschieden.

Die Epithelzellen waren schwach Vimentin positiv. Im Vergleich dazu verursachte der Marker für mesenchymale Zellen eine starke Reaktion in den benachbarten fibroblastoiden Zellen (Abb. 33).

Aus der Kotyledone isolierte Zellen zeigten bis auf einige wenige Ausnahmen, nämlich die Zellen aus dem im Chorionzottenbaum vorhandenen Gefäßen, keine Immunreaktion mit α-smooth muscle Actin und die positiven Zellen wiesen ein von Epithelzellen abweichendes Aussehen auf (Abb. 34).

Auch die Zellen, bei denen eine Desminexpression nachweisbar war, kamen nur in einem geringen Prozentsatz bezogen auf die gesamte isolierte Zellpopulation vor und ihre Morphologie wich stark von der der Trophoblastzellen ab, denn diese Muskelzellen waren länglich und kamen vereinzelt zwischen den Epithelkolonien vor (Abb. 35).

5.2.4.2. Integrinuntereinheiten

Die Integrinuntereinheiten α_6 und β_1, die zusammen als Integrin $\alpha_6\beta_1$ den Rezeptor für das Basalmembranprotein Laminin bilden, wurden in basalen Bereichen der fetalen Epithelzellen vorgefunden (Abb. 36, 37). Hervorzuheben ist ihre Kolokalisation mit Laminin in den Trophoblastzellen (Abb. 39). In den morphologisch identifizierten, kultivierten Epithelzellen wurden beide Untereinheiten des Integrins $\alpha_6\beta_1$ an den jeweils gleichen Stellen detektiert, nämlich in Bereichen, an denen die Zellen in Kontakt mit benachbarten Zellen standen und zum Kulturuntergrund hin. Die Untereinheit α_v wurde unter in vitro Bedingungen von den Trophoblastzellen in einer punktförmigen Anordnung in geringen Mengen an Zellkontaktstellen ausgebildet, wo auch von der Zelle produziertes FN auftrat (Abb. 40). Des weiteren wurde die Integrinuntereinheit β_3 an gleicher Stelle und mit identischem Reaktionsmuster detektiert (Abb. 41).

5.2.4.3. Bestandteile der ECM

Epithelzellen exprimierten Laminin zum Boden der Kulturflasche hin aus. Einzeln liegende Zellen zeigten dabei eine höhere Expression von Laminin als Zellen, die dicht neben anderen Zellen wuchsen. Der Bereich des Zellkerns blieb ausgespart. FN trat in geringer Menge zwischen nebeneinander liegenden Zellen auf. Solitär wachsende Zellen bildeten dagegen etwas mehr FN und fibroblastoide Zellen zeigten ein stark leuchtendes Signal auf.

Kollagen IV konnte in kultivierten Trophoblastzellen nicht nachgewiesen, weshalb auf eine Darstellung verzichtet wurde.

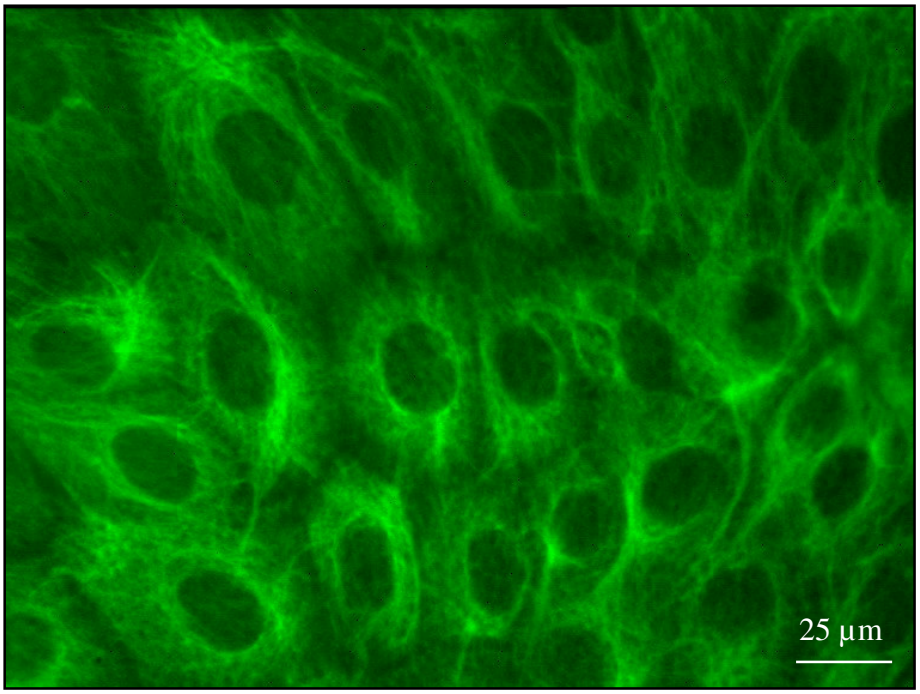


Abbildung 32: Trophoblastzellen (TZ), CK. Der epitheliale Charakter der fetalen Zellen wird durch eine deutlich positive IF Reaktion für CK und das typische Wachstum im Verband bestätigt.

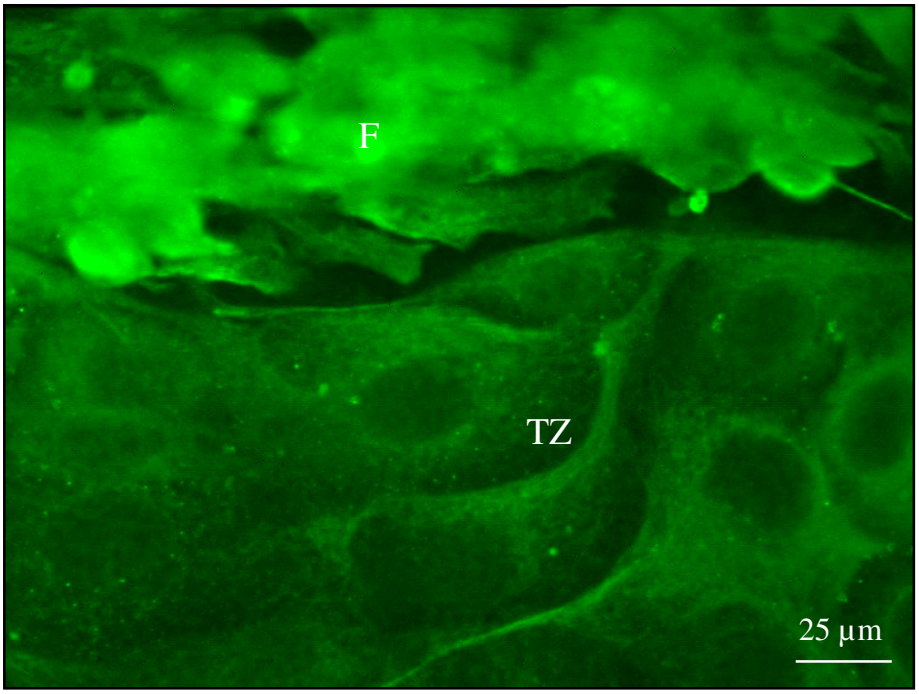


Abbildung 33: TZ, Vimentin. Die Trophoblastzellen sind schwach Vimentin positiv. Im Vergleich dazu wird in den benachbarten fibroblastoiden Zellen (F) eine starke Reaktion beobachtet.

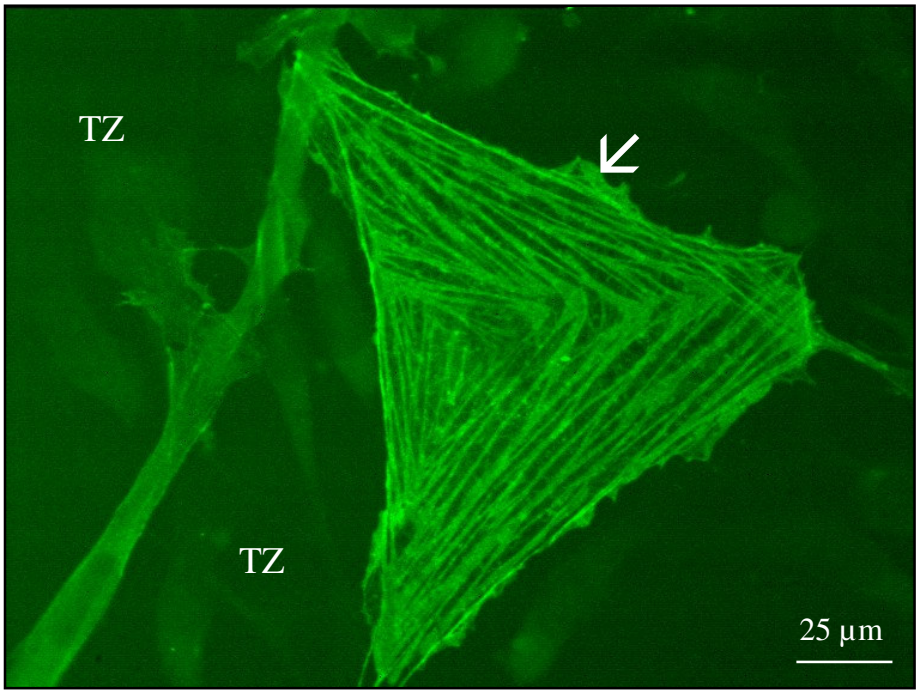


Abbildung 34: TZ, α-sm Actin. Die TZ sind negativ bezüglich α-smooth muscle Actin. Glatte Muskelzellen (↙) weisen eine deutlich abweichende Morphologie mit gerichteten Actinfilamenten auf.

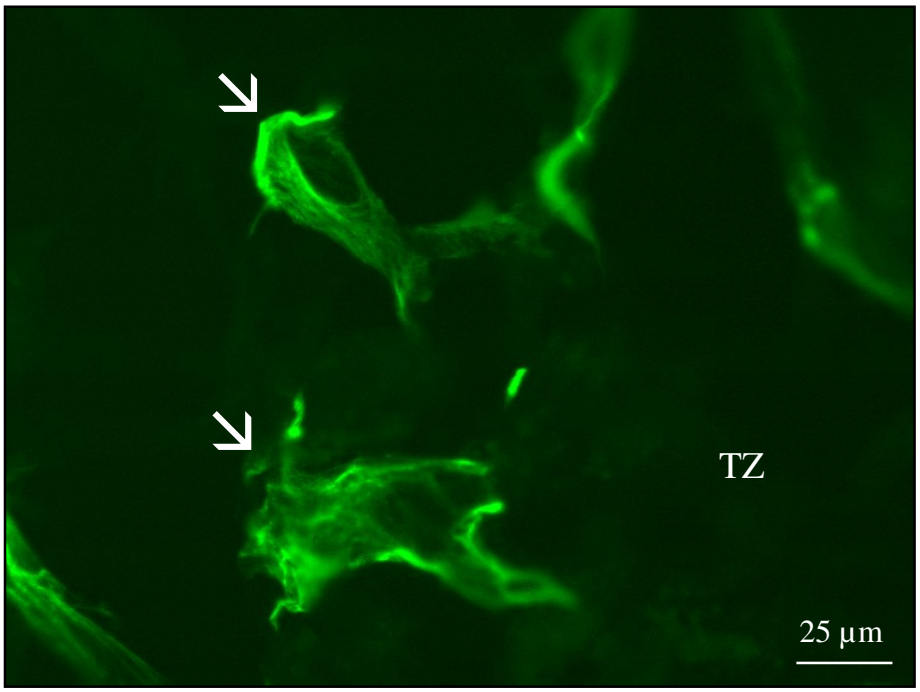


Abbildung 35: TZ, Desmin. TZ sind negativ bezüglich Desmin, nur vereinzelt kommen glatte Muskelzellen (↘) vor, die eine deutlich abweichende Zellform zeigen.

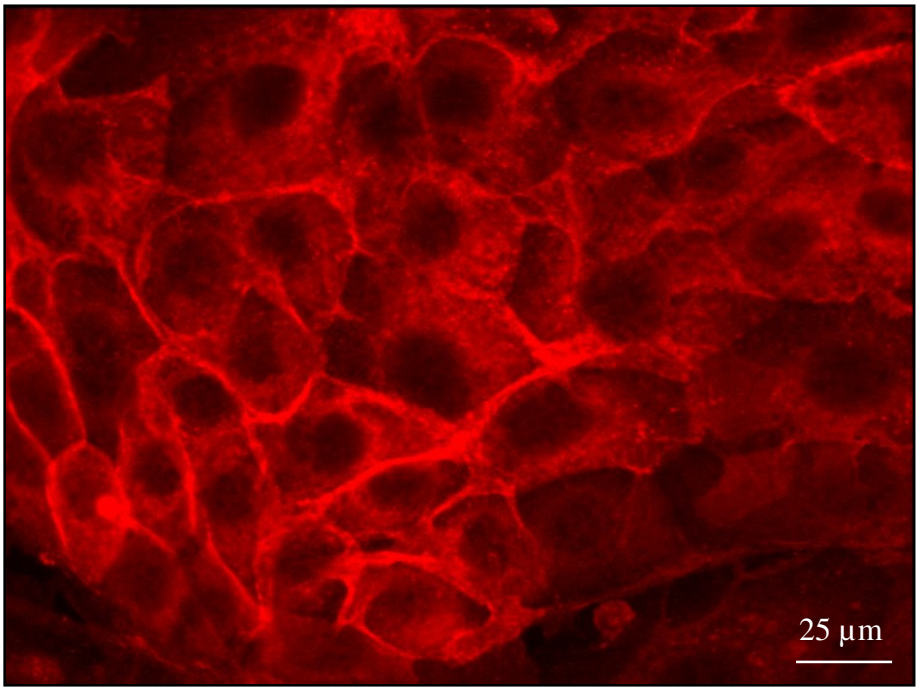


Abbildung 36: TZ, Integrin α_6, DM. Die rot fluoreszierende Integrinuntereinheit α_6 wird in TZ Kolonien an den Zell-Zellgrenzen und, mit Aussparung des Zellkernbereichs, nach basal zum Kulturgefäß hin exprimiert.

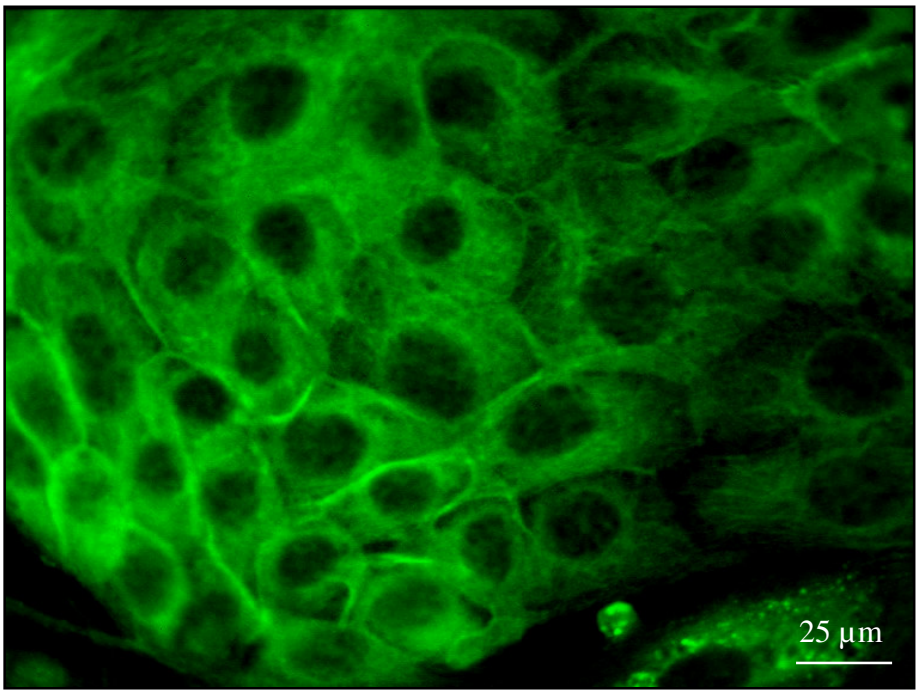


Abbildung 37: TZ, Integrin β_1, DM. Ausschnitt wie Abbildung 36. Die korrespondierende, grün fluoreszierende Untereinheit β_1 zeigt sich kolokalisiert zur α_6 Untereinheit.

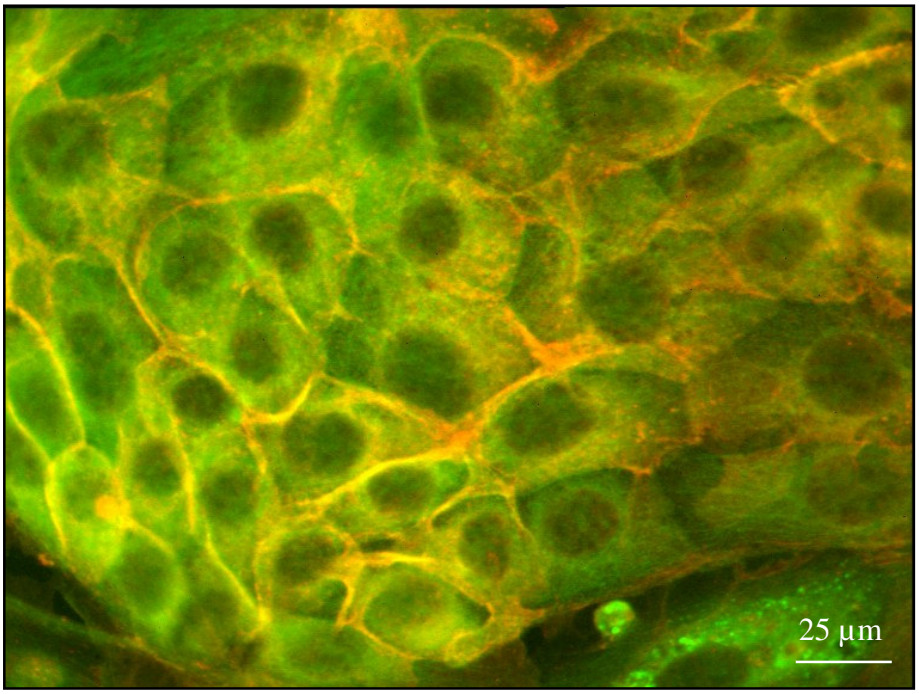


Abbildung 38: TZ, Doppelmarkierung Integrin α_6 und β_1. In der Überlagerung der Abbildungen 36 und 37 wird die Kolokalisation in Form von gelb-orangen Fluoreszenzen zwischen den Zellen und zum Boden der Kulturflasche sichtbar.

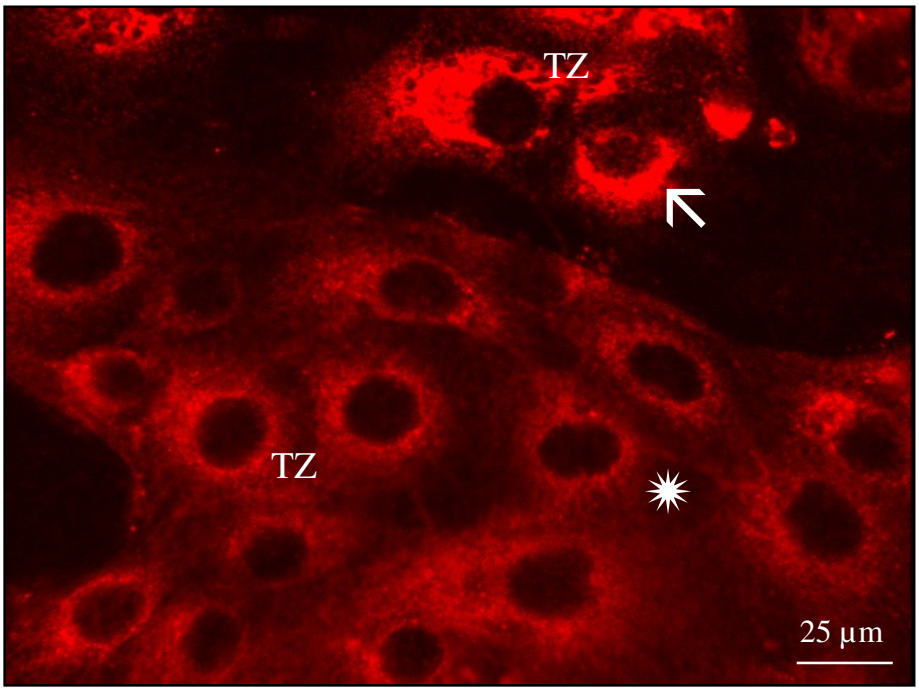


Abbildung 39: TZ, Laminin (LM). TZ exprimieren LM zum Boden der Kulturflasche hin, einzeln liegende Zellen (↖) bilden dabei mehr LM als Zellen, die mit zahlreichen anderen Zellen in Kontakt standen (✷).

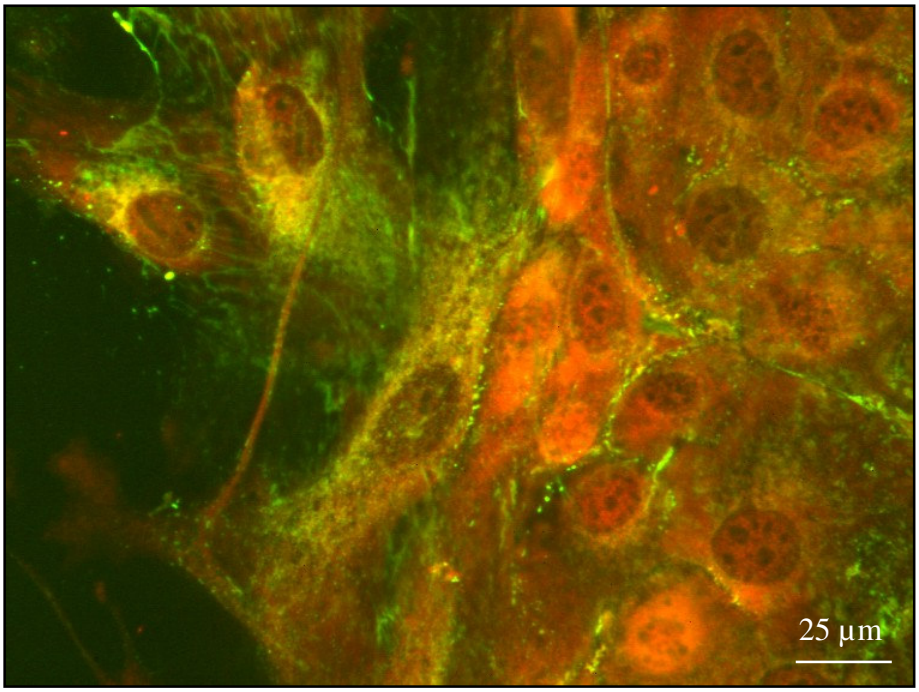


Abbildung 40: TZ, Doppelmarkierung Integrin α_v und Fibronectin (FN). αv (rot markiert) kann in vitro punktförmig an Zell-Zellgrenzen in Bereichen, wo auch FN (grünes Signal) sezerniert wurde, detektiert werden. Eine Überlagerung der Signale erscheint gelb.

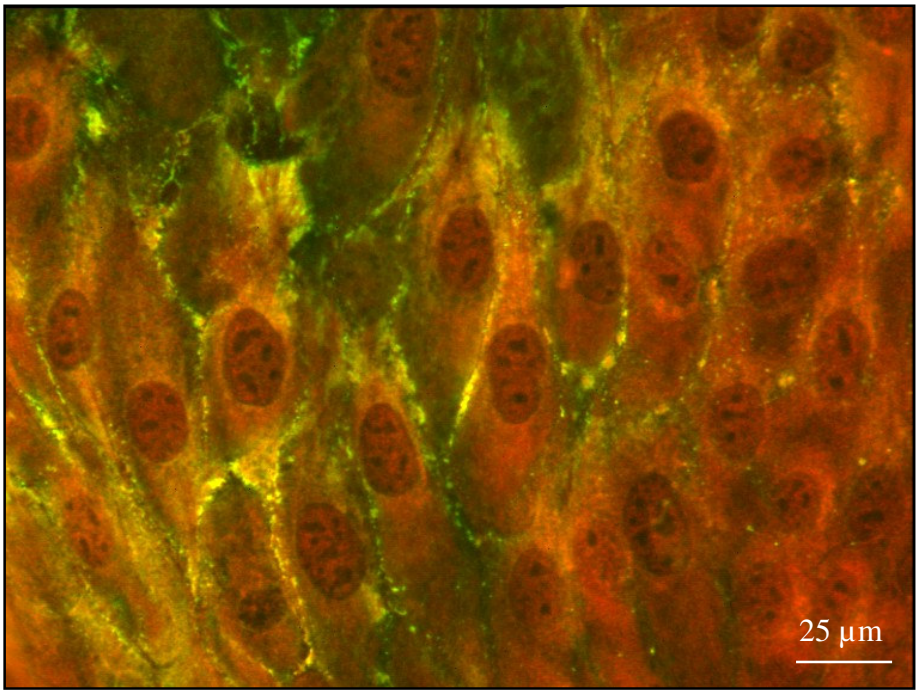


Abbildung 41: TZ, Integrin β_3 und FN. β_3 (Cy3 gekoppelt = rot) und FN (FITC markiert = grün) liegen kolokalisiert, also in Form gelber IF sichtbar, an den Zell-Zellgrenzen des Epithels.

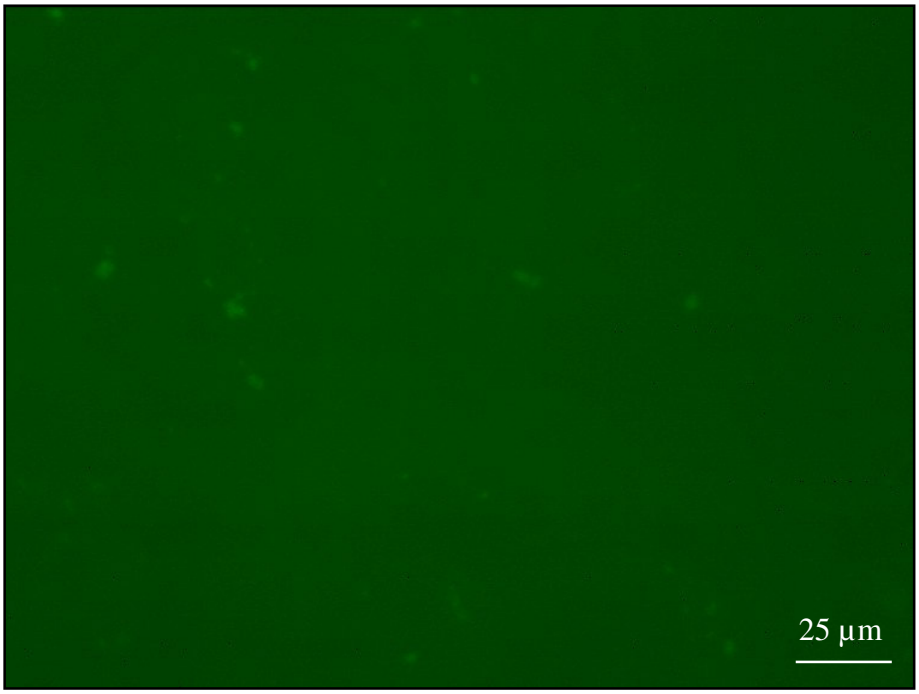


Abbildung 42: Negativkontrolle, FITC.

Für die Negativkontrollen wurde der jeweilige Primärantikörper durch AVP mit Eselserum ersetzt, hier ist eine Kontrolle mit dem Sekundärantikörper FITC abgebildet.

Abbildung 43: Negativkontrolle, Cy3.

Für die Negativkontrollen wurde der jeweilige Primärantikörper durch AVP mit Eselserum ersetzt, hier ist eine Kontrolle mit dem Sekundärantikörper Cy3 abgebildet.

5.2.5. Nachweis Integrin-spezifischer mRNA mittels RT-PCR

5.2.5.1. Nachweis der Integrine im Rinderplazentom durch RT-PCR in vivo

Die RT-PCR für die vier untersuchten Integrinuntereinheiten an Gesamthomogenat aus bovinen Plazentomen unterschiedlichen Trächtigkeitsalters (Tag 120, 190, 230) zeigte, dass in allen drei Stadien die spezifische mRNA exprimiert wurde. Die spezifischen PCR-Produkte wurden für Integrin α_6 (285 bp), für β_1 (313 bp), für α_v (295 bp) und für β_3 (392 bp) in den erwarteten Größen amplifiziert (Abb. 44).

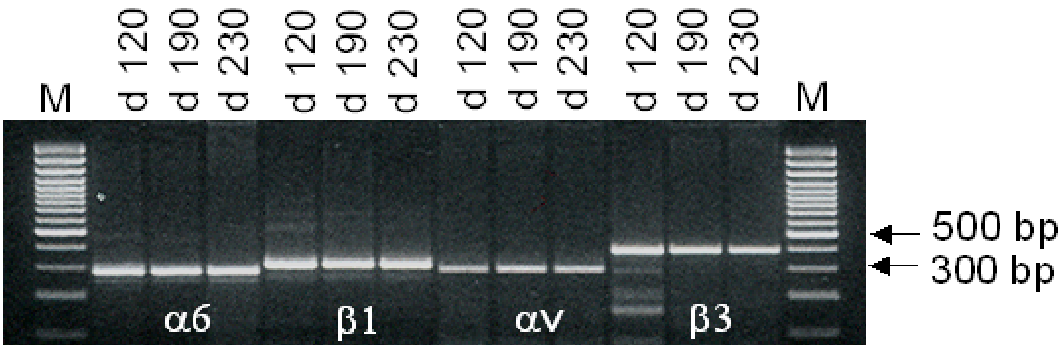


Abbildung 44: Nachweis Integrin-spezifischer mRNA in Plazenten unterschiedlichen Trächtigkeitsalters (Tag 120, 190, 230) mittels RT-PCR. Die Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 wurden in allen drei untersuchten Stadien im Rinderplazentom exprimiert. M entspricht einem 100 bp Marker.

5.2.5.2. Nachweis der Integrine mittels RT-PCR in kultivierten Plazentazellen des Rindes

Auch in kultivierten Rinderplazentomzellen (Uterusepithel, maternales Stroma, Trophoblastzellen und fetales Stroma) konnte mittels RT-PCR Integrin-spezifische mRNA nachgewiesen werden. Es ergaben sich für die Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 Banden in den erwarteten Größen (Abb. 45).

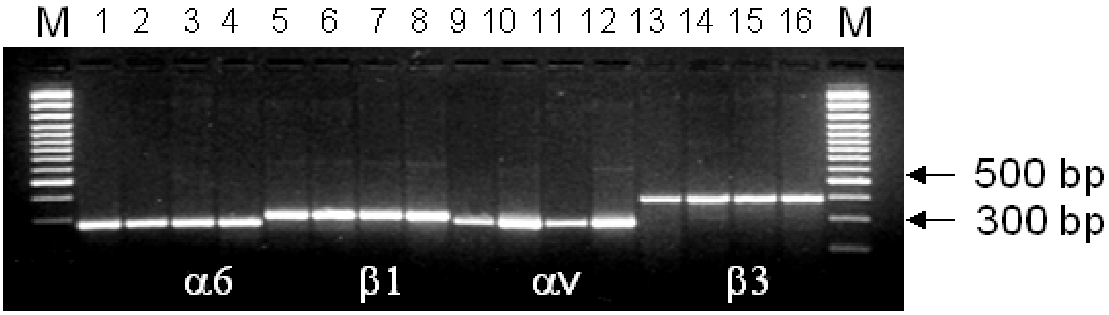


Abbildung 45: Nachweis Integrin-spezifischer mRNA in kultivierten Plazentazellen mittels RT-PCR. Spezifische mRNA für die Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 wurde in UE (Slots 1, 5, 9 und 13), maternalem Stroma (MS, Slots 2, 6, 10 und 14) TZ (Slots 3, 7, 11 und 15) und fetalem Stroma (FS, Slots 4, 8, 12 und 16) nachgewiesen. M entspricht einem 100 bp Marker.

5.2.5.3. Sequenzierungsergebnisse

Es wurde ein Single Read Prep (Sequenzierung) durchgeführt, um die Identität der Amplifikate als Integrinuntereinheiten zu bestätigen. Die Banden wurden hierzu aus dem Gel ausgeschnitten und in einem kommerziellen Labor sequenziert (Qiagen). Die erhaltenen Daten wurden mit Referenzsequenzen, die in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind, verglichen. Hierbei stellte sich für das Integrin α_6 eine 87%ige Homologie (188/216 und 193/221) zur Sequenz „Homo sapiens integrin α_6, NM_000210“ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $2e^{-52}$ heraus. Für Integrin β_1 wurde eine 99%ige Gleichheit (237/239 und 234/236) zur Sequenz „Bos taurus integrin β_1 subunit precursor protein“ mit der Genbank-Nummer AF468058.1 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von e^{-126} erzielt. Auch für das Integrin α_v konnte eine spezifische Sequenz für das Rind gefunden werden und das eingesandte Amplifikat wies zur Sequenz „AF239958.2, Bos taurus α_v subunit precursor mRNA“ eine 100%ige Homologie (214/214 und 226/226) mit e^{-116} auf. Das Integrin β_3 stimmte zu 95 % (296/309 und 250/261) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.0e mit der Sequenz „AF349462 Ovies aries integrin β_3 mRNA“ überein.

6. Diskussion

6.1. Etablierung eines Zellkulturmodells für bovine Plazentazellen

Das wichtigste Ziel der vorliegenden Arbeit war die reproduzierbare Etablierung eines Zellkulturmodells für bovine Plazentazellen, hierfür die Wahl des geeigneten Trächtigkeitsstadiums, der besten Methode der Gewebedisaggregation und die Schaffung idealer Bedingungen für eine Kultivierung über mehrere Passagen und die Charakterisierung der gewonnenen Zellen. Dafür galt es, verschiedene Aspekte zu beachten.

Der Transport des Gewebes auf Eis erfolgte so, dass der trächtige Uterus auf dem Weg zum Labor geschlossen blieb, um die Kontaminationsgefahr des Zielgewebes möglichst gering zu halten. Die Präparation fand unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank statt, wodurch eine Kontamination mit Pilzen oder Bakterien meist verhindert werden konnte. Der Zusatz eines Antibiotikums zur Kultur ist empfehlenswert, wohingegen erfahrungsgemäß kein Antimykotikum nötig wurde, welches zudem die empfindlichen Zellen zusätzlich angegriffen hätte.

Die Trennung des Plazentoms in fetale Kotyledone und maternale Karunkel wurde manuell durchgeführt. Dieses Vorgehen ist allgemein akzeptiert (Reimers *et al.,* 1985; Gross & Williams, 1988; Munson *et al.,* 1988; Feng *et al.,* 2000a; Takahashi *et al.,* 2001b; Nakano *et al.,* 2001; 2002a; MacIntyre *et al.,* 2002) und es wird davon ausgegangen, dass eine vollständige Separation bis zum 140. Tag der Trächtigkeit möglich ist und erst zu einem späteren Zeitpunkt das fetale Gewebe nennenswert mit maternalem Gewebe verunreinigt ist, wobei jedoch der Anteil des Karunkelgewebes weniger als 1 % beträgt (Shemesh *et al.*, 1984). Noch sicherer kann man bis zum Tag 100 sein, wo nach der stumpfen Abtrennung keine der fingerartigen Fortsätze des kotyledonären Gewebes in der Karunkel zurückbleiben (Shemesh *et al.*, 1994). Um eine effektive Separation in maternales und fetales Gewebe sicherzustellen und weil mit unserer Methode die Handhabbarkeit bezüglich Isolierung und Wachstumsverhalten auch im 3. oder 4. Trächtigkeitsmonat am besten waren, wurden möglichst Plazenten aus diesem Graviditätsstadium ausgewählt. Es unterschieden sich die Ergebnisse von in späteren Stadien gewonnenen Proben auch nicht von denen im oben genannten Zeitraum.

6.1.1. Spezielle Aspekte zur Wahl der Disaggregationsmethode

Aus den vielen verschiedenen Möglichkeiten, die es gibt, um aus einem Gewebeverband eine Einzelzellpopulation zu erhalten, erwiesen sich die mechanischen Methoden wie das Streichen durch ein Stahlsieb und starkes Pipettieren des zerschnittenen Gewebes als zu traumatisch. Sie übten starke Scherkräfte aus, was zu irreversibel geschädigten Einzelzellen führte und auch in der Literatur wird dieses Vorgehen für die Rinderplazenta nur von einer Arbeitsgruppe und lediglich in Kombination mit dem Einsatz eines enzymatischen Verdaus genannt (Nakano *et al.,* 2001; 2002a).

Die enzymatische Disaggregation dagegen ist die Methode der Wahl, wobei aus der Vielzahl der möglichen Enzyme und ihrer Kombinationen sich CLS I für die Rinderplazenta als schonend und effizient erwies, was sich mit Angaben anderer Autoren deckt (Shemesh *et al.,* 1984; 1994; Munson *et al.,* 1988). Des weiteren wurden Trypsin und DNase in Kombination eingesetzt beziehungsweise Trypsin und in einem zweiten Schritt Trypsin, CLS II und DNase I (Reimers *et al.,* 1985). In Arbeiten, die über das Endometrium und nicht die Plazenta des Rindes verfasst wurden, sind weitere Möglichkeiten zur Zellisolierung beschrieben. So wurde Trypsin für die Gewinnung von Epithelzellen und ein Enzymgemisch aus CLS, DNase und Trypsin zur Ablösung der Fibroblasten eingesetzt (Asselin *et al.*, 1996) oder EDTA-PBS in Verbindung mit Abschaben des Uterusepithels mittels einer Skalpellklinge (Yamauchi *et al.*, 2003) verwendet und dies ergänzt durch anschließenden Collagenaseverdau (Takahashi *et al.*, 2001a) oder nur durch Abschaben der endometrialen Oberfläche (Takahashi *et al.,* 2001b).

Da für die Fragestellung der Arbeit vorerst keine reine Epithelzellkultur benötigt wurde, allerdings die Gefahr bestand, dass die sich langsamer anheftenden und teilenden Epithelzellen durch Stromazellen überwuchert werden, musste ein Weg gefunden werden, dies möglichst von Beginn an einzudämmen. Der Ansatz von Munson *et al.* (1988), die zur Gewinnung von Trophoblastzellen intakte Kotyledonen mit der Trophoblastzelloberfläche nach oben in einen Erlenmeyerkolben legten und das Gewebe mit einer Enzymlösung überschichteten, wurde hierfür weiter entwickelt. Sowohl die Kotyledone als auch die Karunkel wurden mit einem sterilen Baumwollfaden zusammengebunden und in die Enzymlösung gehängt, so dass das außen liegende Gewebe ausschließlich aus Epithel bestand und das sich darunter befindende Bindegewebe und Mesenchym erst angedaut werden konnte, wenn die Epithelzellen schon losgelöst waren. Wurde diese Reaktion zum richtigen Zeitpunkt abgestoppt, war das Verhältnis der beiden Zellpopulationen bezogen auf das Wachstum

zueinander passend. Die eingesetzte Enzymkonzentration und die Inkubationsdauer wurden auf dieses Ziel hin in Testreihen optimiert.

Grundsätzlich führt die Anwesenheit von Stromazellen dazu, dass diese leicht und schnell wachsenden Zellen verschiedene Stoffe wie Wachstumsfaktoren oder ECM-Bestandteile in das Medium sezernieren, die das Wachstum des Epithels erleichterten. Für menschliche Endometriumszellen konnte in einem Kokulturmodell der positive Einfluss parakriner Effektoren aus dem Stroma sowohl auf die Epithelzellmorphologie als auch die Diffenzierung und das Wachstum der Epithelzellen demonstriert werden (Arnold *et al.*, 2001). Der beschriebene Effekt wird auch beim Einsatz von Fibroblasten konditioniertem Medium (fibroblast-conditioned medium) genutzt (Shimada *et al.*, 2001), allerdings entsteht dabei ein beträchtlicher Arbeitsaufwand zur Bereitstellung des Mediums durch die Kultivierung von Fibroblasten über 10 bis 14 Passagen, der beim genannten Vorgehen entfällt.

6.1.2. Spezielle Aspekte zur Wahl des Mediums

Das Kulturmedium DMEM/Ham´s F-12 eignete sich gut zur Anzucht von Zellen aus der Uteruskarunkel und wurde auch von anderen Autoren zu diesem Zwecke und für das Wachstum von Endometriumszellen verwendet (Munson *et al.*, 1990; Shimada *et al.*, 2001; Takahashi *et al.,* 2001a; Yamauchi *et al.,* 2003). Für die Kultivierung der Trophoblastzellen kam erstmals ein Spezialmedium, Quantum 286, zum Einsatz, welches für das Wachstum von Epithelzellen optimiert ist. Im direkten visuellen Vergleich konnten mit diesem Medium ein schnelleres Anheften und das bessere Wachstum der genannten Zellen erreicht werden. Da die Formulierung auf einer DMEM Basis beruht, welche durch Serumkomponenten ergänzt wurde, sollte eine spätere Umstellung des Mediums auf DMEM/Ham´s F-12 zum Beispiel um fetale und maternale Zellen kokultivieren zu können, keine Schwierigkeiten bereiten, zumal die Anzüchtung von Trophoblastzellen auch in DMEM/Ham´s F-12 schon erfolgreich praktiziert wurde (Munson *et al.,* 1988; Nakano *et al.,* 2001; 2002b; 2005; Ushizawa *et al.*, 2005). Der Vorteil von Quantum 286 lag darin, dass der kritische Übergang von der Isolation bis zur Anpassung der Trophoblastzellen an die Kultivierungsbedingungen erleichtert wurde, was für die Zellen aus der Uteruskarunkel ohne Schwierigkeit möglich war. Die Vergleichbarkeit der in vivo und vitro Ergebnisse wurde durch den Einsatz unterschiedlicher Medien für fetale und maternale Zellen nicht beeinträchtigt. Das Medium wurde immer nur zur Hälfte durch neues Medium ersetzt, um einerseits Zellmetabolite zu entfernen und neue Nährstoffe zur Vitalitätserhaltung zuzuführen, ohne gleichzeitig die von den Zellen ins Medium abgegebenen Stoffe komplett zu entziehen. Solch ein Vorgehen wird als Standard bei Suspensionskulturen beschrieben (Lindl, 2000). Des weiteren wurde der positive trophische

Effekt von sogenanntem homologen konditionierten Medium (homologous conditioned medium) bereits bei anderen Primärkulturen nachgewiesen (Charli *et al.*, 1995).

6.1.3. Spezielle Aspekte zur Kultivierungsweise

Zur Kultivierung wurden die einheitlichen Angaben aus der Literatur übernommen und im Brutschrank 37 °C und eine Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid zu 95 % Luft bei hoher Luftfeuchtigkeit gewählt. Bezüglich des Zellwachstums oder der Zellmorphologie ließen sich mikroskopisch keine Verbesserungen erkennen, wenn die Zellen auf kollagenbeschichteten Oberflächen oder in Matrigel kultiviert wurden oder dem Medium EGF oder Progesteron zugesetzt wurden. Diese Ergebnisse entstanden im direkten visuellen Vergleich mit Zellen gleicher Isolationen, allerdings kamen keine statistischen Verfahren zum Einsatz, um diese Aussagen zu verifizieren. Das verwendete FKS wurde keiner Dextran-Kohle Extraktion unterzogen, da der Einfluss von Steroidhormone nicht näher untersucht wurde. Die Gefahr der Überwucherung des Epithels durch Fibroblasten infolge der Serumzugabe (Takahashi *et al.,* 2001a) bestand durch den geringen Anteil von Fibroblasten nicht. Bei jeder Passagierung erfolgte zudem eine erneute Anreicherung der Epithelzellen durch selektives Ablösen der Zellen.

6.2. Zytoskelettbestandteile zur Charakterisierung der Primärkultur

Zur Charakterisierung der Primärkultur boviner Uterusepithel- und Trophoblastzellen ist die morphologische Untersuchung des Phänotyps im Inversmikroskop alleine nicht ausreichend. Als eindeutiger Indikator für die Differenzierung und Abstammung von Zellen gilt der Nachweis von Zytoskelettbestandteile in den isolierten Zellen (Willers *et al.*, 1990; Moll, 1993; Wang *et al.*, 2000). Im Plazentagewebe des Rindes werden Cytokeratinfilamente (Epithelzellen), Vimentinfilamente (mesenchymale Zellen) und Desminfilamente (Muskelzellen) und α-smooth muscle Actin (glatte Muskelzellen) beschrieben (Krebs *et al.*, 1997; Pfarrer *et al.,* 2003; 2005; Lang *et al.*, 2004). Dass die verwendeten nicht rinderspezifischen Antikörper auch bei dieser Spezies einsetzbar sind, ist durch eine hohe Homologie der Filamente gerechtfertigt und wurde durch die in vivo Ergebnisse an Gefrierschnitten bestätigt.

Meistens werden in einer Epithelzelle zeitgleich verschiedene der 20 Cytokeratin-Polypeptide exprimiert und die Ausbildung bleibt unabhängig von der Zellumgebung oder einer neoplastischen Entartung erhalten (Moll *et al.,* 1982; Lodish *et al.,* 2001c). Der verwendete Antikörper-Cocktail aus drei unterschiedlichen Klonen deckt mit seinen Reaktionen ein umfangreiches Spektrum ab, er detektiert fast alle Cytokeratine und bewies aufgrund seiner

Markerfunktion, dass es sich bei den kultivierten Zellen tatsächlich um Epithelzellen handelte. Vimentin kommt in vielen Zelltypen vor, die vom Mesoderm abstammen, hauptsächlich handelt es sich hierbei um Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und lymphoide Zellen (Lodish *et al.,* 2001c). Verschiedene Autoren beschreiben, dass Cytokeratin-positive Zellen, also Epithelzellen, sich bei der Kultivierung zusätzlich Vimentin aneignen (Virtanen *et al.*, 1981; Bergh *et al.*, 1984; Regauer *et al.*, 1985; Greenburg & Hay, 1988; Hunt & Davis, 1990; Willers *et al.,* 1990; Lim *et al.*, 2002; Wang *et al.,* 2000). Dies ist auch bei den hier untersuchten Zellen der Fall (Abb. 23, 33). Für diese Koexpression beider Intermediärfilamente in vitro gibt es diverse Erklärungsansätze. Pagan *et al.* (1996) sprechen bei kultivierten Hepatozyten neonataler Ratten von einer epithelialen-mesenchymalen Transition. Diese wird von fehlenden Zell-Zellkontakten positiv beeinflusst und ist entweder durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren im Medium oder aber den Zusatz von EGF induzierbar und hat eine Anpassung an eine migratorische Morphologie der Zellen zur Folge. Ebenfalls eine Transdifferenzierung vom epithelialen zum mesenchymalen Zelltyp mit einem fortschreitenden Verlust von Cytokeratinen im Verlaufe der Subkultivierung beobachteten Lim *et al.* (2002), allerdings mit der Schlussfolgerung, dass die untersuchten hepatischen Sternzellen eigentlich epithelialer und nicht wie bislang angenommen fibroblastischer Herkunft sein könnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kultivierten Zellen in dieser Studie ihre charakteristischen Intermediärfilamente beibehielten und dass es ein phänotypisches Merkmal von vielen Zellen unter in vitro Bedingungen ist, dass sie bei ihrer Adaptation an die Kulturbedingungen auch Vimentin exprimieren können.

Desmin ist ein Intermediärfilament-Protein, welches in Muskelzellen zu finden ist, wo es eine strukturelle Funktion aufweist, indem es die Sarkomere im kontrahierten Muskel stabilisiert (Lodish *et al.,* 2001c; Alberts *et al.,* 2004a). Entsprechend markierten Antikörper gegen Desmin die wenigen Muskelzellen, die bei der Zellgewinnung mitisoliert wurden. Positive Signale für Desmin im fetalen Kompartiment weisen auf das Vorkommen erster glattmuskulärer Zellen in diesen Kulturen hin. Eine besondere Funktion von Desmin, nämlich die als Dezidualisierungsmarker im endometrialen Stroma, wird außerdem beim Schaf, nicht aber der Ziege, beschrieben (Johnson *et al.*, 2003; Joyce *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass der Trophoblast in der synepitheliochorialen Wiederkäuerplazenta invasiver ist als bei epitheliochorialen Plazenten. Dies wird auch durch eine Studie unterstützt, in der die Connexin-Expression beim Schaf mehr dem invasiven Typ der Implantation zuzuordnen ist (Gabriel *et al.*, 2004).

Das Actinfilament ist ein entscheidendes Protein des kontraktilen Apparates in der Muskelzelle. In Säugerzellen treten mindestens sechs Actintypen auf, die anhand ihres isoelektrischen Punkts in drei Gruppen einteilbar sind, wobei die α-Actine in verschiedenen Muskelzellen vorkommen (Alberts *et al.,* 2004a; Chaponnier & Gabbiani, 2004). Der verwendete Antikörper detektiert die α-Isoform des glatten Muskels, die in Gefäßen, Myoepithelzellen und Perizyten exprimiert werden und zeigt keine Reaktion mit gestreiften Muskelzellen. Da das Myometrium vor allem aus glatten Muskelzellen und vaskulären Bestandteilen besteht (Wang *et al.,* 2000), und α-smooth muscle Actin der signifikanteste Marker für eine myofibroblastische Differenzierung und für Gefäße ist (Chaponnier & Gabbiani, 2004), ist es angezeigt, auch diesen Zelltyp bei der Charakterisierung der Plazentazellen mit einzubeziehen.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Immunfluoreszenz-Untersuchungen immer nach der zweiten oder dritten Passage durchgeführt, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Epithelzellen CK-Filamente aufwiesen und lediglich ein schwaches Signal für Vimentin auftrat, welches in der Intensität deutlich von dem der Fibroblasten abfiel.

6.3. Vergleich in vivo-in vitro Expression von Integrinen und ECM

Für die Beantwortung der Frage, welche Bedeutung die Integrine und ihre Liganden der ECM für die Funktion der verschiedenen Zellpopulationen in der Rinderplazenta haben, sind die in entsprechenden Vorarbeiten durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen der in vivo Verhältnisse alleine nicht zufriedenstellend. Die Zellkultur ermöglicht vielmehr das Studium einzelner Zellen und ihrer spezifischen Leistungen, also eine Eingrenzung des multifaktoriellen Geschehens in vivo und darüber hinaus könnten sogar gezielte Stimulationen und Hemmungsversuche durchgeführt werden. Die regulative Funktion von Integrinen während der Adhäsion, Implantation und Trophoblastinvasion als Schalter (integrin-switch) wurde für die hämochoriale Plazenta des Menschen und von Mäusen bereits nachgewiesen (Fisher & Damsky, 1993; Yelian *et al.*, 1995; Lessey *et al.,* 1996; Coutifaris *et al.*, 1998). Auch für weitere Spezies konnte gezeigt werden, dass Interaktionen von Integrinen mit der ECM wichtig für die Implantation und Entwicklung des Embryos sind und Zellwachstum, Differenzierung und Migration bei Pavian (Fazleabas *et al.*, 1997), Schwein (Bowen *et al.*, 1997) und Schaf (Johnson *et al.,* 2001) beeinflussen. Forschungsergebnisse zu Integrinen im Reproduktionstrakt des Rindes sind spärlich. Sie beschränken sich zudem vor allem auf das Geschehen während des Zyklus und auf die Periimplantationsphase auf mRNA

Ebene (MacLaren & Wildeman, 1995) und immunhistochemischen Proteinnachweise an Gewebeschnitten (Kimmins & MacLaren, 1999; Kimmins *et al.*, 2004). Die gleiche Arbeitsgruppe hat ihre Untersuchungen auch auf die Zeit nach dem ersten Trächtigkeitsmonat und auf eine in vitro Studie ausgedehnt, allerdings wurden nur TGC von einem am Tag 70 tragenden Tier gewonnen und direkt anschließend fixiert (MacIntyre *et al.*, 2002). Somit wird mit der vorliegenden Arbeit erstmals die in vivo Expression von Integrinen mit der in vitro Situation beim Rind veglichen, nachdem zunächst die Kultivierungsbedingungen für die entsprechenden Zellpopulationen etabliert wurden. Die im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Immunfluoreszenz-Studien bestätigten die bekannten Lokalisationen der Integrine und ECM im Plazentom (Pfarrer *et al.*, 2003) und zeigten, dass die Antikörper auch bei der Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten kreuzreagieren und für das verwendete Gewebe geeignet sind.

Das Integrin $\alpha_6\beta_1$ wurde ausgewählt, da es den wichtigsten Rezeptor für Laminin darstellt und weil zu vermuten ist, dass die TGC entlang einer Lamininmatrix migrieren. Für die Untereinheit β_1 wurde eine Beteiligung am Migrationsvorgang der TGC im Rinderplazentom auch von MacLaren und Wildeman *et al.* (1995) angenommen, allerdings mit unbekanntem dazugehörendem Dimer. Außerdem ist für metastasierende Zellen bekannt, dass sie Laminin als Leitstruktur für ihre Ausbreitung verwenden (Schuppan *et al.*, 1994).

Vom Heterodimer $\alpha_v\beta_3$ weiß man, dass es im Endometrium (Mensch), Endothel, in Osteoblasten, und Fibroblasten vorkommt und verschiedene Liganden wie Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin, Fibrinogen und von Willebrand-Faktor binden kann (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987; Bosman, 1993). Inzwischen geht man sogar so weit, Integrine, die die Untereinheit α_v beinhalten sowie $\alpha_5\beta_1$ als „interstitielle Integrine“ zu bezeichnen (Kemp *et al.*, 2002). Somit stellt $\alpha_v\beta_3$ für die hier präsentierte Zellcharakterisierung eine hilfreiche Ergänzung zum „epithelialen Integrin“ $\alpha_6\beta_1$ dar. Neben der abweichenden Lokalisation spricht auch die Tatsache, dass α_v und β_3 als Marker für die uterine Empfänglichkeit verwendbar sind, für eine Untersuchung dieses Rezeptors (Lessey *et al.*, 1992; 1996; Sutherland *et al.*, 1993; Bowen *et al.*, 1996). Eine zyklusabhängige zeitliche und räumliche Regulation der Untereinheiten α_6, α_v und β_3 im Endometrium des Rindes wurde nachgewiesen (Kimmins & MacLaren, 1999). Im Gegensatz zu Kimmins & MacLaren (1999), die Fibronectin und $\alpha_v\beta_3$ nicht in der Karunkel nachweisen konnten, aber vermuten, dass $\alpha_v\beta_3$ der Fibronectinrezeptor im interkarunkulären Stroma sein könnte, zeigen Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe, dass die Untereinheit α_v während der gesamten Trächtigkeit und vor allem in den Septenspitzen exprimiert wird und auch β_3 dort im letzten

Trimester vermehrt zu finden ist. Da im maternalen Stroma nur wenig β_1 vorgefunden wurde, lassen diese Resultate die Vermutung zu, dass das ebenfalls detektierte Fibronectin nicht über den klassischen Fibronectinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ gebunden wird, sondern über $\alpha_v\beta_3$ (Hirsch, 2001), welches aufgrund der Redundanz der Integrine ebenso die Tripeptidsequenz RGD des Fibronectins erkennt (Charo *et al.*, 1990; Ruoslahti, 1991). Darüber hinaus scheint Osteopontin, ein weiterer Ligand dieses Rezeptors, in der Rinderplazenta eine Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von maternalen Septen und fetalen Villi zu spielen (Pfarrer *et al.*, 2002). Bezüglich des Vorkommens von Vitronectin in der Rinderplazenta gibt es noch keine Veröffentlichungen. Fibronectin kommt durch seine Rolle bei der Matrixorganisation und als mögliches Substrat für Adhäsion und Zellausbreitung ebenso wie für Proliferation und Migration (Schuppan *et al.,* 1994) eine besondere Bedeutung bei der Reproduktion zu. Schon in der frühen Embryonalentwicklung erhöht Fibronectin die Entwicklung vom Acht- zum 16-Zeller (Larson *et al.*, 1992) und das Anheften boviner Blastozysten an Fibronectin in vitro ist RGD vermittelt (Takahashi *et al.*, 2005).

Die vorliegenden Forschungsergebnisse bestätigen, dass in vivo die Integrinuntereinheiten α_6 und β_1 an der basolateralen Oberfläche von Uterusepithelzellen und mononukleäre Trophoblastzellen sowie TGC exprimiert werden und β_1 zudem schwach im Stroma vorkommt und Laminin in der Basallamina von Epithelien und Endothelien lokalisiert ist. Neu sind die Erkenntnisse, die in vitro gewonnen werden konnten. Die Epithelzellen beider Kompartimente behielten die Expression von α_6 und β_1 bei und die Zellen bildeten ihre eigene Lamininmatrix zum Substrat hin aus. Die Kolokalisation der Untereinheiten legt nahe, dass das Heterodimer $\alpha_6\beta_1$ auch in vitro über eine Zell-Matrix-Interaktion zur Verankerung der Zellen auf dem Substrat dienen könnte und zum Signalaustausch mit Laminin exprimiert wird. Dass Zellen, die in Kultur gebracht wurden, Laminin, Fibronectin oder andere ECM-Komponenten abscheiden können und sich über Integrine an diese Matrix anheften, ist ein seit langem bekannter Vorgang (Gospodarowicz *et al.*, 1981; Wewer *et al.*, 1986; Ruoslahti, 1991; Nakamura *et al.*, 1992). Auffallend ist jedoch, dass das Integrin $\alpha_6\beta_1$ nicht nur an den Stellen auftritt, wo auch der Ligand Laminin nachgewiesen werden konnte. Vielmehr zeigte sich eine verstärkte Reaktion an den Zell-Zellgrenzen. Wahrscheinlich besteht hierbei ein Zusammenhang zur Art der Projektion. Die dreidimensionale Zelle wird zweidimensional betrachtet, wobei sich möglicherweise durch die gewölbte Form der Zelle eine Signalüberlagerung ergibt. Allerdings wurde auch in vivo die Ausbildung der für die Ligandenspezifität entscheidenden Untereinheit α_6 basolateral als napfförmige Umrandung der Epithelzellen zur Basalmembran hin beobachtet. Weiterhin lässt sich die starke

Expression zwischen den Zellen eventuell mit der Bindung eines anderen Ligandens an dieser Stelle erklären. In Frage kommen dafür die ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) Fertilin und Meltrin. Von Meltrin γ (ADAM-9) wurde kürzlich beschrieben, dass es die Beweglichkeit von Fibroblasten induziert (Nath *et al.*, 2000). β_1 bildet mit mindestens 12 α-Untereinheiten Heterodimere und kommt dadurch quasi ubiquitär vor, wodurch die funktionelle Zusammengehörigkeit oftmals nicht sofort erkennbar ist. Häufige Integrine sind $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1$ und ihre interzelluläre Lokalisation legt nahe, dass sie in Zell-Zellinteraktionen involviert sind. Eine β_1 Reaktivität nicht nur an der basalen Oberfläche mit Kontakt zur Basalmembran, sondern zusätzlich zwischen Epithelzellen ist bekannt (Bosman, 1993). In der humanen Plazenta wurde eine diffuse Verteilung von β_1 über die Zelloberfläche des Trophoblasten beschrieben und vermutet, dass sie dort mit α_6 oder α_3 assoziiert sein könnte (Damsky *et al.*, 1992). Im zyklischen Endometrium des Rindes überlappte die konstante Expression der β_1-Untereinheit mit den regulierten α-Untereinheiten α_3, α_4 und α_6, was nahe legt, dass β_1 mit diesen Untereinheiten einen Rezeptor bildet (Kimmins & MacLaren, 1999).
Beide Anteile des zweiten untersuchten Heterodimers $\alpha_v\beta_3$ wurden in vivo vor allem im Stroma von maternalen Zellen gebildet und Fibronectin war ausschließlich auf das fetale Mesenchym und das maternale Stroma begrenzt. Dieses Ergebnis korreliert mit Untersuchungen von MacLaren & Wildeman (1995), die Fibronectin im Rinderplazentom ebenfalls im Stroma nachwiesen und β_1 ab Tag 21 in Trophoblastzellen und ab Tag 24 in TGC. In vitro konnten in der vorliegenden Studie kleine Mengen α_v zwischen Uterusepithelzellen und Trophoblastzellen detektiert werden und an diesen umschriebenen Bereichen an den Zellkontaktstellen hatten die Epithelzellen auch Fibronectin abgegeben. β_3 hingegen kam bei den maternalen Zellen ausschließlich in fibroblastoiden Zellen vor. Es bildete sich ein punktförmiges Färbemuster zum Substrat hin und diese Anordnung der Signale spricht für eine fokale Anheftung der Zellen mittels β_3 an die Kulturunterlage. Ob es sich hier tatsächlich um fokale Adhäsionen, also um Aggregate aus ECM Proteinen, Integrinen und Zytoskelettproteinen, handelt, kann über den Nachweis von Bindungspartner der zytoplasmatischen Domänen wie zum Beispiel Talin erfolgen. Neueste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass in kultiviertem maternalen Epithel eine Kolokalisation von Integrin β_1, Talin, Phosphotyrosin und α-Actinin zu finden ist (Pfarrer *et al.*, 2005). Eine Bindung von mit Osteopontin beschichteten Kügelchen an porcine Trophoblastzellen und luminales Epithel wurde ebenso bereits beschrieben (Garlow *et al.*, 2002). Beim Schaf konnten die Integrinuntereinheiten α_v und β_3 ebenfalls als Orte der Zellverankerung auf dem

Substrat in Trophoblastzellen und luminalen Epithelzellen nachgewiesen werden (Johnson *et al.,* 2001). Für die Ausbildung der Untereinheiten α_5 und α_v in fokalen Kontakten ist wichtig, dass die Zellen auf ihren entsprechenden Liganden wachsen. Eine solche Induktion ist vor allem von Fibronectin bekannt (DiPersio *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Untersuchung sezernierten Trophoblastzellen Fibronectin entlang ihrer Zellkontaktstellen und dort konnten sowohl α_v als auch β_3 detektiert werden. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur Situation in vivo, denn sowohl unsere Arbeitsgruppe als auch MacLaren et al. konnten dieses Integrin im Epithel des Plazentoms nicht nachweisen. Doch obwohl die meisten Zellen in Kultur ihre Adhäsionsmoleküle beibehalten, kann in einigen Fällen die Expression im Vergleich zur Situation in vivo modifiziert werden (Bowen *et al.,* 1997). Offensichtlich wird es im konkreten Fall in Kultur als Reaktion auf das zuvor sezernierte Fibronectin exprimiert, was auch die Begrenzung des granulierten Färbemusters auf genau die Bereiche, in denen Fibronectin auftrat, erklärt. Offensichtlich spielt es für die Sekretion in vitro keine Rolle, dass Fibronectin im Gewebe nur im Stroma auftrat, denn auch von anderen Epithelzellen in Kultur ist bekannt, dass auftretendes Fibronectin hauptsächlich von ihnen stammt (Nakamura *et al.,* 1992). Für porcine Uterusepithelzellen in Kultur wurde zwar bereits ein Vorkommen von $\alpha_v\beta_3$ in einem diffusen Färbemuster an den Zell-Zellgrenzen und in der perinukleären Region beschrieben, allerdings wurden α_v und β_3 beim Schwein auch schon in vivo an den Implantationsstellen des Uterus und vom Konzeptus konstitutiv exprimiert (Bowen *et al.,* 1997). Es muss also beachtet werden, dass die Integrinexpression speziesspezifisch ist und aufgrund ihrer wichtigen Aufgaben im Zyklusgeschehen und bei der Plazentation nicht auf andere Tierarten übertragbar ist. Generell ist die Integrinexpression immer im Zusammenhang mit der Präsenz potentieller Liganden zu interpretieren.

6.3.1. Die RT-PCR

Anhand der spezifischen Amplifikate konnte gezeigt werden, dass sowohl in vivo im Plazentom zu verschiedenen Stadien der Trächtigkeit (Tag 120, 190, 230) als auch in vitro in den kultivierten Zellen die untersuchten Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 exprimiert wurden. Durch die Extraktion der RNA aus einer nicht absolut reinen Zellpopulation muss allerdings bei den RT-PCR Ergebnissen in vitro mitberücksichtigt werden, dass die Zuordnung, welche Integrinuntereinheiten von Epithel- und welche von Stromazellen exprimiert werden, nur unter Vorbehalt und unter Hinzuziehen der mittels Immunfluoreszenz gewonnenen Resultate aussagekräftig ist. Die in der vorliegenden Arbeit für die PCR angewandten Primer stammen im Falle von α_v, β_1 und β_3 aus der Literatur (Johnson *et al.,*

2001), wo sie zum Nachweis der genannten Untereinheiten beim Schaf dienten. Die Primer für die Untereinheit α_6 sind einem homologen Abschnitt des Genoms der Spezies Mensch, Ratte, Maus, Huhn und Xenopus laevis (Krallenfrosch) entnommen, da die Sequenz vom Rind nicht bekannt ist.

6.4. Ausblick/Weiterführende Aspekte

Nachdem mit der vorliegenden Arbeit alle Voraussetzungen für ein überschaubares Zellkulturmodell zum Studium von Invasionsprozessen geschaffen sind, bieten sich verschiedene weiterführende Untersuchungen an.

Zum einen wäre ein systematischer Vergleich unterschiedlicher Trächtigkeitsstadien interessant, wobei als Grundlage genau definierte Bedingungen wie der Einsatz von standardisierten Gewebemengen und Zellzahlen dienen könnten, um die Inkonsistenz zwischen enzymatischen Zellisolierungen gering zu halten.

Das Verhalten und die Lebensfähigkeit der isolierten Zellen über einen längeren Zeitraum muss in weiteren Studien ermittelt werden. Zu beachten ist, dass schon vor dem Altern (Senescence) eine Dedifferenzierung stattfinden kann, die gegebenenfalls zu Veränderungen in der Rezeptorexpression und in der Antwort auf Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine führt.

Besonders im Hinblick auf das Ziel, die feto-maternale Kontaktaufnahme während der Trächtigkeit besser zu verstehen, mit speziellem Augenmerk auf die eingeschränkte Migration der Trophoblastriesenzellen des Rindes, könnte ein Migrationsassay zur Anwendung kommen. Dieser überschaubare Migrationsprozess kann Erkenntnisse liefern, die zu einem besseren Verständnis von invasiven Vorgängen führen, auch wenn die entsprechenden Integrine sicher nur einen Teilaspekt der Invasion abdecken. Dafür bieten sich die Etablierung eines Modells zur Durchführung von Kontaktstudien an, für die auf primären Karunkelepithelzellen fetale Zottenexplantate kultiviert werden. So ließe sich neben der Untersuchung einer Vielzahl von möglicherweise relevanten Integrinen eine gezielte Blockade von Integrinen mit Anti-Integrinen, dem Einsatz von speziellen Peptiden oder Antikörpern, die aktivierte Epitope erkennen, umsetzen und auch der Austausch über andere Signalwege könnte besser nachvollzogen werden. Es könnte des weiteren festgestellt werden, ob sich die Kommunikation zwischen maternalem und fetalem Kompartiment unter verschiedenen Wachstumsbedingungen oder durch Zugabe von bestimmten Wachstumsfaktoren ändert, oder wie die durch verschiedene Beschichtungen der Kulturgefäße mit Fibronectin, Laminin, Kollagen, Poly-L-Lysin oder Vitronectin angebotene

Matrix die Integrinausstattung der Zellen beeinflusst wird. Bedingung für die Kokultur von fetalem und maternalem Gewebe ist die Verwendung von Markern, die eine klare Zuordnung der Zellen zum Herkunftskompartiment erlauben.

Mit dem Nachweis über die Detektion von ZO-1, als Tight Junction-assoziiertes Polypeptid, dass es sich bei den kultivierten Epithelzellen um polarisierte Zellen handelt, wurde bereits zusätzlich zur Expression von Cytokeratin gezeigt, dass diese Zellen außerdem ein funktionelles Epithel darstellen (Bridger *et al.*, 2005).

Auch endokrinologische Fragestellungen zu studieren wäre ein denkbarer Ansatz, wobei zur besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse von zum Beispiel hormonellen Stimulationen eine vorherige Immortalisierung der Zellen ideal wäre. Zusätzlich sollte die Kultivierung mit Dextran-Kohle extrahiertem FKS erfolgen, um den Einfluss von Steroiden aus dem Serum auszuschließen. Da die Plazenta des Rindes während der Trächtigkeit ein wichtiges endokrines Organ darstellt, können so Fragestellungen mit direkter klinischer Relevanz untersucht werden.

Um mit den nun getesteten Primern die Integrinexpression sicher einzelnen Zelltypen zuzuweisen, könnte die UV-Laser-assistierte Mikrodissektion zum Einsatz kommen.

7. Zusammenfassung

Integrine, eine Familie heterodimerer Transmembranrezeptoren, sind nicht nur für das Anheften von Zellen an ihre Liganden der extrazellulären Matrix (ECM) verantwortlich, sondern auch für die Transduktion von Signalen. Durch die so genannte eingeschränkte Trophoblastinvasion bietet die epitheliochoriale Rinderplazenta gute Bedingungen, um invasive Prozesse zu untersuchen. Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass die Migration der TGC im bovinen Plazentom von der Expression spezifischer Integrine und ihrer ECM Liganden begleitet wird. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Primärkulturen verschiedener Zellpopulationen aus dem Rinderplazentom etabliert und charakterisiert und mit den in vivo Verhältnissen verglichen. Hierfür wurde die Methode zur Zellgewinnung und -kultivierung für das Rinderplazentom adaptiert und optimiert.

Plazentome aus dem Routineschlachtbetrieb wurden manuell in fetale Kotyledone und maternale Karunkel separiert und mit dem Epithel nach außen in einer CLS I-Lösung angedaut. Auf diese Weise wurden fast reine Epithelzellpopulationen schonend und effektiv gewonnen.

Die maternalen Zellen wurden in Dulbecco´s modified Eagle Medium mit Ham´s F-12 und die fetalen Zellen in dem besser geeigneten Epithelzellmedium Quantum 286 mit jeweils 10 % fetalem Kälberserum kultiviert. Nach circa zehn Tagen bildeten die Zellen einen konfluenten Zellrasen aus. Anhand des Phänotyps und ihres Wachstumsverhaltens wurden die Zellen in rundlich-ovoide Epithelzellen straßenpflasterartiger Kolonien und spindel- oder sternförmige fibroblastoide Zellen differenziert. Eine weitere Aufreinigung der Epithelzellen wurde durch kontrollierte Inkubation mit Trypsin/EDTA erreicht.

Eine weitere Charakterisierung der kultivierten Zellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz und Antikörpern gegen die Cytoskelettproteine α-smooth muscle (α-sm) Actin, Cytokeratin (CK), Desmin und Vimentin (Vim) nach der zweiten oder dritten Passage. Das Vorkommen und die Lokalisation der Integrinuntereinheiten α_6, α_v, β_1 und β_3 sowie der ECM-Komponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen IV wurde in den kultivierten Zellen und an Gefrierschnitten des Plazentoms auf Protein- und für die Integrinuntereinheiten auch auf mRNA-Ebene untersucht.

In vivo markierte CK die Epithelzellen im Plazentom, während Vim im fetalen Mesenchym sowie im maternalen Kryptenstroma und in den Endothelien beobachtet wurde. α-sm Actin trat in den Gefäßen des Allantochorions, kleineren Arteriolen und Perizyten auf, wohingegen sich Desmin ausschließlich in glatten Muskelzellen der Gefäßwände befand. Die

Integrinuntereinheit α_6 wurde im Gewebeschnitt basolateral an Epithel- und Endothelzellen sowie einem Teil der TGC detektiert. β_1 war überwiegend kolokalisiert zur Untereinheit α_6 im Bereich der Basalmembranen wie auch in den TGC zu finden. Zusätzlich markierte es Endothelien der Gefäße im Karunkelstiel und in den Stammsepten, wobei im Stroma ein homogenes Färbemuster entstand. Die Integrinuntereinheit α_v wurde im Bindegewebe des maternalen Kryptenstromas beobachtet, während die Integrinuntereinheit β_3 im maternalen Bindegewebe und fetalen Mesenchym des Rinderplazentoms nachgewiesen wurde. Laminin trat kolokalisiert zu den Untereinheiten des korrespondierenden Integrinrezeptors $\alpha_6\beta_1$ in der Basalmembran von Epithel- und Endothelzellen und in den TGC auf. Fibronectin war ausschließlich auf bindegewebige Komponenten des Plazentoms beschränkt. Des weiteren wurde Kollagen IV im fetalen Mesenchym und im maternalen Stroma und in den Basalmembranen nachgewiesen.

In vitro waren sowohl die Uterusepithel- als auch die Trophoblastzellen eindeutig CK positiv. Sie waren nur schwach positiv für Vim, wohingegen in Fibroblasten starke Signale für Vim auftraten. Epithelzellen beider Kompartimente waren immer negativ für α-sm Actin und Desmin. Die beiden letztgenannten Antikörper markierten vereinzelte fibroblastoide Zellen, wobei Desmin positive Zellen auch deutlich größer waren. Alle Epithelzellen exprimierten Laminin und die korrespondierenden Untereinheiten des $\alpha_6\beta_1$ Integrinrezeptors. Die Integrinuntereinheit α_v verursachte im Uterusepithel und den Trophoblastzellen nur wenig Fluoreszenz in punktförmiger Anordnung an Zellkontaktstellen, wo gleichzeitig auch Fibronectin auftrat. Die Untereinheit β_3 wurde in Uterusepithelzellen nicht exprimiert, trat allerdings in zwischen den Epithelzellkolonien gelegenen fibroblastoiden Zellen auf, in denen fokale Akkumulationen zur Unterlage hin beobachtet wurden. In Trophoblastzellen wurde die Untereinheit β_3 kolokalisiert zu α_v und mit identischem Reaktionsmuster detektiert. Kollagen IV wurde in kultivierten Karunkelepithelzellen und Trophoblastzellen nicht nachgewiesen.

Die mRNA für die vier untersuchten Integrinuntereinheiten α_6, β_1, α_v und β_3 wurde im Gesamthomogenat boviner Plazentome unterschiedlichen Trächtigkeitsalters sowie in kultivierten Uterusepithel-, maternalen Stroma-, Trophoblast- und fetalen Stromazellen mittels spezifischer PCR-Produkte nachgewiesen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass die isolierten Karunkelepithel- und Trophoblastzellen, die ihre spezifischen Integrinrezeptoren und ECM auch unter Kulturbedingungen produzieren, als Teil eines in vitro Modells für weitere Studien feto-maternaler Zell-Zell-Interaktionen und der Regulation der einschränkten Trophoblastinvasion sowie anderer invasiver Prozesse dienen können.

8. Summary

Integrins, a family of heterodimeric transmembrane receptors are not only responsible for the attachment of cells to their ligands of the extracellular matrix (ECM), but also for signal transduction. Due to the phenomenon of restricted trophoblast invasion, the bovine epitheliochorial placenta offers intriguing conditions to study invasive processes. Our group has previously shown that the migration of TGC in the bovine placentome is accompanied by the expression of specific integrins and their corresponding ECM ligands. On the base of these studies, primary cultures of different cell populations from cow placentomes were established, characterized and compared with in vivo conditions. As a precondition the method for cell isolation and cultivation had to be adapted and optimized for bovine placentomal cells.

Placentomes from routine slaughtering were manually separated into fetal cotyledon and maternal caruncle, and with the epithelium positioned outside digested in a collagenase I-solution. In doing so, epithelial cell populations of a high degree of pureness were gently and effectively harvested.

Maternal cells were cultivated in Dulbecco´s modified Eagle Medium with Ham´s F-12, and fetal cells were supplied with the more suitable medium for epithelial cells, Quantum 286, each with 10 % fetal calf serum. Approximately ten days later the cells formed confluent cell layers. On the basis of the phenotype and their growth pattern, roundish-ovoid and pavement-like colonies of epitheloid cells were discernible from spindle- or star-shaped fibroblastoid cells. A further purification of epithelial cells was achieved by controlled incubation with trypsin/EDTA.

The propagated cells were characterized by indirect immunofluorescence and with antibodies against the cytoskeletal proteins α-smooth muscle (α-sm) actin, cytokeratin (CK), desmin and vimentin (vim) after the second or third passage. The presence and localization of the integrin subunits α_6, α_v, β_1 and β_3 as well as the ECM components fibronectin, laminin and collagen IV were examined in cultivated cells and on cryosections of the placentome on protein level. The occurrence of the integrin subunits was also evaluated on mRNA level.

In vivo CK labeled bovine placentomal epithelial cells, whereas vim was found in fetal mesenchyme as well as in maternal cryptal stroma and endothelium. α-sm actin appeared in vessels of the chorioallantois, little arterioles and pericytes, whereas desmin was located exclusively in vascular smooth muscle cells. The integrin subunit α_6 was detected in basolateral aspects of epithelial and endothelial cells as well as in some TGC. β_1 was

predominantly colocalized to the subunit α_6 in the vicinity of basal membranes and in TGC. Besides, β_1 labeled endothelial cells of vessels in the caruncular stalk and in stem septa, whereas the stroma displayed a homogenous staining pattern. The integrin subunit α_v was observed in the connective tissue of the maternal cryptal stroma, while the integrin subunit β_3 was detected in the maternal connective tissue and fetal mesenchyme of the bovine placentome. Laminin occurred colocalized to the subunits of the corresponding integrin receptor $\alpha_6\beta_1$ in the basal membrane of epithelial and endothelial cells and in TGC. Fibronectin was restricted to connective tissue components of the placentome, and collagen IV was found in fetal mesenchyme and maternal stroma and in basal membranes.

In vitro both, uterine epithelium and trophoblast cells were distinctly CK positive. Additionally, they were weakly positive for vim, whereas in fibroblasts strong signals for vim occurred. Epithelial cells of both compartments were always negative for α-sm actin and desmin. The latter labeled sporadically occurring fibroblastoid cells, whereby desmin positive cells were distinctly bigger. All epithelial cells expressed laminin and the corresponding subunits of the $\alpha_6\beta_1$ integrin receptor. The integrin subunit α_v in uterine epithelium and in trophoblast cells appeared as small fluorescent signals arranged in a punctate pattern on cell contact points, where fibronectin was also present. The subunit β_3 was not expressed in uterine epithelium but occurred in fibroblastoid cells which were found sporadically between epithelial cell colonies as focal accumulations towards the flask ground. In trophoblast cells subunit β_3 was detected colocalized to α_v and with an identical reaction pattern. Collagen IV was not detected in cultured caruncular epithelium and trophoblast cells.

Specific mRNAs for the integrin subunits α_6, β_1, α_v and β_3 were amplified from bovine placentomal homogenate from different gestation ages as well as from cultivated uterine epithelial cells, maternal stromal cells, trophoblast cells and fetal stromal cells by RT-PCR.

From the results presented we may conclude that the isolated caruncular epithelial and trophoblast cells, which retained their specific integrin receptors and ECM also under culture conditions, can serve as part of an in vitro model for further examinations of feto-maternal cell-cell interactions and the regulation of restricted trophoblast invasion as well as other invasive processes.

9. Literaturverzeichnis

ABD-ELNAEIM, M.M., PFARRER, C., SABER, A.S., ABOU-ELMAGD, A., JONES, C.J. & LEISER, R. (**1999**) Fetomaternal attachment and anchorage in the early diffuse epitheliochorial placenta of the camel (Camelus dromedarius). Light, transmission, and scanning electron microscopic study. *Cells Tissues Organs* **164**(3), 141-154.

ALBELDA, S.M. & BUCK, C.A. (**1990**) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **4**(11), 2868-2880.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (**2004a**) Das Cytoskelett. In: *Molekularbiologie der Zelle* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1055-1140.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (**2004b**) Zellverbindungen, Zelladhäsion und die extrazelluläre Matrix. In: *Molekularbiologie der Zelle* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1237-1305.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (**2004c**) Integrine. In: *Molekularbiologie der Zelle* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1291-1296.

ANDRESEN, A. (**1927**) Die Plazentome der Wiederkäuer. *Morph Jahrb* **57**, 410-485.

ARNOLD, J.T., KAUFMAN, D.G., SEPPALA, M. & LESSEY, B.A. (**2001**) Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* **16**(5), 836-845.

ASSELIN, E., BAZER, F.W. & FORTIER, M.A. (**1997**) Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells. *Biol Reprod* **56**(2), 402-408.

ASSELIN, E., GOFF, A.K., BERGERON, H. & FORTIER, M.A. (**1996**) Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod* **54**(2), 371-379.

ATKINSON, B.A., KING, G.J. & AMOROSO, E.C. (**1984**) Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* **30**(3), 763-774.

BERGH, J., NILSSON, K., DAHL, D., ANDERSSON, L., VIRTANEN, I. & LEHTO, V.P. (**1984**) Expression of intermediate filaments in established human lung cancer cell lines. An indicator of differentiation and derivation. *Lab Invest* **51**(3), 307-316.

BJÖRKMAN, N. (**1954**) Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anat (Basel)* **22**, 1-91.

BJÖRKMAN, N. (**1968**) Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *J Ultrastruct Res* **24**(3), 249-258.

BJÖRKMAN, N. & BLOOM, G. (**1957**) On the fine structure of the foetal-maternal junction in the bovine placentome. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **45**, 649-659.

BJÖRKMAN, N. & SOLLEN, P. (**1960**) Morphology of the bovine placenta at normal delivery. *Acta vet scand* **1**, 347-362.

BOENISCH, T. (**2003**) In: *Handbuch Immunchemische Färbemethoden* Carpinteria, CA, USA: DAKOCytomation Corp, 5-13.

BOSMAN, F.T. (**1993**) Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* **25**(7), 469-477.

BOSMAN, F.T. & STAMENKOVIC, I. (**2003**) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* **200**(4), 423-428.

BOSTEDT, H. (**2003**) Geburt und Nachgeburtsperiode. In: *Fruchtbarkeitsmanagement beim Rind* Frankfurt am Main: DLG-Verlags-GmbH, 191-257.

BOWEN, J.A., BAZER, F.W. & BURGHARDT, R.C. (**1997**) Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vitro. *Biol Reprod* **56**(2), 409-415.

BOWEN, J.A., BAZER, F.W. & BURGHARDT, R.C. (**1996**) Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. *Biol Reprod* **55**(5), 1098-1106.

BRIDGER, P., LEISER, R., ZEILER, M., GOEBEL, S. & PFARRER, C. (**2005**) Characterisation of a primary cell culture isolated from the bovine placental caruncle. *Placenta* **26**(8-9, Sept.-Oct.), A.63.

BRONSON, R.A. & FUSI, F.M. (**1996**) Integrins and human reproduction. *Mol Hum Reprod* **2**(3), 153-168.

BURGHARDT, R.C., BOWEN, J.A., NEWTON, G.R. & BAZER, F.W. (**1997**) Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* **52**, 151-164.

CHAPONNIER, C. & GABBIANI, G. (**2004**) Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* **204**(4), 386-395.

CHARLI, J.L., CRUZ, C., REDONDO, J.L., GUERRA, C. & JOSEPH-BRAVO, P. (**1995**) Homologous conditioned medium enhances expression of TRH in hypothalamic neurons in primary culture. *Brain Res Dev Brain Res* **89**(1), 155-160.

CHARO, I.F., NANNIZZI, L., SMITH, J.W. & CHERESH, D.A. (**1990**) The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1), 2795-2800.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (**1987**) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1), 156-159.

CLARK, E.A. & BRUGGE, J.S. (**1995**) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**(5208), 233-239.

COUTIFARIS, C., OMIGBODUN, A. & COUKOS, G. (**1998**) Integrins, endometrial maturation, & human embryo implantation. *Semin Reprod Endocrinol* **16**(3), 219-229.

DAMSKY, C., SUTHERLAND, A. & FISHER, S. (**1993**) Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *FASEB J* **7**(14), 1320-1329.

DAMSKY, C.H., FITZGERALD, M.L. & FISHER, S.J. (**1992**) Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* **89**(1), 210-222.

DAMSKY, C.H. & ILIC, D. (**2002**) Integrin signaling: it's where the action is. *Curr Opin Cell Biol* **14**(5), 594-602.

DAMSKY, C.H., LIBRACH, C., LIM, K.H., FITZGERALD, M.L., MCMASTER, M.T., JANATPOUR, M., ZHOU, Y., LOGAN, S.K. & FISHER, S.J. (**1994**) Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* **120**(12), 3657-3666.

DANEN, E.H. & SONNENBERG, A. (**2003**) Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* **201**(4), 632-641.

DANTZER, V. & LEISER, R. (**1998**) Placentation. In: *Textbook of Veterinary histology*. Dellmann, H. D. and Eurell, J. A. Baltimore: Williams & Wilkins, 270-286.

DAVIES, J. & WIMSATT, W.A. (**1966**) Observation on the fine structure of the sheep placenta. *Acta Anat (Basel)* **65**(1), 182-223.

DIPERSIO, C.M., SHAH, S. & HYNES, R.O. (**1995**) alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J Cell Sci* **108**, 2321-2336.

DOUGLAS, G.C., THIRKILL, T.L. & BLANKENSHIP, T.N. (**1999**) Vitronectin receptors are expressed by macaque trophoblast cells and play a role in migration and adhesion to endothelium. *Biochim Biophys Acta* **1452**(1), 36-45.

FARMILO, A. & STEAD, R. (**2003**) Fixierung. In: *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. Boenisch, T. Carpinteria, CA, USA: DAKOCytomation Corp., 23-29.

FAZLEABAS, A.T., BELL, S.C., FLEMING, S., SUN, J. & LESSEY, B.A. (**1997**) Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* **56**(2), 348-356.

FENG, S., PETER, A.T. & ASEM, E. (**2000a**) Establishment of a pure culture of distinct cell types from bovine placental cotyledon. *Methods Cell Sci* **22**(2-3), 101-106.

FENG, S., PETER, A.T. & ASEM, E.K. (**2000b**) Endothelial-like cells from the bovine placental cotyledon. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**(8), 527-531.

FISHER, S.J. & DAMSKY, C.H. (**1993**) Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol* **4**(3), 183-188.

FORTIER, M.A., GUILBAULT, L.A. & GRASSO, F. (**1988**) Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil* **83**(1), 239-248.

FRESHNEY, R.I. (**2000a**) In Conclusion. In: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Freshney, R. I. Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons,Inc., 475-564.

FRESHNEY, R.I. (**2000b**) Primary Culture. In: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Freshney, R. I. Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons, Inc., 149-176.

FRESHNEY, R.I. (**2000c**) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Freshney, R. Ian. Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons, Inc.

FRISCH, S.M. & RUOSLAHTI, E. (**1997**) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**(5), 701-706.

GABRIEL, S., WINTERHAGER, E., PFARRER, C., TRAUB, O. & LEISER, R. (**2004**) Modulation of connexin expression in sheep endometrium in response to pregnancy. *Placenta* **25**(4), 287-296.

GARLOW, J.E., KA, H., JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., JAEGER, L.A. & BAZER, F.W. (**2002**) Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol Reprod* **66**(3), 718-725.

GARRATT, A.N. & HUMPHRIES, M.J. (**1995**) Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors. *Acta Anat (Basel)* **154**(1), 34-45.

GOSPODAROWICZ, D., GREENBURG, G., FOIDART, J.M. & SAVION, N. (**1981**) The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. *J Cell Physiol* **107**(2), 171-183.

GREENBURG, G. & HAY, E.D. (**1988**) Cytoskeleton and thyroglobulin expression change during transformation of thyroid epithelium to mesenchyme-like cells. *Development* **102**(3), 605-622.

GREENSTEIN, J.S., MURRAY, R.W. & FOLEY, R.C. (**1958**) Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anat Rec* **132**, 321-341.

GROSS, T.S. & WILLIAMS, W.F. (**1988**) Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. *Biol Reprod* **38**(5), 1027-1034.

GROSS, T.S., WILLIAMS, W.F. & RUSSEK-COHEN, E. (**1991**) Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta* **12**(1), 27-35.

GROSSER, O. (**1909**) Die Placentation. In: *Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen* Wien, Leipzig: Wilhelm Braumüller, 89-289.

GROSSER, O. (**1927**) Vergleichende Placentationslehre. In: *Frühentwicklung Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere* München: Verlag von J.F. Bergmann, 95-174.

GUILLOMOT, M. (**1999**) Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. *Placenta* **20**(4), 339-345.

HABERMEHL, K. (**1975**) Die Altersbestimmung beim Hauswiederkäuer. In: *Die Altersbestimmung bei Haus- und Labortieren* Berlin, Hamburg: Paul Parey, 62-63.

HAIER, J., GOLDMANN, U., HOTZ, B., RUNKEL, N. & KEILHOLZ, U. (**2002**) Inhibition of tumor progression and neoangiogenesis using cyclic RGD-peptides in a chemically induced colon carcinoma in rats. *Clin Exp Metastasis* **19**(8), 665-672.

HIRSCH, P. (**2001**) Immunhistochemische Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Expression von Zytokeratinen, extrazellulären Matrixproteinen und Integrinen im Plazentom des Rindes. Diss vet med Giessen.

HOFFMANN, B. & SCHULER, G. (**2002**) The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* **23**(1-2), 309-320.

HRADECKÝ, P., MOSSMAN, H.W. & STOTT, G.G. (**1988**) Comparative development of ruminant placentomes. *Theriogenology* **29**(3), 715-729.

HUNT, R.C. & DAVIS, A.A. (**1990**) Altered expression of keratin and vimentin in human retinal pigment epithelial cells in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* **145**(2), 187-199.

HYNES, R.O. (**1987**) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**(4), 549-554.

JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., JAEGER, L.A., KA, H., GARLOW, J.E., PFARRER, C., SPENCER, T.E. & BURGHARDT, R.C. (**2001**) Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod* **65**(3), 820-828.

JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., BAZER, F.W. & SPENCER, T.E. (**2003**) Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* **69**(5), 1458-1471.

JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., NEWTON, G.R., BAZER, F.W. & SPENCER, T.E. (**1999**) Development and characterization of immortalized ovine endometrial cell lines. *Biol Reprod* **61**(5), 1324-1330.

JONES, C.J., KOOB, B., STODDART, R.W., HOFFMANN, B. & LEISER, R. (**1994**) Lectin-histochemical analysis of glycans in ovine and bovine near-term placental binucleate cells. *Cell Tissue Res* **278**(3), 601-610.

JOYCE, M.M., GONZALEZ, J.F., LEWIS, S., WOLDESENBET, S., BURGHARDT, R.C., NEWTON, G.R. & JOHNSON, G.A. (**2005**) Caprine uterine and placental

osteopontin expression is distinct among epitheliochorial implanting species. *Placenta* **26**(2-3), 160-170.

JULIANO, R.L. & HASKILL, S. (**1993**) Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **120**(3), 577-585.

KANG, I.C., KIM, D.S., JANG, Y. & CHUNG, K.H. (**2000**) Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* **275**(1), 169-173.

KEMP, B., KERTSCHANSKA, S., KADYROV, M., RATH, W., KAUFMANN, P. & HUPPERTZ, B. (**2002**) Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol* **117**(5), 401-414.

KIMMINS, S., LIM, H.C. & MACLAREN, L.A. (**2004**) Immunohistochemical localization of integrin alpha V beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. *Reprod Biol Endocrinol* **2**(1), 19.

KIMMINS, S., LIM, H.C., PARENT, J., FORTIER, M.A. & MACLAREN, L.A. (**2003**) The effects of estrogen and progesterone on prostaglandins and integrin beta 3 (beta3) subunit expression in primary cultures of bovine endometrial cells. *Domest Anim Endocrinol* **25**(2), 141-154.

KIMMINS, S. & MACLAREN, L.A. (**1999**) Cyclic modulation of integrin expression in bovine endometrium. *Biol Reprod* **61**(5), 1267-1274.

KLEINIG, H. & MAIER, U. (**1999a**) Zell-Matrix- und Zell-Zell-Erkennung. In: *Zellbiologie* Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag, 81-87.

KLEINIG, H. & MAIER, U. (**1999b**) Cytoskelett. In: *Zellbiologie* Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag, 129-141.

KLISCH, K., PFARRER, C., SCHULER, G., HOFFMANN, B. & LEISER, R. (**1999**) Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat Embryol* **200**(2), 229-237.

KREBS, C., DIKRANIAN, K., NIKOLOV, S., HOFFMANN, B. & LEISER, R. (**1997**) Filaments of the developing bovine placenta: immunohistochemical observations. *Placenta* **18**(5-6, July-Aug.), A.34.

KUMAR, C.C. (**1998**) Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**(11 Reviews), 1365-1373.

KUMAR, V., BUSTIN, S.A. & MCKAY, I.A. (**1995**) Transforming growth factor alpha. *Cell Biol Int* **19**(5), 373-388.

KURTH, T. (**2000**) Zelloberflächen. In: *Grundstudium Biologie - Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution*. Munk, K. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag, 12.1-12.18.

LANG, C.Y., HALLACK, S., LEISER, R. & PFARRER, C. (**2004**) Cytoskeletal filaments and associated proteins during restricted trophoblast invasion in bovine placentomes: light and transmission electron microscopy and RT-PCR. *Cell Tissue Res* **315**(3), 339-348.

LARSON, R.C., IGNOTZ, G.G. & CURRIE, W.B. (**1992**) Effect of fibronectin on early embryo development in cows. *J Reprod Fertil* **96**(1), 289-297.

LAVEN, R.A. & PETERS, A.R. (**2001**) Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. *Reprod Domest Anim* **36**(6), 289-296.

LEISER, R. (**1975**) Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind. *Anat Embryol* **4**, 63-86.

LEISER, R. & KAUFMANN, P. (**1994**) Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* **102**(3), 122-134.

LESSEY, B.A. & ARNOLD, J.T. (**1998**) Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol* **39**(1-2), 105-116.

LESSEY, B.A., DAMJANOVICH, L., COUTIFARIS, C., CASTELBAUM, A., ALBELDA, S.M. & BUCK, C.A. (**1992**) Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* **90**(1), 188-195.

LESSEY, B.A., ILESANMI, A.O., LESSEY, M.A., RIBEN, M., HARRIS, J.E. & CHWALISZ, K. (**1996**) Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. *Am J Reprod Immunol* **35**(3), 195-204.

LIDDELL, E. & WEEKS, I. (**1996**) Immunlokalisation. In: *Antikörper-Techniken, Reihe "Labor im Fokus"* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 109-128.

LIM, Y.S., KIM, K.A., JUNG, J.O., YOON, J.H., SUH, K.S., KIM, C.Y. & LEE, H.S. (**2002**) Modulation of cytokeratin expression during in vitro cultivation of human hepatic stellate cells: evidence of transdifferentiation from epithelial to mesenchymal phenotype. *Histochem Cell Biol* **118**(2), 127-136.

LINDL, T. (**2000**) Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung und Subkultivierung von Zellen. In: *Zell- und Gewebekultur* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 94-113.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL J.E. (**2001b**) Das Actincytoskelett. In: *Molekulare Zellbiologie* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 814-824.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL J.E. (**2001a**) Integration von Zellen in Geweben. In: *Molekulare Zellbiologie* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1046-1083.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. & DARNELL, J. (**2001c**) Intermediärfilamente. In: *Molekulare Zellbiologie* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 903-912.

LONGHURST, C.M. & JENNINGS, L.K. (**1998**) Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **54**(6), 514-526.

MACINTYRE, D.M., LIM, H.C., RYAN, K., KIMMINS, S., SMALL, J.A. & MACLAREN, L.A. (**2002**) Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. *Biol Reprod* **66**(5), 1430-1436.

MACLAREN, L.A. & WILDEMAN, A.G. (**1995**) Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the alpha 5 and beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod* **53**(1), 153-165.

MATAMOROS, R.A., CAAMANO, L., LAMB, S.V. & REIMERS, T.J. (**1994**) Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biol Reprod* **51**(3), 486-492.

MIYAMOTO, S., AKIYAMA, S.K. & YAMADA, K.M. (**1995**) Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* **267**(5199), 883-885.

MOLL, R. (**1993**) Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors. *Veröff Pathol* **142**, 1-197.

MOLL, R., FRANKE, W.W., SCHILLER, D.L., GEIGER, B. & KREPLER, R. (**1982**) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**(1), 11-24.

MOSSMAN, H.W. (**1937**) Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Carnegie Institute Contributions to Embryology* **26**, 129-246.

MOSSMAN, H.W. (**1987**) Types of eutherian placentation. In: *Vertebrate fetal membranes* Basingstoke, UK: The Macmillan Press LTD, 91-97.

MUNSON, L., CHANDLER, S.K. & SCHLAFER, D.H. (**1988**) Long-term culture of bovine trophoblastic cells. *J Tissue Cult Methods* **11**, 123-128.

MUNSON, L., WILKINSON, J.E. & SCHLAFER, D.H. (**1990**) Effects of substrata on the polarization of bovine endometrial epithelial cells in vitro. *Cell Tissue Res* **261**(1), 155-161.

NAKAMURA, T., MILLER, D., RUOSLAHTI, E. & BORDER, W.A. (**1992**) Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int* **41**(5), 1213-1221.

NAKANO, H., SHIMADA, A., IMAI, K., TAKAHASHI, T. & HASHIZUME, K. (**2005**) The cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-catenin in bovine trophoblasts during binucleate cell differentiation. *Placenta* **26**(5), 393-401.

NAKANO, H., SHIMADA, A., IMAI, K., TAKAHASHI, T. & HASHIZUME, K. (**2002a**) Association of Dolichos biflorus lectin binding with full differentiation of bovine trophoblast cells. *Reproduction* **124**(4), 581-592.

NAKANO, H., SHIMADA, A., IMAI, K., TAKEZAWA, T., TAKAHASHI, T. & HASHIZUME, K. (**2002b**) Bovine trophoblastic cell differentiation on collagen substrata: formation of binucleate cells expressing placental lactogen. *Cell Tissue Res* **307**(2), 225-235.

NAKANO, H., TAKAHASHI, T., IMAI, K. & HASHIZUME, K. (**2001**) Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. *Cell Tissue Res* **303**(2), 263-270.

NATH, D., SLOCOMBE, P.M., WEBSTER, A., STEPHENS, P.E., DOCHERTY, A.J. & MURPHY, G. (**2000**) Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1)integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *J Cell Sci* **113 (Pt 12)**, 2319-2328.

PFARRER, C., GOEBEL, S., BRIDGER, P. & LEISER, R. (**2005**) Co-localization of beta1 integrin and cytoskeleton-associated proteins in primary bovine caruncular cells. *Placenta* **26**(8-9, Sept.-Oct.), A.16.

PFARRER, C., HALLACK, S., JOHNSON, G.A., BURGHARDT, R.C., BAZER, F.W. & LEISER, R. (**2002**) Expression of osteopontin in bovine placentomes and interplacentomal areas from early placentation until term. *Biol Reprod* **66**(Suppl 1), 229.

PFARRER, C., HIRSCH, P., GUILLOMOT, M. & LEISER, R. (**2003**) Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* **24**(6), 588-597.

PFARRER, CD. (**2005**) Characterization of the bovine placenta by cytoskeleton, integrin receptors, and extracellular matrix. In: *Placenta research methods and protocols*. Soares, M. J. and Hunt, J. S.: Humana Press, 323-336.

POZZI, A. & ZENT, R. (**2003**) Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp Nephrol* **94**(3), e77-e84.

PYTELA, R., PIERSCHBACHER, M.D. & RUOSLAHTI, E. (**1985**) Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* **40**(1), 191-198.

REGAUER, S., FRANKE, W.W. & VIRTANEN, I. (**1985**) Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. *J Cell Biol* **100**(4), 997-1009.

REIMERS, T.J., ULLMANN, M.B. & HANSEL, W. (**1985**) Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol Reprod* **33**(5), 1227-1236.

RICHTER, J. & GÖTZE, R. (**1993**) In: *Tiergeburtshilfe*. Grunert, E. Berlin, Hamburg: Parey, 29-58.

RUOSLAHTI, E. (**1991**) Integrins. *J Clin Invest* **87**(1), 1-5.

RUOSLAHTI, E. & PIERSCHBACHER, M.D. (**1987**) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**(4826), 491-497.

RUOSLAHTI, E. & VAHERI, A. (**1997**) Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* **9**(5), 605-607.

SCHAEFFER, W.I. (**1990**) Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. Tissue Culture Association Terminology Committee. *In Vitro Cell Dev Biol* **26**(1), 97-101.

SCHNORR, B. (**1996**) Plazentation beim Säuger und Embryonalhüllen beim Vogel. In: *Embryologie der Haustiere: ein Kurzlehrbuch*. Schnorr, B. Stuttgart: Enke, 66-99.

SCHOENWAELDER, S.M. & BURRIDGE, K. (**1999**) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2), 274-286.

SCHRIMPF, G. (**2002**) Isolierung von RNA. In: *Gentechnische Methoden*: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 129-145.

SCHULER, G., WIRTH, C., KLISCH, K., FAILING, K. & HOFFMANN, B. (**2000**) Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between Day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. *Reprod Domest Anim* **35**, 157-162.

SCHUPPAN, D., SOMASUNDARAM, R., DIETERICH, W., EHNIS, T. & BAUER, M. (**1994**) The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* **733**, 87-102.

SHEMESH, M., HANSEL, W. & STRAUSS, J.F., III. (**1984**) Modulation of bovine placental prostaglandin synthesis by an endogenous inhibitor. *Endocrinology* **115**(4), 1401-1405.

SHEMESH, M., HAREL-MARKOWITZ, E., GUREVICH, M. & SHORE, L.S. (**1994**) Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells. *Biol Reprod* **51**(1), 146-151.

SHIMADA, A., NAKANO, H., TAKAHASHI, T., IMAI, K. & HASHIZUME, K. (**2001**) Isolation and characterization of a bovine blastocyst-derived trophoblastic cell line, BT-1: development of a culture system in the absence of feeder cell. *Placenta* **22**(7), 652-662.

STEVEN, D.H. (**1975**) Anatomy of the placental barrier. In: *Comparative Placentation: Essays in Structure and Function*. Steven, D. H. New York: Academic Press, 25-56.

STRAHL, H. (**1906**) Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta. In: *Hertwigs Handbuch der Vergleichenden und Experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere*. Hertwig. Jena: Fischer, 235-368.

SUEOKA, K., SHIOKAWA, S., MIYAZAKI, T., KUJI, N., TANAKA, M. & YOSHIMURA, Y. (**1997**) Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril* **67**(5), 799-811.

SUTHERLAND, A.E., CALARCO, P.G. & DAMSKY, C.H. (**1993**) Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* **119**(4), 1175-1186.

TAKAHASHI, H., IGA, K., SATO, T., TAKAHASHI, M. & OKANO, A. (**2001a**) Isolation and culture of bovine endometrial epithelial cells in an serum-free culture system. *J Reprod Dev* **47**(3), 181-187.

TAKAHASHI, M., TAKAHASHI, M., HAMANO, S., TAKAHASHI, H. & OKANO, A. (**2005**) In vitro attachment of bovine hatched blastocysts on fibronectin is mediated by integrin in a RGD dependent manner. *J Reprod Dev* **51**(1), 47-57.

TAKAHASHI, T., ASO, H. & HASHIZUME, K. (**2001b**) Immunological and biological activities of bovine placental lactogen in placental explant culture. *J Reprod Dev* **47**(1), 63-67.

TALBOT, N.C., CAPERNA, T.J., EDWARDS, J.L., GARRETT, W., WELLS, K.D. & EALY, A.D. (**2000**) Bovine blastocyst-derived trophectoderm and endoderm cell cultures: interferon tau and transferrin expression as respective in vitro markers. *Biol Reprod* **62**(2), 235-247.

ULLMANN, M.B. & REIMERS, T.J. (**1989**) Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *J Reprod Fertil Suppl* **37**, 173-179.

USHIZAWA, K., TAKAHASHI, T., KANEYAMA, K., TOKUNAGA, T., TSUNODA, Y. & HASHIZUME, K. (**2005**) Gene expression profiles of bovine trophoblastic cell line (BT-1) analyzed by a custom cDNA microarray. *J Reprod Dev* **51**(2), 211-220.

VAN DER LOOS, C. (**1999**) *Immunenzymatische Doppelfärbungen* Hamburg: DAKO Diagnostika GmbH, 4-27.

VATNICK, I., SCHOKNECHT, P.A., DARRIGRAND, R. & BELL, A.W. (**1991**) Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J Dev Physiol* **15**(6), 351-356.

VINATIER, D. (**1995**) Integrins and reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **59**(1), 71-81.

VIRTANEN, I., VON, K.H., LEHTO, V.P., VARTIO, T. & AULA, P. (**1981**) Cultured human amniotic fluid cells characterized with antibodies against intermediate filaments in indirect immunofluorescence microscopy. *J Clin Invest* **68**(5), 1348-1355.

WANG, G., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E. & BAZER, F.W. (**2000**) Isolation, immortalization, and initial characterization of uterine cell lines: an in vitro model system for the porcine uterus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**(10), 650-656.

WEHRLE-HALLER, B. & IMHOF, B.A. (**2003**) Integrin-dependent pathologies. *J Pathol* **200**(4), 481-487.

WEWER, U.M., DAMJANOV, A., WEISS, J., LIOTTA, L.A. & DAMJANOV, I. (**1986**) Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. *Differentiation* **32**(1), 49-58.

WILLERS, I., BLANKENFELD, J. & GOEDDE, H.W. (**1990**) Characterization of long-term cell cultures of human chorion villi and fibroblasts using antibodies to cytoskeletal proteins. *Arch Gynecol Obstet* **248**(2), 87-92.

WILLIAMS, W.F., MARGOLIS, M.J., MANSPEAKER, J., DOUGLASS, L.W. & DAVIDSON, J.P. (**1987**) Peripartum changes in the bovine placenta to fetal membrane retention. *Theriogenology* **28**(2), 213-223.

WIMSATT, W.A. (**1951**) Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am J Anat* **89**, 233-282.

WOICKE, J., SCHOON, H.A., HEUWIESER, W., SCHULZ, L.C. & GRUNERT, E. (**1986**) Morphological and functional aspects of placental maturing mechanisms in the cow. 1. Light microscopic findings. *Zentralbl Veterinarmed A* **33**(9), 660-667.

WOODING, F.B. (**1984**) Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am J Anat* **170**(2), 233-250.

WOODING, F.B. (**1982**) Structure and function of placental binucleate ('giant') cells. *Bibl Anat* (22), 134-139.

WOODING, F.B. (**1992**) Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* **13**(2), 101-113.

WOODING, F.B. & FLINT, D.J. (**1994**) Development of embryonic membranes in the various vertebrate taxa. In: *Marshall´s Physiology of Reproduction*. Lamming, G. E. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall, 233-460.

WOODING, F.B. & WATHES, D.C. (**1980**) Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil* **59**(2), 425-430.

YAMADA, O., TODOROKI, J., TAKAHASHI, T. & HASHIZUME, K. (**2002**) The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. *J Vet Med Sci* **64**(3), 207-214.

YAMAUCHI, N., YAMADA, O., TAKAHASHI, T., IMAI, K., SATO, T., ITO, A. & HASHIZUME, K. (**2003**) A three-dimensional cell culture model for bovine endometrium: regeneration of a multicellular spheroid using ascorbate. *Placenta* **24**(2-3), 258-269.

YELIAN, F.D., YANG, Y., HIRATA, J.D., SCHULTZ, J.F. & ARMANT, D.R. (**1995**) Molecular interactions between fibronectin and integrins during mouse blastocyst outgrowth. *Mol Reprod Dev* **41**(4), 435-448.

YOSHIMURA, Y., MIYAKOSHI, K., HAMATANI, T., IWAHASHI, K., TAKAHASHI, J., KOBAYASHI, N., SUEOKA, K., MIYAZAKI, T., KUJI, N. & TANAKA, M. (**1998**) Role of beta 1 integrins in human endometrium and decidua during implantation. *Horm Res* **50**(Suppl 2), 46-55.

Anhang

Rezepturen, Geräte, Reagenzien

ZELLKULTUR

Präparationsausrüstung

- Tonne mit Deckel, 46 l, Art. Nr. 3253925054093, OBI, D-Gießen
- OP-Besteck und Schlachthofmesser, Medizintechnik für Human- und Veterinärmedizin, Labortechnik für Wissenschaft und Industrie, Erich Reinke e.K., D-Gießen
- DUROPLAN-Petrischalen, Schott, 10 x 2 cm, Art. Nr. 192175548, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Bechergläser, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Brauns Wundheftseide roh auf Knäuel, Braun, D-Melsungen
- Zentrifugenröhrchen Nunc, 15 ml, 500 Stück, Art. Nr. 366079, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Zentrifugenröhrchen Nunc, 50 ml, 400 Stück, Art. Nr. 373687, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Rotilabo Schwimmständer dreieckig, 5 Stück, Art. Nr. H070.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Cell Dissociation Sieve - Tissue Grinder Kit, Art. Nr. CD1 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen

Verwendete Zellkulturmedien

Die Angaben der Konzentrationen beziehen sich auf das unsupplementierte Medium gemäß den Herstellerangaben. Eine Supplementierung fand mit Natriumhydrogencarbonat (2438 mg/l) statt.

- DMEM/Ham´s F-12 Trockenmedium mit L-Glutamin, ohne $NaHCO_3$, 1 l, Art. Nr. T481-01, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Natriumhydrogencarbonat 500 g, Art. Nr. 6329, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Quantum 286 für Epithelzellen mit Glutamin, 500 ml, Art. Nr. U15-818, PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe
- Hybridoma-Express Medium, serumfrei, 100 ml, Art. Nr. U11-001, PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe
- RPMI 1640 mit L-Glutamin, Art. Nr. E15-840, 500 ml, PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe
- William´s Medium E mit L-Glutamin, Art. Nr. E15-854, PAA Laboratories GmbH, D-Cölbe

Enzyme

- CLS Typ 1, 100 mg, Art. Nr. C1-28, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
    - 219 U/mg, Charge MOE4015
    - 334 U/mg, Charge M1E4825
    - 274 U/mg, Charge S3K6654
- CLS Typ II, 100 mg, Art. Nr. C2-28, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
    - 282 U/mg, Charge S1M5127

Ansatz: 2000 U CLS/1 ml Hanks+ und Zugabe von 9 ml Medium

- Trypsin/EDTA, Art. Nr. L2153, 100 ml, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) (w/v) in (10x) PBS ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}, 100 ml, Art. Nr. L2143, Biochrom AG seromed®, D-Berlin

Puffer

- Hanks´ Salzlösung (HBSS) ohne Phenolrot, mit 0,35 g/l $NaHCO_3$, 500 ml, Art. Nr. L2035, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Hanks´ Salzlösung (HBSS) ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}, ohne Phenolrot, mit 0,35 g/l $NaHCO_3$, 500 ml, Art. Nr. L2045, Biochrom AG seromed®, D-Berlin

Verwendete Geräte für die Zellkultur mit Produktbeschreibungen und Bezugsquellen

- HERAsafe Typ HS 12, Sicherheitswerkbank der Klasse 2, Art. Nr. 51016687, Kendro Laboratory Products GmbH, D-Hanau
- Begasungsbrutschrank für Zell- und Gewebekulturen Typ B 5061 EK/CO_2, Art. Nr. 26139001, Fabriknummer 8616049, Heraeus, Bezug über Kendro Laboratory Products GmbH, D-Hanau
- Biologisches Invers-Mikroskop Modell MBL 3100 Labormikroskop A. KRÜSS Krüss Optronic GmbH, Hamburg) (Routinemikroskop mit Binokulartubus), Art. Nr. 656110107, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Zentrifuge Hettich Rotanta/S Typ 3510, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
- Umlufttrockenschrank/Sterilisator, Heraeus, UT12, Art. Nr. 411242305, Bezug über MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Wasserbad Typ 1004, Nr. 10671492e, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, 30938 Burgwedel
- IKA®-Schüttler Typ MTS 2, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA®-Labortechnik, D-Staufen i. Br.
- Vortex Genie 2, Modell G-560E, Scientific Industries, Inc Bohemia, über MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf

- Messpipetten Kl. B, 1 ml (E942.1), 2 ml (E943.1), 5 ml (E945.1), 10 ml (E946.1) und 20 ml (E947.1), Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Pipettencontainer, Art. Nr. P979.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Nalgene Pipettenreinigungssatz, Größe D, Art. Nr. 24875201, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Pipetus Standard, Art. Nr. B010.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Gas-Sicherheitsbrenner S, Art. Nr. L151.1, Carl Roth GmbH & CoKG, D-Karlsruhe
- Adapter für Gaskartusche CV 360, Art. Nr. L153.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Kartusche CV 360 mit Ventil, Art. Nr. T927.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Zählkammer nach Neubauer, Art. Nr. T728.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Hämazytometer-Deckgläser 22 x 22 mm, Art. Nr. L190.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Gewindeflasche transparent, 500 ml, Art. Nr. A360.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Pumpe Typ MP1/63, Art. Nr. 12393 für Sterilfiltration des Mediums, Arthur Pfeiffer Vakuumtechnik GmbH Wetzlar, jetzt Pfeiffers VacuumTechnology AG, D-Wetzlar
- Steritop™ Millipore Flaschenaufsatzfilter, 250 ml, Neck Size 45 mm, 0,22 µl GP Express Membrane, Art. Nr. X335.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Magnetrührstäbchen teflonbeschichtet, Art. Nr. 241735020, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Reagenzglasgestell Art. Nr. 7475.1 und 7495.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Beschwerungsring Lead Donut LD-7C, Art. Nr. 317218007, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf

Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur mit Produktbeschreibung und Bezugsquellen

- Kohlensäure in Flasche, Art. Nr. M04584602, W. Balser GmbH, D-Gießen
- Gewebekulturschalen (Tissue Culture Dishes) 60/15 mm, steril, Cellstar®, greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhausen
- Gewebekulturflaschen (Tissue Culture Flasks) 250 ml, Art. Nr. 658170, Cellstar®, greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhausen
- Gewebekulturflaschen (Tissue Culture Flasks) 50 ml, Art. Nr. 690160, Cellstar®, greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhausen
- 6-Wells: MULTIWELL* Tissue Culture Plate 6-Well, FALCON* 3046, Becton Dickinson GmbH, D-Heidelberg
- Objektträger: 50 SuperFrost Objektträger circa 76 x 26 mm, R. Langenbrinck D-Emmendingen

- Deckgläser: 24 x 24 mm, Art. Nr. H 875, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 500 Stück, Art. Nr. 366079, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml, 400 Stück, Art. Nr. 373687, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Gazin® 10 x 10 cm, 100 Stück, Mullkompresse DIN 61 630-VM 17 12fach, Firma Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, D-Rengsdorf
- Prüfröhrchen für CO_2, 1 Pack à 10 Stück, Art. Nr. 845810016, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Serologische Pipette 1 ml (N231.1), 2 ml (N236.2), 5 ml (N239.1), 10 ml N242.1), Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Polystyrol-Einmalpipetten, 25 ml, steril, 200 Stück, Nunc GmbH & Co. KG, D-Wiesbaden
- Cell Scraper 24 cm, 150 Stück, Art. Nr. 38022, Renner GmbH, D-Dannstadt-Schauernheim
- TC Flask, canted neck, 25 cm^2, 360 Stück, Art. Nr. 38000, Renner GmbH, D-Dannstadt-Schauernheim
- TC Testplate, 6 wells PS, 126 Stück, Art. Nr. 38007, Renner GmbH, D-Dannstadt-Schauernheim
- Sterilindikatorband für Dampfsterilisation, Art. Nr. 8221.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Sterilindikatorband für Heißluftsterilisation, Art. Nr. H590.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Zellkulturschalen, 92 mm, Art. Nr. 150350, Nunc GmbH & Co. KG, D-Wiesbaden
- Sterillium, Hände-Desinfektionsmittel®, BODE Chemie, 500 ml, D-Hamburg, Art. Nr. L276.1, Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

Sonstige Produkte für die Zellkultur

- FBS = Fötales Bovines Serum, 500 ml, Art. Nr. S0115, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/10.000 µg/ml, 100 ml, Art. Nr. A2213, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Augenwatte N1, 100g, Baumwolle, Kerma Verbandstoff GmbH, Hainichen, Bezug über Schubert Apotheke D-Gießen
- EGF, murin, nativ, lyophilisiert, 100 µg, Art. Nr. 53003-018, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- Progesteron, Zellkultur getestet, P8783-5G, Charge 080K0885, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Matrigel Matrix, 10 ml, Art. Nr. 354234, Becton Dickinson GmbH, D-Heidelberg
- Collagen A, Art. Nr. L7220, 6 x 5 ml, Charge 708B, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Dimethyl Sulfoxide Hybri-Max, steril, Art. Nr. D2650-5X, 10ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Amphotericin B, Art. Nr. A2610, 6 x 5 ml, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Aqua stabil, 100 ml, Art. Nr. 8940006, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf

IMMUNFLUORESZENZ (IF)

Lösungen für die IF

Stammlösung 0,04 molares PBS:

300 ml Aqua bidest

16 g NaCl

0,4 g KH_2PO_4

2,28 g Na_2HPO_4

mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen

Arbeitslösung 0,02 molares PBS:

250 ml 0,04 molares PBS

250 ml Aqua bidest

auf pH 7,3 einstellen

0,3 % Tween in 0,02 molarem PBS:

498,5 ml 0,02 molares PBS

1,5 ml Tween 20

Antikörper-Verdünnungspuffer:

100 ml 0,3 % Tween in 0,02 molarem PBS

1,0 g BSA

45 ml Glycerol

pH mit 0,5 molarem Na_2CO_3 (pH 9,5) auf pH = 8,0 einstellen

Verwendete Geräte für die Immunfluoreszenz

- Analysenwaage Mettler PC 4400, DeltaRange, IKAMAG® RET, IKA®-Labortechnik, D-Staufen im Br.
- pH-Meter CG 820, Typ CG820, Art. Nr. 55395, Schott Geräte GmbH, D-Hofheim a. Ts.
- Seradest S750, Firma Seral, Medizin- und Labortechnik, Kretschmer, D-Gießen
- Aqua bidest: EASY Pure LF, Barnstead, über MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Heidolph Instruments, Schüttel- und Mischgeräte, taumelnd, Typ Polymax 1040, Art. Nr. 524142210, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Kryostat 2800 Frigocut-E, Reichert-Jung, jetzt Leica Microsystems GmbH, D-Nussloch
- Küvetten Art. Nr. H550.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Immunfluoreszenz mit Produktbeschreibung und Bezugsquellen

- Gelatine gepulvert, Art. Nr. 104078, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Chromalaun (= Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat, KCr(SO4)2 x 12 H2O), Art. Nr. 101036, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Faltenfilter von Schleicher & Schuell, Durchmesser 21 cm, Art. Nr. 311649, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Methanol zur Analyse, 2,5 l, Art. Nr. 1.06009.2511, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Polyoxyethylensorbitan Monolaurate = TWEEN® 20, 250 g Art. Nr. 9127.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4, 1 kg, Art. Nr. P018.2, Carl Roth GmbH & Co KG, D-Karlsruhe
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Na_2HPO_4, 1 kg, Art. Nr. 1.06580.1000, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Natriumchlorid, NaCl, 1 kg, Art. Nr. 3957.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Albumin, bovine Fraction V Powder, Art. Nr. A8022-50G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- PAP PEN, Immunostaining Pen extra dick, Art. Nr. MKP-2, Fa. G. Kisker GbR, D-Steinfurt
- Pasteurpipetten Hirschmann, 250 Stück, Art. Nr. 197734145, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Glycerin = Glycerol, Art. Nr. 4043.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Deckgläser 18 x 18, Art. Nr. 0657.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Deckgläser 24 x 24 à 200 Stück, Art. Nr. H875.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Objektträger Art. Nr. 1880.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Tissue Tek® O.C.T.™ Compound 4584, Sakura Finetek Europe B.V., über Leica Mikrosystems GmbH, D-Nussloch
- Edisonite®, 5 kg Art. Nr. 60137, Schnellreiniger für Instrumente, Geräte und Anlagen, Heiland, Vet GmbH & Co. KG, D-Hamburg
- Verschlusslösung: ProLong® Antifade Kit, Art. Nr. P-7481, MoBiTec GmbH, D-Göttingen
- Vectashield® Mounting Medium mit DAPI, Art. Nr. H-1200, Alexis Deutschland GmbH, D-Grünberg
- Kernfärbung: 4´,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI), Art. Nr. D-1306, 10 mg, Lot 28B2-9, MoBiTec, D-Göttingen

Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Dokumentation der Ergebnisse mit Produktbeschreibungen und Bezugsquellen

- Photomikroskop Axiophot, Durchlicht und Auflicht-Fluoreszenz, Carl Zeiss AG, D-Oberkochen
- DMRB Fluoreszenz Mikroskop Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-Bensheim
- Kamera VC45, 2/3 “, PCO AG, D-Kelheim
- Software: Diplomarbeit von S. Kieslich aus Wolfsburg, Mai 1999, „Entwicklung einer Analysesoftware zur computergestützten Fluoreszenzmikroskopie“ im Strahlenzentrum der JLU Gießen und analySIS®, digitale Bildanalyse, Soft Imaging System GmbH, Münster
- Auflichtmikroskop IX70, Olympus Deutschland GmbH, D-Hamburg
- Kamera SC 35 Typ 12, Olympus Deutschland GmbH, D-Hamburg
- Vergrößerungsgerät Facomat IIc, Leitz, D-Wetzlar
- Farbfluoreszenzdias Kodak Ektachrome P1600 professional, Tageslichtfilm, Farbumkehrfilm, EPH 135-36, Seibel, D-Gießen
- ringfo Neopan 1600 135-36, Prof. Schwarzweißfilm, Art. Nr. 930719, Seibel, D-Gießen
- ringfo Ektachrome P 1600 135-36, Colorfilm, Art. Nr. 966484, Seibel, D-Gießen
- ringfo 64T Prof. EPY, 135-36, Kunstlicht Diafilm, Seibel, D-Gießen
- Kodak, Ektachrome professional EPY64T, 36er, Seibel, D-Gießen
- Fotopapier Agfa Brovira-Speed, BN 310 RC 3, glossy, grade normal, Seibel, D-Gießen
- Fotopapier Agfa Brovira-Speed, BH 310 RC 4, glossy, grade hard, B/W RC-Paper, Seibel, D-Gießen
- Fotopapier Agfa Brovira-Speed, BEH 310 RC 5, glossy, grade extra hard, Seibel, D-Gießen
- SW-Papierentwickler, AGFA Neutol Liquid NE, Agfa-Gevaert AG Leverkusen, über Seibel, D-Gießen
- Einmal-Entwickler für SW-Filme, AGFA Rodinal B & W Film Developer, 500 ml, Agfa-Gevaert AG Leverkusen, über Seibel, D-Gießen

<u>Ansatz der Fixierlösung:</u>

400 g Natriumthiosulfat

10%ige Kaliumjodidlösung

40 g Kaliumdisulfid

RNA-EXTRAKTION UND RT-PCR

Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien zur RNA-Extraktion und RT-PCR mit Produktbeschreibungen und Bezugsquellen

- Thermocycler T3, Whatman Biometra GmbH i.L., D-Göttingen
- Zentrifuge Typ 1610 Universal 32R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D-Tuttlingen
- Zentrifuge Typ 1110 Mikro 22R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D-Tuttlingen
- Zentrifuge Typ 2070 Mikro 12-24 Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D-Tuttlingen
- Photometer, Art. Nr. 61310043, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-Hamburg
- Küvette UVette® 220-1600 nm, MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
- Gelkammern Agagel Mini/Maxi Whatman Biometra GmbH i.L., D-Göttingen
- Elektrophoreseapparatur Mini-Protean 3® Elektrophoresis Cell-System; Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München
- Stromgeber Elektrophoresekammer PowerPac 200 Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München
- High Performance Ultraviolett Transilluminator, Fa UVP, Upland, CA
- Elektrophoresis Hood mit 0,8 Vergrößerung, Polaroid, GmbH, D-Offenbach
- Polaroid-Sofortbildfilm High Speed, Typ 667 3 ¼ x 4 ¼ “, Polaroid GmbH, D-Offenbach
- peqGOLD RNAPure™ Art. Nr. 30-1010 für 100 ml, 30-1020 für 200 ml und 30-1030 für 500 ml, PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen
- peqGOLD 100 bp DNA-Leiter nPlus 50 µg Art. Nr. 25-2020, PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen
- Chloroform/Trichlormethan, Art. Nr. 3313.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Isopropanol, Art. Nr. 8.18766.2500, Merck KgaA, D-Darmstadt
- DEPC (Diethylpyrocarbonat), Art. Nr. D-5758, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Ethanol pro analysi, 2,5 l, Art. Nr. 1.00983.2511, Merck KgaA, D-Darmstadt
- RNase-AWAY® Reagent, 250 ml, Art. Nr. 10328-011, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- Primersynthese: MWG-Biotech AG, D-Ebersberg
- SuperScript™ II RNase H^- Reverse Transcriptase mit first strand buffer und DTT, Art. Nr. 18064-014, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- Taq DNA-Polymerase, 10x PCR-Puffer und 25 mM $MgCl_2$-Lösung, Art. Nr. N8080241, Roche Applied Biosystems, D-Mannheim
- AmpliTaq Gold® mit Gene Amp 10x PCR Gold Buffer und $MgCl_2$ Solution, Art. Nr. 4311816, Roche Applied Biosystems, D-Mannheim
- Primer Oligo dT-15, Art. Nr. C1101, Promega GmbH, D-Mannheim
- GeneAmp® dNTPs 10 mM, Art. Nr. N808-0007, Roche Applied Biosystems, D-Mannheim
- 100 bp DNA-Leiter Plus, 100-3000 bp, Art. Nr. 25-2020, PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen

- Agarose High Resolution, Roti®garose, Art. Nr. K297.2, 100 g, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Ethidiumbromid, 0,5 M, 5 ml, Art. Nr. E-1385, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml, 500 Stück, Art. Nr. 0030121.023, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml, 1000 Stück, Art. Nr. 0030120.086, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml, 1000 Stück, Art. Nr. 0030120.094, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“ und die freundliche Aufnahme im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie danken. Sein Vertrauen, das er mir während der ganzen Zeit und besonders in der Endphase entgegengebracht hat, war mir eine besonders große Hilfe.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau PD Dr. Christiane Pfarrer, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form hätte entstehen können.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die erteilte Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“. Besonders bedanken möchte ich mich bei den Koordinatoren des Kollegs Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger und Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind, die viel für unsere fachliche und persönliche Weiterentwicklung getan haben und Frau Jana Heber, der guten Seele des Kollegs.

Herzlichen Dank gilt Frau Dr. Carola Hauptmann und Frau Dr. Karen Bücher, die beide nicht nur Begleiterinnen auf Kongressen und Helfer bei Computerfragen, sondern auch prima Gesprächspartnerinnen waren und zu Freundinnen wurden und Frau Sonja Hartmann für die fachliche Unterstützung bei allen Fragen zur PCR und für den guten Ausgleich zur Arbeit, den unsere gemeinsamen Laufstunden boten.

Bei Frau Kathrin Wolf, die im genau richtigen Moment in unsere Arbeitsgruppe kam und viele Anregungen zur Etablierung der Zellkultur beisteuerte, sowie bei Frau Sigrid Kettner und Frau Susanne Schubert-Porth möchte ich mich ebenfalls bedanken.

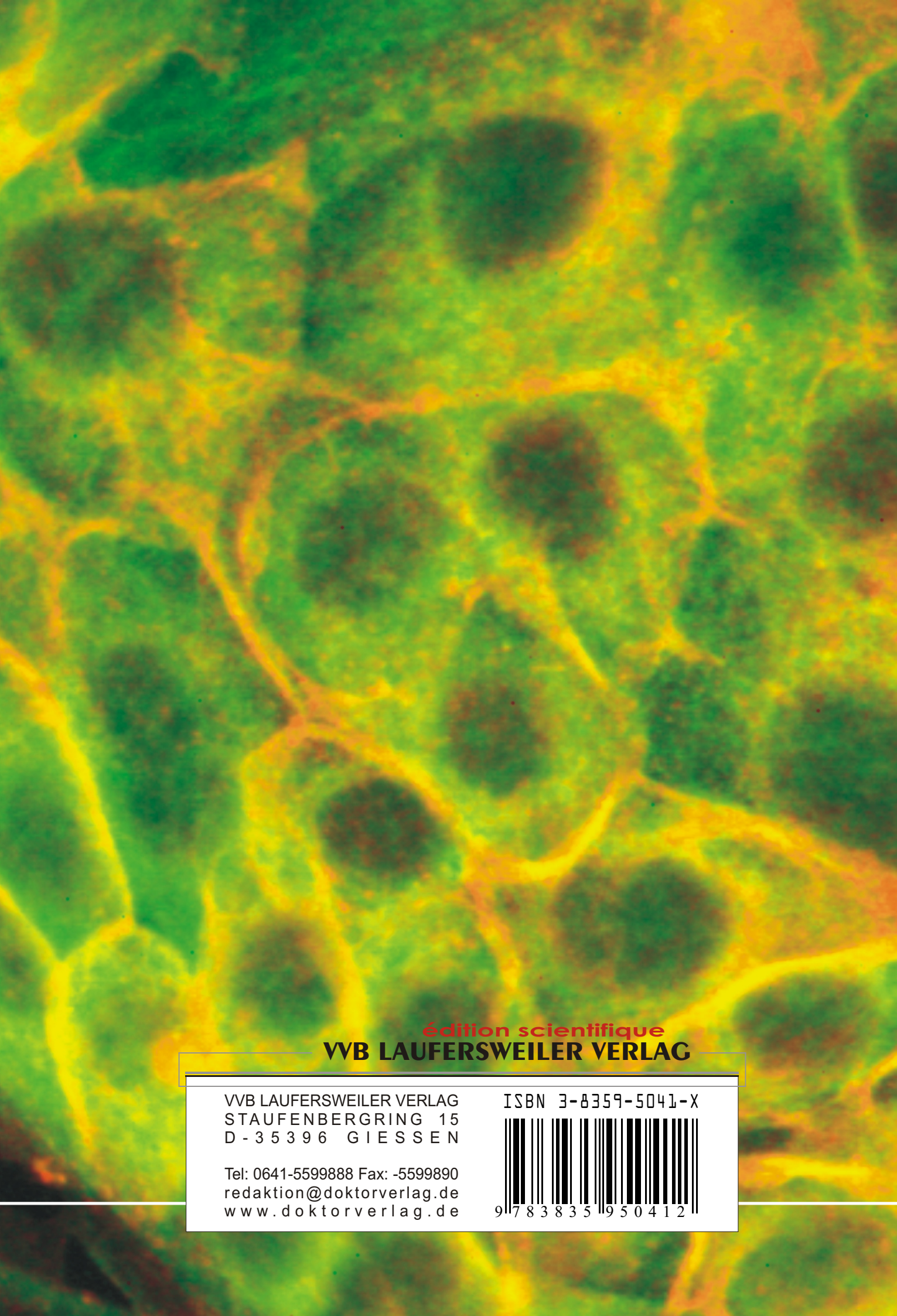
Allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung.

Dank sagen möchte ich auch Herrn Dr. Markus Ott aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie, dafür, dass ich bei ihm die Grundlagen der Zellkultur erlernen durfte.

Bei Frau Dr. Sabine Pils und Frau Sandra Schneider aus der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der JLU Gießen möchte ich mich für den jederzeit freundlichen Empfang und die Möglichkeit, meine Fluoreszenzbilder in Farbe aufzunehmen, bedanken.

Meinem Freund Stefan Brandl möchte ich für die entgegengebrachte Geduld im alltäglichen Umgang und den Verzicht auf so manche gemeinsame Stunde danken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Zwillingsschwester danken, die niemals Zweifel an meinem Gelingen aufkommen ließen und mich immer liebevoll unterstützt und motiviert haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5041-X
9783835950412