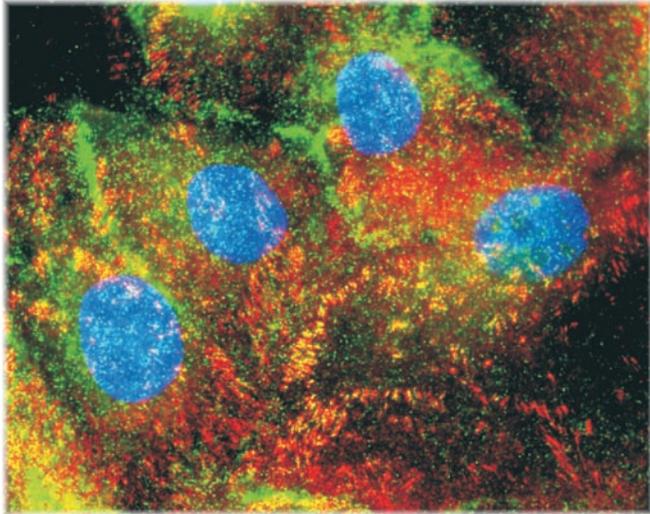


**SUSANNE HAUPT**

**Zytoskelettassoziierte Moleküle und  
Integrinaktivierung in bovinen Plazentazellen:  
in vivo und in vitro Studie**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



**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 2008

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.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 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](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuerin: Prof. Dr. C. Pfarrer

**Zytoskelettassoziierte Moleküle und  
Integrinaktivierung in bovinen Plazentazellen:  
in vivo und in vitro Studie**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**SUSANNE HAUPT**, geb. Goebel  
Tierärztin aus Darmstadt

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. C. Pfarrer

Prof. Dr. A. Wehrend

Tag der Disputation: 14.12.2007

**Meinem Vater**



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE BOVINE PLAZENTA.....	1
1.1.1	<i>Typisierung</i> .....	1
1.1.2	<i>Besonderheiten der bovinen Plazenta</i> .....	2
1.2	DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (ECM) .....	3
1.3	INTEGRINE.....	5
1.3.1	<i>Übersicht und Definition</i> .....	5
1.3.2	<i>Fokalkontakte</i> .....	9
1.3.3	<i>Integrinaktivierung</i> .....	11
1.3.4	<i>Integrine und ECM im weiblichen Reproduktionstrakt</i> .....	17
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER STUDIE .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
3.1	MATERIAL.....	22
3.2	METHODEN .....	26
3.2.1	<i>Entnahme und Bearbeitung der Plazentome</i> .....	27
3.2.2	<i>Zellkultur</i> .....	27
3.2.3	<i>Aussaat der Zellen zur Gewinnung von Zellmonolayern für die Immunfluoreszenz</i> .....	30
3.2.4	<i>Herstellung von Kryostatschnitten für die Immunfluoreszenz</i> .....	31
3.2.5	<i>Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenz (IF)</i> .....	31
3.2.6	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	35
3.2.7	<i>Vergleichende IF Untersuchung der Zytoskelettbestandteile und Fibronectin von nativen und tiefgefrorenen Zellen</i> .....	36
3.2.8	<i>Herstellung von Paraffinschnitten für die Immunhistochemie</i> .....	36
3.2.9	<i>Proteinnachweis mittels Western blot (WB)</i> .....	38
3.2.10	<i>Proteinnachweis mittels Immunhistochemie (IHC)</i> .....	43
3.2.11	<i>Wachstumsvergleiche der Zellkultur auf verschiedenen Matrices</i> .....	47
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
4.1	ALLGEMEINES ZUR BEURTEILUNG DER FARBINTENSITÄT BEI PRÄPARATEN DER IMMUNHISTOCHEMIE UND -FLUORESZENZ.....	51
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER KULTIVIERTEN ZELLEN MITTELS LOKALISATION ZYTOSKELETTALER FILAMENTE UND EXTRAZELLULÄRE MATRIX .....	52
4.3	LOKALISATION DER ZYTOSKELETTASSOZIIERTEN SIGNALMOLEKÜLE UND DER BETA-INTEGRINUNTEREINHEIT MITTELS IMMUNFLUORESZENZ IM GEFRIERSCHNITT .....	55
4.3.1	<i><math>\beta_1</math>-Integrinuntereinheit</i> .....	55
4.3.2	<i><math>\alpha</math>-Aktinin</i> .....	56
4.3.3	<i>Fokale Adhäsionskinase (FAK)</i> .....	57
4.3.4	<i>Phosphotyrosin (PT)</i> .....	58
4.3.5	<i>Talin</i> .....	59

## II

4.4	LOKALISATION DER ZYTOSKELETTASSOZIIERTEN SIGNALMOLEKÜLE UND DER BETA- INTEGRINUNTEREINHEIT MITTELS IMMUNFLUORESCENZ IM ZELLKULTURPRÄPARAT.....	64
4.4.1	<i>β<sub>1</sub>-Integrin</i> .....	64
4.4.2	<i>α-Aktinin</i> .....	64
4.4.3	<i>FAK</i> .....	64
4.4.4	<i>Phosphotyrosin</i> .....	65
4.4.5	<i>Talin</i> .....	65
4.4.6	<i>Nachweis der Kolokalisation durch Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen</i> .....	72
4.5	PROTEINNACHWEIS MITTELS WESTERN BLOT.....	77
4.6	VERGLEICH DER PROTEINEXPRESSION AUF UNTERSCHIEDLICHEN MATRICES MIT IMMUNFLUORESCENZ.....	79
4.6.1	<i>β<sub>1</sub> Integrin</i> .....	79
4.6.2	<i>α-Aktinin</i> .....	79
4.6.3	<i>Phosphotyrosin</i> .....	79
4.6.4	<i>Talin</i> .....	80
4.7	WACHSTUMSVERGLEICHE AUF UNTERSCHIEDLICHEN MATRICES.....	91
4.7.1	<i>Ergebnisse der Auszählung von jeweils 10 Sichtfeldern</i> .....	91
4.7.2	<i>Ergebnistabelle der SAS-Routine</i> .....	92
4.8	PROTEINNACHWEIS MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE.....	93
4.8.1	<i>β<sub>1</sub>-Integrin</i> .....	93
4.8.2	<i>FAK</i> .....	93
4.8.3	<i>Talin</i> .....	94
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>97</b>
5.1	METHODISCHE ASPEKTE: EINFLUSS DER KRYOKONSERVIERUNG AUF DIE ZELLDIFFERENZIERUNG.....	97
5.2	FUNKTIONALITÄT DER INTEGRINBINDUNG.....	99
5.3	EINFLUSS SPEZIELLER BESCHICHTUNGEN AUF DAS ZELLWACHSTUM SOWIE DIE INTEGRIN- UND SIGNALMOLEKÜLEXPRESSION.....	104
5.4	AUSBLICK.....	108
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>133</b>
9.1	GERÄTE, REAGENZEN.....	133
9.1.1	<i>Zellkultur</i> .....	133
9.1.2	<i>Versuche</i> .....	135
9.1.3	<i>Antikörper</i> .....	138
9.2	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	139
9.3	STATISTIK: SAS-OUTPUT.....	141

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$ -sm Aktin	$\alpha$ -smooth muscle Aktin
a.p.	Ante partum
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
APES	3 Aminopropyltriethoxysilan
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AVP	Antikörperverdünnungspuffer
BNC	Binucleate giant cells (binukleäre Riesenzellen)
CaM	Calmodulin-like domain
CH	Calponin homology
CLS	Kollagenase 1
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
FA	Focal adhesions
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAT	Focal adesion targetin
FCS	Fetales Kälberserum
FERM	4.1 ezrin, radixin, moesin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronektin
FS	Fetales Stroma
FX	Focal complexes
g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
GAGs	Glykosaminoglykane
Hanks´+	Hanks´ Salzlösung mit Kalzium und Magnesium
Hanks´-	Hanks´ Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium
IF	Immunfluoreszenz

#### IV

IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
Koll	Kollagen
Lam	Laminin
LDV	Leucin-Asparaginsäure-Valin
m	Männlich
M	Marker
ME	Maternales Epithel
MIDAS	Metal ion dependent-adhesionsite
Mo	Monat
MS	Maternales Stroma
NBT-BCIP	Nitroblautetrazolium/Brom-Chlor-Indolylphosphat
PBL	Proteinblocklösung
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
p.i.	Post inseminationem
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PT	Phosphotyrosin
PTB	Phosphotyrosine binding
PTK2	Protein-tyrosine kinase 2
Ras	Rat sarcoma
RGD-Sequenz	Arginin-Glyzin-Asparaginsäure-Sequenz
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
STD	Standardabweichung
t	Tage
T	Trophoblast
TGC	Trophoblastriesenzelle
w	Weiblich
WB	Western blot
Z	Fetale Zotte
ZK	Zellkultur

# 1 Einleitung und Literaturübersicht

## 1.1 Die bovine Plazenta

### 1.1.1 Typisierung

Die Plazenta der höheren Säugetiere dient nicht nur zum Schutz des Keims, sie ist auch fetomaternalen Austauschorgan, produziert graviditätsaufrechterhaltende Hormone und hat immunologische Aufgaben (Schnorr, 1996; Weetman, 1999; Hoffmann und Schuler, 2002). Im Laufe der Evolution hat sich bei den verschiedenen Säugetieren eine Vielzahl unterschiedlicher Plazentatypen ausgebildet. Eine Übersicht hierzu findet sich bei Leiser und Kaufmann (Leiser und Kaufmann, 1994).

Strahl (1906) deklariert die Plazenta des Rindes zur *Semiplacenta multiplex sive cotyledonaria*. Er unterscheidet zwischen *adeciduaten* (Semiplazenten) und *deciduaten* Plazenten (Vollplazenten), womit er den Zustand der Uterusmukosa nach der Geburt beschreibt. Während sich bei einer *adeciduaten* Plazenta die Chorionzotten bei der Geburt ohne Gewebsverlust von der maternalen Mukosa trennen, die Nachgeburt also nur aus der fetalen Plazenta besteht, werden bei der *deciduaten* Form auch Anteile des maternalen Gewebes abgestoßen. „*Multiplex sive cotyledonaria*“ beschreibt die für den Wiederkäuer typische Ausbildung von Plazentomen. Beim Rind entwickeln sich im Laufe der Gravidität 70-150 Plazentome, welche die Form von Kissen aufweisen. Der vorgeformte Karunkelstiel der Uterusschleimhaut verzweigt sich in Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten. Er wird von der sich aus dem Chorion bildenden *Kotyledone*, deren Zotten sich tief in die Krypten senken, kappenartig überzogen (Björkman, 1954; Björkman und Sollen, 1960). Die Chorionzotten bilden ihrerseits komplementäre Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten aus (Pfarrer et al., 2001). Auf diese Art entsteht eine sehr große Verbindungs- bzw. Austauschfläche zwischen fetalem und maternalem Epithel sowie eine starke Verankerung der fetalen Plazenta im Uterus (Leiser et al., 1998). Aufgrund der Zottenausbildung bezeichnen Leiser und Kaufmann (1994) die Plazenta des Rindes als villösen Plazentatyp.

Grosser (1927) typisiert die unterschiedlichen Säugetierplazenten nach dem histologischen Gesichtspunkt, wie invasiv sich der jeweilige Trophoblast verhält. Die invasivste Form führt zu einer *Placenta haemochorialis*, bei der das maternale Endometrium einschließlich der Endothelzellen der Blutgefäße abgebaut wird, so dass die Chorionepithelzellen direkt vom mütterlichen Blut umspült werden. Dieser bei Primaten, Kaninchen und Nagern

vorkommende Plazentatyp unterscheidet sich weiterhin in der Anzahl der Trophoblastschichten in haemomono-, haemodi-, und haemotrichialis (Enders, 1965). Der Fleischfresser bildet eine Placenta endotheliochorialis aus, da das uterine Epithel und endometriale Bindegewebe durch den eindringenden Trophoblasten degenerieren und der Trophoblast damit an die Endothelzellen der maternalen Uterusgefäße grenzt. Aufgrund der engen Verbindung des maternalen und fetalen Plazentaanteils bei diesen beiden Plazentatypen kommt es bei der Trennung der beiden Anteile nach der Geburt zu Gewebeverlusten auf der maternalen Seite, was zu der Klassifizierung als deciduate Typen führt (Strahl, 1906). Bei Pferd, Schwein und Wiederkäuer handelt sich um eine Plazenta epitheliochorialis, bei der generell keine Invasion des Trophoblasten beobachtet wird. Daher bleiben auf der maternalen Seite Epithel, Bindegewebe und Gefäßendothelien bestehen und es kommt zu keinem Gewebsverlust, weil sich Trophoblast und uterines Epithel entlang des apikalen Mikrovillisaumes trennen.

### **1.1.2 Besonderheiten der bovinen Plazenta**

Bei genauerer Betrachtung kommt es jedoch in der bovinen Plazenta sehr wohl zu einer Invasion, allerdings zu einer von einzelnen Zellen. Es lassen sich nämlich im Chorionepithel zwei unterschiedliche Zelltypen unterscheiden. Einerseits existieren die regulären, einkernigen, polarisierten Trophoblastzellen mit Kontakt zur Basalmembran, die apikal durch Tight-junctions verbunden sind und über einen interdigitierenden Mikrovillisaum mit dem Uterusepithel in Kontakt stehen (Leiser, 1975) und andererseits findet man beim Rind größere Zellen mit zwei oder mehreren Kernen „binucleate giant cells (BNC)“ (Wimsatt, 1951; Björkmann, 1954). Diese, präziser Trophoblast Giant Cells (TGC) (Wooding, 1992; Klisch et al., 1999b) genannten Zellen, - nur 80 % der TGC sind binukleär (Wooding et al., 1997) - kommen zu etwa 20 % während der gesamten Gravidität im Chorionepithel vor und besitzen nicht mehr die typischen Eigenschaften von Epithelzellen (Wooding und Flint, 1994). Sie sind nicht polarisiert und bilden keine apikalen Mikrovilli aus (Wooding, 1982b). TGC produzieren endokrine Substanzen, wie z.B. Progesteron, plazentäres Laktogen, Prostazykline, Prostaglandine und schwangerschaftsassozierte Glykoproteine (Reimers et al., 1985; Wooding, 1992; Zoli et al., 1992). Zweikernige TGC entstehen durch azytokinetische Mitosen von mononukleären Trophoblastzellen (Wimsatt, 1951; Wooding, 1992), die Entstehung von dreikernigen TGC geht vermutlich auf tripolare azytokinetische Mitosen zurück (Klisch et al., 1999a; Klisch et al., 1999b). Die bovinen TGC, die einen DNA-Gehalt

von bis zu  $c = 32$  pro Kern aufweisen (Klisch et al., 1999b) können aus dem Chorionepithel in das maternale Epithel migrieren und verschmelzen dort mit jeweils einer Uterusepithelzelle zu meist dreikernigen fetomaternalen Hybridzellen (Wooding und Flint, 1994; Klisch et al., 1999b). Die Rinderplazenta wird deshalb im Besonderen Plazenta synepitheliochorialis genannt (Wooding, 1992). Die Tatsache, dass es durch die Bildung der Hybridzellen niemals zu einer Überschreitung der Basalmembran des maternalen Epithels durch den Trophoblasten kommt, bezeichnen Pfarrer et al. (2003) als eingeschränkte Trophoblastinvasion. Neben den dreikernigen Hybridzellen finden sich überall im Plazentom, jedoch vermehrt im Bereich der Septenspitzen, Hybridzellen mit mehr als drei Kernen. Dieses Phänomen erklären Klisch et al. (1999b) folgendermaßen: Mehrkernige Hybridzellen entstehen durch verschmelzen von weiteren TGC mit bereits gebildeten Hybridzellen. Da sich auf dem konvexen Anteil der Septenspitze sehr viel weniger Uterusepithelzellen befinden, als auf dem konkaven Gegenstück fetale Chorionzellen zu finden sind, kommt es vermehrt vor, dass eine wandernde TGC mit einer Zelle des Uterusepithels verschmilzt, die bereits eine fetomaternale Hybridzelle ist. Aus den schon im fetalen Kompartiment gebildeten Granula, die über die Migration und Fusion in die Hybridzellen überführt werden, werden weiterhin die bereits erwähnten endokrinen Substanzen freigesetzt. In diesem nun gerichteten Transport in das maternale Kompartiment und in dem verbesserten fetomaternalen Stoffaustausch sehen Wooding und Klisch et al. (1992; 1999a) die funktionelle Bedeutung der Hybridzellen. Nach Erfüllung dieser Funktion degenerieren die Hybridzellen (Wooding et al., 1997) und werden vom Trophoblasten resorbiert (Schuler et al., 1999).

## **1.2 Die extrazelluläre Matrix (ECM)**

Die extrazelluläre Matrix ist ein aus Makromolekülen bestehendes Netzwerk, in welches die Zellen einerseits eingebettet sind, welches andererseits durch Sekretion spezifischer Zellen entsteht, und dessen Ausrichtung durch sie bestimmt wird. Gleichzeitig werden Überleben, Form, Entwicklung, Polarität und Verhalten der Zellen von der ECM beeinflusst. Prinzipiell findet sich in allen Gewebetypen ECM, die größten Mengen jedoch sind im Bindegewebe zu finden. Durch die ECM werden die unterschiedlichsten Strukturen, wie Zähne, Knochen, Sehnen oder auch die Kornea gebildet. Am Übergang zu Epithelien formiert sie die Basallamina. Die Makromoleküle der ECM lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen, zum Einen die Polysaccharide vom Glykosaminoglykan-Typ (GAGs) und zum Anderen die Faserproteine. Innerhalb der Faserproteine kann man eine Unterscheidung zwischen den

sogenannten Anheftungsproteinen Fibronectin und Laminin und den funktionellen Strukturproteinen, zu denen das Kollagen und das Elastin gehören, vornehmen (Alberts et al., 2004b). Die ECM ist jedoch kein statisches Gebilde, sondern ein hoch dynamisches Gerüst, welches sich ständig anpasst und eine entscheidende Rolle in der Migration, Proliferation und dem Metabolismus der eingebetteten Zellen spielt. Sie steht mit den intrazellulären Signalkaskaden in Kontakt und interagiert über Wachstumsfaktoren und andere Hormone (Garratt und Humphries, 1995).

Die Hauptproteine der ECM sind die Kollagene. Sie machen 25% der Säugetierproteine aus. Kollagene zeichnen sich durch ihre typische lange unbewegliche Helikalstruktur aus, die aus drei Kollagen-Polypeptidketten zusammengesetzt ist. Diese sogenannten  $\alpha$ -Ketten winden sich zu einer seilförmigen Superhelix. Durch die Zusammensetzung unterschiedlicher  $\alpha$ -Ketten können sehr viele unterschiedliche Kollagene gebildet werden. Bis zum heutigen Tag wurden 25 verschiedene  $\alpha$ -Ketten nachgewiesen. Von den daraus möglichen 10.000 verschiedenen Superhelices findet man jedoch nur 20. Die meisten bekannten Kollagene bilden durch Zusammenlagerung ihrer Helices Fibrillen, wie sie hauptsächlich in Knochen, Haut, Sehnen, Bändern und inneren Organen benötigt werden. Kollagen I stellt zudem 90% der Kollagene des Körpers. Es gibt aber auch transmembranständige, Fibrillen assoziierte und Netzwerk bildende Kollagene. Zu den Netzwerk bildenden gehört das Kollagen IV, welches als filzartiges Geflecht den Hauptbestandteil der Basallamina von Epithelien ausmacht. In der frühen Entwicklung der Basallamina allerdings ist kaum Kollagen IV enthalten, sondern vorwiegend Laminin vorhanden. Kollagen IV ist flexibler als fibrilläre Kollagene, weil seine Helix in 26 Abschnitte unterteilt ist, die zahlreiche Flexionen ermöglichen (Alberts et al., 2004b).

In der Basallamina der Uterusepithelzellen ist Kollagen IV zu jeder Zeit vorhanden, während der Implantation vom 18ten bis 30ten Tag jedoch nimmt die Menge signifikant zu (MacIntyre et al., 2002).

Fibronectin ist ein dimeres Glykoprotein, welches über Disulfidbrücken verbunden ist. Jede der beiden sehr großen Untereinheiten besteht aus mehreren funktionellen Domänen, welche durch spezielle Bindungsstellen für andere Makromoleküle, wie Kollagen und Heparin, sowie spezielle Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren die Vernetzung mit der Matrix unterstützen (Alberts et al., 2004b). Die unterschiedlichen Fibronektine entstehen durch verschiedenartiges Spleißen eines RNA-Stranges aus dem Fibronektingen. Jedes dieser Transkripte enthält um die 50 Exons, so dass viele verschiedene Fibronektinketten gebildet werden können. Bis heute sind 20 verschiedene bekannt (Kurth, 2000). Man unterscheidet das

lösliche Plasma-Fibronectin, welches in Blut und anderen Körperflüssigkeiten zu finden ist, von den anderen nahezu unlöslichen Fibronectinen, die in der ECM als Fibronectinfibrillen vorkommen. Fibronectine spielen eine wichtige Rolle bei Zellprozessen, wie der Adhäsion, der Migration, der Differenzierung und der Proliferation und beeinflussen diverse Prozesse, wie Entzündung, Wundheilung, bösartige Metastasierung und Thrombose. Bösartige Zellen zeigen häufig eine Matrix mit verminderter Fibronectindichte (Romberger, 1997). Der häufigste Rezeptor für die zelluläre Bindung von Fibronectin ist das  $\alpha_5\beta_1$  Integrin (Hocking et al., 1998).

Laminin ist ein großes Multiadhäsionsprotein aus drei Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), welche sich in Kreuzform aneinander lagern und über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Alberts et al., 2004b). Die Länge der einzelnen Ketten entspricht der Dicke der Basallamina (Kurth, 2000). Verschiedene Isoformen der Lamininketten können sich aneinander lagern und so eine Vielzahl verschiedener Proteine bilden. Bisher sind bei Säugetieren 12 verschiedene Proteine identifiziert worden, die sich aus fünf  $\alpha$ -, drei  $\beta$ - und drei  $\gamma$ -Ketten zusammensetzen (Cognato und Yurchenco, 2000). In den meisten jedoch findet man die Laminin  $\gamma_1$ -Kette (Alberts et al., 2004b). Ähnlich wie andere Matrixproteine besitzt Laminin verschiedene Domänen, die für spezielle Proteine, wie Heparinsulfat und Kollagen IV, aber auch für verschiedene  $\beta_1$ - und  $\beta_4$ -Integrine Bindungsstellen darstellen (Cognato und Yurchenco, 2000). Laminin spielt eine große Rolle als Vermittler für Interaktionen zwischen Zelle und ECM und ist außer an der Zelladhäsion auch an Migration und Zelldifferenzierung beteiligt (Bosman und Stamenkovic, 2003). Sowohl Laminin als auch Fibronectin enthalten das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD), welches das kleinste von Integrinen erkannte Strukturelement darstellt (Romberger, 1997; Cognato und Yurchenco, 2000).

## 1.3 Integrine

### 1.3.1 Übersicht und Definition

Integrine sind eine für die Zelladhäsion wichtige Gruppe von transmembranen Glykoproteinrezeptoren aus nicht kovalent gebundenen Heterodimeren, die zuerst am Huhn entdeckt wurden (Hynes, 1987) und von fast allen Zellen exprimiert werden (Longhurst und Jennings, 1998). Sie dienen hauptsächlich als Transmembranrezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) (Parise und Phillips, 1986), wie Kollagen, Fibronectin und Laminin (Horwitz et al., 1985), können aber auch als Zell-zu-Zell Rezeptor dienen, indem sie

zum Beispiel an Zelloberflächenrezeptoren der Immunglobulinfamilie binden (Marlin und Springer, 1987). Eine dritte Möglichkeit stellt das „Integrindoppel“ dar, bei dem zwei Integrine über ein ECM-Molekül gekoppelt zwei Zellen miteinander verbinden (Ruoslahti, 1991). Der Name Integrine beschreibt ihre Funktion (Ruoslahti, 1991): „To integrate“ bedeutet zusammenfassen, verflechten, einbinden. Integrine verbinden die ECM mit dem Zytoskelett. Neben den Integrinen gibt es noch drei weitere Klassen von Zelladhäsionsproteinen: die Immunglobulinsuperfamilie, die Cadherine und die Selektine. Die Integrine gelten jedoch als die wichtigsten Rezeptoren zur Verbindung von Zelle und ECM (Alberts et al., 2004a).

Die kleinere disulfidreichere Untereinheit der Heterodimere wird von Hynes (1987) als  $\beta$ -Kette, die größere, stärker variierende als  $\alpha$ -Kette bezeichnet. Die Unterschiede in den jeweiligen  $\alpha$ -Ketten sind erheblich größer als die innerhalb der  $\beta$ -Ketten. Beide Ketten zeigen eine pilzartige, extrazelluläre N-terminale Region, welche gemeinsam den Rezeptor für den Liganden bilden. Sie ziehen mit ihrem C-terminalen-Schwanz bis in das Zytoplasma hinein und binden an das auf Aktin basierende Mikrofilamentsystem, welches sie regulieren und modulieren (Longhurst und Jennings, 1998; Hynes, 2002).  $\alpha_6\beta_4$  stellt diesbezüglich eine Ausnahme dar; es kommt auf Hemidesmosomen vor und ist an Intermediärfilamente gekoppelt (Quaranta und Jones, 1991). Inzwischen sind acht verschiedene  $\beta$ - und 18 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die insgesamt mindestens 24 verschiedene Integrinheterodimere bilden und damit eine Vielzahl verschiedener Liganden binden können (Hynes, 2002). Erstaunlicher Weise kann ein und dasselbe Heterodimer jedoch auf verschiedenen Zellen unterschiedliche Liganden binden. Es wird angenommen, dass zelltypspezifische Faktoren die Bindungsaffinität der Integrine modulieren können (Alberts et al., 2004a).

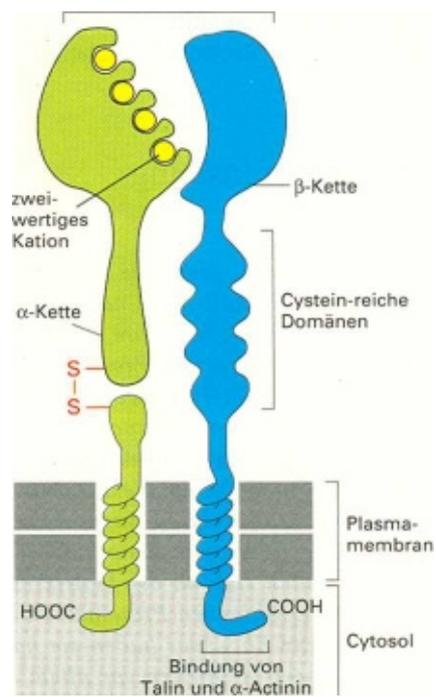


Abb. 1: Schematische Darstellung des Integrinheterodimers mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette (aus Alberts et al., 2004)

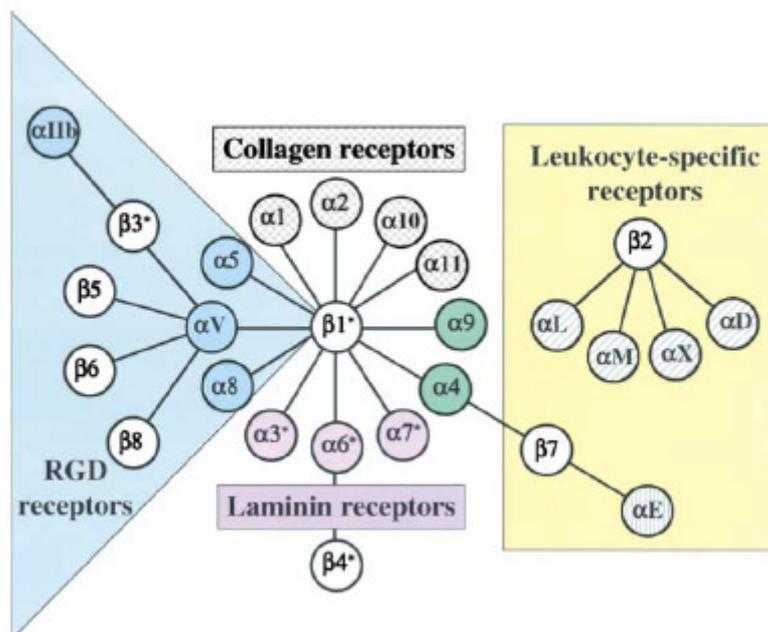


Abb. 2: Übersicht über die Integrinheterodimere (aus Hynes, 2002)

Integrine können in verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden. Zur Einteilung dienen die Ligandenspezifität, das alleinige Vorkommen auf Leukozyten und die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse;  $\alpha_4$  und  $\alpha_9$  kommen nur bei Chordatieren vor (Hynes, 2002) (siehe Abb. 2).

Integrine weisen einige Besonderheiten auf, die sie von allen anderen bisher bekannten Oberflächenproteinen unterscheiden. So binden sie zum Beispiel mit einer relativ geringen Affinität an ihre Liganden, kommen dafür aber in einer zehn bis 100fach höheren Konzentration auf den Zellen vor (Alberts et al., 2004a). Des Weiteren können diese Rezeptoren in verschiedenen Aktivierungsformen vorliegen. Während im sogenannten „low-affinity Status“, in welchem sich die Integrine normalerweise befinden (Lollo et al., 1993; Faull et al., 1994), keine Bindung an einen Liganden möglich ist, kann nach Aktivierung eine Verbindung zur ECM oder einer anderen Zelle aufgenommen werden. Die Zell-Bindungseigenschaften können demnach durch eine Affinitätsmodifizierung variiert werden, ohne dass die Genexpression verändert werden muss (Longhurst und Jennings, 1998).

Sämtliche Integrine, die eine  $\beta$ -Untereinheit  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  oder  $\beta_3$  besitzen, zeigen die Notwendigkeit der Aktivierung, um an Liganden binden zu können (Williams et al., 1994). Diese Aktivierung wird als „inside-out-signaling“ bezeichnet im Gegensatz zum „outside-in-signaling“, wobei über die Integrin-Liganden-Wechselwirkung Signale in das Zellinnere übertragen werden (Longhurst und Jennings, 1998). Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften haben die Integrine eine spezielle Bedeutung in allen nicht statischen Adhäsionsbedingungen. Wegen ihrer Schnelligkeit und Anpassungsfähigkeit sind die Integrin-Liganden-Verbindungen ideal für dynamische Prozesse (Longhurst und Jennings, 1998), da die Verbindung zwischen Integrin und Zytoskelett selbst hoch dynamisch ist (Regen und Horwitz, 1992; Schmidt et al., 1993). Sie spielen zum Beispiel eine große Rolle bei der Zellmigration, dem Zellwachstum, der Gewebeorganisation, der Entzündung, der Hämostasis, der Zielfindung von Lymphozyten und Zelldifferenzierung (Hughes und Pfaff, 1998). Die hauptsächliche Erkennungsbindungsstelle für Integrine scheint die Arginin-Glyzin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenz zu sein, die zuerst im Fibronectin entdeckt wurde und inzwischen in sehr vielen Proteinen, wie zum Beispiel dem Laminin und dem Kollagen Typ I, nachgewiesen worden ist (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Eine weitere bekannte Bindungsstelle scheint das Leuzin-Asparaginsäure-Valin (LDV) Peptid zu sein (Garratt und Humphries, 1995). Weiterhin ist ebenfalls bekannt, dass die Bindung an die Liganden in einer Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ ) steht, welche an spezielle Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit binden (Ginsberg et al., 1988; Hemler, 1988), wobei  $\text{Mg}^{2+}$

häufig zu einer Stimulierung und  $\text{Ca}^{2+}$  hingegen zu einer Hemmung der Affinität führt (Garratt und Humphries, 1995). Neben den zweiwertigen Kationen benötigen Integrine Aspartat- oder Glutamatrückstände als Schlüssel zur Ligandenerkennung. Dieses Phänomen nennen Lee et. al. (1995) MIDAS (metal ion dependent-adhesionsite). Integrine fördern die Bildung von Fokalkontakten und lösen Signaltransduktionskaskaden aus, die über zytoplasmatische Proteine wie Talin,  $\alpha$ -Aktinin und die fokale Adhäsionskinase (FAK) laufen (Lewis und Schwartz, 1995). Viele durch Integrine stimulierte Signalwege ähneln denen, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöst werden und sind eng mit diesen verbunden (Hynes, 2002).

### 1.3.2 Fokalkontakte

Die Zellen im Säugetierorganismus müssen die paradoxe Tätigkeit erfüllen einerseits durch Adhäsion zur Stabilität beizutragen, aber andererseits auch flexibel reagieren zu können, um sich fortzubewegen. Um dieses zu ermöglichen, werden einzelne Integrinbindungen, welche lediglich eine Überlebenszeit von einigen Sekunden erreichen, zu Clustern zusammengefasst. Diese Cluster können von variabler Größe sein, um dem Bedarf entsprechend der Adhäsionskontakte aufrecht zu erhalten. Eine Besonderheit von stationären Zellen wie den Epithelzellen ist die Ausbildung von dicken Bündeln von Aktinfilamenten, welche an entsprechend großen Adhäsionskontaktstellen zur extrazellulären Matrix enden, den sogenannten Fokalkontakten (Focal adhesions). Auf der zytoplasmatischen Seite lagern sich große Mengen von Proteinen an, welche über Kopplung an die Aktinfilamente Signale vermitteln (Abedi und Zachary, 1995; Schwarz, 2003).

Neuere Studien zeigen, dass nicht alle Integrin-Adhäsionskontakte der Zellen einander entsprechen, es finden sich unterschiedliche molekuläre und zelluläre Varianten (Zamir und Geiger, 2001). Die klassischen Fokalkontakte (FA) finden sich hauptsächlich in der Zellperipherie und sind hochgradig Tyrosin phosphoryliert. An zentraleren Stellen der Zelle finden sich die sogenannten fibrillar adhesions, welche wenig oder kein Phosphotyrosin enthalten (Zamir et al., 1999). Des Weiteren finden sich in der Peripherie vor allem bei sehr motilen Zellen focal complexes (FX), welche sehr kurzlebige Strukturen sind (Nobes und Hall, 1995; Ballestrem et al., 2001). Die verschiedenen Formen der Adhäsion mit der ECM zeigen sich zu unterschiedlichen Stadien der Zelladhäsion. So ist zum Beispiel FX eine sehr frühe Adhäsionsform, welche sich entweder durch die Aktivierung von Rho-A oder durch persistierende mechanische externe Stimulation in eine FA umwandelt (Rottner et al., 1999;

Ballestrem et al., 2001). Im Gegensatz dazu entstehen fibrilläre Adhäsionen durch Ablösung und zentripetale Wanderung von Fibronektinrezeptoren aus FA (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000).

Murphy-Ullrich (2001) setzt die Bindung über FA in einen zeitlichen Ablauf, so beginnt die Zelladhäsion mit dem Attachment, in welchem die Integrinbindung einsetzt und es zu Clustering und Affinitätssteigerung, der Integrinaktivierung, kommt. Als nächsten Schritt beschreibt er die „intermediate adhesion“; in diesem Stadium vergrößert die Zelle ihre Auflagefläche und formiert ihre Aktinfilamente. Wenn jetzt die adäquaten Signale gesandt werden, bilden sich die echten Fokalkontakte aus. Da runde Zellen nicht migrieren können, ist das Intermediärstadium wichtig für die Fortbewegung der Zellen (Huttenlocher et al., 1995). Der typische Fokalkontakt ist 2-10 $\mu$ m lang, 0,25-0,5 $\mu$ m breit und hat einen Abstand zum Untergrund von 10-15nm. Um ihn immunhistologisch nachzuweisen wurde häufig Vinkulin benutzt, was allerdings problematisch ist, da dieses auch an anderen Stellen der Zelle vorkommen kann (Burrige et al., 1988).

### 1.3.3 Integrinaktivierung

Integrine können aktiviert oder inaktiviert vorliegen, was wie erwähnt ihre Affinität zu den Liganden beeinflusst (Longhurst und Jennings, 1998). Es wird angenommen, dass das inside-out-signaling als Antwort auf intrazelluläre Signale über zytoplasmatische Domänen gesteuert wird (Williams et al., 1994; O'Toole et al., 1994). An diese Domänen binden intrazelluläre Integrinaktivierungskomplexe, die Proteine wie Talin (Horwitz et al., 1986) und  $\alpha$ -Aktinin (Otey et al., 1993) enthalten. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Aktin an das Integrin gebunden werden kann. Zum Beispiel bindet Talin (Horwitz et al., 1986) an die zytoplasmatische Domäne des Integrins, Vinkulin an Talin (Otto, 1983; Wilkins et al., 1983),  $\alpha$ -Aktinin an Vinkulin und Aktin an  $\alpha$ -Aktinin (Belkin und Retta, 1998). In dieser Darstellung finden sich drei Proteine zwischen dem Aktin und dem Integrin. Inzwischen weiß man, dass Talin auch direkt an Aktin binden kann (Muguruma et al., 1990; Goldmann und Isenberg, 1991) und eine direkte Verbindung zwischen beiden darstellt (BurrIDGE und Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Auch von  $\alpha$ -Aktinin wird vermutet, dass es eine direkte Verbindung zwischen Integrin und Aktin herstellen kann (Otey et al., 1993). Durch die Bindung des Integrinaktivierungskomplexes kommt es zu einer Konformitätsänderung des Integrins auf der Oberfläche der Zelle und somit zur höheren Affinität zum Liganden (Hynes, 2002). Beim outside-in-signaling entsteht direkt nach der Bindung der Integrine eine Tyrosinphosphorylierung von FAK (Miyamoto et al., 1995), denn anders als bei den Wachstumsfaktorrezeptoren fehlt den Integrinen eine Tyrosinkinaseaktivität, so dass der erste Schritt der Aktivierung die Phosphorylierung der rezeptorabhängigen Kinase ist (Schaller und Parsons, 1994a). Die schnelle Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung sind wichtig für die schnelle Veränderung und Formierung von Adhäsionsstellen (Schoenwaelder und BurrIDGE, 1999).

#### 1.3.3.1 Talin

Talin ist ein sehr großes Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Integrine spielt (Tadokoro et al., 2003) und das erste Molekül, von dem nachgewiesen werden konnte, dass es sowohl an Aktin als auch an Integrine bindet (BurrIDGE und Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Critchley (2000) zeigte, dass Talin an die Integrin  $\beta$ -Untereinheit bindet und mit aktivierten Integrinen kolokalisiert ist. Außer Talin gibt es noch mindestens zwei weitere Proteine (Calderwood, 2004a), die durch eine Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit die

Integrine direkt aktivierten, das  $\beta_3$ -endonexin (Kashiwagi et al., 1997) und das Zytohesin (Kolanus et al., 1996). Für die sehr häufig vorkommende  $\beta_1$ -Untereinheit ist jedoch Talin das wichtigste dieser Aktivierungsproteine, da das  $\beta_3$ -endonexin hauptsächlich an die  $\beta_3$ -Untereinheit (Shattil et al., 1995) und Zytohesin vor allem an die  $\beta_2$ -Untereinheit bindet (Kolanus et al., 1996; Korthauer et al., 2000). Lewis und Schwartz (1995) zeigen, dass die Aktinbindung an Integrine nur mit Hilfe von Talin funktioniert und die Anwesenheit von  $\alpha$ -Aktinin alleine für eine solche Bindung nicht ausreicht. Giannone (2003) stellt die Behauptung auf, dass Talin eine besonders wichtige Rolle in der frühen Phase der FA spielt, in dem es zum Beispiel als Antwort auf Krafteinwirkung die FA initiiert und zur Stabilisierung beiträgt.

Es handelt sich bei Talin um ein antiparallel angeordnetes Heterodimer, dessen zwei Untereinheiten jeweils aus einem kleineren Kopf und einem längeren Schwanz bestehen (Rees et al., 1990; Critchley, 2000). Das Gewicht der Talin-Untereinheiten ist tierartlich unterschiedlich, wobei es bislang keine Angaben über das Gewicht beim Rind gibt. Die Hauptbindungsstelle des Moleküls liegt innerhalb des Talin-Kopfes (Calderwood et al., 1999; Patil et al., 1999; Yan et al., 2001), der eine FERM (4.1, ezrin, radixin, moesin) Domäne besitzt (Rees et al., 1990; Calderwood et al., 2002). Diese Domänen haben in der Regel drei Untereinheiten, die F1, F2 und F3 genannt werden und häufig zu Interaktionen mit dem zytoplasmatischen Schwanz von Integrinen führen (Pearson et al., 2000). Calderwood (1999) vermutete zu der Zeit schon, dass die FERM-Region von Talin an die  $\beta_3$ -Integrinuntereinheit bindet und dadurch die Integrinaktivierung steuert. F3, welches mit einer vierfach höheren Affinität an Integrine bindet als zum Beispiel F2 (Calderwood et al., 2002) ähnelt in seiner Tertiärstruktur stark den PTB (phosphotyrosin-binding) Domänen, welche häufig an die NpxY-Motive der Integrine binden. Obwohl die PTB hauptsächlich bekannt sind, weil sie an Phosphotyrosin binden, so können sie auch unabhängig davon binden (Schlessinger und Lemmon, 2003). Im Falle von Talin ist es hingegen sogar so, dass die Phosphorylierung der NpxY-Motive der Integrine eine Bindung von Talin hemmt und damit als Negativregulator dienen könnte (Tapley et al., 1989). Das Talin-Molekül kann in verschiedenen Formen vorliegen. Bei der inaktiven Form sind die F2 und F3 Domänen durch den antiparallelen Strang verdeckt. Diese Form kann aktiviert werden, indem die N- und die C-terminalen Enden von Talin getrennt und die Integrinbindungsstellen dadurch freigelegt werden. Dieses geschieht unter anderem durch die Bindung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Martel et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit ist die vollständige Trennung der beiden Anteile zu einem Monomer,

welches sich zu einer Schleife zusammenlagert wodurch wiederum die Bindungsstellen verdeckt werden. Aus diesem Monomer spaltet zum Beispiel die Protease Calpain den Talin-Kopf ab, welcher auch selbstständig zu einer Integrinaktivierung führen kann (Yan et al., 2001). Der Talin-Kopf bindet sechsfach stärker an Integrin  $\beta_3$  als die Dimerform des Moleküls, welche hingegen eine große Rolle bei der Bindung von Integrin  $\beta_1$  spielt (Yan et al., 2001; Martel et al., 2001).

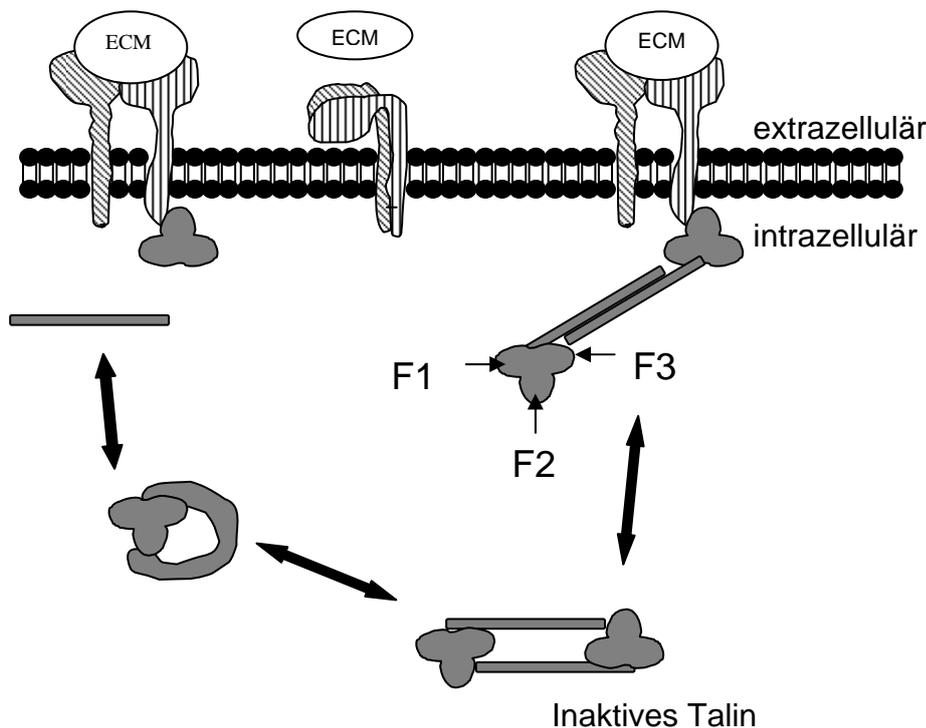


Abb. 3: Talin aktiv und inaktiv zur Aktivierung von Integrinen  
(Modifiziert nach Calderwood, 2004b)

### 1.3.3.2 $\alpha$ -Aktinin

Unter  $\alpha$ -Aktinin versteht man eine Familie von vier sehr eng miteinander verwandten Genprodukten, welche ursprünglich als Aktin-crosslinking Proteine beschrieben wurden, von denen man heute weiß, dass sie das Zytoskelett über eine Vielzahl von Verbindungsstellen mit verschiedenen Transmembranproteinen verbinden, die Aktivität von Rezeptoren regulieren und als Gerüst dienen, welches das Zytoskelett mit Signalwegen verknüpft (Otey

und Carpen, 2004). Neben dem Aktin weist  $\alpha$ -Aktinin eine große Menge an weiteren molekularen Partnern auf. Hierbei handelt es sich einerseits um die Integrine (Otey et al., 1990), Vinkulin (Belkin und Koteliansky, 1987; Wachsstock et al., 1987) und Palladin (Parast und Otey, 2000; Mykkanen et al., 2001) innerhalb der Fokalkontakte aber andererseits um die  $\beta_2$ -Integrine der Lymphozyten (Pavalko und LaRoche, 1993) und viele weitere Moleküle innerhalb von Tight junctions, Adherens junctions oder Synapsen (Walikonis et al., 2001; Patrie et al., 2002; Asada et al., 2003). Neben  $\alpha$ -Aktinin gibt es eine Reihe weiterer Proteine, welche den monomeren bzw. polymeren Zustand von Aktin stabilisieren. Während  $\alpha$ -Aktinin, Filamin und Fimbrin durch ihre quervernetzende Wirkung stabilisierend auf die Aktinfilamente wirken, können Profilin, Gelsolin und Villin Aktinmonomere binden oder Aktinfilamente fragmentieren (Löffler und Petrides, 1998).

Das Aktingerüst ist erstaunlich stabil und dynamisch zugleich und das  $\alpha$ -Aktinin kann durch seine ungewöhnliche Struktur beide Eigenschaften unterstützen (Broderick und Winder, 2002). Das hantelförmige Molekül besteht aus zwei antiparallel zueinanderliegenden Einheiten, welche beide am N-terminalen Ende einen Aktin-bindenden Kopf aus zwei calponin-homologen Domänen besitzen. Dadurch entsteht ein ideales Verknüpfungsdimer zwischen zwei Aktinfilamenten (Otey und Carpen, 2004). Auf Grund dieser Kopfstruktur wird  $\alpha$ -Aktinin zu der Familie der calponin homology (CH) domain proteins gezählt (Kim et al., 2004). Der Schwanz der beiden Untereinheiten besteht aus vier Domänen, die eine Homologie zum Aktin-bindenden Protein Spektrin besitzen und deshalb spectrin-like repeats genannt werden. Außerdem befindet sich am C-terminalen Ende eine calmodulin-like domaine (CaM). Die meisten Interaktionen werden durch die spectrin-like repeats vermittelt (Otey und Carpen, 2004).

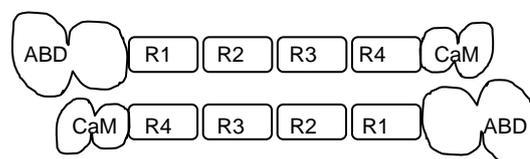


Abb. 4:  $\alpha$ -Aktinin (aus Otey und Carpen, 2004)

In den Fokalkontakten erfüllt  $\alpha$ -Aktinin mehrere Funktionen. Indem es Transmembranproteine wie die Integrine an das Aktinzytoskelett bindet, gibt es der Adhäsionsstelle Stabilität und leistet einen Beitrag zur Beibehaltung der Zellform (Rajfur et al., 2002). Dadurch, dass  $\alpha$ -Aktinin viele Regulatorproteine bindet, dient es als Gerüst um Signalmoleküle an die Adhäsionsstellen zu binden. An bestimmten Stellen fördert  $\alpha$ -Aktinin die Akkumulation von Adhäsionsmolekülen. Das ist bei ICAM-2 von besonderer Bedeutung, da dieses keiner Regulierung bei erhöhter Expression unterliegt und durch eine solche Anhäufung seine adhäsive Funktion erhöhen kann (Pavalko et al., 1995; Dwir et al., 2001). Im Sarkomer der quergestreiften Muskulatur befinden sich sogenannte Z-Membranen, die  $\alpha$ -Aktinin und Desmin enthalten, welche den Grund der Deckplatte des Zylinders bilden. In der jeweiligen Z-Membran sind die dünnen Myofilamente verankert (Otey und Carpen, 2004). Auf Zellebene innerhalb der kontraktiven Aktinfibrillenbündel (stress fibers), befinden sich analog dazu die dense regions. Lazarides und Burridge (1975) bezeichnen  $\alpha$ -Aktinin als das Herzstück dieser dense regions. Neuere Studien unterstützen die Vorstellung, dass  $\alpha$ -Aktinin in den stress fibers als eine Art Plattform für Multiproteinkomplexe dient, die vor allem zwischen Kern und dem Zytoskelett kommunizieren (Bauer et al., 2000; Vallenius et al., 2000; Otey und Carpen, 2004).

### 1.3.3.3 Fokale Adhäsionskinase

1992 wurde die Fokale Adhäsionskinase (FAK) von unterschiedlichen Forschern unabhängig entdeckt, einerseits als Produkt von viralen Src-Onkogenen und andererseits in gesunden Zellen als hochgradig tyrosinphosphoryliertes Protein, welches an Fokalkontakten mit Integrinen kolokalisiert ist (Hanks et al., 1992; Guan und Shalloway, 1992; Schaller et al., 1992). Schon kurz darauf konnte gezeigt werden, dass die FAK tyrosinphosphoryliert wird, sobald sich Integrine anhäufen (Kornberg et al., 1992). Heute ist bekannt, dass die Protein-Tyrosin-Kinase eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch Integrine spielt (Parsons, 2003).

FAK oder PTK2 (protein-tyrosine kinase 2) gehört zusammen mit PYK2, welche auch related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK), cell adhesion kinase  $\beta$  (CAK $\beta$ ) oder calcium-dependent protein-tyrosine kinase (CADTK) genannt wird, zu der FAK Familie der non-receptor protein-tyrosine kinases (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995; Yu et al., 1996). Während FAK in fast allen Geweben in allen Zellen vorkommt (Schaller et

al., 1992), findet man das strukturell sehr ähnliche PYK2 hauptsächlich im Gehirn und in kleineren Mengen in den inneren Organen (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995).

Die Tyrosinkinase FAK wiegt 125 kDa und wird in der Zelle zu jedem Zeitpunkt synthetisiert (Mitra et al., 2005). In der Mitte des Proteins befindet sich die katalysierende Domäne. Am N-terminalen Ende findet man eine Sequenz, welche stark einer FERM-Sequenz gleicht (Girault et al., 1999; Sun et al., 2002). Die Mitglieder der Proteinfamilie, die diese Domäne enthalten, sind dafür bekannt durch FERM transmembrane Glykoproteine mit dem Aktinzytoskelett zu verbinden. Durch diese FERM-Domäne regelt FAK die Interaktionen mit den Integrinen und Wachstumsfaktoren (Parsons, 2003). Schaller et al. (1995) konnten in vitro eine Verbindung von FERM an  $\beta$ -Integrinuntereinheiten erzeugen, wohingegen Schlaepfer et al. (2004) vermuten, dass eine Bindung über Talin und Paxillin an die Integrine lediglich in vivo erfolgt. Am C-terminalen Ende befindet sich die sogenannte FAT-Region (focal adhesion targetin), welche FAK mit neu gebildeten oder schon bestehenden Adhäsionskomplexen verbindet (Martin et al., 2002). Es gibt innerhalb des Moleküls mehrere Positionen, an denen bei Anhäufung von Integrinen innerhalb sehr kurzer Zeit Phosphor angelagert wird. Die meisten dieser Stellen befinden sich innerhalb der FAT-Region, die wichtigste Region befindet sich jedoch direkt am Übergang zwischen der FERM-Homologie und der katalysierenden Region. Die Phosphorylierung dieser Tyr397 führt zu einer Steigerung der katalysierenden Wirkung von FAK (Calalb et al., 1995) und ist notwendig für die Tyrosinphosphorylierung von vielen Fokalkontaktproteinen (Cobb et al., 1994; Schaller und Parsons, 1994c; Schaller et al., 1999). Innerhalb der katalysierenden Region befinden sich Tyr567 und Tyr577, deren Phosphorylierung ebenfalls abhängig von der Tyr397 Phosphorylierung und wichtig für die maximale adhäsionsinduzierte Aktivierung von FAK ist (Calalb et al., 1995; Owen et al., 1999). Auf molekularer Ebene hat FAK zwei Funktionen, zum einen ist FAK Teil von Signalkaskaden und zum anderen unterstützt es als Skelettprotein die Stabilität der Zelle. Die Tatsache, dass die Tyrosinphosphorylierung von FAK innerhalb kürzester Zeit nach Kontakt von  $\beta_1$ -Integrin mit Fibronectin erfolgt, lässt eine Bedeutung, von FAK genau in dieser Signalkette vermuten (Abedi und Zachary, 1995). Es sind mehrere verschiedene Signalwege bekannt, für die FAK relevant ist (Vuori, 1998). Insgesamt spielt FAK eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration von Zellen (Schaller und Parsons, 1994d; Abedi und Zachary, 1995; Mitra et al., 2005). Zum Beispiel erhöht eine stärkere Signalgebung durch FAK die Zellmotilität und das Zellüberleben (Cary et al., 1996). Es ist daher nicht erstaunlich, dass FAK in vielen hochmalignen Zellen erhöht ist (Cance et

al., 2000) und positiv mit der Invasivität von Tumoren korreliert (Abedi und Zachary, 1995; Jones et al., 2000). Zellen, welche keine FAK produzieren können, sind nicht in der Lage durch Bewegungsrichtungsänderung oder Formierung von Adhäsionsstellen auf äußere Einwirkungen zu reagieren (Wang et al., 2001).

#### **1.3.4 Integrine und ECM im weiblichen Reproduktionstrakt**

Für eine erfolgreiche Implantation und Plazentation sind Gewebeveränderungen im Endometrium notwendig, welche eng mit den Komponenten der ECM zusammenhängen. Die Bindung der Integrine an ECM-Proteine ist daher neben vielen anderen Bereichen ein wichtiger Faktor für die Entwicklungen im Uterus (Juliano und Haskill, 1993; Bronson und Fusi, 1996). Für die hämochoriale Humanplazenta wurde dieses 1993 anhand der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  gezeigt (Damsky et al., 1993; Fisher und Damsky, 1993). Diese spezielle Untereinheit wurde bei Mäusen bereits im Zweizellstadium, beim menschlichen Embryo im Morulastadium nachgewiesen (Damsky et al., 1993). Ähnlich früh wie die Integrinuntereinheit  $\beta_1$  finden sich im Mäuseembryo die  $\beta$ -Ketten des Laminins und auch die  $\alpha$ -Kette ist ab dem 16-Zellstadium vorhanden (Damsky et al., 1993; Vinatier, 1995). Kollagen IV und Fibronektin konnten ihrerseits erst in der Blastozyste gezeigt werden (Damsky et al., 1993). In der Plazenta der Makaken, welche der des Menschen sehr ähnelt, werden während der gesamten Gestation große Mengen an Kollagen IV, Laminin und Fibronektin nachgewiesen (Blankenship und King, 1992; Blankenship und King, 1993). Fazleabas et al. (1997) zeigen in einer Studie am Pavian die Verhältnisse von Integrinen und ECM im Endometrium während des Menstruationszyklus und der frühen Trächtigkeit. Auch diese kommen den Verhältnissen in der Humanplazenta sehr nahe.

Die Wichtigkeit der Integrine im weiblichen Reproduktionstrakt zeigt sich besonders bei Reproduktionsstörungen. So konnte die Integrinuntereinheit  $\beta_3$ , welche im menschlichen Uterusepithel zyklusabhängig reguliert und nur zur Zeit der Empfänglichkeit exprimiert wird, bei unfruchtbaren Frauen nicht nachgewiesen werden (Lessey et al., 1992). Genauere Studien ergaben, dass es sich bei dieser Problematik um das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  handelt und dass sich die Infertilität mittels einer Hormonbehandlung, welche die Regulierung dieses Integrins korrigierte, rückgängig machen ließ (Lessey et al., 1996; Lessey und Arnold, 1998).

Derartige, durch fehlerhafte Integrinexpression bedingte Reproduktionsstörungen, sind inzwischen einige bekannt (Zusammenfassungen in (Lessey, 1997; Reddy und Mangale, 2003)). Während die Lokalisation der Integrine und der ECM Proteine im normalen Zyklus

und während der Schwangerschaft in der hämochorialen Plazenta der Frau sehr gut untersucht ist, gibt es wenige Untersuchungen beim Wiederkäuer. Bei der Ziege gibt es nur geringe Unterschiede in der Expression von Integrinen und ECM während des Zyklus und direkt vor der Implantation (18. Tag) (Guillomot, 1999). Allerdings stellt sich heraus, dass im Gegensatz zum Menschen im caprinen Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation keine Veränderungen in der  $\beta_3$ -Integrinuntereinheit auftraten, wohingegen die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit abreguliert wurde. Des Weiteren war zum Zeitpunkt der Implantation sowohl die Menge von Kollagen I, Kollagen IV als auch von Laminin erheblich reduziert. Die Teile des Uterus jedoch, die nicht in Kontakt mit dem Trophoblasten stehen, bleiben unverändert (Guillomot, 1999). Parallel hierzu verläuft die Entwicklung von Kollagen I, Kollagen IV, Laminin und Fibronectin beim Rind, bei welchem ab dem 14. Tag, dem Zeitpunkt der Implantation, die genannten ECM-Proteine erst einmal stark abfallen (Yamada et al., 2002). Kollagen IV und Laminin sind allerdings in der Basallamina und im darunterliegenden endometrialen Stroma zu jeder Zeit vorhanden, ihre Menge nimmt aber zwischen dem 18. und 30. Tag signifikant zu (MacIntyre et al., 2002). Takahashi et al. (Takahashi et al., 2005) zeigen, dass beim Rind die Anheftung und das Wachstum des bovinen Embryos nur über Fibronectin (FN), nicht aber wie beim Menschen über Fibronectin und Laminin reguliert wird. Die RGD-Region des FN wird schon im 8 Zellstadium erkannt (Takahashi et al., 2005). Die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit scheint beim Rind auch eine wichtige Rolle bei der Migration der TGC zu spielen, welche ab dem 24. Tag deutlich  $\beta_1$  exprimieren. Allerdings scheint es sich hierbei nicht um den üblichen  $\alpha_5\beta_1$  Fibronectinrezeptor zu handeln, da Fibronectin nur im Stroma nachgewiesen werden konnte (MacLaren und Wildeman, 1995; Pfarrer et al., 2003). Eine Downregulation der  $\beta_1$ -Untereinheit während der Implantation konnte beim Rind allerdings nicht gezeigt werden (Kimmins und MacLaren, 1999). Das Expressionsmuster der  $\alpha$ -Integrinuntereinheiten zeigt eine zyklusabhängige räumliche und zeitliche Verteilung. Es wird eine Regulation der Integrinuntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_v$  und  $\alpha_6$  beobachtet (MacLaren und Wildeman, 1995; MacIntyre et al., 2002). Die Veränderungen innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheiten und der ECM-Proteine lassen auf eine Beteiligung beim Attachment, der Migration und der Implantation schließen (MacIntyre et al., 2002). Pfarrer et al. (Pfarrer et al., 2003) untersuchten den zeitlichen Verlauf der Integrinuntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$ , sowie der ECM-Proteine Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin und Laminin in der Rinderplazenta in vivo. Diese Studie zeigte, dass es zu einer Verschiebung des Verteilungsmusters während der Gravidität kommt. Sowohl das Signal der

$\alpha$ -Untereinheiten 2, 5 und  $\nu$  als auch die  $\beta$ -Untereinheiten 3 und 4 wanderten aus den maternalen Stammsepten in die Wachstumszone der Septenspitzen. Des Weiteren konzentrierte sich das  $\beta_1$ -Signal, das zu Beginn der Trächtigkeit im gesamten maternalen Stroma auftrat, ab dem 150. Tag auf die Basalmembranen von Epi- und Endothelien. Im Zusammenhang mit dieser Studie stellten sie die These auf, dass TGC mit der Expression von Laminin ähnliche Mechanismen nutzen wie Tumorzellen bei der Auswanderung aus Blutgefäßen (Pfarrer et al., 2003).

## 2 Zielsetzung der Studie

Pfarrer et al. (2003) haben gezeigt, in welchem räumlichen und zeitlichen Verteilungsmuster Integrinuntereinheiten und ECM-Proteine während der Gravidität in der Rinderplazenta vorkommen. Ihr besonderes Augenmerk galt dabei den TGC, welche bei ihrer Migration eine Integrinexpression zeigten, die derjenigen der fest verankerten, polarisierten Epithelzellen entsprach. In einer darauf folgenden Studie der Arbeitsgruppe wurden diese Ergebnisse mittels Immunfluoreszenz reproduziert. Um die Wanderung der TGC genauer erforschen zu können, wurde in einem ersten Schritt ein Zellkulturmodell mit primären Zellen des maternalen Karunkelepithels und der fetalen Kotyledone entwickelt, in welchem die kultivierten Zellen im Großen und Ganzen ihre in vivo Qualitäten in Bezug auf die Expression von Integrinen und Proteinen der ECM beibehielten (Zeiler, 2006). In dieser Studie wurde zunächst die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Versuche an der entstandenen Primärzellkultur mit der in vivo Situation überprüft, da beispielsweise humane endometriale Zellen im Gegensatz zur in vivo Situation die Integrinuntereinheiten  $\alpha_1$  und  $\alpha_4$  in vitro nicht exprimieren (Simon et al., 1999). In den isolierten Karunkelepithelzellen konnten jedoch die Integrinuntereinheiten  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_v$  und  $\beta_3$  ebenso wie in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden (Zeiler, 2006). In diesen Versuchen konnten  $\alpha_6$  und  $\beta_1$  kolokalisiert werden, was darauf schließen lässt, dass es sich bei dieser Expression um den typischen Lamininrezeptor handelt.  $\alpha_v$  und  $\beta_3$  konnten ihrerseits jeweils mit Fibronectin kolokalisiert werden (Zeiler, 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll, um bessere Ausgangsmöglichkeiten für zukünftige Versuche zu schaffen, eine Möglichkeit der Kryokonservierung für die Primärkultur von Epithelzellen aus der maternalen Karunkel gefunden werden. Mittels Antikörpern gegen die Zytoskelettfilamente  $\alpha$ -smooth muscle Aktin, Desmin, Vimentin und Zytokeratin soll gezeigt werden, dass sich die Expression dieser Proteine durch das Einfrieren nicht verändert und die Zellen somit nativen, primären Zellen gleichgesetzt werden können.

Hauptziel der vorliegenden Dissertation ist der Nachweis, dass Integrine im Zellkulturmodell nicht nur für die Zelladhäsion verantwortlich sind, sondern auch funktionell aktiviert werden, also am „inside-out-“ und „outside-in-signaling“ teilnehmen. Da Integrine selbst keine enzymatische Aktivität haben, muss die  $\beta_1$ -Untereinheit zur Aktivierung an Hilfsproteine, wie  $\alpha$ -Aktinin, fokale Adhäsionskinase oder Talin gebunden werden, welche ihrerseits

tyrosinphosphoryliert werden. Mit Hilfe der Kollokalisierung der Integrin  $\beta_1$ -Untereinheit mit den genannten Signalproteinen soll die funktionelle Aktivierung des Integrinrezeptors in Gewebeschnitten und Primärkulturen von Karunkelepithelzellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen und mit Western blot bestätigt werden. Auf dieselbe Art wurde demonstriert, dass die Integrine und FAK in einer humanen dezidualen Zellkultur aktiv sind (Shiokawa et al., 1998).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es zu testen, ob die Expression und Aktivierung der Integrine sowie das Wachstum der Epithelzellen durch unterschiedliche Matrices beeinflusst werden können. Durch Beschichtung der Zellkulturböden mit Fibronectin, Kollagen IV und Laminin im Vergleich zu unbeschichteten Böden soll sowohl die Zellzahl, als auch die qualitative Expression der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  und der genannten Signalproteine mittels Immunfluoreszenz bestimmt werden.

In späteren Schritten der Forschung könnten Kontaktstudien folgen, in denen die Regulierung der Trophoblastriesenzellmigration untersucht werden kann.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von 26 trächtigen Rindern unmittelbar nach der Schlachtung auf dem Schlachthof Gießen Untersuchungsmaterial gewonnen. In 20 Fällen wurden parallel Zellen für eine primäre Epithelzellkultur isoliert und jeweils Plazentome zur Überprüfung der *in vivo* Verhältnisse gewonnen. In den übrigen Fällen wurden entweder lediglich Plazentome entnommen oder eine Zellisolation für die Zellkultur durchgeführt (siehe Tabelle 2). Das jeweilige Graviditätsstadium wurde anhand der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Feten nach Habermehl (1975) bestimmt (siehe Tabelle 1).

Als Vergleich für die Altersbestimmung wurde die Formel nach KELLER verwendet, die auf Tage genau bestimmt;  $t = 28(\sqrt{y+1}-1)$ , wobei  $y$  die Scheitel-Steiß-Länge in Zentimetern angibt (Wille 1984). Bei diesem Vergleich kam es nur zu geringen Abweichungen (siehe Tabelle 2). Nach Beendigung der Probenentnahme stand Untersuchungsmaterial vom 77. bis zum 216. Trächtigkeitstag, entsprechend den Trächtigkeitsmonaten drei bis acht zur Verfügung. Um auch den neunten Trächtigkeitsmonat *in vivo* abzudecken, wurden tiefgefrorene Plazentome von zwei Tieren hinzugenommen, die im Rahmen früherer Versuche in gleicher Weise gewonnen wurden. Zusätzlich wurden paraffinfixierte Plazentome aus früheren Materialentnahmen verwendet. Die genauen Daten der verwendeten Tiere sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Wachstum und Altersbestimmung beim Rinderfetus

Alter Monatsende	Gewicht der Frucht in kg	SSL in 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 u. Brustbein schließen sich	Plazentation im Gange, linsengroße Kotyledonen
3.	0,17-0,30	13	-	Hodensack, Euteranlagen, Magenabteilungen erkennbar	Plazentare Verankerung vollständig
4.	0,8-1	24,5	Feine Haare am Augenbogen	Klauen abgesetzt u. 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, Augenliedern, Ohrrand, Hornstellen, Schwanzspitze	Alle Organe angelegt, fortschreitendes Wachstum	Plazentome 8,0:4,5:2,5 cm
7.	8-15	56	An Extremitäten bis an Karpal-u. Tarsalgelenk		Plazentome 11,0:5:2,8 cm
8.	15-25	69	Vollständig aber kurz behaart, Bauch- u. Nabelhaar kurz und dünn		Plazentome 11,0:6:3,5 cm
9.	20-45	81	Behaarung wird länger u. vollständiger, auch an Hautnabel und Bauch		Plazentome 14,0:6,5:4,5 cm

(aus Habermehl, 1975)

Tabelle 2: Plazentaprobe

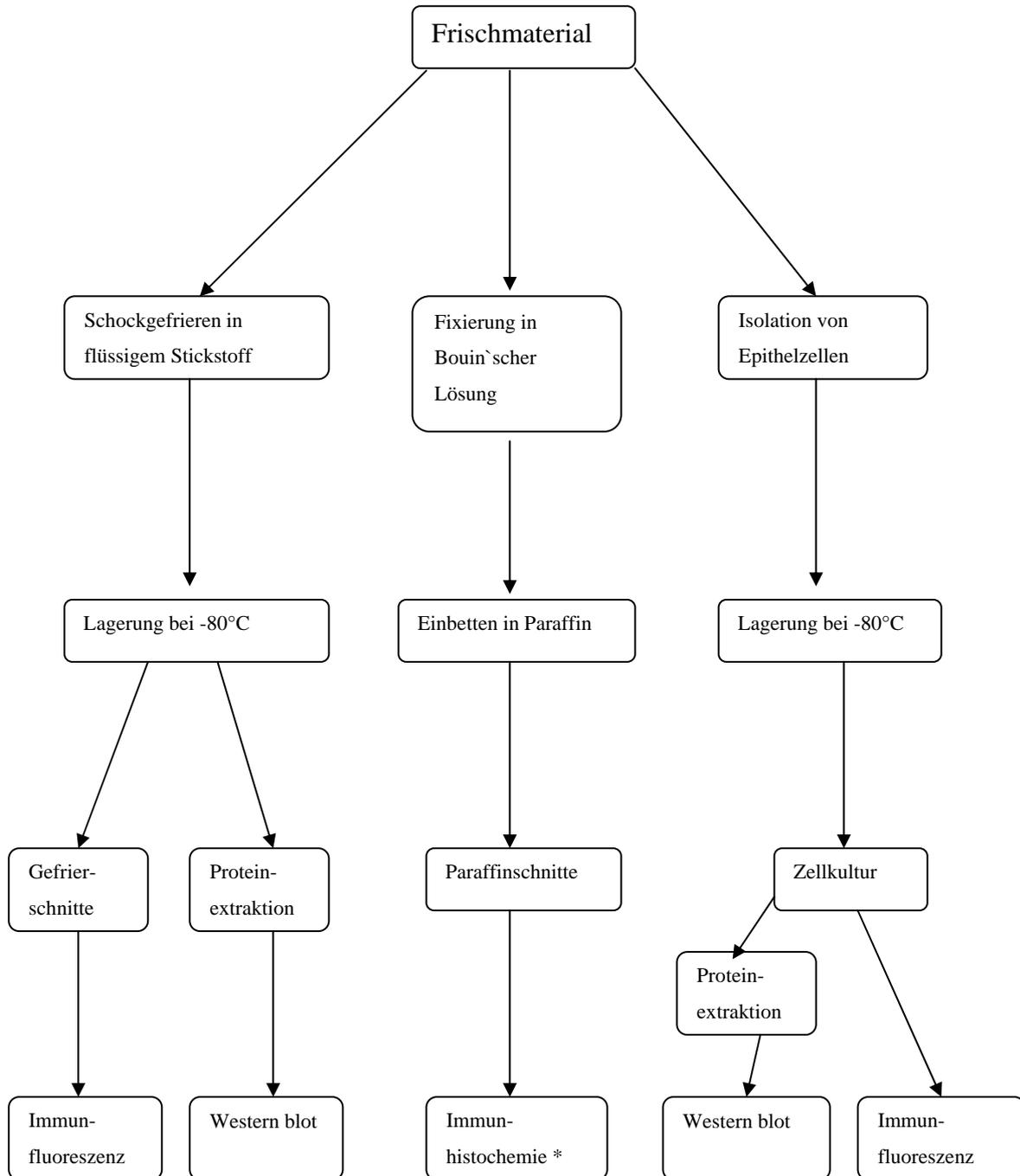
Rind	Schlacht- datum	SSL in cm	Alter nach Keller (Wille, 1984)	Alter nach Habermehl (1975)	Sex.	Probenmaterial	Bemerkung
1	06.01.04	75	216 t /8 Mo	8 Mo	?	ZK	
2	16.01.04	37	145 t/5 Mo	5 Mo	w	ZK	
3	06.02.04	16	87 t/3 Mo	3 Mo	m	ZK	
4	16.02.04	13	77 t/3 Mo	3 Mo	m	ZK/Plazentom	
5	27.02.04	55	182 t/6 Mo	6 Mo	w	ZK/Plazentom	
6	16.04.04	27	120 t/4 Mo	4 Mo	m	ZK/Plazentom	
7	14.05.04	45	162 t/6 Mo	6 Mo	m	ZK/Plazentom	
8	18.06.04	45	162 t/6 Mo	6 Mo	m	ZK/Plazentom	
9	06.07.04	40	151 t/5 Mo	5 Mo	w	ZK/Plazentom	
10	14.09.04	54	180 t/6 Mo	6 Mo	m	ZK/Plazentom	
11	21.09.04	18	94 t/3 Mo	3 Mo	w	ZK/Plazentom	Zwillinge m und w
12	05.10.04	33	135 t/5 Mo	5 Mo	m	ZK/Plazentom	
13	05.11.04	17	91 t/3 Mo	3 Mo	m	ZK/Plazentom	Kontami- nation der ZK
14	12.11.04	17	91 t/3 Mo	3 Mo	m	ZK/Plazentom	
15	19.11.04	33	135 t/3 Mo	5 Mo	w	ZK/Plazentom	
16	26.11.04	70	208 t/7 Mo	8 Mo	m	ZK/Plazentom	
17	23.12.04	41	153 t/5 Mo	5 Mo	m	ZK/Plazentom	
18	07.01.05	60	191 t/7 Mo	7 Mo	m	ZK/Plazentom	
19	27.01.05	19	97 t/3 Mo	3 Mo	m	ZK	
20	18.03.05	26	117 t/4 Mo	4 Mo	w	ZK/Plazentom	Zwillinge beide w
21	22.04.05	24	112 t/4 Mo	3 Mo	m	-	

Rind	Schlacht- datum	SSL in cm	Alter nach Keller (Wille, 1984)	Alter nach Habermehl (1975)	Sex.	Probenmaterial	Bemerkung
22	13.05.05	64	198 t/7 Mo	7 Mo	m	Plazentom	
23	27.05.05	52	176 t/6 Mo	6 Mo	w	Plazentom	
24	17.08.05	36	142 t/5 Mo	5 Mo	m	ZK/Plazentom	
25	16.09.05	24	112 t/4 Mo	3 Mo	w	ZK/Plazentom	
26	11.11.05	39	149 t/5 Mo	5 Mo	w	ZK/Plazentom	
S11		13,7	80 t/3 Mo	3 Mo		Paraffin	
S19		36,8	145 t/6 Mo	6 Mo		Paraffin	
S30		13,2	77 t/3 Mo	3 Mo		Paraffin	
S31		78	221 t/8 Mo	8 Mo		Paraffin	
S33		96	248 t/9 Mo	9 Mo		Paraffin	

m, männlich; w, weiblich; ZK, Zellkultur; t, Tage; Mo, Monate

## 3.2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Methoden angewandt.



\*Für ausgewählte Antikörper

### **3.2.1 Entnahme und Bearbeitung der Plazentome**

Auf dem Schlachthof wurde der gravide Uterus des entbluteten Rindes mitsamt den anhängenden Bauchorganen entnommen und abgebunden. Auf diese Weise konnte der Uterus abgetrennt werden, ohne dass es zu Kontaminationen kam. Er wurde auf Eis gelagert sofort in das Labor verbracht. Nach Reinigung des Uterus mit Wasser und Alkohol wurde er unter möglichst keimfreien Bedingungen mittels Skalpell entlang der Curvatura major eröffnet und Plazentome von unterschiedlichen Lokalisationen exzidiert. Plazentome für die in vivo Versuche wurden an der Oberfläche angeschnitten, um ein Brechen des Gewebes beim Einfriervorgang zu vermeiden. Danach wurden sie in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um schließlich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert zu werden. Die Plazentome, aus denen Zellen isoliert werden sollten, wurden schnellstmöglich auf Glaspetrischalen gelegt und im Weiteren in der Sterilwerkbank weiterverarbeitet. Abschließend wurde der Fetus untersucht, hierbei sein Geschlecht festgestellt und die Scheitel-Steiß-Länge gemessen. Für die Paraffinschnitte wurden Plazentome verwendet, die im Rahmen früherer Arbeiten in diesem Institut gewonnen wurden.

### **3.2.2 Zellkultur**

#### **3.2.2.1 Epithelzellmedium**

Für alle Versuche wurde mit DMEM/HAM's F12 Medium (PAA) gearbeitet. Dieses wurde sofort nach dem Öffnen mit 5,5 ml Penizillin Streptomycin (PAA) auf 500 ml Medium versetzt. Für das bessere Wachstum der Zellen wurde pro 500 ml Medium 55 ml fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Es wird also zwischen DMEM+FCS (als Nährmedium) und DMEM-FCS (als Basis für das Gefriermedium) unterschieden, wobei immer ein Zusatz von 1 % Penizillin Streptomycin enthalten ist. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden sämtliche Medien und Puffer für die Zellkultur vor Gebrauch im Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt.

#### **3.2.2.2 Isolation**

Die entnommenen Plazentome wurden auf sterile Glaspetrischalen gelegt und in der Sterilwerkbank möglichst schonend von Amnionresten, Gefäßen und sonstigem Bindegewebe

befreit. Danach wurde das Plazentom unter sanftem Zug mit der Pinzette in fetale Kotyledonen und maternale Uteruskarunkel getrennt.

### 3.2.2.3 Disaggregation

Zur Disaggregation wurde Kollagenase I (CLS, Biochrom) verwendet und nach folgender Formel eine Lösung hergestellt:

$X \text{ mg CLS} + 1 \text{ ml Hanks}^{+} + 9 \text{ ml DMEM+FCS}$

$X = 2000 \text{ U/ml}$

10 ml dieser Enzymlösung wurden in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Die maternale Uteruskarunkel wurde mit einem sterilen Baumwollfaden in der Form zusammengebunden, dass das angeschnittene Bindegewebe möglichst komplett im Inneren zu liegen kam, und somit die äußere Fläche die epitheliale Schicht des Gewebes präsentierte. Der so geformte Block von ca.  $1 \text{ cm}^3$  wurde mittels des Baumwollfadens soweit in das Falconröhrchen hinabgelassen, dass er zur Hälfte mit Enzymlösung bedeckt war und nicht den Boden berührte. Die so präparierten Röhrchen wurden für 60-90 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die genaue Zeitdauer richtete sich nach der Geschwindigkeit, in der sich Zellen von der Oberfläche des Gewebes lösten. Erst, wenn sich am konisch zulaufenden Boden des Röhrchens ein sichtbares Zellpellet gebildet hatte, wurde der Block vorsichtig entnommen und entsorgt. Die Lösung inklusive Zellen wurde mittels einer Pipette resuspendiert, in ein 15 ml Tube überführt und 5 min bei  $160 \times g$  ( $1000 \text{ U/min}$ ) zentrifugiert.

### 3.2.2.4 Aussaat

Pro Röhrchen wurde in vier Zellkulturflaschen jeweils 5 ml DMEM+FCS vorgelegt. Mittels Pipette musste zuerst der Überstand über dem Zellpellet abgezogen und verworfen werden. Danach wurde das Zellpellet in 8 ml DMEM+FCS resuspendiert und die Lösung gleichmäßig auf die Zellkulturflaschen verteilt (2 ml je Flasche), so dass jede Flasche 7 ml Flüssigkeit enthielt. Die Flaschen wurden vorsichtig geschwenkt und anschließend im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

### 3.2.2.5 Passage

Nach circa zwei Wochen und zweimaligem Medienwechsel mit jeweils 4 ml Medien austausch, waren bei der Untersuchung mit dem inversen Mikroskop (Vergrößerung 10x10) am Boden der Zellkulturflaschen mehrere große Epithelzellkolonien, die sich über drei bis vier Gesichtsfelder erstreckten, erkennbar. Daneben wurden auch fibroblastoide Zellpopulationen beobachtet, welche mittels Passagierung möglichst vollständig entfernt werden sollten. Hierzu wurde sich der Tatsache bedient, dass sich die unerwünschten, fibroblastoiden Zellen bei Trypsinbehandlung sehr viel schneller vom Boden der Kulturflaschen lösen als die Epithelzellen.

Für diese selektive Passagierung wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Flasche zweimal mit 7 ml Hanks<sup>~</sup> durch kurzes Schwenken gespült. Daraufhin wurde der Zellrasen mit 2 ml Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) - Lösung bedeckt und die Flasche für ca. 4 min bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Da sich die Inkubationsdauer nach der Geschwindigkeit richtete mit der sich die fibroblastoiden Zellen ablösten, wurde der Vorgang in Abständen mikroskopisch kontrolliert. In dem Moment in dem die Epithelzellen anfangen sich abzukugeln wurde das Trypsin abgesaugt, der Zellrasen mit 7 ml Hanks<sup>~</sup> gespült, 1 ml Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) - Lösung hinzugegeben und die Zellkulturflasche wieder in den Brutschrank gestellt. Nach zwei Minuten wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber vom Untergrund gelöst und die Lösung in 5 ml DMEM+FCS verdünnt. Die so entstandenen 6 ml wurden gleichmäßig auf zwei Zellkulturflaschen verteilt, in denen jeweils schon 4 ml DMEM+FCS vorgelegt worden waren. Dieses Verfahren führte nach der zweiten Passage zu fast reinen Epithelzellkulturen.

### 3.2.2.6 Kryokonservierung

Bei der zweiten Passage wurden die Epithelzellen auf dieselbe Art und Weise vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, wie bei der ersten Passage. Auch in diesem Falle wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 5 ml DMEM+FCS gestoppt. Zur möglichst vollständigen Entfernung des Trypsins aus der gewonnenen Zellsuspension wurde diese in ein Falconröhrchen gegeben und 5 min bei 160 x g (1000 U/min) zentrifugiert. Mittels einer Pipette wurde der Überstand aus dem Röhrchen verworfen, wobei die Zellschicht in der Spitze des Röhrchens nicht berührt werden durfte. Das so entstandene Zellpellet wurde in 10 ml DMEM + FCS resuspendiert und erneut 5 min bei 160 x g (1000 U/min) zentrifugiert.

Dieser zweite Schritt wurde noch einmal wiederholt.

Danach wurde das Zellpellet in 1 ml Gefriermedium resuspendiert. Das Gefriermedium bestand aus einem Verhältnis von 1 Teil DMSO, 3 Teilen FCS und 6 Teilen DMEM-FCS und hatte zum Zeitpunkt der Benutzung Kühlschranktemperatur (4°C). Die resultierende Gefriermediumzellsuspension wurde unverzüglich auf Eis gelegt und bei -80°C eingefroren.

### **3.2.3 Aussaat der Zellen zur Gewinnung von Zellmonolayern für die Immunfluoreszenz**

Die tiefgefrorenen Zellen wurden sofort nach der Entnahme aus dem -80°C Gefrierschrank bei Raumtemperatur in der Sterilwerkbank aufgetaut. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension unverzüglich nach dem Auftauen in ein Falconröhrchen überführt und dort mit 9 ml DMEM+FCS versetzt und 5 min bei 160 x g (1000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mittels einer Pipette verworfen und das Zellpellet erneut in 10 ml DMEM+FCS resuspendiert. Dieser Spülvorgang wurde zweimal wiederholt. In der Zwischenzeit wurden 6-Well Zellkulturschalen mit sterilen Deckgläschen 22 x 22 mm versehen und pro Well 2 ml DMEM+FCS vorgelegt. Nach der dritten Spülung wurde das Zellpellet in 6 ml DMEM + FCS resuspendiert und schließlich pro Well 1 ml der Zellsuspension verteilt. Hierbei war zu beachten, dass die Deckgläschen mit der Pipette nach unten gedrückt wurden, um ein Aufschwimmen und somit das Wachstum von Zellen unter den Deckgläschen zu verhindern. Nach einer Inkubationsdauer von vier bis sieben Tagen im Brutschrank bei 37°C waren die Zellen mehr oder weniger konfluent und somit einsatzbereit für die Immunfluoreszenz.

Für bestimmte Versuche wurden die Deckgläschen in den 6-Wells mit unterschiedlichen Zellmatrices beschichtet (siehe unten).

### **3.2.4 Herstellung von Kryostatschnitten für die Immunfluoreszenz**

In einem ersten Schritt wurden die Antikörper an Gefrierschnitten der Rinderplazenta evaluiert. Dazu wurden aus den tiefgefrorenen Proben Stücke von ca. 2 x 1 x 1 cm geschnitten. Bei der Schnittführung wurde darauf geachtet, dass von der Chorionplatte bis zum Plazentomstiel alle Anteile des Plazentoms im Anschnitt erkennbar waren. Die Probenstückchen wurden mit Tissue-Tek<sup>®</sup>-Gewebekleber auf dem Objekthalter des Kryotoms (Reichert und Jung<sup>®</sup>-Kryostat) befestigt und bei -22°C weiterverarbeitet. Nach Anfertigung einer glatten Schnittfläche wurden Gefrierschnitte von ca 12 µm Dicke angefertigt und auf Chromalaun-beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach einer Trockenzeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT), wurden die Schnitte bis zur Verwendung (spätestens eine Stunde nach Herstellung) bei -20°C gelagert. Die Fixierung der Gefrierschnitte erfolgte erst direkt vor dem Versuchsbeginn mit 100 % Methanol bei -20°C für 10 min. Durch den präzisen Schneidevorgang und diese schonende Form der Fixierung entsprach die morphologische Qualität der Gefrierschnitte annähernd der von Paraffinschnitten.

#### **3.2.4.1 Objektträgerbeschichtung**

Zur besseren Anhaftung der Gefrierschnitte auf den Objektträgern wurden diese zuvor mit Chromalaun (Kaliumchrom (III) -sulfat Dodecahydrat) beschichtet. In einem ersten Schritt wurden die Objektträger mit 80 % Alkohol gereinigt. Anschließend wurden 5 g Gelatine abgewogen und in 1 l Aqua dest. auf 35°C erwärmt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurden 0,5 g Chromalaun zugegeben und die Lösung kurz auf 40°C erwärmt. Anschließend wurde sie auf 20°C abgekühlt und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Objektträger wurden daraufhin für 10 min in die Lösung getaucht und anschließend ein bis zwei Nächte bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

### **3.2.5 Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenz (IF)**

Die Immunfluoreszenz ist eine sehr sensitive Nachweismethode, bei der ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet, der seinerseits ein Protein im Gewebe gebunden hat, welches so mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden kann. Hierzu wird die Probe, ein Gewebeschnitt oder ein Zellkulturmonolayer, mit einer proteinschonenden Methode fixiert und mit dem Serum der

Spezies aus der der Sekundärantikörper stammt blockiert, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden.

### 3.2.5.1 Fixierung und Permeabilisierung

Um den Monolayer der Zellkultur zu fixieren, wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Hanks<sup>+</sup> Puffer gespült. In den darauffolgenden Schritten wurden sowohl die Zellen als auch die Gefrierschnitte folgender Prozedur unterzogen:

- 10 min Fixation in 100 % Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , bei der Zellkultur 3 ml pro Well  
(Für besonders gute Ergebnisse bei FAK und  $\alpha$ -Aktinin 10 Sekunden in 70 % Aceton und 30 % Methanol bei  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ )  
Objektträger aus dem Methanol nehmen, beziehungsweise Methanol aus den Wells absaugen und verwerfen
- Lufttrocknen
- Eingrenzen des zu untersuchenden Bereiches mit dem PapPen
- Kurzes Spülen mit PBS/Tween

### 3.2.5.2 Blockierung

- Proteinblocklösung (PBL) aus 1:10 Eseserum und Antikörperverdünnungspuffer (AVP) herstellen
- Jeweils 150  $\mu\text{l}$  PBL auf die Präparate pipettieren
- 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubieren

Tabelle 3 Daten der Primärantikörper

Antikörper	Klon	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-Human Smooth Muscle Aktin	1A4	Maus	IF: 1:50	DakoCytomation Hamburg Deutschland
Anti-Chicken- alpha-Aktinin	BM-75.2	Maus	IF: 1:200 IHC: 1:200 WB: 1:2000	SIGMA Saint Louis Missouri USA
Anti-Cow Zytokeratin	Polyklonal	Kaninchen	IF: 1:300	DakoCytomation Hamburg Deutschland
Anti-Human Zytokeratin	E020	Maus	IF: 1:10	LINARIS Wertheim- Bettingen Deutschland
Anti-Human Desmin	D33	Maus	IF: 1:100	DakoCytomation Hamburg Deutschland
Anti-Human FAK	Polyklonal	Kaninchen	IF: 1:100 IHC: 1:100 WB: 1:200	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Anti-Human Fibronectin	IST-3	Maus	IF: 1:250	SIGMA Saint Louis Missouri USA
Anti-Cattle Integrin beta1	FW4-101	Maus	IF: 1:100 IHC: 1:100	NatuTec Frankfurt Deutschland
Anti-Human Integrin beta1	Polyklonal	Kaninchen	IF: 1:100 IHC: 1:100 WB: 1:600	CHEMICON INTERNATIONAL
Anti-Human Phosphotyrosin	4G10	Maus	IF: 1:50 IHC: 1:50	Upstate biomol Lake Placid NY USA
Anti-Chicken Talin	8D4	Maus	IF: 1:400 IHC: 1:400 WB: 1:2000	SIGMA Saint Louis Missouri USA
Anti-Human Vimentin	Polyklonal	Kaninchen	IF: 1:100	DakoCytomation Denmark

Tabelle 4 Daten der Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	Cy3	Esel	1:300	CHEMICON INTERNATIONAL
Anti-Maus	Cy3	Esel	1:300	CHEMICON INTERNATIONAL
Anti-Kaninchen	FITC	Esel	1:200	CHEMICON INTERNATIONAL
Anti-Maus	FITC	Esel	1:200	CHEMICON INTERNATIONAL

### 3.2.5.3 Primärantikörper

- Während der Inkubationszeit Antikörperverdünnung mit AVP herstellen (siehe Tabelle 3)  
Für Doppelmarkierungen beide Antikörper in einem Eppendorfröhrchen vermischen
- PBL absaugen
- Kurz in PBS/Tween spülen
- Jeweils 150 µl Primärantikörper auf die Präparate pipettieren
- Über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer inkubieren

### 3.2.5.4 Sekundärantikörper

- Primärantikörper absaugen
- 3 x 10 min in PBS/Tween auf Wipptisch spülen
- In der Zwischenzeit Sekundärantikörperverdünnung mit AVP herstellen (siehe Tabelle 4), dabei dürfen diese Antikörper keinem hellen Licht ausgesetzt sein.
- Jeweils 150 µl Sekundärantikörper auf die Präparate pipettieren
- 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubieren

### 3.2.5.5 Eindeckeln der Präparate

- Sekundärantikörper absaugen
- 3 x 10 min in PBS/Tween auf Wipptisch spülen
- PBS/Tween absaugen und Aqua bidest. auf die Präparate geben
- Jeweils 16 µl Verschlusslösung mit DAPI (Vectashield) auf die Objektträger pipettieren. Hierbei werden für die Zellkultur frische Objektträger verwendet, wohingegen die Verschlusslösung bei den Gefrierschnitten direkt auf die Schnitte aufgebracht wird.
- Deckgläschen ohne Lufteinschluss auf die Objektträger legen. Bei der Zellkultur werden die Deckgläschen aus den 6-Wells mit den Zellen nach unten aufgelegt, während bei den Gefrierschnitten frische Deckgläschen verwendet werden.
- Die so hergestellten Immunfluoreszenzpräparate wurden bei 4°C gelagert und innerhalb der darauffolgenden vier bis fünf Tage untersucht und archiviert.

### 3.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Immunfluoreszenzpräparate wurde mit einem Olympus BX50 Mikroskop gearbeitet. Zur Anregung der jeweiligen Emissionsstrahlung wurde das Licht durch spezielle Filter in die entsprechende Wellenlänge gebracht. Um das grüne Licht des mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelten Antikörpers (490–525 nm) anzuregen wurde mit 450–490 nm bestrahlt; das rote Licht von Cy3 (Carboxymethylindocyanin) (630–660 nm) konnte mit 510–530 nm angeregt werden und für das blaue Licht der DAPI-Kernfärbung (461 nm) wurde ein Filter verwendet, der ein Licht mit der Wellenlänge von 358 nm passieren ließ. Für die Bilddokumentation wurde mit einer digitalen Schwarz-Weiß-Kamera (Spot Insight, Visitron Systems, D-Puchheim) und einer entsprechenden Software (Spot Insight Software, Diagnostic Instruments, Michigan, USA) gearbeitet. Die so entstandenen Schwarz-Weiß-Bilder wurden mit einem speziellen Softwareprogramm (Metamorph, Visitron Systems GmbH, D-Puchheim) entsprechend der emittierenden Lichtfarbe eingefärbt und gegebenenfalls überlagert.

### **3.2.7 Vergleichende IF Untersuchung der Zytoskelettbestandteile und Fibronektin von nativen und tiefgefrorenen Zellen**

Um die nativen Zellen mit den tiefgefrorenen Zellen vergleichen zu können wurde in n=5 Fällen mittels Immunfluoreszenz (siehe 1.2.5) in einer Paralleluntersuchung die Expression der Zytoskelettbestandteile  $\alpha$ -sm Aktin, Desmin und Zytokeratin sowie die Expression von Fibronektin detektiert. Zu diesem Zweck wurden Zellen derselben Isolation verwendet. Die gleiche Herkunft der Zellen war gewährleistet, weil es sich um das Paar handelte, welches aus der Passage einer Zellkulturschale entstanden war. Nach sechs Tagen wurden die Zellen aus einer der beiden Schalen tiefgefroren (siehe 1.2.2.6). Am darauf folgenden Tag wurde diese Probe wieder aufgetaut und gleichzeitig mit der Parallelprobe ausgesät. Nach einer Inkubationsdauer von vier bis sieben Tagen im Brutschrank bei 37°C waren die Zellen mehr oder weniger konfluent ausgewachsen und wurden gleichzeitig einer Immunfluoreszenz unterzogen.

### **3.2.8 Herstellung von Paraffinschnitten für die Immunhistochemie**

Für einige ausgewählte Antikörper wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten angefertigt, um das Ergebnis im Gefrierschnitt zu bestätigen beziehungsweise um dauerhafte Präparate höherer Qualität zu erzielen.

#### **3.2.8.1 Fixierung der Plazentome in Bouin`scher Lösung**

Bouin`scher Lösung wurde unmittelbar vor der Verwendung aus 15 ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung, 5 ml Formalin (36 %) und 1 ml Eisessig gemischt. Die Plazentome wurden in situ im eröffneten Uterus über Äste der Arteria umbilicalis perfusionsfixiert und nach ca. 30 min extirpiert. Nach der Extirpation wurden die Plazentome in ca. 1 cm dicke Scheiben geschnitten und in der gleichen Lösung für 24 h nachfixiert. Anschließend wurden 2 x 1 x 1 cm große Proben entnommen und an den fünf darauf folgenden Tagen mit 70 %igem Ethanol gespült bis sich das Ethanol nicht mehr gelb färbte.

#### **3.2.8.2 Dehydratation und Paraffineinbettung der Proben**

Zur Dehydratation der Proben wurden diese in Plastikkörbchen (3 x 2 x 2 cm) in die Entwässerungsmaschine (Vakuum-Gewebeinfiltrationsapparat TP 1050, Leica) gelegt. Das

ausgewählte Programm lässt die Proben im Vakuum folgende Schritte durchlaufen:

- Ethanol 80 % für 2 h
- Ethanol 96 % für 2 h
- Ethanol 100 % für 3 h
- Ethanol 100 % für 3 h
- Ethanol 100 % für 3 h
- Xylol für 1 h
- Xylol für 45 min
- Xylol für 45 min
- Paraffin mit 59°C für 40 min
- Paraffin mit 59°C für 40 min
- Paraffin mit 59°C für 40 min

#### 3.2.8.3 Gießen der Paraffinblöcke

Zur Ausbettung wurden die Proben in dafür vorgesehene Stahlförmchen (3 x 2 x 2 cm) verbracht und in dem Einbettgerät Leica EG116 mit 60°C warmem Paraffin übergossen. Die Aushärtung und Abkühlung fand auf der dem Gerät eigenen Kühlplatte statt.

#### 3.2.8.4 Objektträgerbeschichtung

Um eine gute Haftung der Paraffinschnitte auf den Objektträgern zu sichern, wurden diese zuvor mit APES (3-Triethoxysilyl-propylamin) beschichtet. Dazu wurden die Objektträger, nach Reinigung mit 80 % Alkohol, jeweils 20 sec in folgende Lösungen getaucht: 1:50 APES: Aceton, reines Aceton (2 x), Aqua dest. (2 x). Danach wurden die Objektträger bei 37°C im Trockenschrank ein bis zwei Tage getrocknet.

#### 3.2.8.5 Herstellung von Paraffinschnitten

Von den in Paraffin eingebetteten Proben wurden mit einem Schlittenmikrotom (Leica SM 200 R) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. In einem Wasserbad von 37°C wurden diese Schnitte gestreckt, auf APES beschichtete Objektträger überführt und über Nacht bei 37°C getrocknet. In dieser Form können Paraffinschnitte sehr lange bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 3.2.8.6 Entparaffinierung

Paraffinschnitte müssen vor immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Versuchen entparaffiniert werden. Dazu wurden die Proben auf den Objektträgern folgendem Protokoll unterzogen:

- Xylol (60°C) 5 min
- Xylol (RT) 5 min
- Xylol (RT) 5 min
- Absteigende Alkoholreihe jeweils 5 min
- Aqua dest. 5 min

### 3.2.9 Proteinnachweis mittels Western blot (WB)

Das Western blot Verfahren basiert auf einer gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen, welche dann mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Bei der Gelelektrophorese werden die Komponenten einer Proteinmischung, ihrem Molekulargewicht entsprechend, aufgetrennt und anschließend durch Elektroblothing auf eine Membran transferiert. Die so auf der Membran fixierten Proteine können jetzt einer immunhistochemischen Nachweisreaktion unterzogen werden, die für eine bestimmte Aminosäuresequenz spezifisch ist.

Für die vorliegende Arbeit wurde die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode) zum Nachweis der Proteine verwendet, welche von Cordell et al. (Cordell et al., 1984) erstmals beschrieben wurde. Bei dieser Färbemethode verwendet man einen löslichen Enzym / Anti-Enzym-Immunkomplex, in diesem Falle die Alkalische Phosphatase und die Anti-Alkalische Phosphatase. Um die Immunkomplexlösung herzustellen wird das Enzym im Überfluss zugegeben und mögliche Präzipitate entfernt. Diese auch als unmarkierte Antikörpermethode bezeichnete Methode läuft in aller Regel in drei Schritten ab. Ein unmarkierter Primärantikörper bindet an das Antigen, ein unmarkierter Sekundärantikörper bindet mit einem Fab-Fragment an den Primärantikörper, der APAAP-Komplex bindet das zweite Fab-Fragment und wird mit einer Substrat-Chromagenlösung angefärbt. Voraussetzung für die Verknüpfung durch den Sekundärantikörper, der auch Brückenantikörper genannt wird ist, dass der Enzym-Immun-Komplex und der Primärantikörper aus einer Spezies stammen. Der für diese Arbeit verwendete APAAP-

Komplex stammt aus der Maus, so dass, wenn es sich nicht um einen murinen Primärantikörper handelte, eine Mausifizierung notwendig wurde.

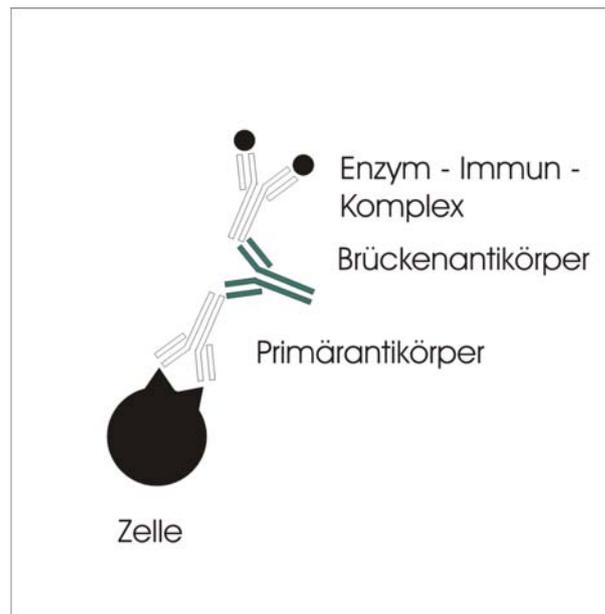


Abb. 5: Schematische Darstellung der APAAP-Methode

### 3.2.9.1 Proteinextraktion mittels Lämmli-puffer

Es wurde sowohl aus dem Nativmaterial, den tiefgefrorenen Plazentomen, als auch aus der Zellkultur mittels Lämmli-puffer das Gesamtprotein isoliert. Zur Isolierung direkt aus dem Plazentom wurden mit dem Gefriermikrotom sieben 12µm dicke Schnitte angefertigt, welche in ein gekühltes 1,5 ml Tube gegeben wurden. 250 µl Lämmli 1 (Sigma) wurden mit 5 µl Benzonase (10.000 U/vial) versetzt, auf Raumtemperatur gebracht und dem Probenmaterial zugefügt. Das Probengemisch wurde mittels eines Vortex kräftig durchmischt und 30 min bei RT auf einem Wipptisch geschwenkt. Anschließend wurden die Proteine im Wasserbad bei 65°C für 7 min denaturiert. Mit der Zellkultur wurde ähnlich verfahren. Zuerst wurde der Zellrasen mit Hanks' Puffer gespült, dann wurden 250 µl Lämmli 1 + 5 µl Benzoase (RT) hinzugegeben und die Schale 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Zellen lösten sich

während dieser Zeit vom Boden ab und konnten so mittels eines Zellschabers in 1,5 ml Tubes überführt werden. Auch dieses Probengemisch wurde 7 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die so entstandenen Lösungen wurden anschließend erneut kräftig durchmischt (Vortex) und bei 10-12.000 Rpm 2-5 min zentrifugiert. Die proteinhaltige Lösung wurde über dem Zelldetritus abpipettiert und bei -20°C bis zur Nutzung eingefroren.

### 3.2.9.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese bestimmt das Molekulargewicht des darzustellenden Proteins die Art des verwendeten Gels. Für diese Arbeit wurde mit dem NuPAGE Gelsystem von Invitrogen gearbeitet, wobei die sehr schweren Proteine mit Tris-Acetat-Gel 3-8 % und die etwas leichteren mit Bis-Tris-Gel 4-12 % aufgetrennt wurden.

#### 3.2.9.2.1 Probenvorbereitung

Die Proteinproben wurden langsam aufgetaut und kräftig durchmischt (Vortex). Zur Probenverdünnung wurden pro 10 µl Flüssigkeit folgende Substanzen verwendet (pro Spur benötigt man 14 µl Substanz). Die erste Zahl bezieht sich auf das Bis-Tris Gel, während die in Klammern aufgeführte Zahl das Vorgehen beim Tris-Acetat Gel beschreibt.

- 7,5 µl (6,5 µl) Proteinlösung
- 2,5 µl (2,5 µl) NuPAGE LDS Sample Buffer (4 x)
- 1 µl (0 µl) NuPAGE Reducing Agent (10 x)

Danach wurden die Proben 10 min bei 70°C im Wasserbad denaturiert und nach nochmaligem Vortexen direkt auf Eis gelegt.

#### 3.2.9.2.2 Proteinmarker

Entsprechend der zu erwartenden Proteingewichte wurden bei der Elektrophorese folgende Marker mitlaufen gelassen. Während derpeq GOLD Protein-Marker IV (Prestained bis 160 kDa) zuvor derselben Prozedur zugeführt wurde wie die Proteinproben, wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard (BIO-RAD) (Prestained bis 250 kDa) lediglich aufgetaut und in die Spur gefüllt. Der Genauigkeit halber wurde auch der HiMark™ Unstained High Molecular Weight Protein Standard (Invitrogen) (bis 500 kDa) mitlaufen gelassen, welcher ebenfalls keine Vorbehandlung benötigt.

### 3.2.9.2.3 Elektrophorese

Die Elektrophoreseapparatur von NuPAGE XCell SureLock™ wurde auf einen festen Untergrund gestellt und die ausgesuchten Gele fest eingespannt. Danach wurde der entsprechende Laufpuffer auf die gewünschte Konzentration gebracht. Für die Bis-Tris Gele wurde 50 ml 20 x MOPS SDS Running Buffer mit 950 ml Aqua dest. verdünnt, für die Tris-Acetat Gele wurde dieselbe Verdünnung mit 20 x NuPAGE Tris-Acetate SDS Running Buffer hergestellt. Jeweils 200 ml der Laufpufferlösungen wurden mit 500 µl NuPAGE Antioxidant versetzt, um danach in die innere Kammer gefüllt zu werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Kamm des eingespannten Gels soweit mit Laufpuffer bedeckt war, dass beim Ziehen des Kammes keine Luft in die Probenkammer eindrang. Die äußere Kammer wurde mit der restlichen Lösung aufgefüllt. Die Kämmen wurden vorsichtig herausgezogen und pro Spur 14 µl Proteinprobengemisch eingefüllt.

Durch das Aufsetzen des Apparaturdeckels wurden die Elektroden automatisch mit dem Stromgeber (Biometra Standard PowerPac P25) verbunden und die Elektrophorese bei 200 V konstant (Bis-Tris Gele) und 150 V konstant (Tris-Acetat Gele) durchgeführt. Wenn anhand der Markerbande ersichtlich war, dass die gesuchte Proteinbande ungefähr bis zur Mitte des Gels gelaufen sein musste, wurde die Stromzufuhr unterbrochen und die Elektrophorese damit beendet.

### 3.2.9.3 Elektroblotting

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine unmittelbar auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde ein Semi-Dry-Verfahren verwendet, für das wiederum die Invitrogen Apparatur, (XCell II™ Blot Module) inklusive vorgefertigter Filterpapiere, Sponge Pads und Membranen benutzt wurde. Für den Transferpuffer wurde zwischen der Proteinübertragung von nur einem Gel oder der von zwei Gelen unterschieden. Bei nur einem Gel wurden auf 850 ml Aqua dest. 50 ml 20 X NuPAGE Transfer Buffer und 100 ml Methanol gegeben, für zwei Gele wurden 750 ml Aqua dest. 50 ml Transfer Buffer und 200 ml Methanol gemischt. Für die sehr schweren Proteine, wie zum Beispiel Talin, wurde nur die halbe Menge Methanol verwendet. Bei allen möglichen Varianten wurde 1 ml Antioxidanz hinzugegeben.

In 700 ml des so entstandenen Blotting Puffers wurden die Sponge Pads eingelegt, so dass sie sich mit dem Puffer voll saugen konnten, während die Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membranen erst kurz vor der Verwendung in den Puffer getaucht wurden. Anschließend

wurde die Blottingkammer wie folgt gefüllt:

=====	Sponge Pad
=====	Sponge Pad
-----	Filter
_____	Membran
.....	Gel
-----	Filter
=====	Sponge Pad
-----	Filter
_____	Membran
.....	Gel
-----	Filter
=====	Sponge Pad
=====	Sponge Pad

Es musste beim Auflegen der Gele und Membranen darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen, denn an diese verhindern eine Übertragung der Proteine auf die Membran.

Die Blottingkammer wurde geschlossen, aufrecht in die NuPAGE Apparatur gestellt und bis zu den Schrauben mit Blotting Puffer gefüllt. Die so entstandene äußere Kammer wurde als Hitzeschutz zu drei Vierteln mit Aqua dest. gefüllt. Das Stromgerät wurde mit 30 V konstant angeschlossen, die Blotzeit variierte allerdings abhängig von der Größe des gewünschten Proteins stark (50 min bis 2,5 h).

### 3.2.9.4 Nachweisreaktion (Immunchemie)

#### 1. Tag

Um unspezifische Reaktionen so weit wie möglich auszuschließen wurde die Membran direkt nach dem Blotten für ca. 60 min in 5 % igem Milchpulver in 1 x PBS (pH 7,4) auf dem Schwenktisch geblockt. Beim dem polyklonalen  $\beta_1$ -Antikörper wurde die Membran über Nacht geblockt. Das Milchpulver wurde durch kurzes Spülen in Tris Puffer entfernt und der Primärantikörper jeweils in 3 ml Tris-Puffer verdünnt auf die Membran gegeben (siehe Tabelle 3).

Die Inkubation fand luftdicht abgeschlossen über Nacht auf dem Wipptisch statt. Die Gele

wurden gleichzeitig mit Brilliantblau gefärbt, um bei späterer Entfärbung mit Comassie Destain (über Nacht) beurteilen zu können, ob die Proteine beim Blotvorgang gut auf die Membran übergetreten sind. Die Bahnen des ungefärbten Markers wurden ebenfalls mit Brilliantblau angefärbt, jedoch lediglich 5 min lang und konnten nach der Entfärbung mit Comassie Destain (über Nacht) mit denen der gefärbten Marker verglichen werden. Dadurch wurde die Genauigkeit der Aussagen über das Molekulargewicht der Bande geprüft.

## 2. Tag

Für das Sichtbarmachen der Banden wurde die APAAP Methode in folgenden Schritten vollzogen:

- Mausifizieren (aller Antikörper, die nicht aus der Maus stammen)
  - 3 x 5 min in Tris-Puffer waschen
  - 45 min in 3 ml 1:500 Maus gegen Kaninchen
- Brückenantikörper
  - 3 x 5 min in Tris-Puffer waschen
  - 45 min in 3 ml 1:500 Kaninchen gegen Maus
- APAAP
  - 3 x 5 min in Tris-Puffer waschen
  - 45 min in 3 ml 1:500 APAAP
- Färben
  - 3 x 5 min in Tris-Puffer waschen
- Visualisieren
  - mit BCIP/NBT- (Brom-Chlor-Indolylphosphat/Nitroblautetrazolium) unter dem Abzug. Der Farbstoff wurde so lange auf der Membran gelassen, bis die Banden gut sichtbar waren, aber sich die Membran selber noch nicht verfärbt hatte.
  - 5 min in Aqua dest. waschen
  - Über Nacht im Wärmeschrank trocknen

### 3.2.10 Proteinnachweis mittels Immunhistochemie (IHC)

Für einige ausgewählte Antikörper sollte die in der IF identifizierte Lokalisation am Gefrierschnitt in der IHC bestätigt werden. Auch bei der Immunhistochemie werden mittels einer Antigen-Antikörperreaktion Proteinlokalisationen bestimmt. Im Gegensatz zur IF wird hier jedoch nicht mit einem an Fluoreszenzfarbstoffe konjugiertem Sekundärantikörper gearbeitet sondern der Antigen-Antikörperkomplex durch eine Enzymreaktion visualisiert. In

dieser Studie wurde dafür die Avidin-Biotin-Methode verwendet.

Die ABC (Avidin-Biotin Komplex) Methode, erstmals von Hsu et al. (Hsu et al., 1981) beschrieben, beruht auf der hohen Affinität von Avidin (bzw. Streptavidin) zu Biotin. Der Primärantikörper wird mit einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden, an welchen auf Grund der erwähnten hohen Affinität zu Biotin ( $K_m=10\text{-}15\text{M}$ ) ein Peroxidase konjugierter (Strept) Avidin-Biotin-Enzymkomplex bindet. Mittels Substrat-Chromogenlösung kann nun die Lokalisation der Peroxidase visualisiert werden. Da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin aufweist und sich somit vier Biotinmoleküle an das Avidin anlagern können, kommt es durch die ABC-Methode zu einer Signalverstärkung.

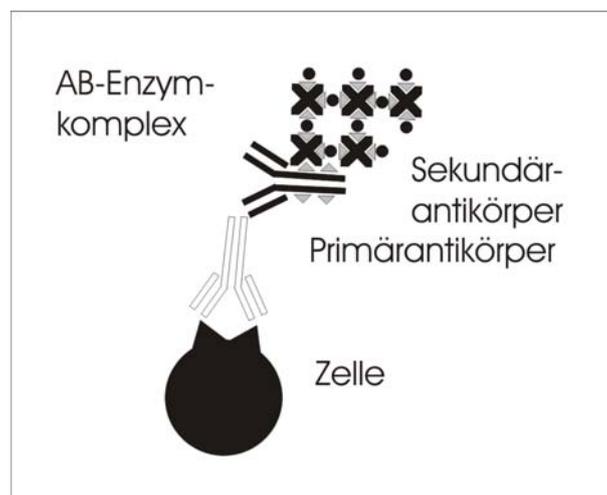


Abb. 6: Schematische Darstellung der ABC-Methode

### 3.2.10.1 Entparaffinieren und Entwässern der Paraffinschnitte

- 1 x 5 min in Xylol bei 60°C
- 2 x 5 min in Xylol bei RT
- 5 min in abs. Ethanol
- 5 min in 96% Ethanol
- 5 min in 80% Ethanol
- 5 min in 70% Ethanol
- 5 min in Aqua dest.
- 5 min in PBS spülen

### 3.2.10.2 Freilegen und Blocken des Epitops

- 20 min kochen in Zitratpuffer (pH 6,0)
- 3 x 5 min in PBS spülen
- Objektträger abtrocknen
- Schnitte mit PapPen umranden
- Jeweils 100µl 5 %iges Pferdeserum in Blockpuffer auf die Schnitte geben
- 3 x 5 min in PBS spülen

### 3.2.10.3 Primärantikörper

- Während der Inkubationszeit Antikörperverdünnung mit PBS herstellen
 

$\alpha$ -Aktinin	1:200
$\beta_1$ -Integrin (polyklonal)	1:100
$\beta_1$ -Integrin (monoklonal)	1:100
FAK	1:100
Phosphotyrosin	1:50
Talin	1:400
- Jeweils 100µl Primärantikörper auf die Schnitte pipettieren
- Über Nacht in feuchter Kammer bei 4°C inkubieren

#### 3.2.10.4 Sekundärantikörper

- 3 x 5 min in PBS spülen
- In der Zwischenzeit Biotin-Universal-Antikörper 1:100 in PBS verdünnen
- Jeweils 100µl Biotin-Universal-Antikörper auf die Schnitte pipettieren
- 45 min in feuchter Kammer bei RT inkubieren

#### 3.2.10.5 Färbung

- Während der Inkubationszeit ABC-Komplex ansetzen
- 3 x 5 min in PBS spülen
- Jeweils einige Tropfen ABC-Komplex auf die Präparate geben
- 45 min in feuchter Kammer bei RT inkubieren
- 3 x 5 min in PBS spülen
- Jeweils einige Tropfen AEC-Lösung auf die Präparate geben
- Unter ständiger Beobachtung 1-30 min in feuchter Kammer bei RT inkubieren
- Bei erwünschter Färbung in Aqua bidest. spülen
- 10 sec mit Hämatoxylin gegenfärben
- Kurz spülen mit Aqua bidest.

#### 3.2.10.6 Eindecken

- Kaisers Glycingelatine in Mikrowelle erwärmen, bis es flüssig ist
- Jeweils einen Tropfen Glycerin auf die Schnitte geben
- Deckgläschen auf die Schnitte legen und mit Bleistückchen beschweren, bis das Glycerin festgeworden ist
- Bei Raumtemperatur lagern und unter dem Lichtmikroskop beurteilen

#### 3.2.10.7 Lichtmikroskopische Auswertung der Immunhistochemie

Zur Analyse der Immunhistochemiepräparate wurde das Axiophot Photomikroskop von Zeiss benutzt. Für die Bilddokumentation wurde mit einer Sensitiv Farb-Digitalkamera CC-12 (Soft Imaging Systems, D-Münster) und einer entsprechenden Software (Analysis<sup>®</sup> 3.1, Soft Imaging Systems, D-Münster) gearbeitet.

### 3.2.11 Wachstumsvergleiche der Zellkultur auf verschiedenen Matrices

Um Unterschiede in der Proliferationsrate bzw. in der Expression Zytoskelett-assoziiierter Moleküle erkennen zu können, wurde die Epithelzellkultur auf verschiedenen Matrices, Fibronektin (FN), Laminin (Lam), Kollagen IV (Koll) und auf einem Kontrollboden ohne Beschichtung ausgesät. Zuvor wurden, wie auch schon bei den Versuchen ohne Beschichtungen, in jedes Well Deckgläschen gelegt.

Nach fünf Tagen Wachstum wurde dann mittels Immunfluoreszenz die jeweilige Zellzahl miteinander verglichen. Auf dieselbe Art wurden die Versuche für die Ausprägung der fokalen Adhäsionskomplexe miteinander verglichen.

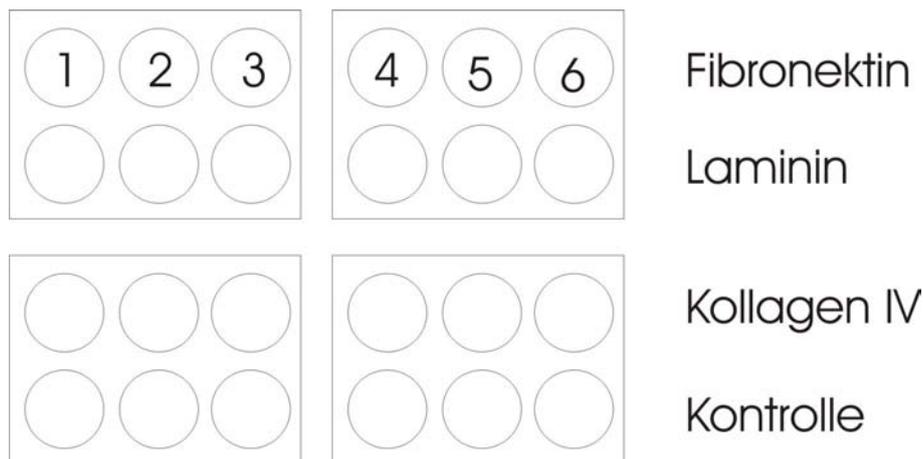


Abb. 7: Beschichtung der 6-Well

#### 3.2.11.1 Beschichtung mit FN

Mittels einer sterilen Pipette wurden unter der Sterilbank 9900  $\mu\text{l}$  Hanks<sup>-</sup> und 100  $\mu\text{l}$  FN-Lösung 0,1 % in ein 10 ml Falconröhrchen pipettiert und durch sanftes Schwenken vermischt. In jedes Well, welches mit FN beschichtet werden sollte, wurden nun 1,5 ml dieser Lösung gegeben und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die verbleibende Flüssigkeit abgezogen und verworfen.

### 3.2.11.2 Beschichtung mit Lam

In einem ersten Schritt musste die Laminin-Lösung 0,05 % langsam aufgetaut werden, so dass es nicht schon vor der Beschichtung zur Gelbildung kommen konnte, daraufhin wurde mittels einer sterilen Pipette unter der Sterilbank 9800  $\mu$ l Hanks<sup>-</sup> und 200  $\mu$ l Laminin-Lösung in ein 10 ml Falconröhrchen pipettiert und durch sanftes Schwenken vermischt. In jedes Well, welches mit Laminin beschichtet werden sollte, wurden nun 1,5 ml dieser Lösung gegeben und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die verbleibende Flüssigkeit abgezogen und verworfen.

### 3.2.11.3 Beschichtung mit Koll

Mittels einer sterilen Pipette wurden unter der Sterilbank 9800  $\mu$ l Hanks- und 200  $\mu$ l Kollagen-Lösung 0,05 % in ein 10 ml Falconröhrchen pipettiert und durch sanftes Schwenken vermischt. In jedes Well, welches mit FN beschichtet werden sollte, wurden nun 1,5 ml dieser Lösung gegeben und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die verbleibende Flüssigkeit abgezogen und verworfen.

### 3.2.11.4 Aussaat der Epithelzellen

Es wurden Zellen gemäß Punkt 1.2.3 ausgesät, allerdings wurden die einzelnen Zellproben miteinander vermischt, so dass in jeweils zwei 6-Wellplatten (Nr. 1 und 3 sowie Nr. 2 und 4) pro Well dieselben Kulturmischungen ausgesät wurden. In einem Versuch wurden die Proben so gemischt, dass in alle vier 6-Wells dieselbe Zellmischung gegeben wurde. Auf diese Art konnte ohne vorhergegangene Zellzählung davon ausgegangen werden, dass in den entsprechenden Wells dieselbe Anzahl Zellen ausgesät wurde. Dadurch wurde eine Quantifizierung des Ergebnisses ermöglicht. Nach fünf Tagen Wachstum wurden die Zellen einer Immunfluoreszenz gegen die Integrinuntereinheit  $\beta_1$ ,  $\alpha$ -Aktinin, PT und Talin unterzogen (s.o.), mit Vectashield (mit DAPI) eingedeckelt (s.o.) und innerhalb der nächsten vier bis fünf Tage mittels Fluoreszenzmikroskop abfotografiert.

### 3.2.11.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden von jedem Objektträger zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder in der 20-iger Vergrößerung in der Kernfärbung fotografiert und die Kerne mit dem computergestützten Bildanalyzesystem „Analysis“ ausgezählt. Es war notwendig mehrere Gesichtsfelder auszuzählen, da nach einer Wachstumsphase von fünf Tagen nicht zwingend eine Konfluenz erreicht wurde und deshalb auch Bereiche ohne Zellrasen fotografiert wurden. Um diesen Fehler auszugleichen wurden die Zahlenwerte der zehn Gesichtsfelder addiert und als ein Wert für das jeweilige Präparat der Statistik zugeführt. Weil nur Proben ausgewertet werden, auf denen keine fibroblastoiden Zellkolonien gewachsen waren, ergab sich eine Versuchszahl mit  $n=6$  mit zweimal 3, einmal 1, einmal 6 und zweimal 2 Versuchsansätzen.

### 3.2.11.6 Statistische Auswertung der Proliferation

Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Statistical Analysis System (SAS® Institute Inc. Cary, N.C, USA, Release 8.2).

Für die Versuchsergebnisse der Zellproliferation wurde eine Varianzanalyse (GLM-Prozedure) durchgeführt, in der die Beschichtung und die in 3.2.11.4 beschriebene Zellkulturmischung als feste Faktoren eingegangen sind. Die Prüfstatistik der klassischen Varianzanalysen setzt ein balanciertes Versuchsdesign voraus; da sich in der vorliegenden Arbeit eine unbalancierte Zellenbesetzung ergab, wurden Mittelwerte und Unterschiede in der SAS-Routine über Minimalisierung der Abweichungsquadrate bei linearem Modell (Least Square Mean Estimates) geschätzt und bewertet. (Paarweise Vergleiche - etwa mit dem t-Test - scheiden aus, weil sie unweigerlich zu einer Inflation der Irrtumswahrscheinlichkeit führen würden).

Der Fehler erster Art wurde auf 5% festgelegt worden, wobei nur vorab geplante Vergleiche bewertet werden sollten. Detaillierte Angaben zum SAS-Analyseergebnis finden sich als Originalausdruck im Anhang.

### 3.2.11.7 Bestimmung der Expressionsstärke der Signalmoleküle

Um die Expressionsstärke der Signalmoleküle auf den verschiedenen Beschichtungen zu beurteilen, wurde jede Immunfluoreszenzprobe an 5 Stellen mit derselben Belichtungszeit fotografiert. Weil diese Stellen aufgrund von Unterschieden im Zellwachstum nicht beliebig gewählt werden konnten, wurden aus den fünf Fotografien drei beliebige ausgewählt und diese jeweils in ihrer Intensität mit den Bildern der anderen Signalmoleküle verglichen. Da es sich hierbei um eine rein qualitative Beurteilung handelte, wurde keine statistische Auswertung vorgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeines zur Beurteilung der Farbintensität bei Präparaten der Immunhistochemie und -fluoreszenz

Die Ergebnisse wurden hauptsächlich qualitativ beurteilt, da die Intensität der Fluoreszenz, beziehungsweise der rotbraunen Anfärbung bei der Immunhistochemie bei unterschiedlichem Ausgangsmaterial und unterschiedlichen Versuchen leichte Abweichungen aufwies. Das Verteilungsmuster der Färbung hingegen zeigte keine Varianz. Daher wurde bei den Vergleichsversuchen mit unterschiedlicher Beschichtung dasselbe Ausgangsmaterial auf unterschiedlichen Matrices in einem Versuch ausgewertet. Zur Vereinheitlichung wurden die einzelnen Intensitäten in Kategorien eingeteilt, die sowohl für die Kryostatschnitte und die Zellkulturpräparate der Immunfluoreszenz als auch für die immunhistochemischen Präparate verwendet wurden:

- +++ → starke Immunreaktion
- ++ → mittlere Immunreaktion
- + → schwache Immunreaktion
- +/- → schwache, örtlich begrenzte Immunreaktion
- → keine Immunreaktion

In den Abbildungen werden die Gewebeanteile wie folgt abgekürzt:

fetale Zotte (Z); maternales Stroma (MS), maternales Epithel (ME), fetales Mesenchym (FS)  
Trophoblast (T) und Trophoblastriesenzelle (TGC)

## **4.2 Charakterisierung der kultivierten Zellen mittels Lokalisation zytoskelettaler Filamente und extrazellulärer Matrix**

Zur Zelldifferenzierung und Demonstration der Repräsentanz der tiefgefrorenen Zellen wurde die Lokalisation zytoskelettaler Filamente und Fibronectin sowohl in den tiefgefrorenen als auch in den nativen Zellen untersucht. In der Zellkultur finden sich fast ausschließlich maternale Karunkelepithelzellen, welche anhand der Expression von Zytokeratin eindeutig identifiziert werden. Die durch Zytokeratin markierten Keratinfilamente sind gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, allerdings zeichnet sich direkt um den Kern eine leichte Anhäufung ab (Abb. 8). Innerhalb der Epithelzellkolonien wird entlang der Zell-zu-Zell Kontakte Fibronectin exprimiert (Abb. 10). Eine besonders intensive Fluoreszenz wird an den Kontaktpunkten von zwei oder mehr Zellen beobachtet

Die vereinzelt vorhandenen fibroblastoiden Zellen stromalen Ursprungs hingegen zeigen positive Reaktionen auf  $\alpha$ -smooth muscle Aktin, Desmin und Vimentin. Die Aktinfilamente zeigen einen gerichteten Verlauf, die dicken Bündel lassen ein gitterartiges Bild erscheinen (Abb. 11). Nicht alle fibroblastoiden Zellen weisen eine Immunfluoreszenzreaktion für Desmin auf, bei den positiven Zellen jedoch zeigt sich ein sehr starkes Signal in den Zellausläufern (Abb. 12). Vimentin zeigt einen faserartigen Verlauf innerhalb der Zellen und ebenfalls eine starke Reaktion an den Zellausläufern (Abb. 9). Auch die Epithelzellen zeigen eine schwache Vimentinfluoreszenz.

In den Vergleichsversuchen zwischen natürlichen und tiefgefrorenen Zellen stellten sich keine Veränderungen in der Expression der Zytoskelettbestandteile und des Fibronectins dar.

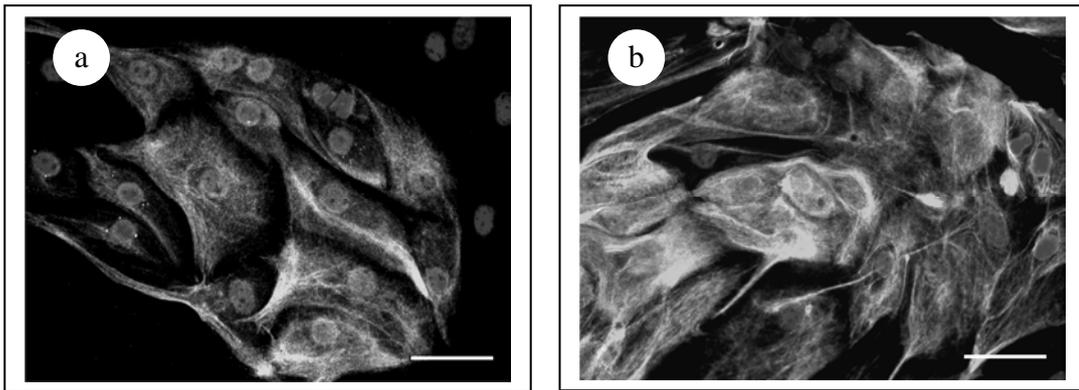


Abb. 8. Zytokeratinexpression im Epithelzellverband, Kerne durch Dapi-Färbung sichtbar. a. natürlich und b. tiefgefroren. Bar 50 $\mu$ m.

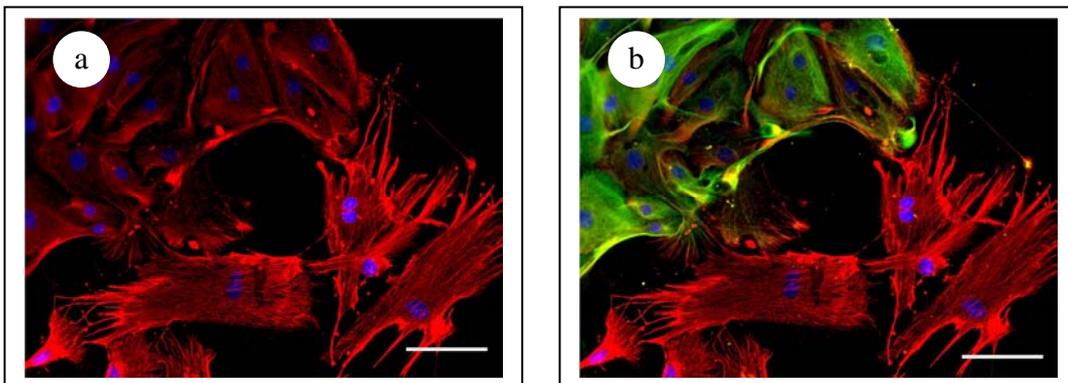


Abb. 9. Identischer Ausschnitt des Randes einer Epithelzellkolonie (oben links) und einzelnen fibroblastoiden Zellen (unten rechts). a. Beide Zellarten zeigen Vimentinfluoreszenz, jedoch die Epithelzellen um einiges schwächer. b. Mittels Doppelmarkierung mit Vimentin (rot) und Zytokeratin (grün) lassen sich die Epithelzellen eindeutig identifizieren. Blau, mit Dapi gefärbte Zellkerne. Bar 50 $\mu$ m.

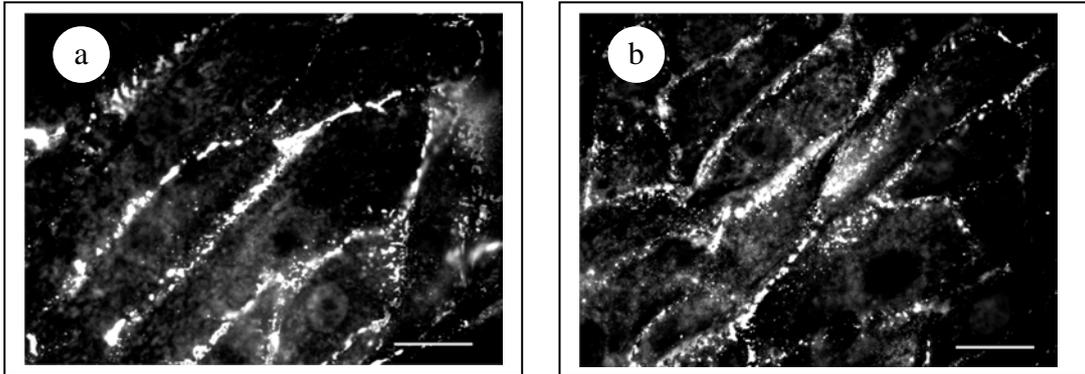


Abb. 10. Expression von Fibronectin entlang der Zellgrenzen im Epithelzellverband. a. natürlich und b. tiefgefroren. Bar 50 $\mu$ m.

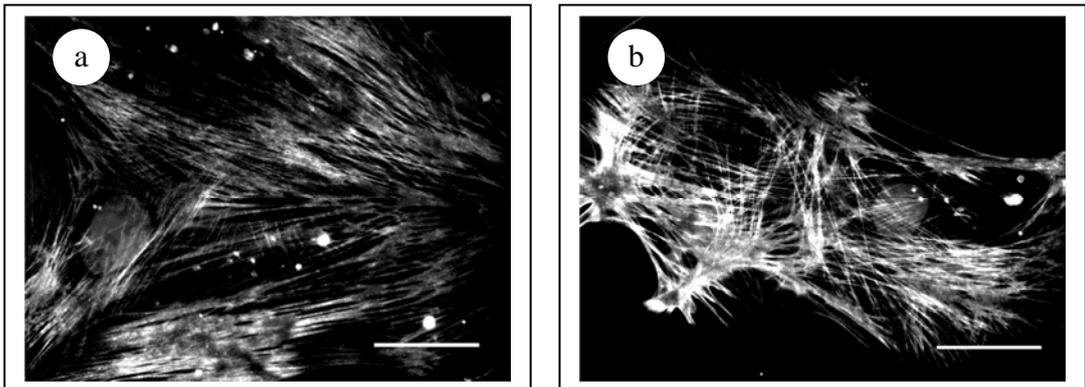


Abb. 11.  $\alpha$ -sm Aktin Fluoreszenz fibroblastoider Zellen, Kerne durch Dapi-Färbung sichtbar. a. natürlich und b. tiefgefroren. Bar 25 $\mu$ m.

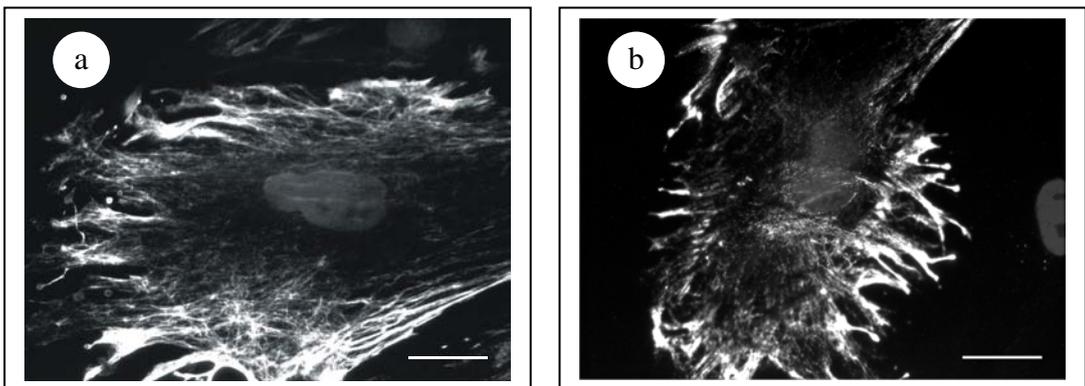


Abb. 12. Desminmarkierung in fibroblastoiden Zellen, Kerne durch Dapi-Färbung sichtbar. a. natürlich und b. tiefgefroren. Bar 25 $\mu$ m.

### 4.3 Lokalisation der zytoskelettassoziierten Signalmoleküle und der $\beta_1$ -Integrinuntereinheit mittels Immunfluoreszenz im Gefrierschnitt

#### 4.3.1 $\beta_1$ -Integrinuntereinheit

Das Verteilungsmuster der  $\beta_1$  Integrinuntereinheit (Abb. 13) zeigt keine größeren Veränderungen im Laufe der Gravidität. Das Signal der maternalen Epithelzellen zur Basalmembran hin ist so stark, dass die schwächeren Signale, zum Beispiel diejenigen im maternalen Stroma, mittels Immunfluoreszenz nur sehr schwer dargestellt werden können, da die stark fluoreszierenden Stellen sonst massiv überbelichtet werden. Im maternalen Stroma und fetalen Mesenchym zeigen die Endothelien der Gefäße eine schwache Reaktion. Die TGC und die fetalen Epithelzellen zeigen zur Basalmembran hin eine mittlere Reaktion.

Tabelle 5: Verteilungsmuster der  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit

$\beta_1$ Integrin	3. Mo	4. Mo	5. Mo	6. Mo	7. Mo	9. Mo
Maternales Stroma	+	+	+	+	+	+
Maternales Epithel basal	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Maternales Epithel interzellulär	+	+	+	+	+	+
Maternales Epithel apikal	-	-	-	-	-	-
Fetales Epithel	++	++	++	++	++	++
TGC	++	++	++	++	++	++
Fetales Stroma	+	+	+	+	+	+

Besonderheit: Eine maximale Reaktion gegen die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit wird entlang der Basalmembranen beobachtet.

### 4.3.2 $\alpha$ -Aktinin

$\alpha$ -Aktinin wird mittels Immunfluoreszenz in allen Zellen detektiert. Die Hauptlokalisierung jedoch sind in den Epithelzellen, sowohl der maternalen als auch der fetalen Gewebeanteile, sowie die TGC. Während das  $\alpha$ -Aktinin in den TGC in Form eines Saums entlang der Zellmembran angeordnet ist, ist es auffällig, dass das Signal der Epithelzellen nicht in Richtung Basalmembran orientiert ist, sondern hauptsächlich apikal und im apikalen Bereich zwischen den Epithelzellen vorkommt. Das Stroma der beiden Kompartimente ist schwach positiv (Abb. 14).

Tabelle 6: Verteilungsmuster von  $\alpha$ -Aktinin

$\alpha$ -Aktinin	3. Mo	4. Mo	5. Mo	6. Mo	7. Mo	9. Mo
Maternales Stroma	+	+	+	+	+	+
Maternales Epithel basal	-	-	-	-	-	-
Maternales Epithel interzellulär	++	++	++	++	++	++
Maternales Epithel apikal	+	+	+	+	+	+
Fetales Epithel	++	++	++	++	++	++
TGC	++	++	++	++	++	++
Fetales Stroma	+	+	+	+	+	+

### 4.3.3 Fokale Adhäsionskinase (FAK)

Im dritten Trächtigkeitsmonat findet man weder im maternalen noch im fetalen Gewebe Signale der FAK. Lediglich die TGC zeigen eine im Zytoplasma lokalisierte Immunfluoreszenz (Abb. 15). Im Verlauf der Trächtigkeit verändert sich dieses Bild. Während die fetalen Anteile weiterhin signalfrei bleiben, kommt es im maternalen Anteil in sämtlichen Zellpopulationen zu einer Immunfluoreszenzreaktion. Ab dem 4. Monat ist das maternale Stroma leicht fluoreszierend und es zeigt sich ein schwaches Signal an der basalen Seite der Epithelzellen. Die basale Reaktion nimmt im Laufe der Gravidität zu und ist im 5. Monat zu einer mittleren Reaktion herangereift. Zur dieser Zeit zeigt auch die apikale Seite sowie die interzellulären Bereiche der Epithelzellen ein schwaches Signal. Auffällig ist, dass die reifen TGC im Gegensatz zu den jüngeren, unreifen, welche weiterhin eine zytoplasmatische Reaktion aufweisen, ein ringförmiges Signal entlang der Zellmembran zeigen. Die großen Zellkerne bleiben vom Signal ausgespart (Abb. 16).

Tabelle 7: Verteilungsmuster von FAK

FAK	3. Mo	4. Mo	5. Mo	6. Mo	7. Mo	9. Mo
Maternales Stroma	-	+	+	+	+	+
Maternales Epithel basal	-	+	++	++	++	++
Maternales Epithel interzellulär	-	-	+	+	+	+
Maternales Epithel apikal	-	-	+	+	+	+
Fetales Epithel	-	-	-	-	-	-
TGC	++	+++	+++	+++	+++	+++
Fetales Stroma	-	-	-	-	-	-

Besonderheit: Die unreifen TGC zeigten die Immunfluoreszenzsignale hauptsächlich im Zytoplasma, während in den reiferen Zellen ein membranassoziiertes Signal detektiert wurde (siehe Abb. 16).

#### 4.3.4 Phosphotyrosin (PT)

Das Verteilungsmuster von PT stellt sich über die gesamte Trächtigkeit unverändert dar. Das Hauptsignal liegt in den TGC, es handelt sich um eine sehr starke zytoplasmatische Reaktion, die in den TGC aller Reifestadien vorzufinden ist. Während sich der Rest des Trophoblasten reaktionsfrei darstellt, finden sich schwache Signale sowohl im maternalen Epithel, vor allem in Richtung der Basalmembran, als auch im maternalen Stroma, dort hauptsächlich in Gefäßendothelien (Abb. 17).

Tabelle 8: Verteilungsmuster von PT

PT	3. Mo	4. Mo	5. Mo	6. Mo	7. Mo	9. Mo
Maternales Stroma	+	+	+	+	+	+
Maternales Epithel basal	+	+	+	+	+	+
Maternales Epithel interzellulär	-	-	-	-	-	-
Maternales Epithel apikal	-	-	-	-	-	-
Fetales Epithel	-	-	-	-	-	-
TGC	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Fetales Stroma	-	-	-	-	-	-

### 4.3.5 Talin

Das Verteilungsmuster der Talinexpression stellt sich, mit Ausnahme der TGC, durch die gesamte Trächtigkeit hindurch relativ einheitlich dar. Das maternale Gewebe zeigt eine mittlere Reaktion und die Epithelzellen grenzen sich deutlich vom umliegenden Gewebe ab, da vor Allem die Zellgrenzen stark fluoreszieren. Entlang der Basalmembran findet sich das stärkste Signal. Im Stroma finden sich einige sehr starke Reaktionen, welche Gefäßwänden zugeordnet werden können (Abb. 18).

Die verschiedenen Zellpopulationen des Trophoblasten zeigen zu Beginn der Trächtigkeit einheitlich ein schwaches Signal, ab dem 6. Monat jedoch steigert sich das Signal in den TGC und auch die Kontaktstellen zwischen den einwandernden Riesenzellen und dem maternalen Epithel zeigen eine maximale Fluoreszenzreaktion (Abb. 19).

Tabelle 9: Verteilungsmuster von Talin

Talin	3. Mo	4. Mo	5. Mo	6. Mo	7. Mo	9. Mo
Maternales Stroma	+(+)	++	++	++	++	++
Maternales Epithel basal	+++	+++	+++	+++	++	++
Maternales Epithel interzellulär	++	++	++	+	++	++
Maternales Epithel apikal	+(+)	+	++	++	++	++
Fetales Epithel	+	+	+	+	+	+
TGC	-	+	+	++	++	++
Fetales Stroma	+	+	+	+	+	+

Besonderheit: In der Nachbarschaft migrierender TGC ist die apikale Fluoreszenz im maternalen Epithel besonders stark.

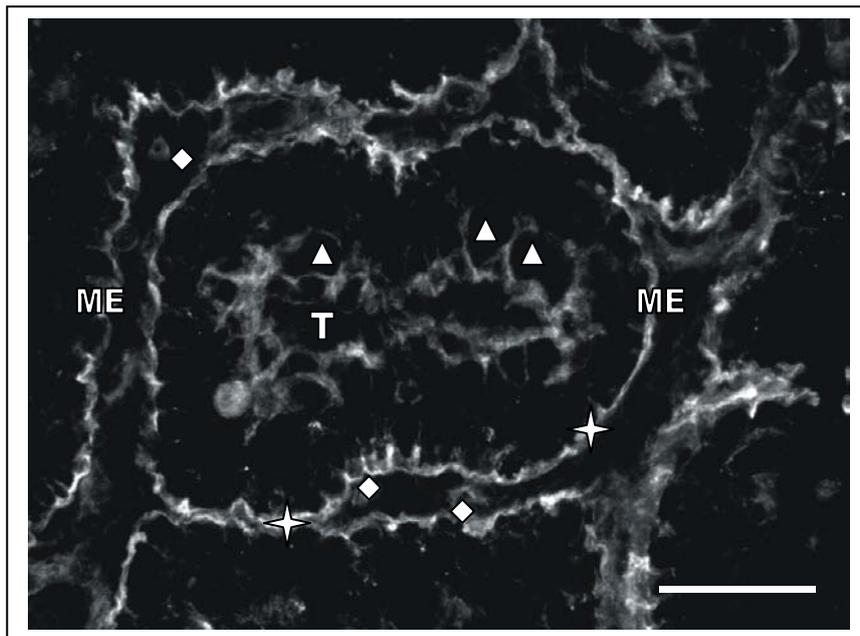


Abb. 13.  $\beta_1$ -Integrin, Gefrierschnitt, 7. Monat, Messbalken 50 $\mu$ m.  
Das maternale Epithel zeigt zur Basalmembran (Stern) hin ein maximales Signal.  
Die fetalen einkernigen Epithelzellen exprimieren die  $\beta_1$ -Untereinheit basalseitig,  
während die TGC (Dreieck) entlang der gesamten Zellmembran eine starke  
Reaktion zeigen. Weiterhin positiv sind fetale und maternale Endothelien (Raute).

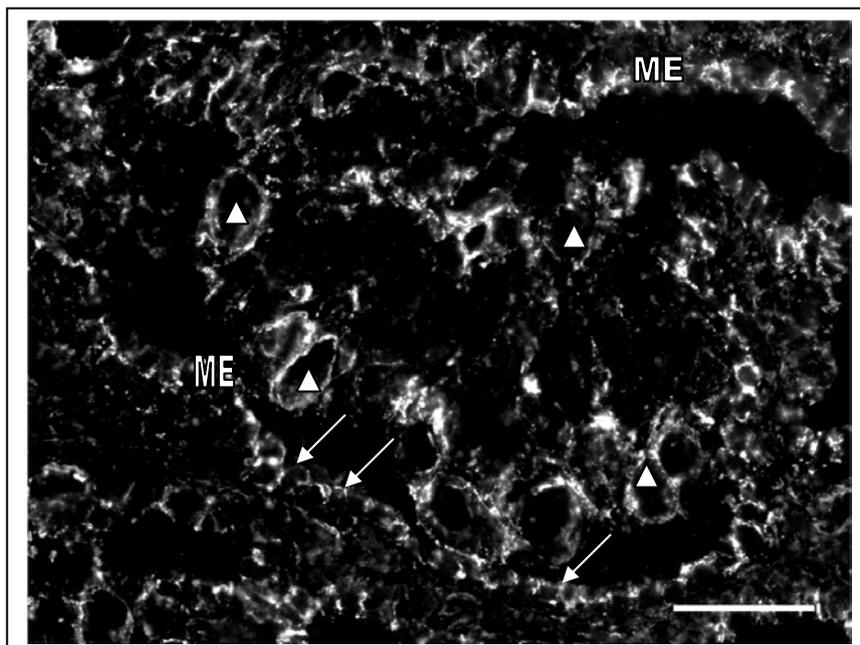


Abb. 14.  $\alpha$ -Aktinin, Gefrierschnitt, 4. Monat, Messbalken 50 $\mu$ m.  
 $\alpha$ -Aktinin kommt in fast allen Zellen vor. Im Gegensatz zu den polarisierten  
Epithelien, die hauptsächlich interzellulär und apikal ein Signal zeigen, erscheint  
bei den TGC (Dreieck) eine deutliche zellmembranständige Immunfluoreszenz.

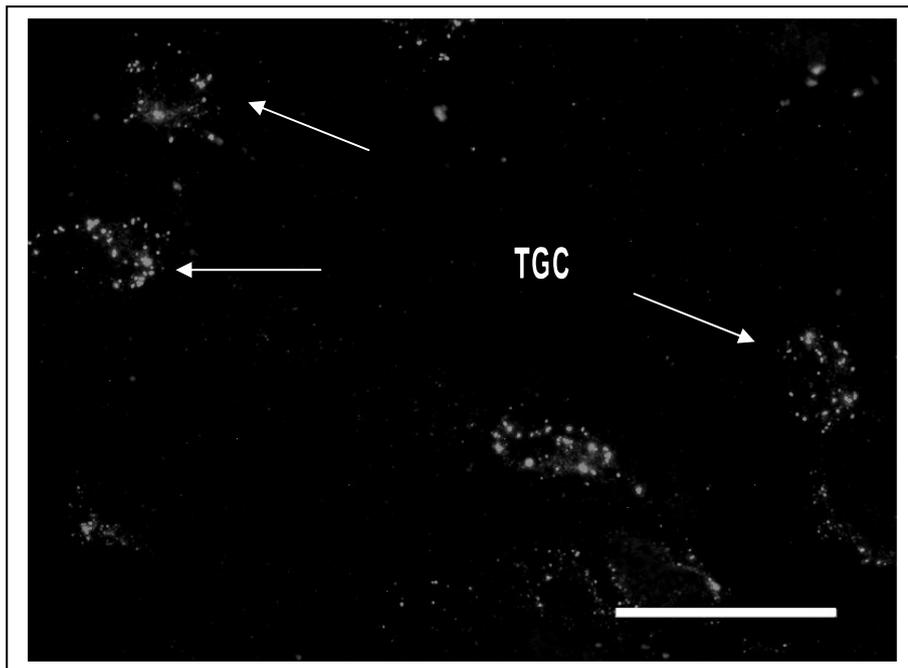


Abb. 15. FAK, Gefrierschnitt, 3. Monat, Messbalken 50 $\mu$ m.  
In der frühen Trächtigkeit zeigen nur TGC eine  
Immunfluoreszenzreaktion für FAK.

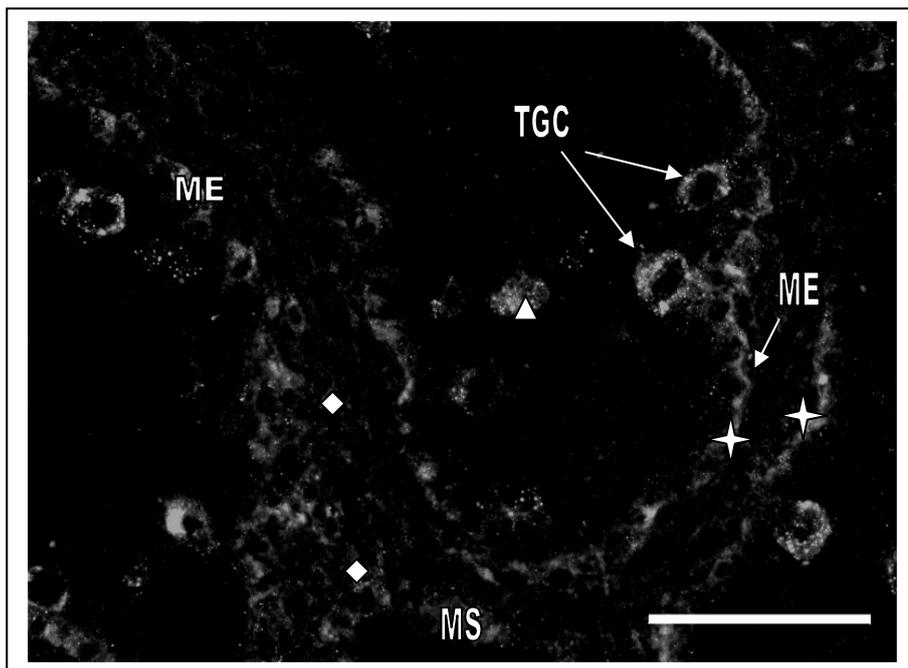


Abb. 16. FAK, Gefrierschnitt, 7. Monat, Messbalken 100 $\mu$ m.  
Das maternale Gewebe zeigt sowohl eine leichte Reaktion in den  
Endothelien des maternalen Stroma (Raute), als auch eine stärkere,  
vor allem entlang der Basalmembran (Stern) am Epithel. Die  
unreifen TGC zeigen eine zytoplasmatische Reaktion (Dreieck) bei  
den reiferen erscheint sie membranständig (siehe Pfeile).

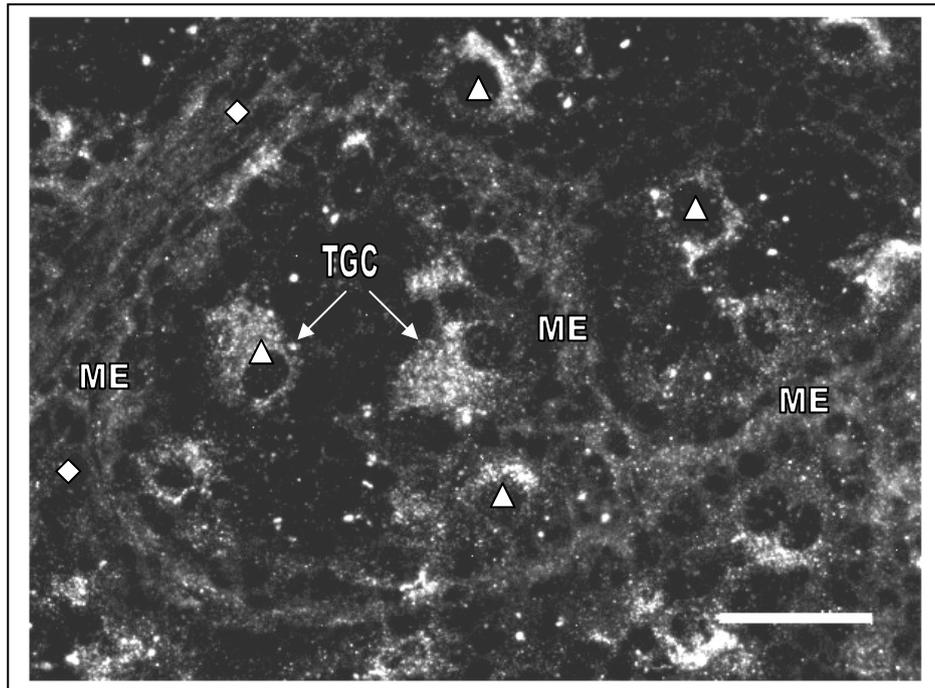


Abb. 17. PT, Gefrierschnitt, 5. Monat, Messbalken 50 $\mu$ m.  
TGC (Dreieck) zeigen eine starke zytoplasmatische Reaktion,  
während im maternalen Epithel und Endothel (Raute) der Gefäße des  
maternalen Stromas schwache Signale beobachtet werden.

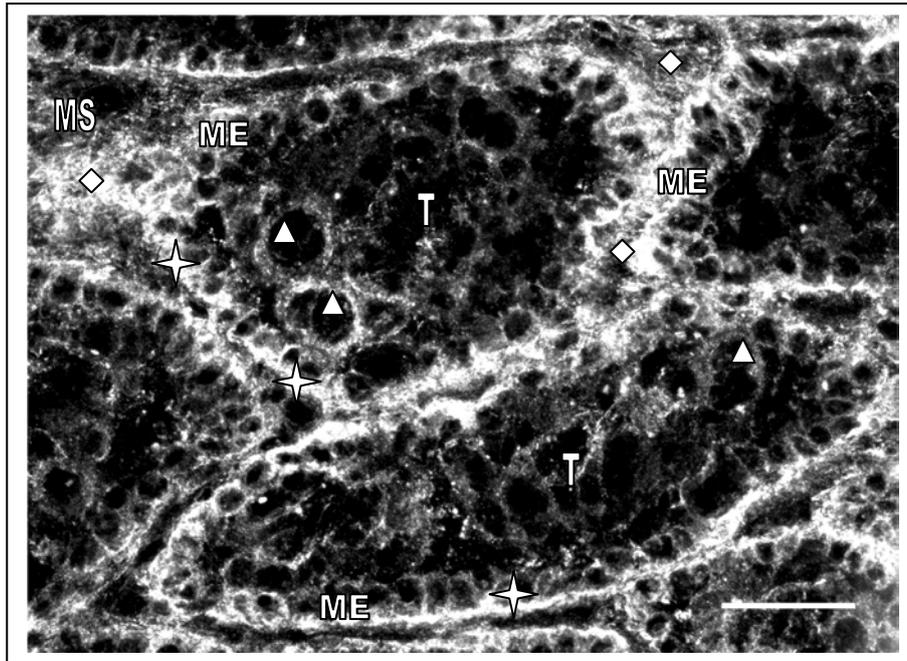


Abb. 18. Talin, Gefrierschnitt, 4. Monat, Messbalken 50µm.  
 Das maternale Epithel fluoresziert vor allem zur Basalmembran (Stern) hin stark und das maternale Stroma zeigt starke Signale in den Gefäßendothelien (Raute). Der Trophoblast ist mit Ausnahme der TGC (Dreieck) nur schwach angefärbt.

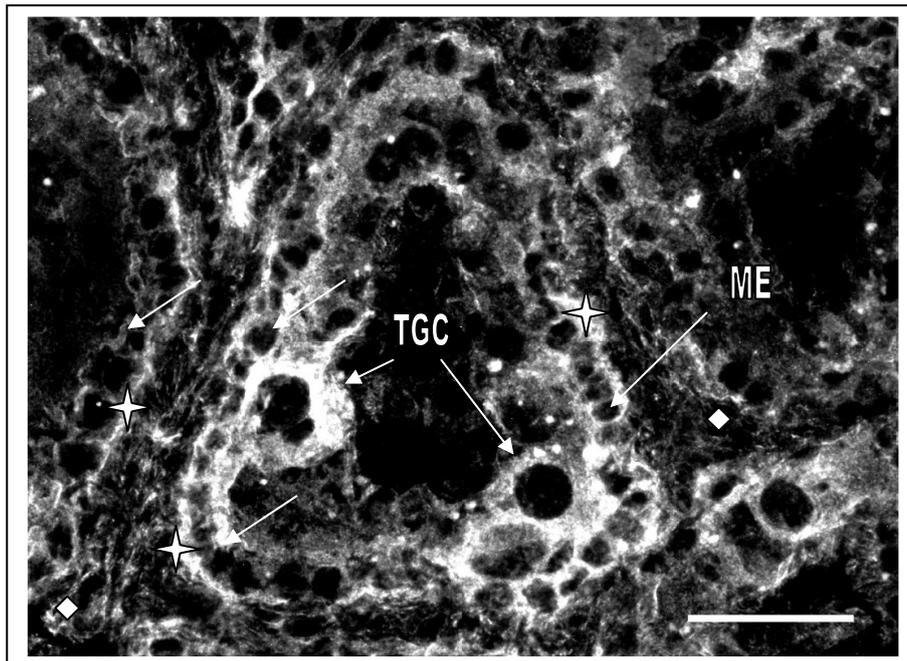


Abb. 19. Talin, Gefrierschnitt, 9. Monat, Messbalken 50µm.  
 Das maternale Epithel ist stark angefärbt, vor allem an der Basalmembran (Stern), aber auch apikal (siehe Pfeile). Das maternale Stroma zeigt starke Signale in den Gefäßendothelien (Raute). Der Trophoblast ist mit Ausnahme der TGC nur schwach angefärbt. Im Kontaktbereich zwischen maternalem Epithel und einwandernden TGC ist die Fluoreszenz besonders stark.

## **4.4 Lokalisation der zytoskelettassoziierten Signalmoleküle und der $\beta_1$ -Integrinuntereinheit mittels Immunfluoreszenz im Zellkulturpräparat**

### **4.4.1 $\beta_1$ -Integrin**

Jede untersuchte Epithelzelle zeigt ein starkes Signal entlang der Zellmembran, welches besonders im Zellverband zur Geltung kommt (Abb. 21). Fokussiert man auf den Objektträgerboden findet man dort in schwacher bis durchschnittlicher Signalstärke Reaktionen an den fokalen Adhäsionsstellen (Abb. 20). Allerdings sind diese, aufgrund der starken Membranfluoreszenz, schwer darzustellen und in später durchgeführten Doppelmarkierungen besser erkennbar (Abb. 34, Abb. 37).

### **4.4.2 $\alpha$ -Aktinin**

Auch das  $\alpha$ -Aktinin findet sich an den Zell-zu-Zell Kontakten im Zellverband der Epithelzellen (Abb. 22). Im Gegensatz zum  $\beta_1$ -Integrin jedoch gibt es nur an Zell-zu-Zell Kontakten ein Immunfluoreszenzsignal. Zellmembranen, welche am Rand der Kolonie liegen hingegen exprimieren kein  $\alpha$ -Aktinin. Allein auftretende Zellen wiederum aber zeigen die Reaktion an der kompletten Membran (Abb. 23).

### **4.4.3 FAK**

Das Hauptsignal von FAK zeigt sich an fokalen Adhäsionsstellen, die zum Boden der Probe zeigen (Abb. 24). Interessant ist das Verteilungsmuster in der Kolonie. Randständige Zellen, die an den Verband angeschlossen sind, zeigen keine Adhäsionsstellen an der von der Kolonie abgewandten Seite, was bei den Doppelmarkierungen mit Talin besonders gut zu erkennen ist. Einzelne Zellen jedoch, die noch nicht in den Verband integriert sind, zeigen diese Kontakte in alle Richtungen. Des Weiteren findet man ein schwaches Signal an den Zell-zu-Zell Kontakten im Zellrasen (Abb. 25).

#### 4.4.4 Phosphotyrosin

Phosphotyrosin zeigt fokussiert auf den Zellrasenboden dasselbe Verteilungsmuster wie Talin. Man findet die Fokalkontakte zum Boden innerhalb der Kolonie und Ausläufer am Rand einer Kolonie, dasselbe Bild bei den Einzelzellen und auch die Wellen am Rand des Zellrasens sind entsprechend (Abb. 27). Zusätzlich zeigt PT aber auch eine membranständige Reaktion an den Zell-zu-Zell Kontakten und an der Zellmembran an den Kolonierändern (Abb. 26).

#### 4.4.5 Talin

Die Immunreaktion gegen Talin scheint ausschließlich an den Fokalkontakten zum Zelluntergrund lokalisiert zu sein (Abb. 28). Es lässt sich keinerlei Membranreaktion zeigen. Die Signale an den Fokalkontakten jedoch zeigen im Unterschied zu FAK auch eine Anfärbung im Randbereich einer Kolonie.

Neben den einfachen Fokalkontakten zeigen sich bei der Immunfluoreszenz mit Talin entlang der Koloniegrenzen wellenförmige Ausläufer (Abb. 30). Einzelne Zellen zeigen das gleiche Verteilungsmuster wie bei FAK (Abb. 30).

Tabelle 10: Verteilungsmuster in der Zellkultur

Antikörper	Zellmembran		Fokale Adhäsionsstellen		Wellenförmige Bodenkontakte
	Innerhalb der Kolonie	Rand der Kolonie	Innerhalb der Kolonie	Rand der Kolonie	
$\beta_1$ Integrin	+++	+++	+(+)	-	-
$\alpha$ -Aktinin	++	-	-	-	-
FAK	+	+	++	-	-
PT	++	++-	+++	++	++
Talin	-	-	+++	++	++

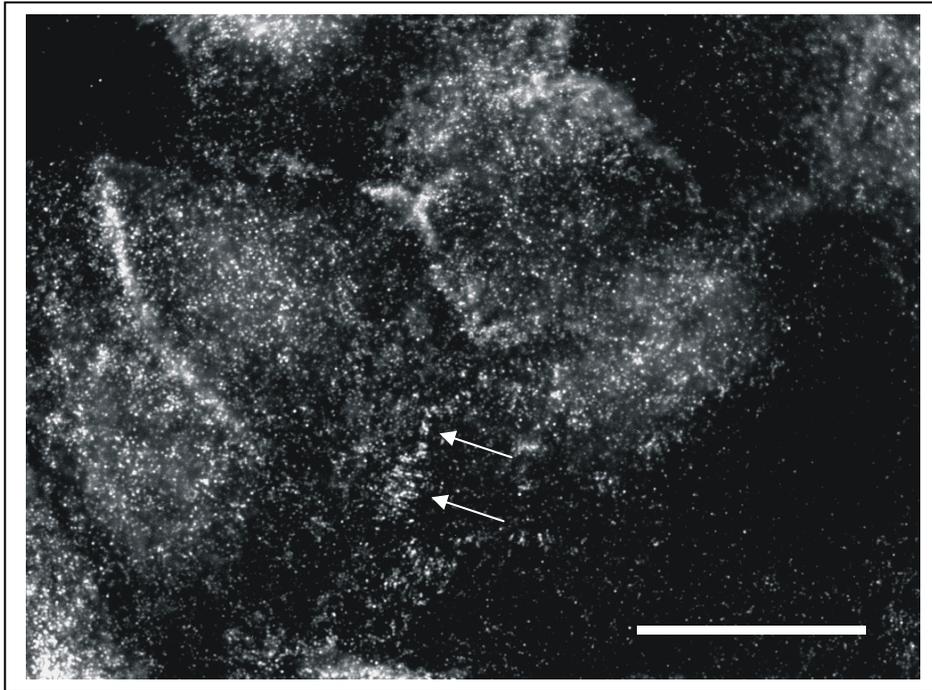


Abb. 20.  $\beta_1$ -Integrin, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu\text{m}$ .  
Fokale Adhäsionsstellen sind mittels Pfeilen angezeigt.

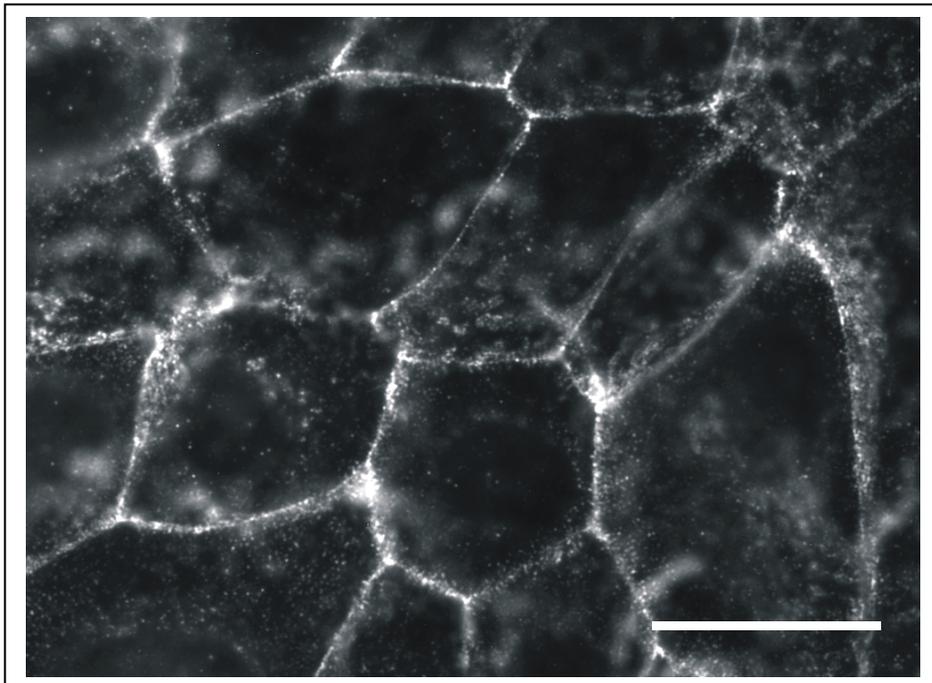


Abb. 21.  $\beta_1$ -Integrin, Epithelzellkultur Messbalken 25 $\mu\text{m}$ .  
 $\beta_1$  Integrin zeigt deutliche Signale an den Zell-zu-Zell Grenzen.

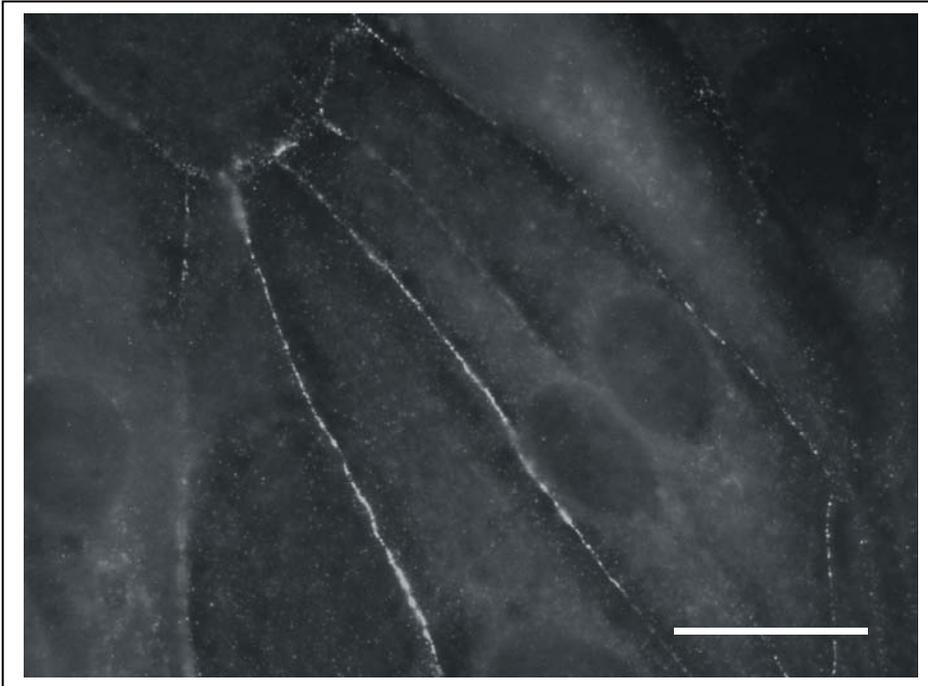


Abb. 22.  $\alpha$ -Aktinin, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m.  
 $\alpha$ -Aktinin zeigt ein deutliches Signal an den Zell-zu-Zell Grenzen.

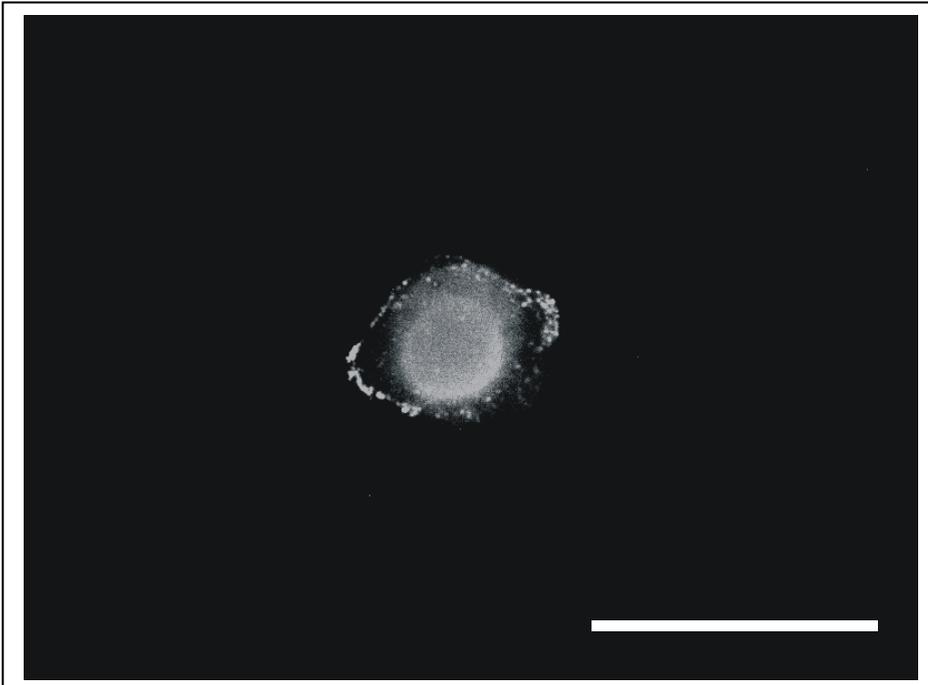


Abb. 23.  $\alpha$ -Aktinin, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m.  
 $\alpha$ -Aktinin wird an den Zellgrenzen exprimiert.  
Kernfärbung mittels Dapi-Färbung.

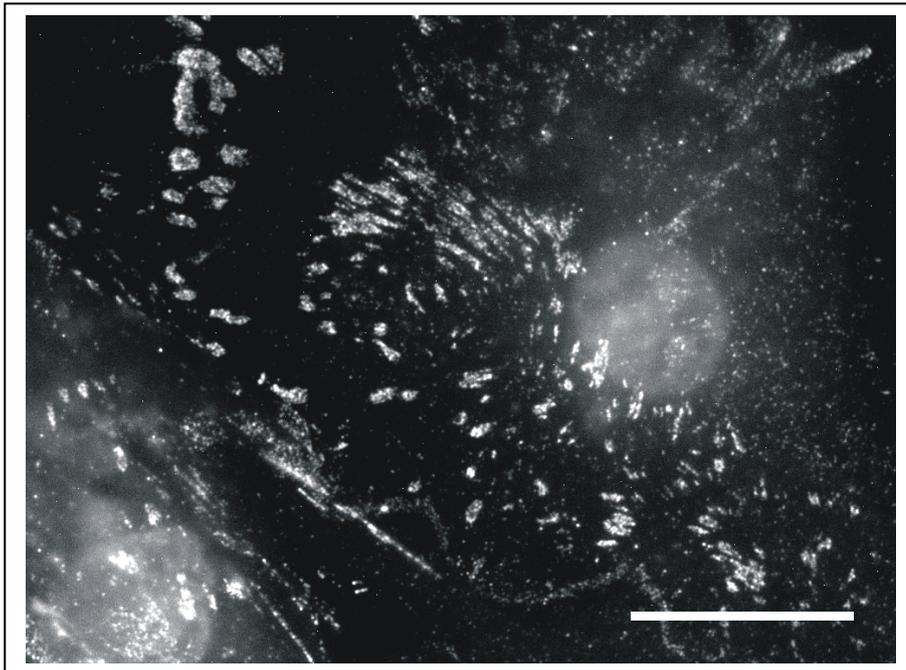


Abb. 24. FAK, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m.  
FAK wird am Boden der Kultur in typischen Plaques exprimiert.

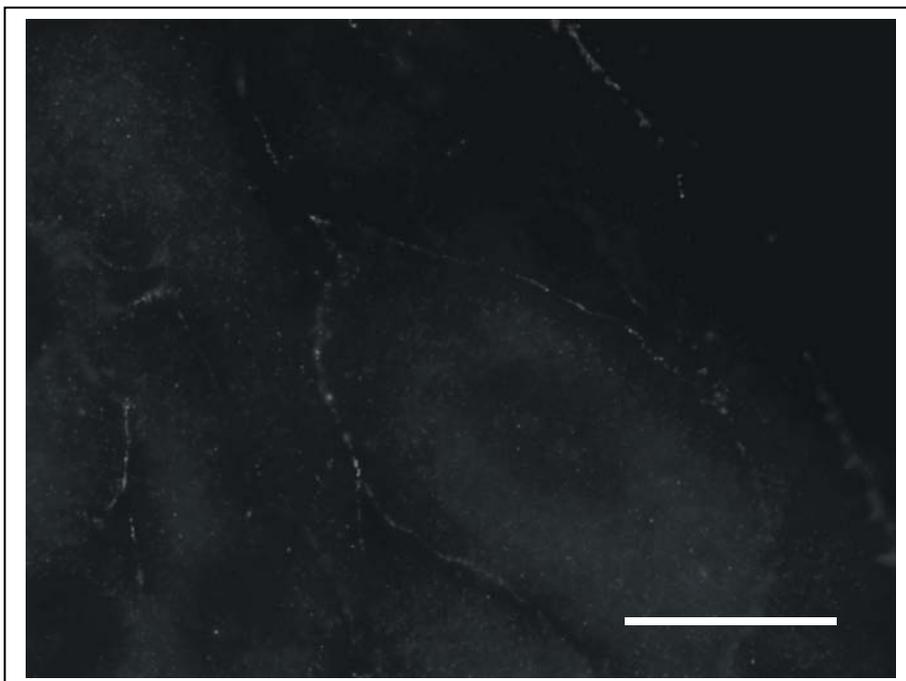


Abb. 25. FAK, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Innerhalb der Kolonien zeigt sich ein schwaches Signal an den  
Zell-zu-Zell Kontakten.

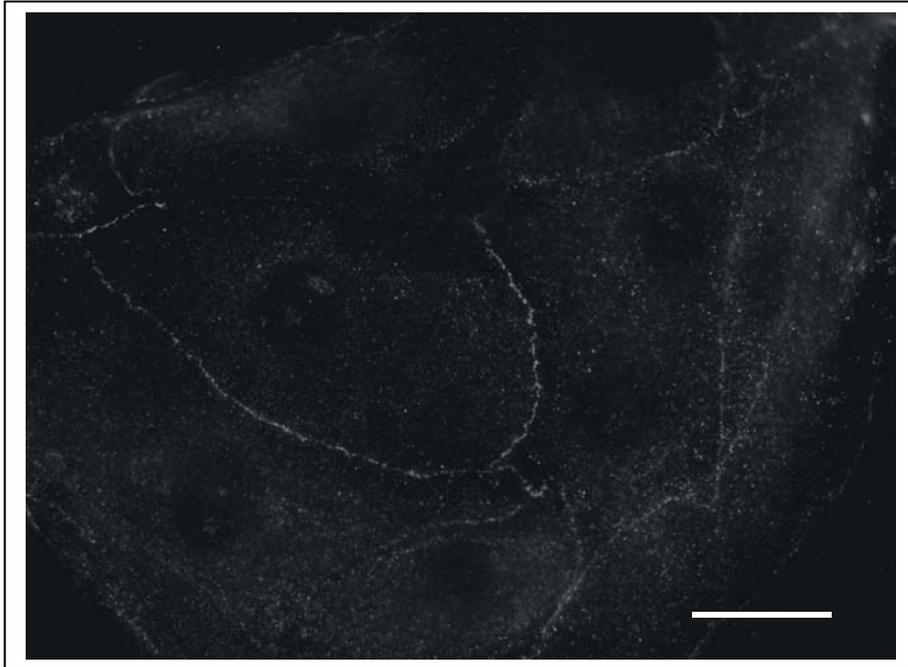


Abb. 26. Phosphotyrosin, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m. Innerhalb der Kolonien zeigt sich eine membranständige Reaktion.

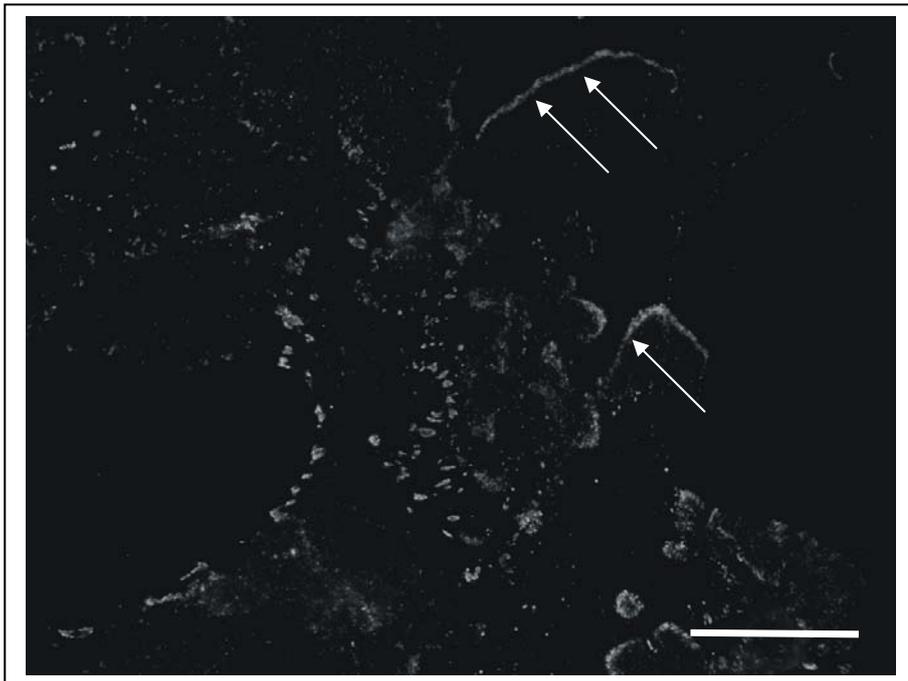


Abb. 27. Phosphotyrosin, Epithelzellkultur, Messbalken 50 $\mu$ m. PT wird am Boden der Kultur in typischen Plaques exprimiert Die Pfeile zeigen wellenförmige Ausläufer am Zellkulturrand.

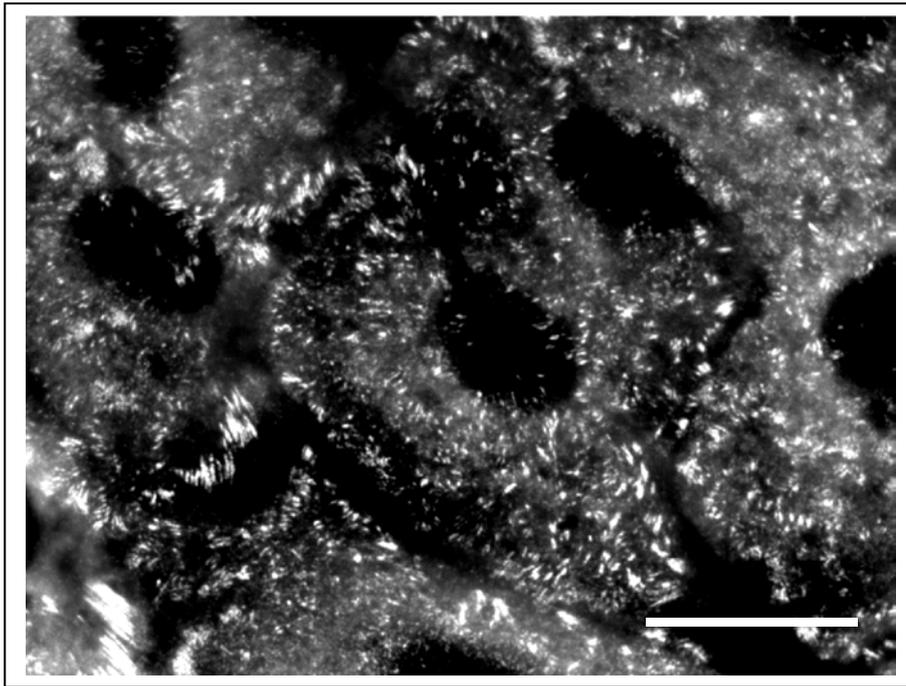


Abb. 28. Talin, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Talin wird am Boden der Kultur in typischen Plaques exprimiert.

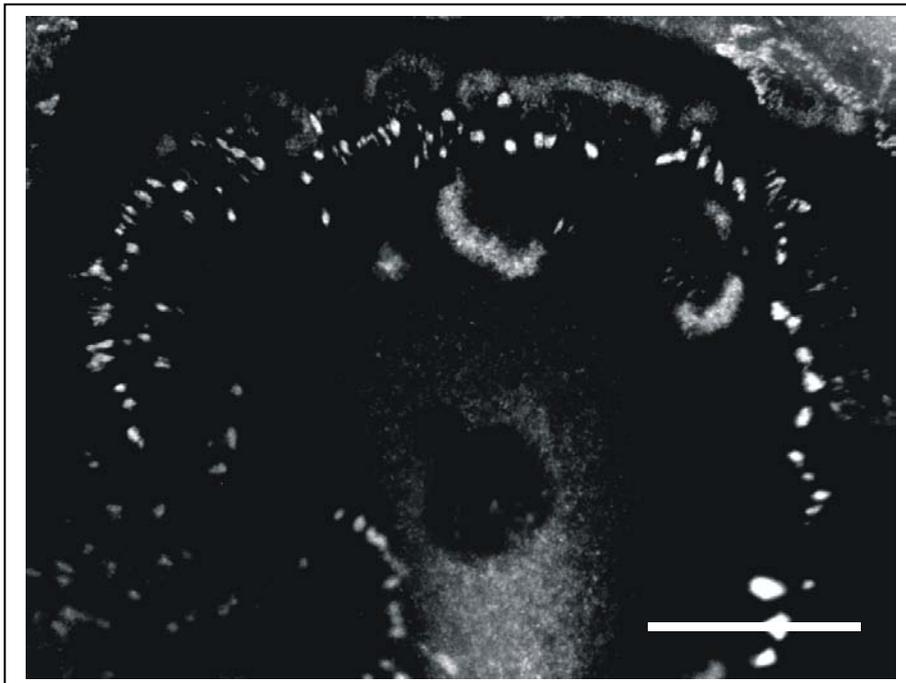


Abb. 29. Talin, Epithelzellkultur, Messbalken 25 $\mu$ m.  
An einer Einzelzelle zeigen sich regelmäßig angeordnete Signale entlang der wellenförmigen Ausläufer.

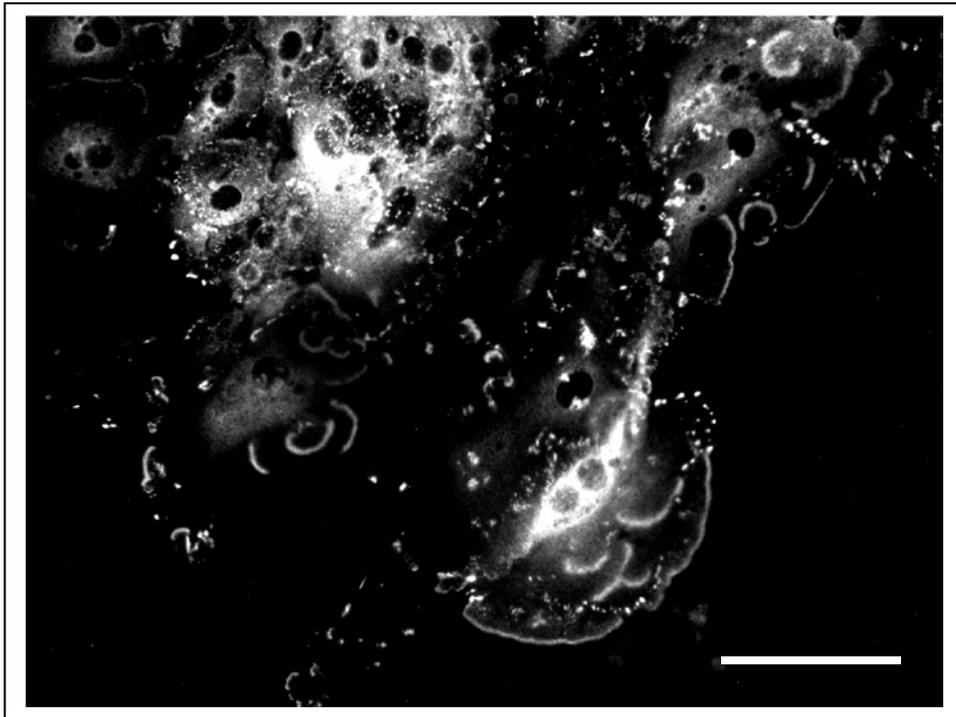


Abb. 30. Talin, Epithelzellkultur, Messbalken 50 $\mu$ m.  
Auch im Zellverband wird Talin entlang der wellenförmigen Ausläufer exprimiert.

## 4.4.6 Nachweis der Kolokalisation durch Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

### 4.4.6.1 Signale entlang der Zellmembran

In der Einzel fluoreszenz finden sich wie bereits erwähnt Signale von  $\beta_1$ -Integrin,  $\alpha$ -Aktinin, FAK und PT entlang der Zellmembranen der Epithelzellen. Eine entsprechende Kolokalisation der untersuchten Moleküle wurde mittels Doppelmarkierung des  $\beta_1$ -Integrins mit den jeweiligen 3 anderen Signalmolekülen nachgewiesen. Hierbei zeigt sich eine Kolokalisation des  $\beta_1$ -Integrins mit  $\alpha$ -Aktinin anhand einer gelben Färbung entlang der Zellgrenzen (Abb. 31). Das Signal von FAK ist im Vergleich zu dem von  $\beta_1$ -Integrin sehr schwach, so dass es nur zu einer Orangefärbung und nicht zu einer Gelbfärbung der überlagerten Signale in der Nähe der Zellmembran kommt (Abb. 32). Im Gegensatz dazu lässt sich eine zellmembranassoziierte Doppelmarkierung von PT und  $\beta_1$ -Integrin nicht darstellen, allerdings scheinen die beiden Moleküle direkt nebeneinander zu liegen (Abb. 33).

### 4.4.6.2 Doppelmarkierungen an den Fokalkontakten

Außer für  $\alpha$ -Aktinin finden sich für alle untersuchten Moleküle Signale an den Fokalkontakten. Um auch hier entsprechende Kolokalisationen zu zeigen wurden Doppelmarkierungen von FAK mit Talin und PT sowie von  $\beta_1$ -Integrin mit Talin, PT und FAK untersucht.

Bei der Doppelmarkierung von FAK mit Talin sind sehr deutliche Kolokalisationen an den Fokalkontakten zum Boden zu erkennen (Abb. 36). Hierbei wird besonders deutlich, dass die FAK im Gegensatz zu Talin lediglich innerhalb der Kolonie fokale Adhäsionen ausbildet, während Talin auch an den Rändern des Zellrasens zu erkennen ist. Neben der genannten membranassoziierten Lage ist auch das  $\beta_1$ -Integrin mit Talin in Form von fokalen Akkumulationen am Zellkulturboden kolokalisiert (Abb. 37). Desgleichen ließen sich das  $\beta_1$  Integrin und die FAK am Zellboden an den Fokalkontakten kolokalisieren, allerdings ist die Intensität der Farbreaktion geringer (Abb. 34). Im Gegensatz dazu konnten von PT und  $\beta_1$ -Integrin keine entsprechenden Kolokalisationen nachgewiesen werden. PT und FAK hingegen zeigten wieder sehr deutliche Kolokalisationen entlang der Fokalkontakte (Abb. 35).

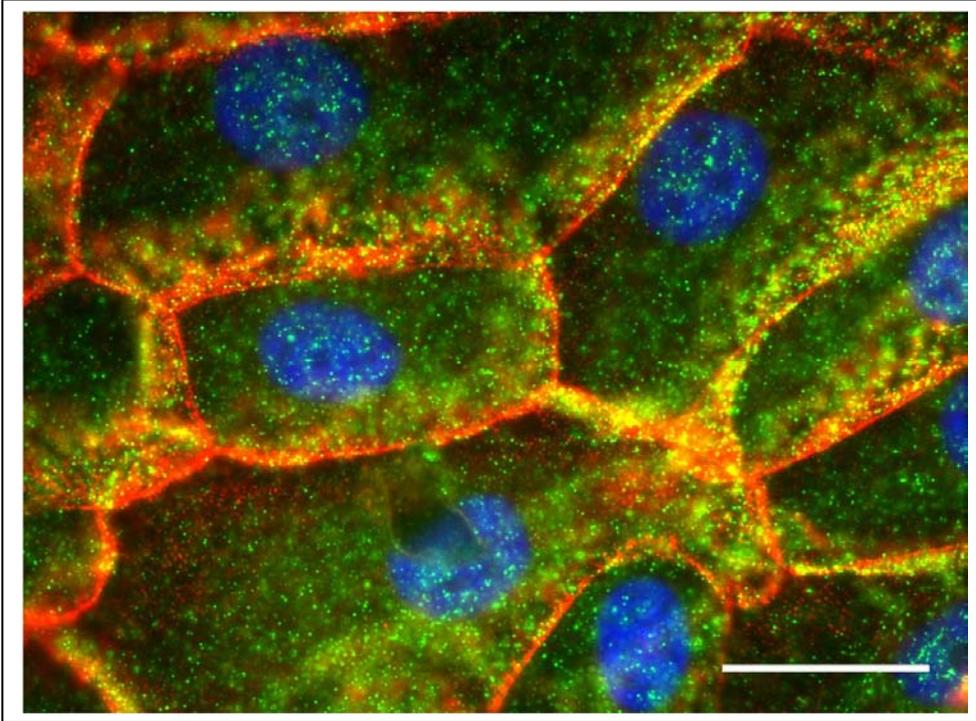


Abb. 31.  $\alpha$ -Aktinin (rot) und  $\beta_1$ -Integrin (grün), Messbalken 25 $\mu$ m. Es zeigt sich eine deutliche Kolokalisationen (gelb) entlang der Zellgrenzen.

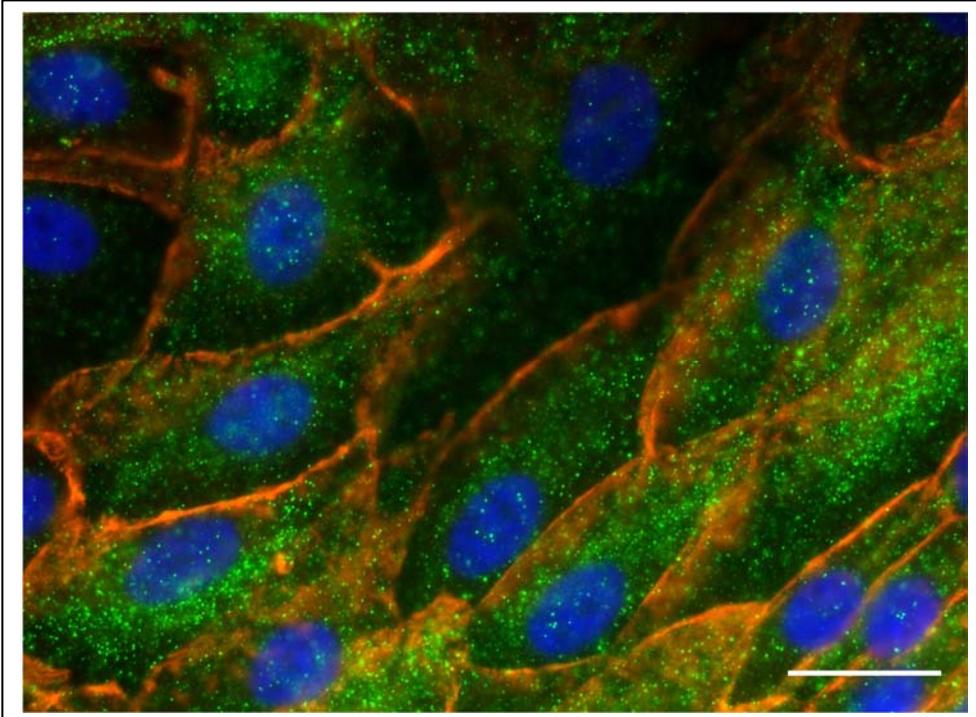


Abb. 32.  $\beta_1$ -Integrin (rot) und FAK (grün), Messbalken 25 $\mu$ m. Die Kolokalisation erscheint hier orange, weil das Signal von FAK sehr schwach ist.

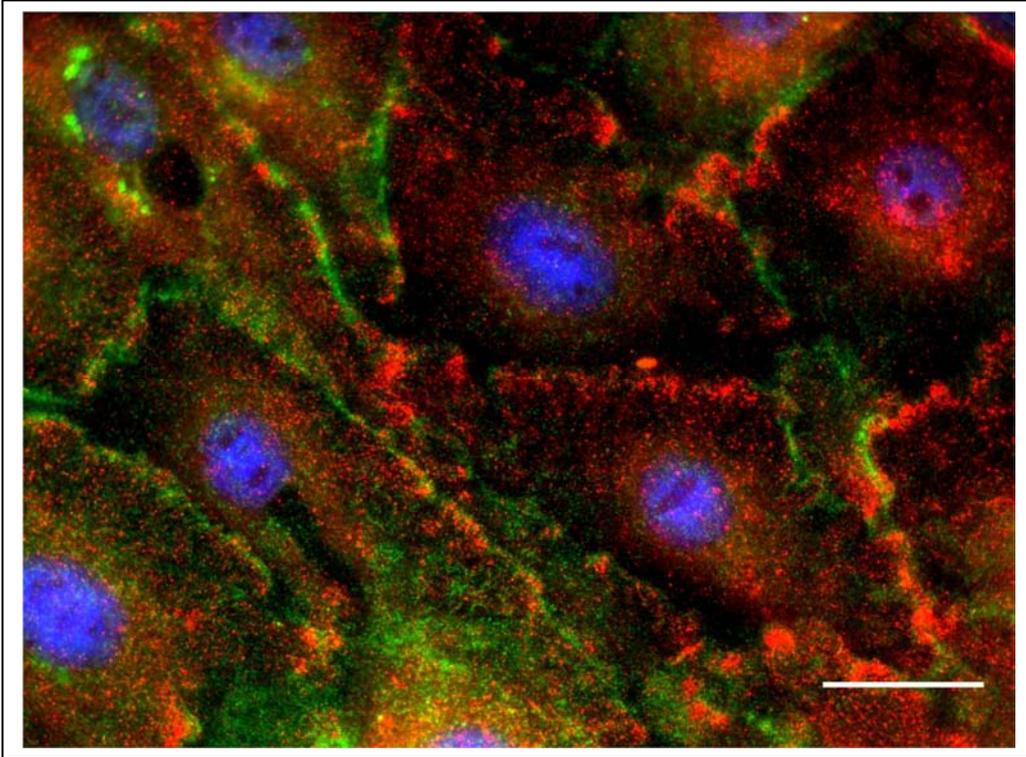


Abb. 33. PT (rot) und  $\beta_1$ -Integrin (grün), Messbalken 25 $\mu$ m.  
Es ist keine direkte Kolokalisation darstellbar. Die Signale liegen direkt nebeneinander.

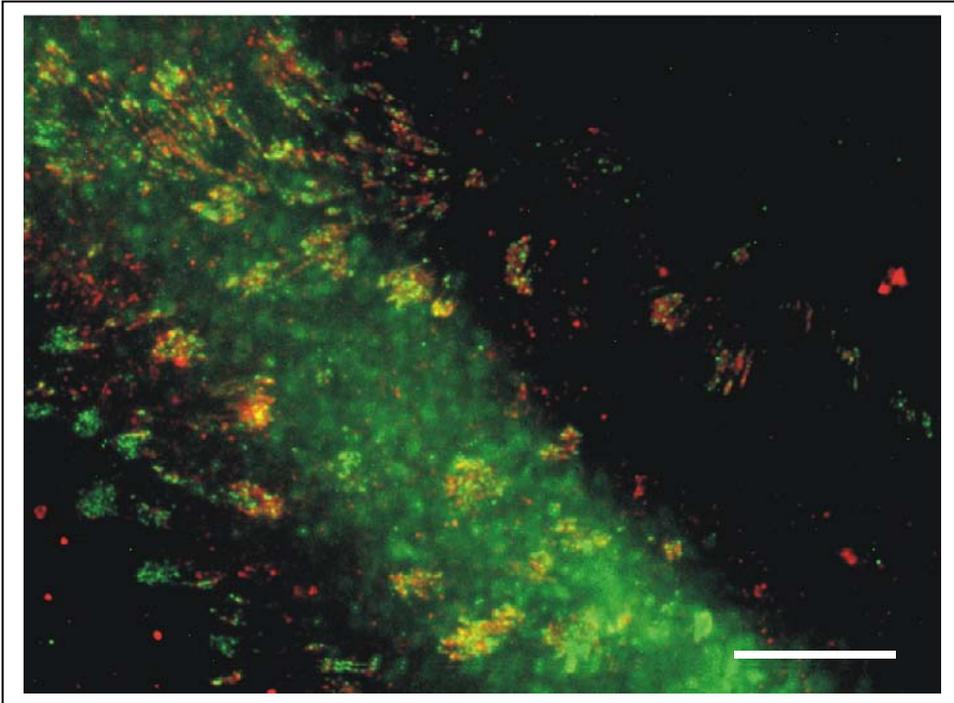


Abb. 34.  $\beta_1$ -Integrin (rot) und FAK (grün), Messbalken 12,5 $\mu\text{m}$ .  
Es zeigt sich eine deutliche Kolokalisation (gelb) an den FA.

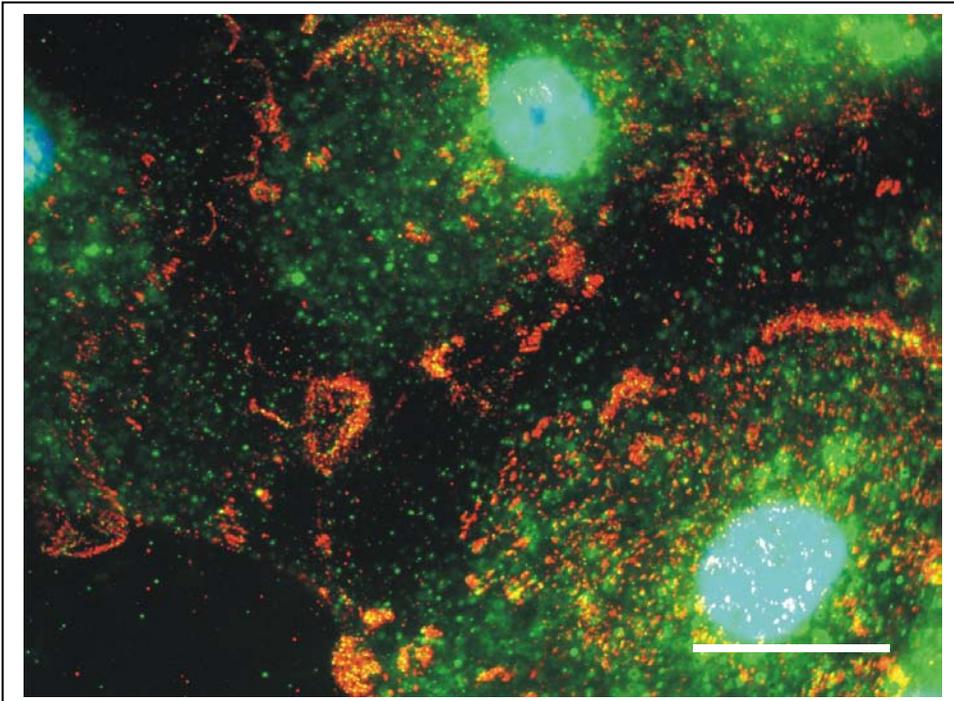


Abb. 35. PT (rot) und FAK (grün), Messbalken 25 $\mu\text{m}$ .  
Es zeigt sich eine deutliche Kolokalisation (gelb) an den FA.

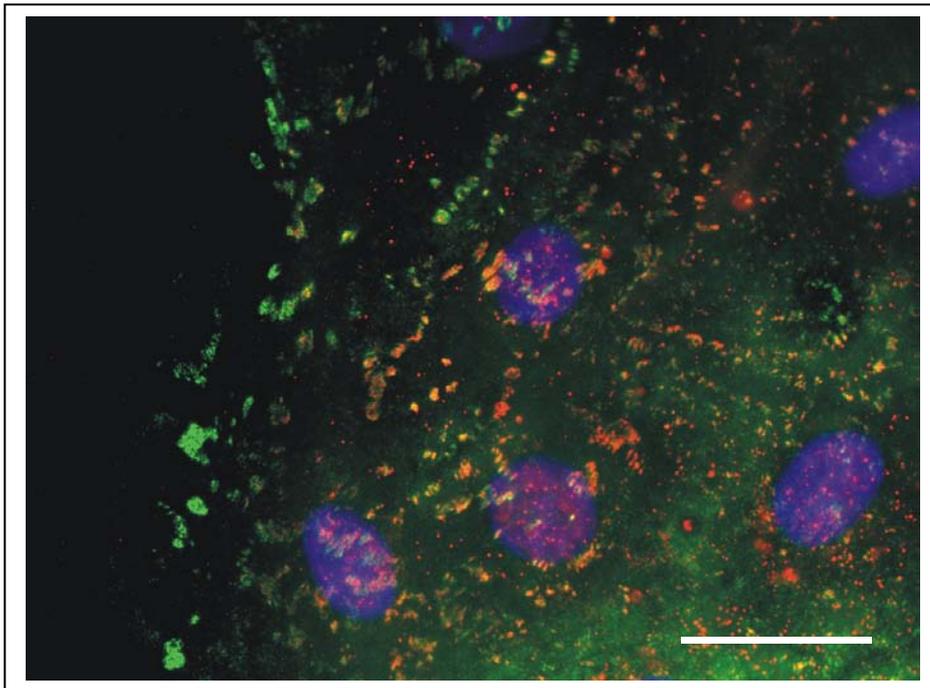


Abb. 36. FAK (rot) und Talin (grün), Messbalken 25 $\mu$ m.  
Innerhalb der Zellkultur finden sich deutliche Kolokalisation (gelb)  
an den FA, während am Rand kein Signal von FAK vorhanden ist.

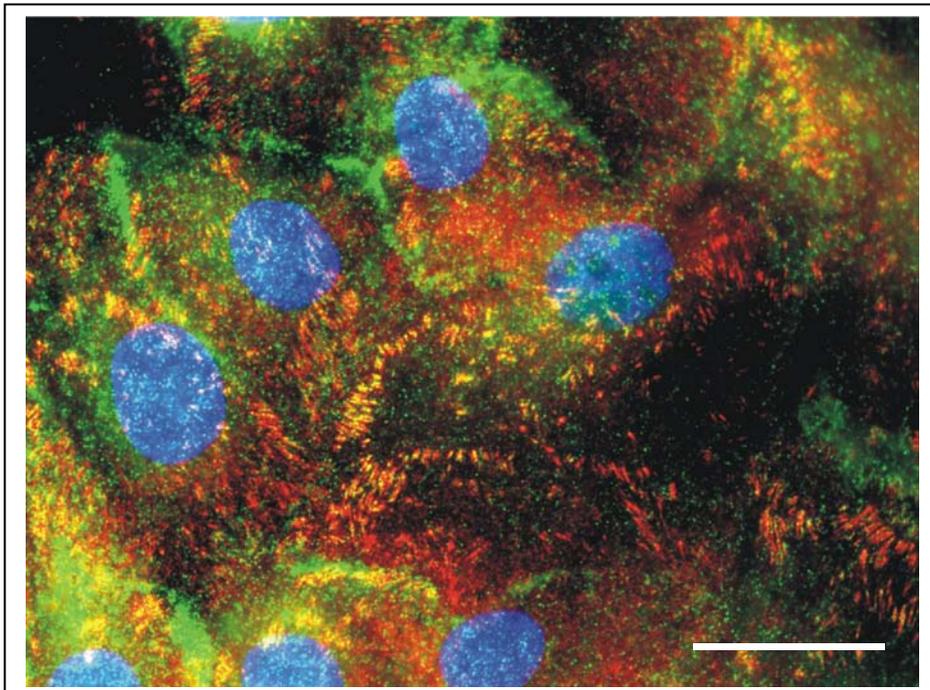


Abb. 37. Talin (rot) und  $\beta_1$ -Integrin (grün), Messbalken 25 $\mu$ m.  
Es zeigt sich eine deutliche Kolokalisation (gelb) an den FA während  
an den Zell-zu-Zell Grenzen nur ein grünes Signal zu erkennen ist.

## 4.5 Proteinnachweis mittels Western blot

Im Western blot werden die histologischen Ergebnisse bestätigt. Von allen untersuchten Proteinen finden sich spezifische Banden in den entsprechenden Proben (Abb. 38).

Talin zeigt in allen drei untersuchten Proben deutlich die erwarteten zwei Banden. Bei 270 kDa liegt das Gewicht des ganzen Moleküls, bei 220 kDa findet sich der sogenannte Talinkörper. Der 50 kDa schwere Talinkopf kann mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden.

FAK zeigt eine sehr deutliche Bande von 125 kDa in der Probe aus Plazentahomogenat, während die Bande der beiden Zellkulturproben relativ schwächer ausfällt, aber eindeutig zu identifizieren ist.

Die Bande von  $\alpha$ -Aktinin ist sehr deutlich und liegt bei 100 kDa. Ein besonders starkes Signal findet sich in der fibroblastoiden Probe.

Mit dem polyklonalen Antikörper gegen die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit konnte bei dem Proteinextrakt der fibroblastoiden Zellen keine spezifische Bande dargestellt werden, wohingegen man bei den Proben aus der Plazenta und aus den Epithelzellen eindeutige Banden bei 130 kDa findet.

Rückschlüsse auf die Gesamtmenge der betreffenden Proteine konnten nicht gezogen werden, weil die eingesetzte Proteinmenge nicht quantifiziert wurde.

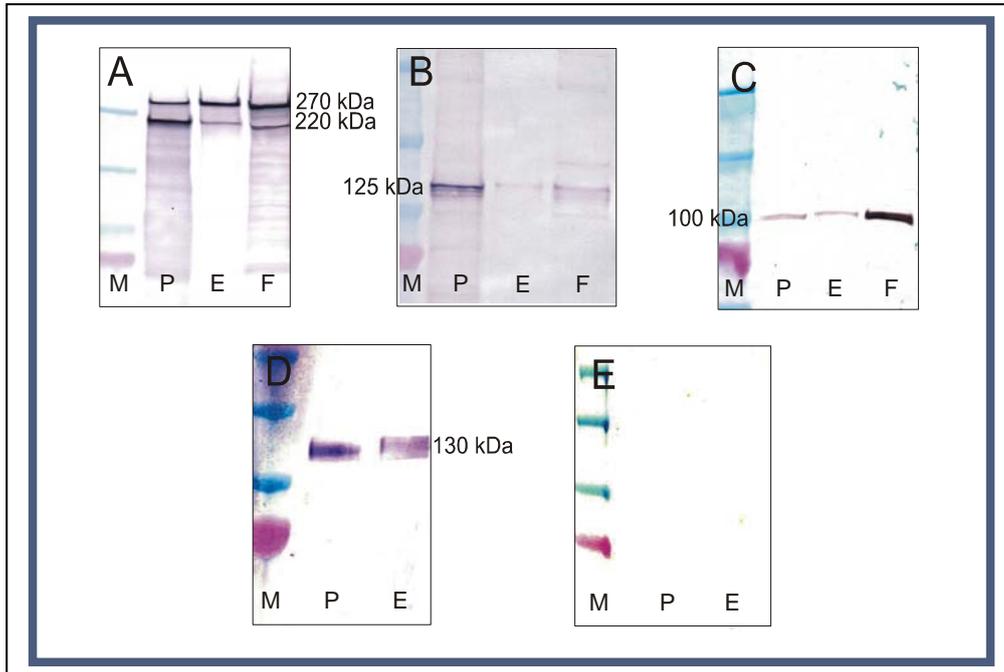


Abb. 38. Proteinnachweis mittels Western blot.

Spezifische Banden für Talin (A, intaktes Talin-Molekül bei 270 kDa und 220 kDa Fragment), FAK (B, 125 kDa),  $\alpha$ -Aktinin (C, 100 kDa) und die  $\beta$ 1 Integrinuntereinheit (D, reduzierte Form 130 kDa). Negativ-Kontrolle (E). E, Proteinextrakt aus maternalen Epithelzellen; F, Proteinextrakt aus stromalen fibroblastoiden Zellen; M, gefärbter Marker; P, Proteinextrakt aus Plazentom.

## **4.6 Vergleich der Proteinexpression auf unterschiedlichen Matrices mit Immunfluoreszenz**

### **4.6.1 $\beta_1$ Integrin**

Die sehr starke Fluoreszenzreaktion gegen das  $\beta_1$ -Integrin im Bereich der Zell-zu-Zell Kontakte der lateralen Zellmembranen ist beim Wachstum auf allen drei Matrices im Vergleich zur unbeschichteten Probe unverändert (Abb. 43) Bei der Untersuchung der Fokalkontakte hingegen zeigt sich ein anderes Bild. Die mit schwach bis normal beschriebenen  $\beta_1$ -Integrin Signale der auf unbeschichtetem Untergrund wachsenden Zellen (Abb. 39) zeigen keine Veränderung auf Kollagen IV- oder Lamininbeschichtung (Abb. 40/ Abb. 42). Bei Beschichtung mit Fibronectin aber ist die Anzahl der  $\beta_1$  enthaltenden Fokalkontakte um ein vielfaches gestiegen (Abb. 41).

### **4.6.2 $\alpha$ -Aktinin**

Ohne eine Beschichtung des Objektträgers findet sich  $\alpha$ -Aktinin wie oben beschrieben mit mittelstarken Signalen entlang der Zellmembranen an den Zell-zu-Zell Kontakten (Abb. 44). Dasselbe Bild stellt sich bei einer Beschichtung mit Kollagen IV oder Laminin dar (Abb. 45/ Abb. 47). Dagegen kommt es beim Wachstum auf Fibronectin an denselben Stellen zu einer sehr starken Reaktion (Abb. 46).

### **4.6.3 Phosphotyrosin**

Die Phosphotyrosinfluoreszenz zeigt ähnliche Veränderungen im Beschichtungsvergleich wie die der  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit. Die Zell-zu-Zell Kontaktsignale zeigen keine Veränderungen (Abb. 49) und auch die sehr starken Signale, die von den Fokalkontakten einzelner Zellen ausgehen, sind auf allen Matrices gleich (Abb. 48). Innerhalb der Kolonien beim Wachstum auf Fibronectin aber zeigen die Phosphotyrosin enthaltenden Fokalkontakte eine Vermehrung um ein Vielfaches (Abb. 52), wohingegen bei den anderen beiden Beschichtungen keine Veränderungen festgestellt werden können (Abb. 50/ Abb. 51/ Abb. 53).

#### **4.6.4 Talin**

Talin stellt sich als das einzige zytoskelettassoziierte Molekül dar, welches auch bei Kollagen IV- und Lamininbeschichtung Veränderungen zeigt. Auf diesen beiden Matrices stellen sich die Talin enthaltenden Fokalkontakte deutlicher dar als auf der unbeschichteten Unterlage (Abb. 54/ Abb. 55/ Abb. 57). Die erhöhte Signalstärke musste bei der Dokumentation durch eine reduzierte Belichtungszeit ausgeglichen werden. Auf mit Fibronectin beschichteten Unterlagen wachsende Zellkolonien, zeigen die gleiche Signalstärke der Talin Immunfluoreszenz, allerdings ist die Zahl der Talin enthaltenden Fokalkontakte um ein vielfaches angestiegen (Abb. 56).

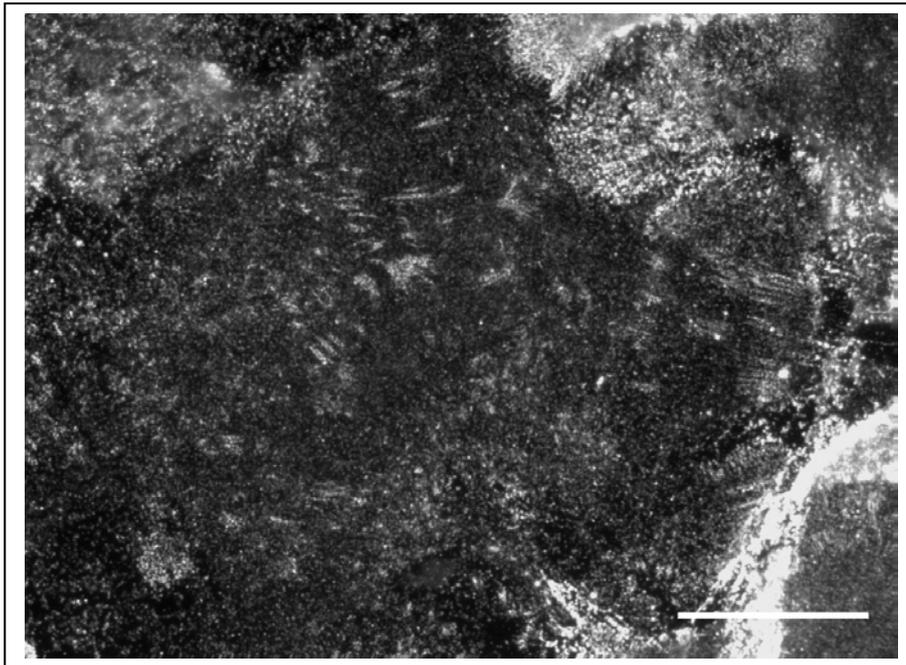


Abb. 39.  $\beta_1$ -Integrin ohne Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
An den FA zeigt sich ein schwaches bis mittleres Signal.

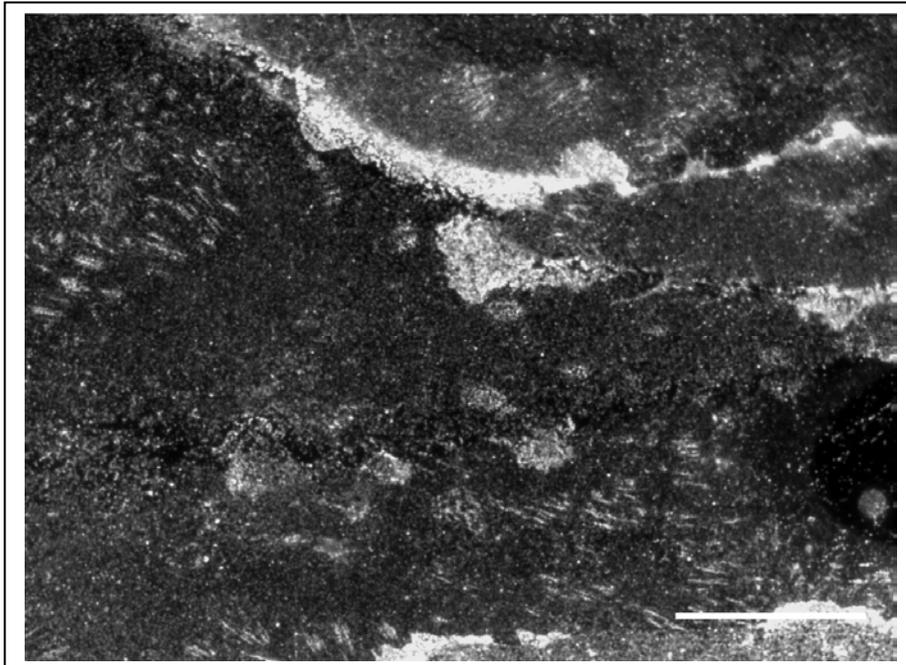


Abb. 33.  $\beta_1$ -Integrin auf Kollagen IV-Beschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Kollagenbeschichtung bleibt die Signalstärke an den FA  
unverändert.

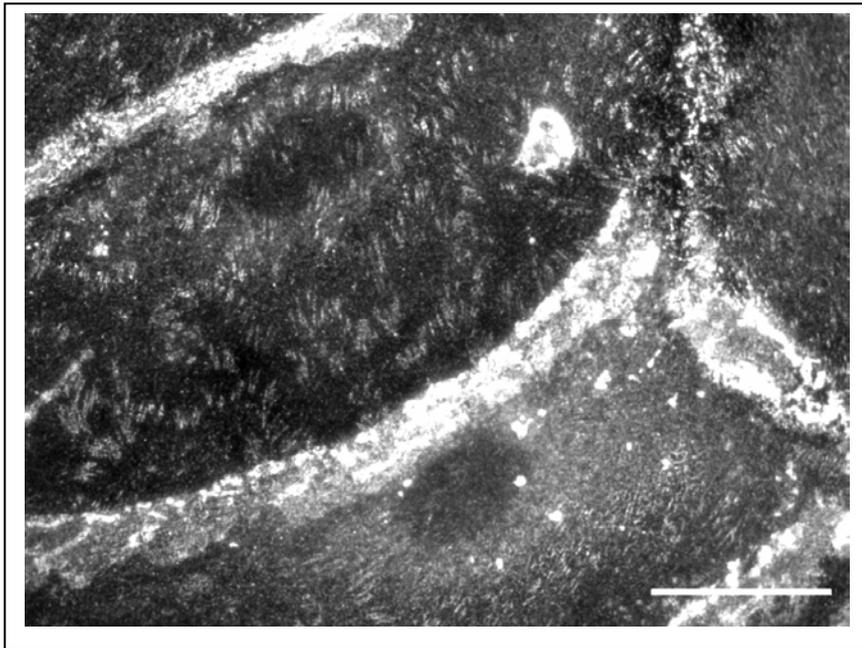


Abb. 41.  $\beta_1$ -Integrin auf Fibronectinbeschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Fibronectinbeschichtung erhöht sich die Anzahl der  
darstellbaren Fokalkontakte.

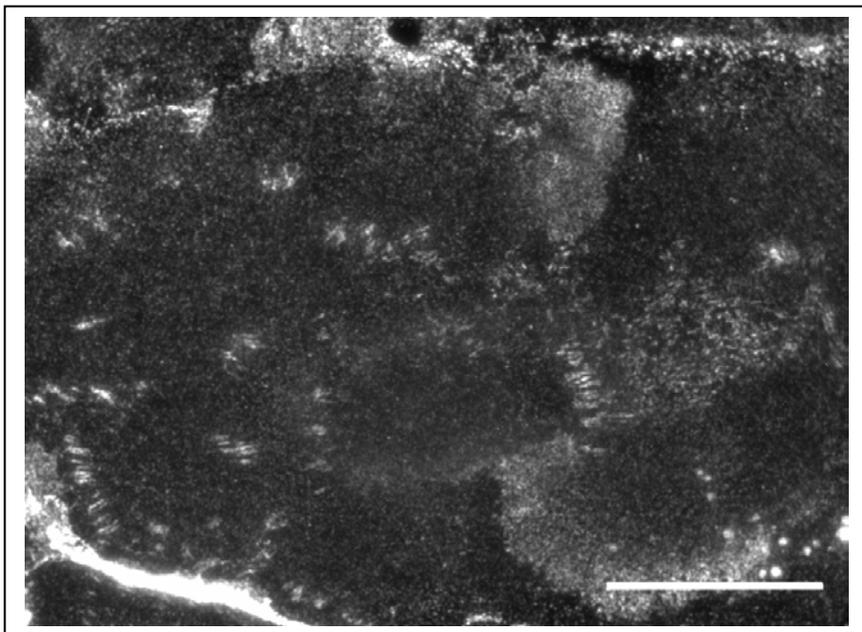


Abb. 42  $\beta_1$ -Integrin auf Lamininbeschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Lamininbeschichtung bleibt die Signalstärke an den FA  
unverändert.

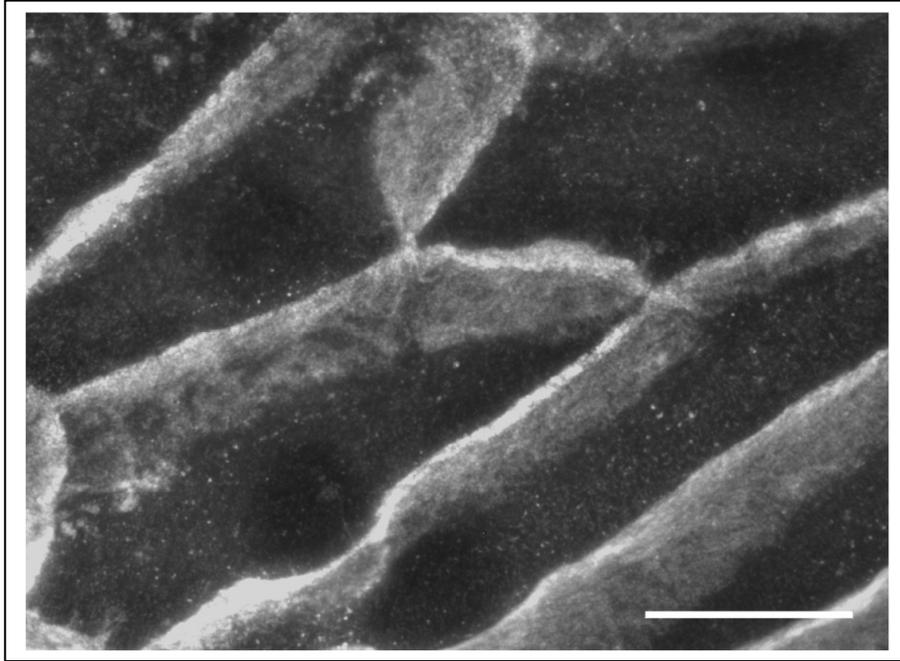


Abb. 43.  $\beta_1$ -Integrin auf Lamininbeschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
An den Zell-zu-Zell Kontakten wird  $\beta_1$ -Integrin sehr stark  
exprimiert.

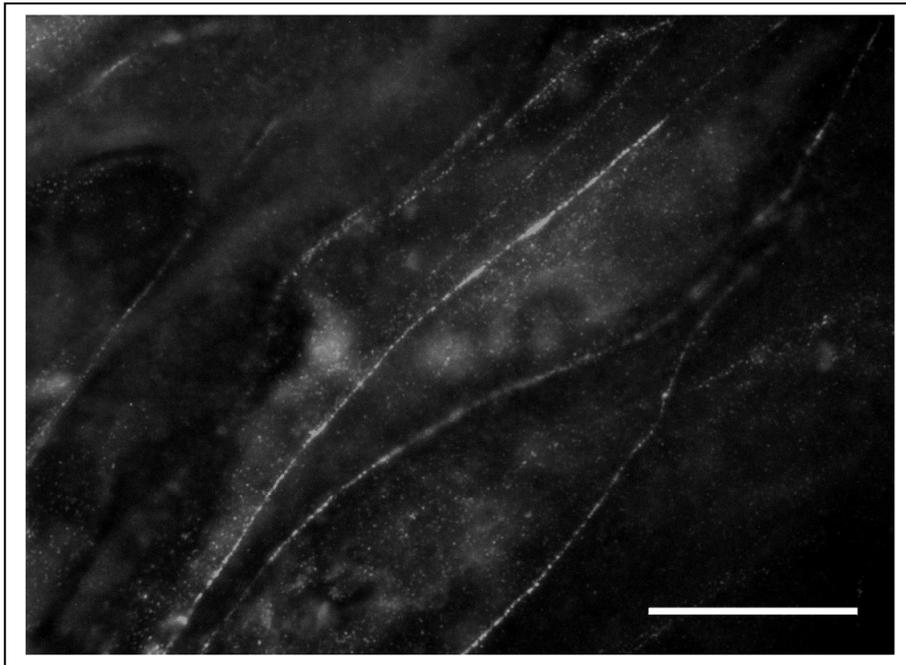


Abb. 44.  $\alpha$ -Aktinin ohne Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
 $\alpha$ -Aktinin zeigt ein deutliches Signal and den Zell-zu-Zell Grenzen.

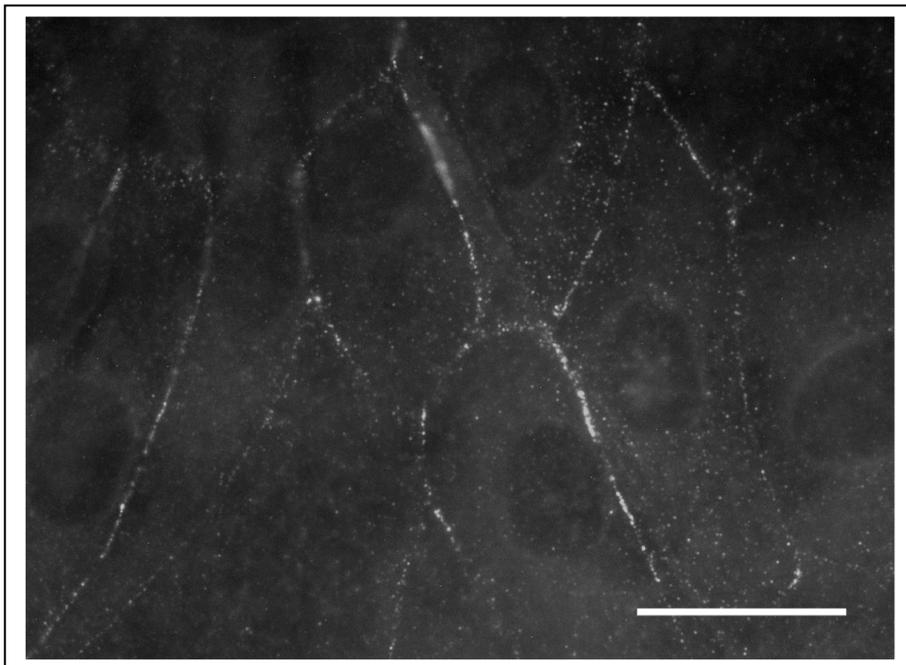


Abb. 45.  $\alpha$ -Aktinin auf Kollagen IV-Beschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Kollagenbeschichtung bleibt die Signalstärke an den Zell-zu-Zell Grenzen unverändert.

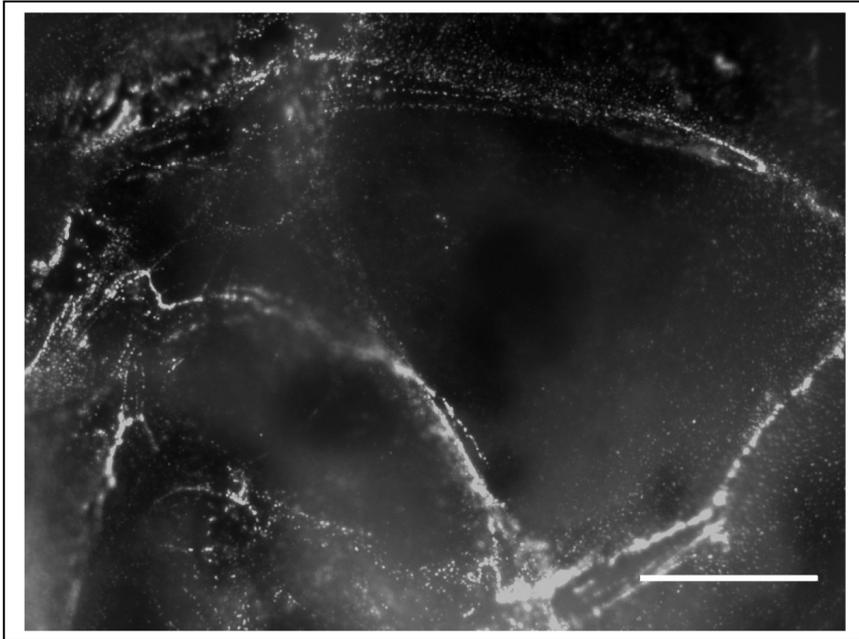


Abb. 46.  $\alpha$ -Aktinin auf Fibronectinbeschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Fibronectinbeschichtung kommt es zu einer Verstärkung  
des Signals entlang der Zell-zu-Zell Grenzen.

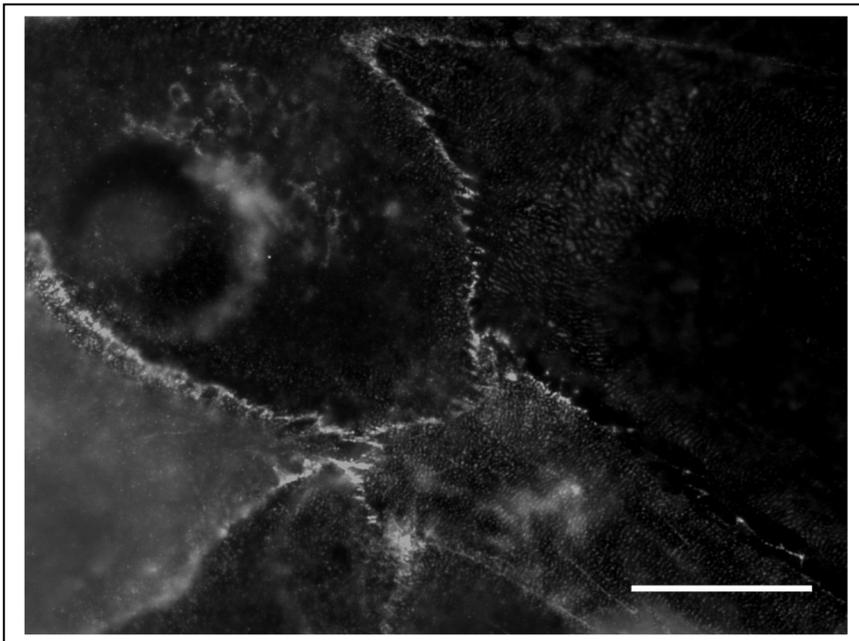


Abb. 47.  $\alpha$ -Aktinin auf Lamininbeschichtung,  
Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Lamininbeschichtung bleibt die Signalstärke an den Zell-  
zu-Zell Grenzen unverändert.

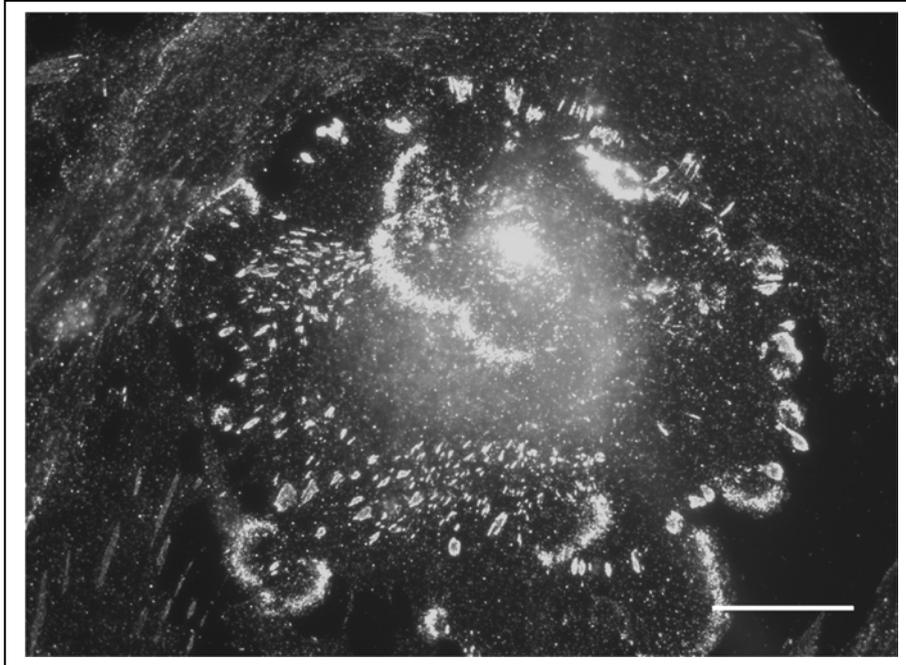


Abb. 41. PT auf Fibronectinbeschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
PT wird deutlich entlang der Fokalkontakte und der wellenförmigen Ausläufer exprimiert.

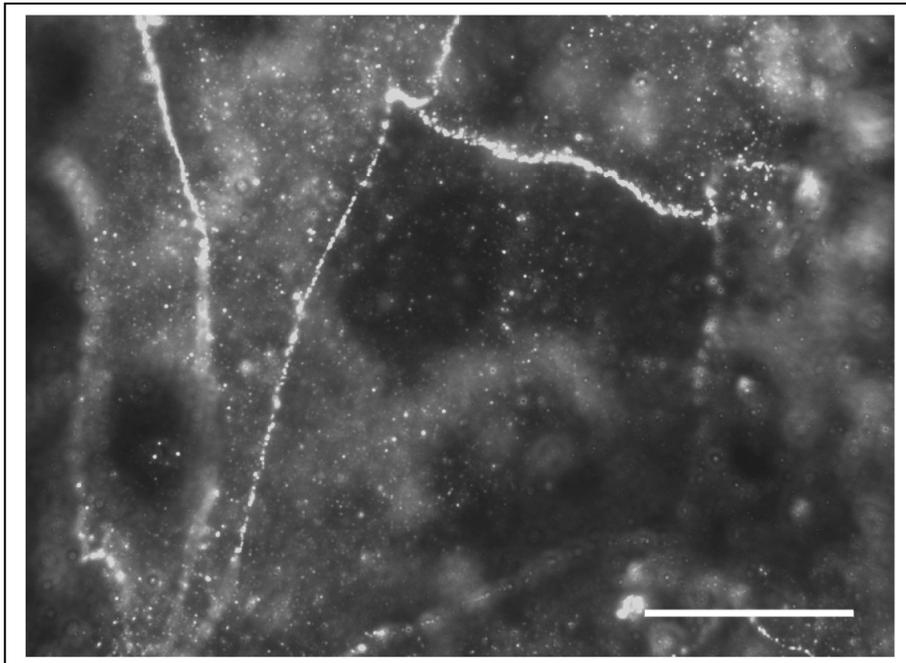


Abb. 49. PT ohne Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Entlang der Zellmembran finden sich mittelstarke Signale.

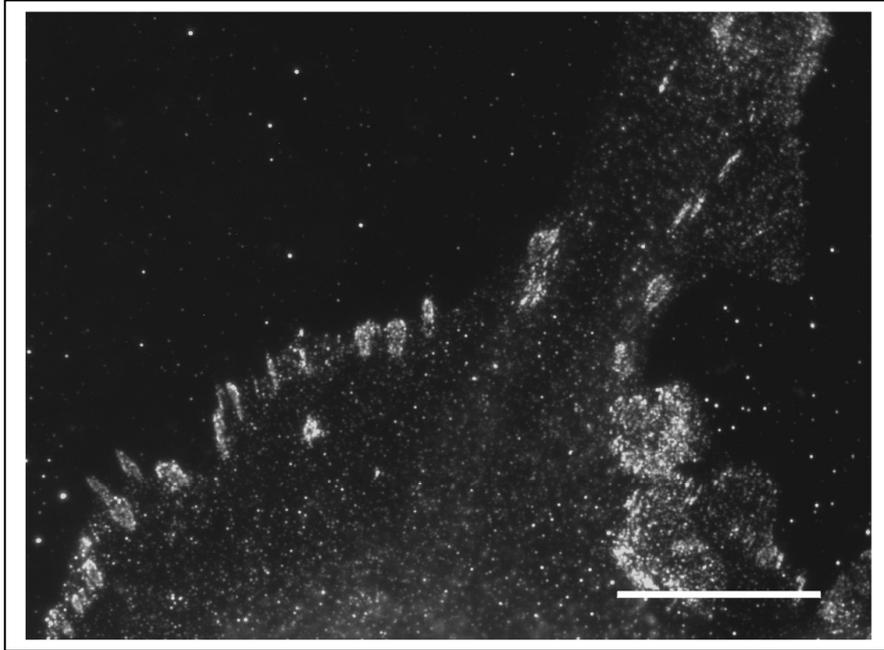


Abb. 50. PT ohne Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
PT wird deutlich entlang der Fokalkontakte exprimiert.

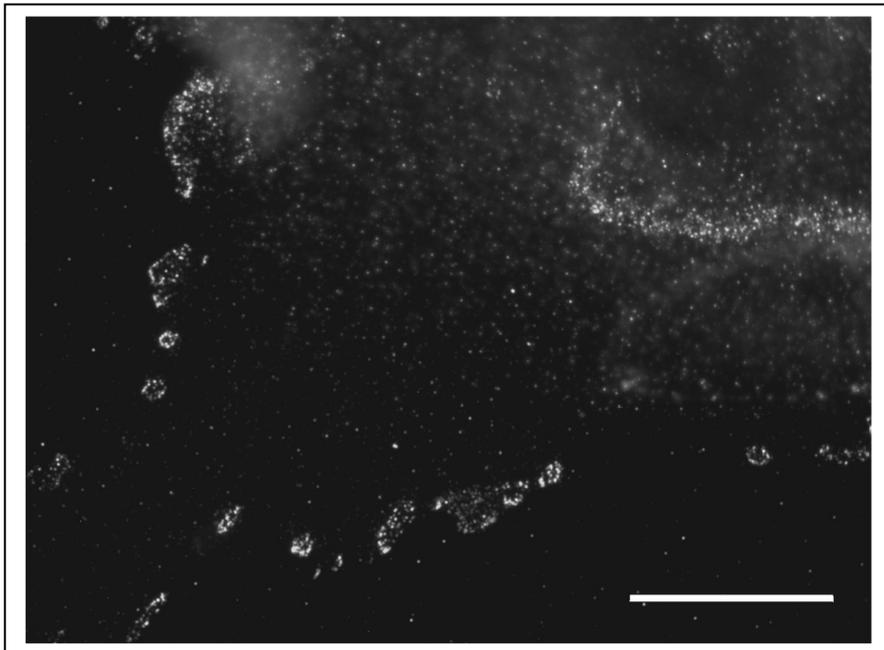


Abb. 51. PT auf Kollagen IV-Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Kollagenbeschichtung bleibt die Stärke der Signale an den  
FA unverändert.

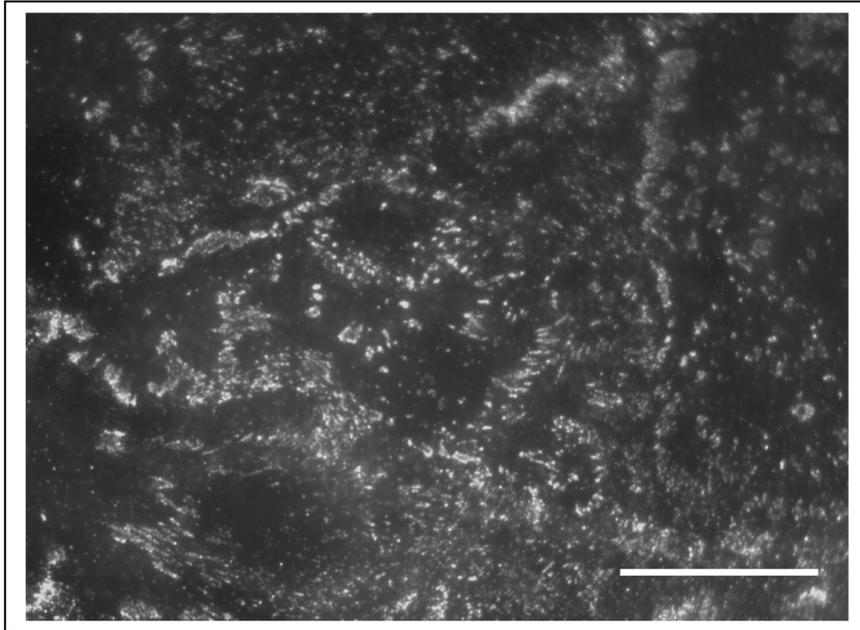


Abb. 52. PT auf Fibronectinbeschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m. Bei Fibronectinbeschichtung kommt es zu einer deutlich erhöhten Anzahl an darstellbaren FA und einem stärkeren Signal an diesen Stellen.

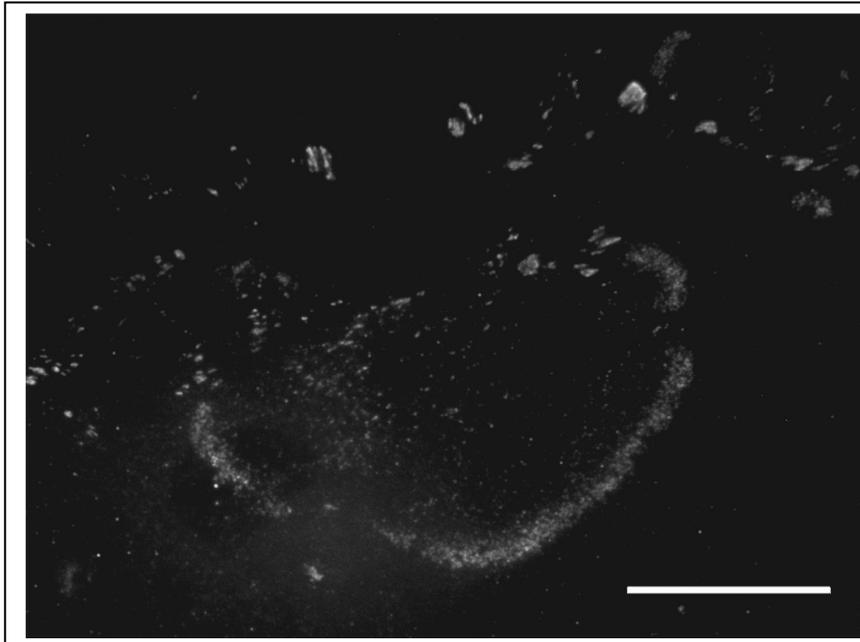


Abb. 53. PT auf Lamininbeschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m. Bei Lamininbeschichtung bleibt die Stärke des Signals an den FA unverändert.

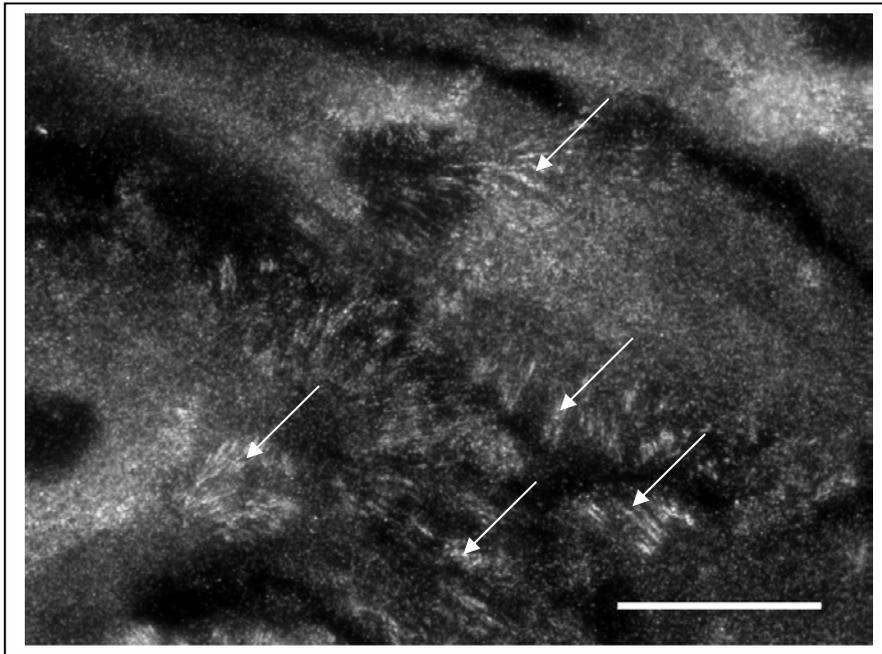


Abb. 54. Talin ohne Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Ohne Beschichtung zeigt Talin nur vergleichsweise schwache  
Signale an den FA.

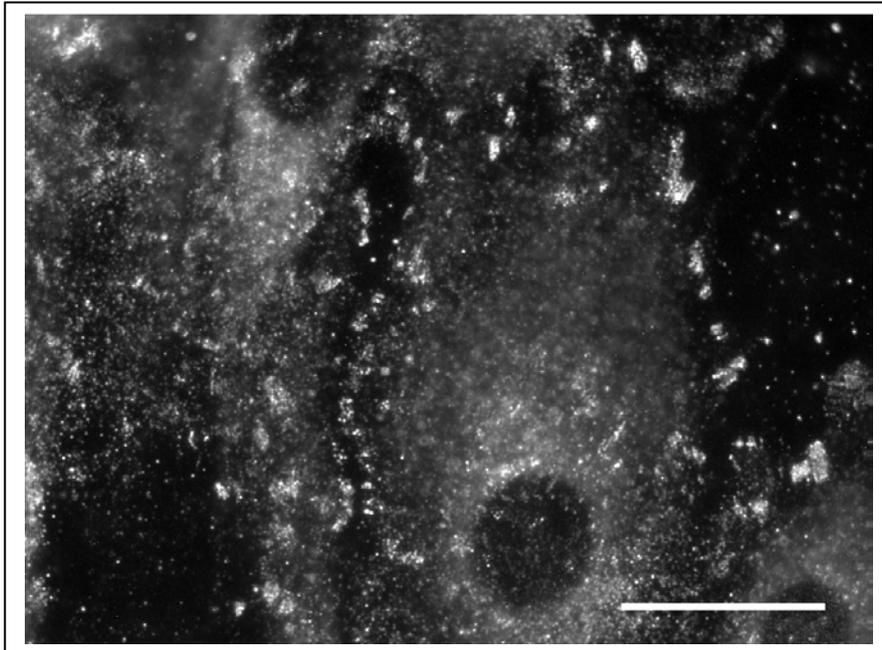


Abb. 55. Talin auf Kollagen IV-Beschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Kollagenbeschichtung sind die Signale an den FA bei gleicher  
Belichtung mittelsstark.

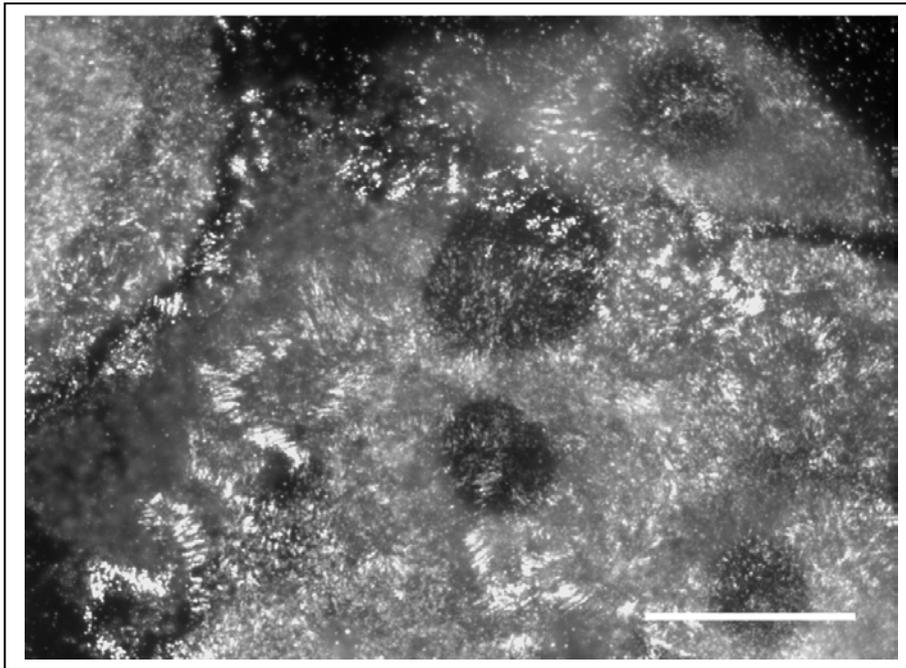


Abb. 56. Talin auf Fibronectinbeschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Fibronectinbeschichtung kommt es bei gleicher Belichtung zu einer deutlich erhöhten Anzahl an darstellbaren FA und einem starken Signal an diesen Stellen.

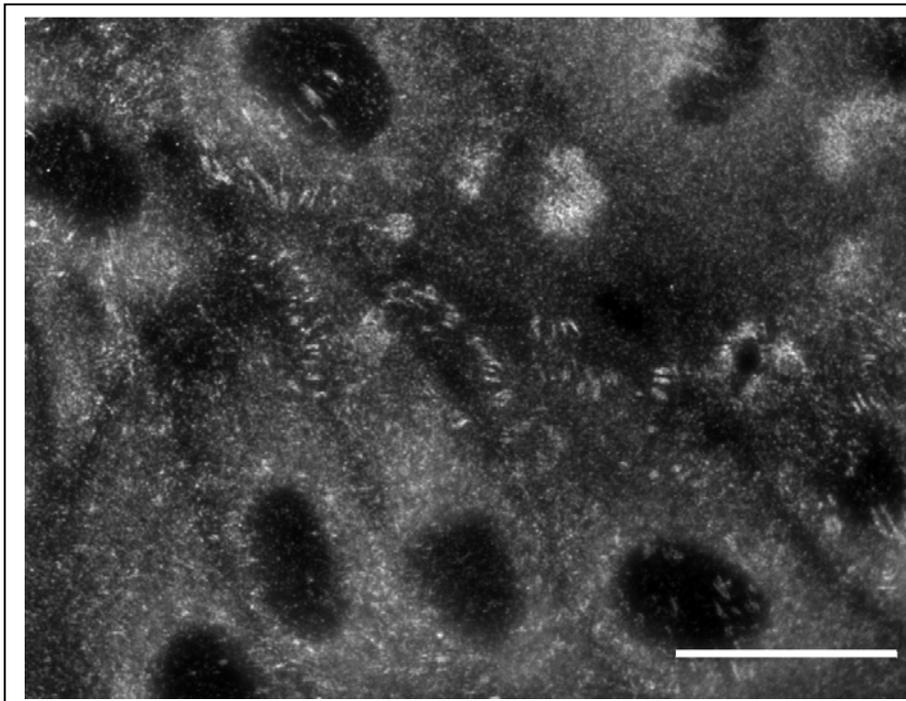


Abb. 57 Talin auf Lamininbeschichtung, Messbalken 25 $\mu$ m.  
Bei Lamininbeschichtung sind die Signale an den FA bei gleicher Belichtung mittelstark.

## 4.7 Wachstumsvergleiche auf unterschiedlichen Matrices

### 4.7.1 Ergebnisse der Auszählung von jeweils 10 Sichtfeldern

Bei der Auszählung der Zellen mittels der mit Dapi angefärbten Kerne ergaben sich folgende in der Tabelle 11 aufgeführte Zahlen. Während ohne Beschichtung im Schnitt nur 436,1 Zellen in 10 Gesichtsfeldern gewachsen sind, konnten bei Fibronektinbeschichtung 1619,7 Zellen gezählt werden und auch bei der Beschichtung mit Kollagen und Laminin konnte mit 592,6 und 691,4 Zellen pro 10 Gesichtsfelder eine deutliche Zellvermehrung gesehen werden. Alle drei Beschichtungen führten zu einem vermehrten Zellwachstum.

In den Versuchen 6 und 7 wurde keine Kollagen IV-Beschichtung untersucht und bei Versuch 5,3 konnte die Kollagenbeschichtung nicht ausgewertet werden.

Tabelle 11: Zellauszählung

Versuchs Nr.	Zellzahl ohne Beschichtung	Zellzahl mit FN-Beschichtung	Zellzahl mit Koll-Beschichtung	Zellzahl mit Lam-Beschichtung
1,1	72	1119	449	128
1,2	156	1236	463	246
1,3	139	1986	307	198
3,1	472	1587	531	1052
3,2	226	1697	557	894
3,3	509	1715	634	934
3,4	292	1551	304	756
3,5	686	1726	475	918
3,6	449	2112	887	1078
4,1	566	1369	752	465
5,1	587	1857	816	781
5,2	539	1262	936	786
5,3	610	1746		796
6,1	574	1469		596
6,2	741	2320		1005
7,1	460	1227		525
7,2	335	1556		595
Anzahl	17	17	12	17
Mittelwert	436,1	1619,7	592,6	691,4
STD	199,5	329,9	213,8	297,7
SEM	48,38	80,01	61,72	72,20

Die angegebenen deskriptiven statistischen Parameter fassen alle Werte einer Behandlung zusammen; in der Varianzanalyse wurde aber außerdem noch nach Versuchsansatz differenziert.

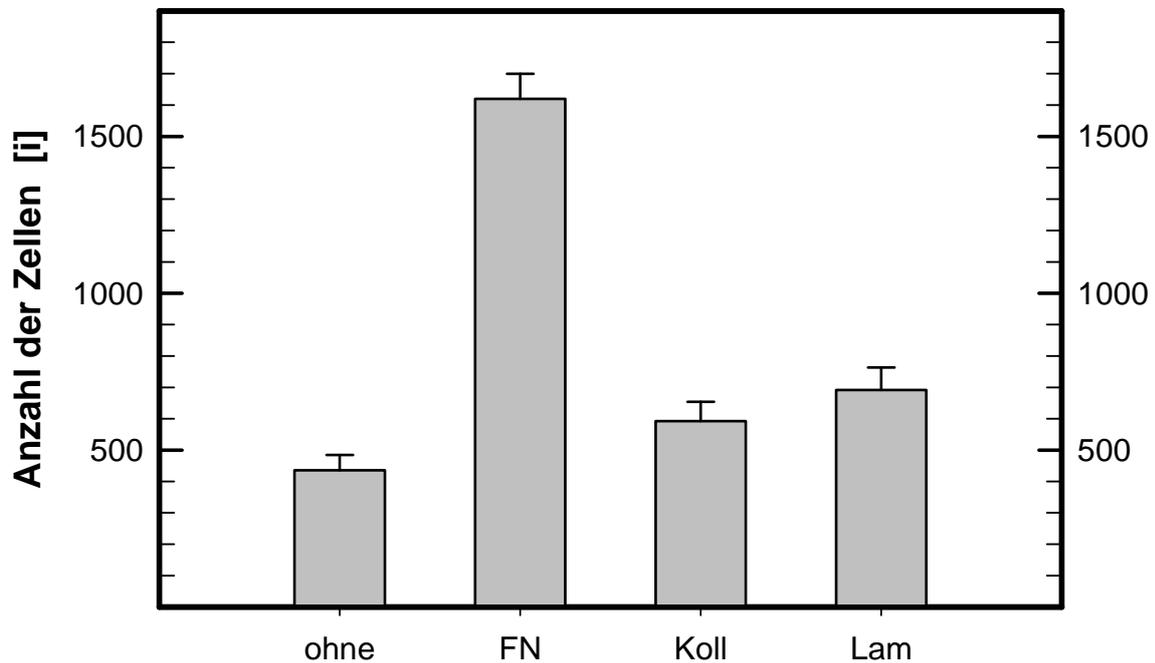


Abb. 58: Wachstumsvergleiche auf unterschiedlichen Matrices

Die Abbildung dient zur Illustration, es werden alle Werte einer Behandlung zusammengefasst, wohingegen in der Varianzanalyse außerdem noch nach Versuchsansatz differenziert wurde.

#### 4.7.2 Ergebnistabelle der SAS-Routine

Tabelle 12: Beobachtungswahrscheinlichkeiten

(es werden nur vorab geplante Vergleiche bewertet)

p-Wert	unbeschichtet	Fibronectin	Laminin	Kollagen
Fibronectin	0,0001		0,0001	0,0001
Kollagen	0,0400	0,0001	0,3604	
Laminin	0,0013	0,0001		0,3604

P-Werte für den Vergleich der unterschiedlichen Beschichtungen. Als statistisch signifikant wurden Werte von  $< 0,05$  angesehen, als hochsignifikant Werte von  $< 0,001$ .

Aus der Varianzanalyse, in der Nährboden und Primärzellkultur als feste Faktoren berücksichtigt wurden, ergab sich, dass jede der Beschichtungen im Vergleich zu den unbeschichteten Platten zu einem signifikant besseren Wachstum der Zellen führte (siehe Tabelle 12). Außerdem unterschieden sich das Zellwachstum nach Beschichtung mit Fibronectin signifikant von der Beschichtung mit Kollagen IV und Laminin, die ihrerseits nicht signifikant verschieden ausfielen (p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen).

## **4.8 Proteinnachweis mittels Immunhistochemie**

### **4.8.1 $\beta_1$ -Integrin**

Das Verteilungsmuster der Immunhistochemiefärbung gegen den  $\beta_1$ -Integrinantikörper verdeutlicht die Ergebnisse der Immunfluoreszenz (Abb. 59). Das maternale Epithel zeigt eine starke Färbung, welche sich hauptsächlich gegen die Basalmembran richtet. Die Färbung der fetalen Epithelzellen ist als mittelgradig zu beschreiben, wobei sich die TGC deutlich hervorheben. Sowohl im maternalen als auch im fetalen Stroma findet man mittelgradig angefärbte Gefäßendothelien. In den drei untersuchten Trächtigtkeitsstadien – dritter, sechster und neunter Monat – lässt sich kein Unterschied im Farbverteilungsmuster ausmachen.

### **4.8.2 FAK**

FAK zeigt ein dem  $\beta_1$ -Integrin sehr ähnliches Färbemuster (Abb. 60). In den späteren Trächtigtkeitsmonaten entspricht es den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz. Die TGC zeigen eine sehr starke zytoplasmatische Färbung, die maternalen Epithelzellen sind von einer mittleren Anfärbung, welche sich in Richtung der Basalmembran verstärkt. Das fetale Stroma ist bis auf ganz leichte Signale an den Gefäßendothelien negativ, das maternale Stroma ist homogen leicht angefärbt und zeigt deutlich positive Gefäßendothelien. Die fetalen Epithelzellen weisen im Gegensatz zur Immunfluoreszenz eine leichte Färbung auf. Ein weiterer Unterschied zur Immunfluoreszenz ist in den früheren Trächtigtkeitsstadien zu erkennen. Im dritten Monat ist das maternale Epithel schon leicht angefärbt, die Reaktion fällt jedoch um einiges schwächer aus als in den späteren Trächtigtkeitsmonaten.

### 4.8.3 Talin

Auch das Verteilungsmuster von Talin entspricht größtenteils dem von  $\beta_1$ -Integrin und den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz (Abb. 61). Das stärkste Signal findet sich zur Basalmembran gerichtet an den maternalen Epithelzellen. Das maternale Stroma ist homogen leicht angefärbt, die Gefäßendothelien jedoch weisen ein mittelgradiges Signal auf. Das fetale Stroma ist bis auf die Signale der Gefäßendothelien negativ. Das fetale Epithel ist gleichmäßig leicht angefärbt, die TGC setzen sich aber massiv ab. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz finden sich in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien Anfärbungen der TGC, jedoch sind diese im dritten Monat sehr viel schwächer, als in späteren Versuchen. Die starke Fluoreszenz bei TGC, welche gerade in das maternale Epithel migrieren, ist in der Immunhistochemie nicht darstellbar.

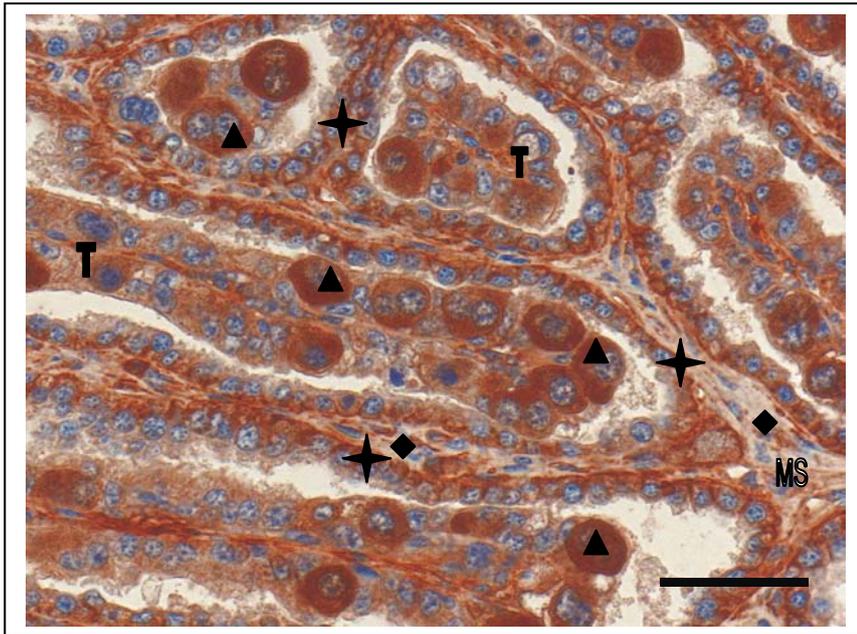


Abb. 59.  $\beta_1$ -Integrin, Paraffinschnitt, Messbalken 50 $\mu$ m.  
Die TGC (Dreieck) zweier quer getroffener und zweier längs getroffener Zotten sind stark angefärbt, wobei sich die Basalmembranen (Stern) deutlich hervorheben. Im maternalen Stroma sind die Gefäßwände (Raute) ebenfalls rotbraun gefärbt.

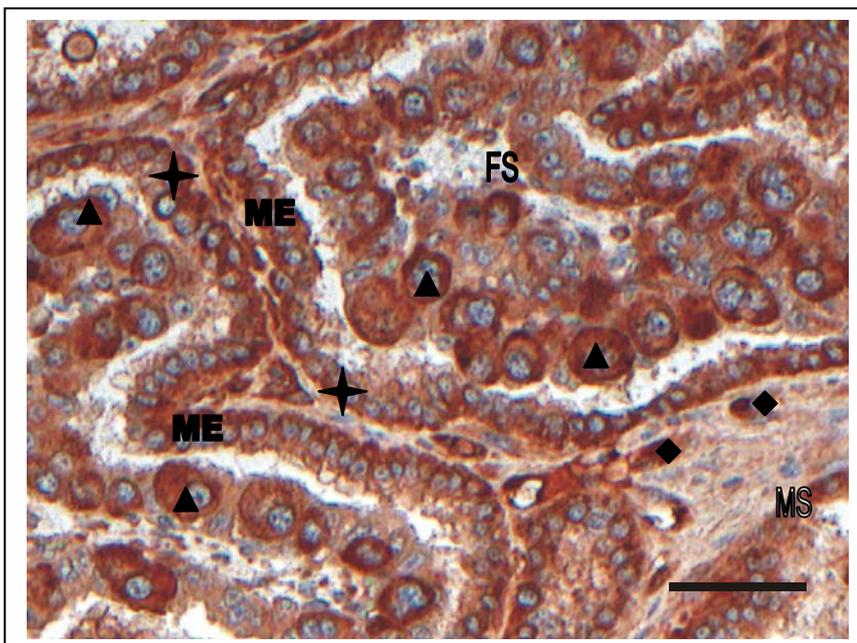


Abb. 60. FAK, Paraffinschnitt, Messbalken 50 $\mu$ m  
Die TGC (Dreieck) zweier quer getroffener Zotten, das maternale Epithel, hauptsächlich entlang der Basalmembran (Stern) und das Endothel (Raute) der Gefäße im maternalen Stroma sind stark positiv.

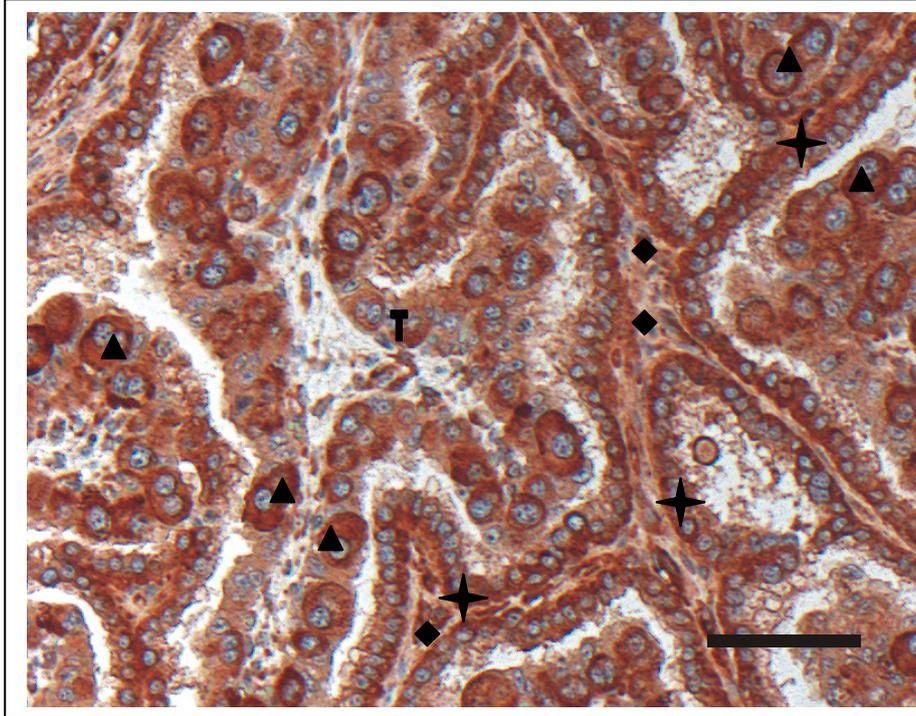


Abb. 61. Talin, Paraffinschnitt, Messbalken 100 $\mu$ m  
Die TGC (Dreieck) und das maternale Epithel in Richtung der Basalmembran (Stern) zeigen ein deutliches Signal. Das fetale Epithel und die Endothelien (Raute) des maternales Stroma sind mittelgradig angefärbt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodische Aspekte: Einfluss der Kryokonservierung auf die Zelldifferenzierung

Um standardisierte Versuchsbedingungen für die Experimente der vorliegenden Arbeit aber auch für weitere Studien mit den isolierten primären Karunkelepithelzellen zu schaffen, wurde nach einer Methode gesucht, die Zellen zu konservieren. Da idealerweise Zellen jeder Passage konserviert werden können und später zu jedem gewünschten Zeitpunkt ausgesät werden können, lassen sich Versuchsmodelle somit Zeit unabhängig gestalten. Eine gängige Methode ist die Kryokonservierung. Diese Form der Konservierung kann allerdings bei manchen Zellen zu starken Veränderungen im Sinne von Zellalterung oder Dedifferenzierung führen, so dass diese nicht mehr als repräsentativ angesehen werden können (Freshney, 2000a). Für die Karunkelepithelzellkultur tragender Rinder der vorliegenden Studie wurde eine Einfriermethode verwendet, welche im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg als Standard für unterschiedlichste Zellkulturen gilt (Poltermann, 2006). Weil Zellen für Dedifferenzierung und Alterung besonders anfällig sind, wenn sie bei einer höheren Temperatur als  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden (Freshney, 2000a), wurde die vorliegende Karunkelepithelzellkultur bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass es die in dieser Arbeit angewandte Kryokonservierung zu keiner signifikanten Zellveränderung führte. Sollte eine dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgen, wäre es sinnvoll die gefrorenen Zellen noch kälter zu Lagern, sie zum Beispiel in flüssigen Stickstoff zu überführen.

Bei der Entwicklung der Primärkultur boviner Karunkelepithelzellen aus dem trächtigen Uterus wurde neben der morphologischen Untersuchung des Phänotyps im inversen Mikroskop der Nachweis spezifischer Zytoskelettbestandteile in den isolierten beziehungsweise kultivierten Zellen zur Charakterisierung herangeführt (Zeiler, 2006). Die Ergebnisse dieser Methode gelten als eindeutiger Indikator für die Differenzierung und Abstammung von Zellen (Willers et al., 1990; Moll, 1993; Wang et al., 2000).

Dieselbe Methode wurde nun in dieser Arbeit angewendet um zu zeigen, dass sich die Zellen durch die Kryokonservierung im Gegensatz zu den nativen Zellen nicht merklich verändern. In der Rinderplazenta finden sich  $\alpha$ -sm Aktin und Desminfilamente in glatten Muskelzellen, Vimentinfilamente in Zellen mesenchymaler Herkunft (insbesondere Zellen des Bindegewebes) und Zytokeratinfilamente in Epithelzellen (Krebs et al., 1997; Pfarrer et al.,

2003; Lang et al., 2004; Pfarrer, 2006).  $\alpha$ -sm Aktin, Desmin und Zytokeratin wurden für den Vergleich nativer mit kryokonservierten Zellen herangezogen und als weiteres Kriterium wurde die Fibronektinproduktion der beiden Zellproben verglichen. Durch das parallele Aussäen einer zuvor tiefgefrorenen und einer nativen Probe aus derselben Isolation wurde gewährleistet, dass sich so wenige konservierungsunabhängige Zellunterschiede als möglich in den Kulturen befanden. Für die Versuche wurden größtenteils nicht rinderspezifische Antikörper verwendet, was jedoch aufgrund der großen Homologie der Filamente vernachlässigt werden kann (Zeiler, 2006). In den vergleichenden Immunfluoreszenzbildern konnte kein Unterschied zwischen nativen und kryokonservierten Zellen in der Expression von  $\alpha$ -sm Aktin, Desmin, Zytokeratin oder Fibronektin beobachtet werden.

Der wichtigste Zytoskelettbestandteil für die Zelldifferenzierung von Epithelzellen ist das Zytokeratin, welches ausschließlich in Epithelzellen vorkommt und deshalb als Marker für Epithelzellen verwendet werden kann (Lodish et al., 2004). Bei der Untersuchung auf Vimentin fällt auf, dass auch die Epithelzellen, welche in vivo kein Vimentin exprimieren, ein schwach positives Signal zeigen. Es handelt sich hierbei um ein bekanntes Phänomen, welches beschreibt, dass sich Epithelzellen bei Kultivierung Vimentin aneignen (Bergh et al., 1984; Regauer et al., 1985; Greenburg und Hay, 1988; Willers et al., 1990; Hunt und Davis, 1990; Vinatier, 1995; Wang et al., 2000; Lim et al., 2002). Auch bei Primärzellkulturen placentärer Epithelzellen ist Tierart übergreifend bekannt, dass sie in vitro neben Zytokeratin auch Vimentin exprimieren. Diese Tatsache darf aber nach dem heutigen Stand der Wissenschaft toleriert werden (Classen-Linke et al., 1997; Galabova-Kovacs et al., 2004). Aufgrund der Ergebnisse der Immunfluoreszenz kann davon ausgegangen werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den nativen und den tiefgefrorenen Zellen besteht. Beide haben ihre charakteristischen Intermediärfilamente und ihre Fähigkeit zur Fibronektinsekretion beibehalten, so dass beide als gleichwertig angesehen werden können. Unterstützend für diese Schlussfolgerung ist die Tatsache, dass es sich bei der Kryokonservierung um eine gängige Methode handelt, die von vielen anderen Forschungsgruppen angewendet wird (Mattson und Rychlik, 1990; Borderie et al., 1998; Poltermann, 2006; Reuther et al., 2006; Sundlisaeter et al., 2006). Des Weiteren zeigten Murakami et al. (2003), dass während des frühen Zyklus des Rindes die Uterusepithelzellen bezüglich Passage und Einfrieren zwar empfindlicher sind als die Stromazellen, es jedoch zu keiner signifikanten morphologischen oder physiologischen Veränderungen durch Kryokonservierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kommt.

## 5.2 Funktionalität der Integrinbindung

Durch die Darstellung der Kolo-kalisation der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit verschiedenen für die Signalübertragung wichtigen Hilfsmolekülen und ihrer Lokalisierung in Fokalkontakten konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die Integrine in den kultivierten Karunkelepithelzellen nicht nur exprimiert werden sondern auch funktionell aktiv sind und so durch „inside-out-“ und „outside-in-signaling“ an der Signalübertragung zwischen den Zellen und der ECM teilnehmen.

In der Embryonalentwicklung und der Plazentation spielt die Interaktion von Integrinen mit der ECM bekannter Maßen eine wichtige Rolle (Fisher und Damsky, 1993; Lessey et al., 1996; Fazleabas et al., 1997; Coutifaris et al., 1998; Johnson et al., 2001; MacIntyre et al., 2002; Pfarrer et al., 2003). Um besseren Einblick in die fetomaternale Kommunikation der Rinderplazenta zu erlangen, wurde eine Primärzellkultur aus dem Karunkelepithel tragender Rinder entwickelt. In diesen Epithelzellen wurden mittels Immunfluoreszenz die Integrinuntereinheiten  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$ , und  $\beta_1$  entlang der Zell-zu-Zell Kontakte lokalisiert (Zeiler, 2006). Es gilt allerdings zu bedenken, dass Integrine, welche nicht an ECM-Liganden gebunden sind und nicht mit dem Aktinzytoskelett in Kontakt stehen, diffus über der Zelloberfläche verteilt sind (Ruoslahti, 1991). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Integrine in der untersuchten Zellkultur exprimiert, aber nicht aktiviert wurden (siehe unten). Weiterhin könnten die detektierten Signale entlang der Zell-zu-Zell Kontakte das Ergebnis einer Fehleinschätzung der Immunfluoreszenz durch die zweidimensionale Betrachtungsweise sein. Durch Aufsicht auf das Zellkulturpräparat wird die laterale Zellmembran quer getroffen und so Integrine übereinander projiziert, so dass diese an den Zell-zu-Zell Kontakten konzentrierter erscheinen als sie in Wirklichkeit vorliegen. Diese Vermutungen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels zweier verschiedener Darstellungen widerlegt. Einerseits konnten am Zellboden die typischen fokalen Adhäsionsplaques, welche die Integrine in den Fokalkontakten bilden, dargestellt werden und andererseits ist es gelungen, die Kolo-kalisation der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit ihren Signalproteinen  $\alpha$ -Aktinin, FAK, PT und Talin darzustellen, was auf eine gleichzeitige Integrinaktivierung schließen lässt.

Integrine unterscheiden sich in zwei elementaren Punkten von allen anderen bisher bekannten Membranproteinen. Erstens binden sie mit einer sehr geringen Affinität an ihre Liganden und kommen dafür aber in der 10 bis 100fachen Menge, verglichen mit anderen

Membranrezeptoren, vor (Alberts et al., 2004a) und zweitens liegen sie in unterschiedlichen Aktivierungsstadien vor. Im sogenannten „low-affinity“-Status, in welchem sich Integrine normalerweise befinden (Lollo et al., 1993; Faull et al., 1994) kann kein Ligand gebunden werden. Verantwortlich für den inaktiven Status sind die proximalen Anteile der Heterodimeruntereinheiten. Mutationen in diesen Bereichen können zu einer dauerhaften Aktivierung der Integrine führen (Hughes et al., 1996). Im Bereich der Basalmembran besteht eine Salzbrücke, welche die proximalen Anteile der Integrinuntereinheit  $\beta$  und der Integrinuntereinheit  $\alpha$  miteinander verbindet. Zur Aktivierung muss diese Verbindung gelöst werden, damit sich die beiden Schwänze voneinander trennen können. Dieser Effekt tritt zum Beispiel ein, wenn das Talin-Molekül an die  $\beta$ -Untereinheit bindet (Takagi et al., 2001; Vinogradova et al., 2002; Humphries et al., 2003; Garcia-Alvarez et al., 2003). Durch die Trennung der proximalen Anteile kommt es auch zu einer Aufrichtung des Heterodimers in seiner Knieregion. Diese Konformitätsänderung des Integrins führt zur Freilegung der Bindungsstellen für die entsprechenden Liganden. Das Integrin befindet sich jetzt im „high-affinity“-Status (Carman und Springer, 2003; Humphries et al., 2003).

Ohne auf weitere Signalwege über Talin oder seine Stützfunktion durch die direkte Aktinbindung (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996) einzugehen, kann demnach geschlossen werden, dass die Kollokalisierung einer  $\beta$ -Untereinheit mit dem Talin-Molekül in der vorliegenden Kultur boviner Karunkel epithelzellen auf den „high-affinity“-Status des Integrins hinweist.

Aktuelle Studien belegen eine sechsfach höhere Bindungsaffinität des Talinkopfes an die Integrinuntereinheit  $\beta_3$  im Vergleich zur Bindungsaffinität des ganzen Talinmoleküls (Yan et al., 2001; Martel et al., 2001). Beim Talinmolekül handelt es sich um ein antiparallel angeordnetes Heterodimer, in dessen Kopfbereich die Hauptbindungsstellen liegen (Calderwood et al., 1999; Patil et al., 1999; Critchley, 2000; Pearson et al., 2000; Yan et al., 2001; Calderwood et al., 2002). Das Talinmolekül kann in verschiedenen Formen vorliegen. Im inaktiven Heterodimer sind die Hauptbindungsstellen durch den jeweils antiparallelen Strang verdeckt. Durch eine Streckung können diese freigelegt und aktiviert werden. Es besteht auch die Möglichkeit einer Spaltung des Heterodimers in Monomere. Im Monomer wiederum sind die Bindungsstellen durch den Molekülschwanz verdeckt und es muss zu einer Abspaltung des Talinkopfes kommen, damit das Molekül aktiviert wird (Yan et al., 2001; Martel et al., 2001). Der in der aktuellen Studie verwendete Talinantikörper reagiert nur mit dem ganzen Talinmolekül beziehungsweise mit dem Talinschwanz, nicht aber mit dem Talinkopf. Für die untersuchte Integrinuntereinheit  $\beta_1$  ist das jedoch ausreichend, da der

Talinkopf hauptsächlich an die hier nicht untersuchte Integrinuntereinheit  $\beta_3$  bindet, wohingegen das aktivierte Talinheterodimer eine große Rolle bei der Bindung von Integrin  $\beta_1$  spielt (Yan et al., 2001; Martel et al., 2001). Damit konnte mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper durch Doppelmarkierung die Kolo­kalisierung der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit dem Talinmolekül gezeigt werden, was darauf schließen lässt, dass die typischen fluoreszierenden Strukturen fokale Adhäsionskomplexe sind und damit ein „inside-out-signaling“ in der in vitro Kultur von Karunkelepithelzellen aus dem Rinderplazentom stattfindet. Die Integrinrezeptoren, welche die Untereinheit  $\beta_1$  enthalten und in der Zellkultur exprimiert werden, können demnach in diesem Punkt der in vivo Situation gleichgesetzt werden.

Neben Talin konnte auch die Kolo­kalisierung von FAK mit der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  und PT dargestellt werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Integrine in der Karunkelepithelzellkultur des tragenden Rindes auch am „outside-in-signaling“ teilnehmen. Da den Integrinen eine eigene Tyrosinkinaseaktivität fehlt, sind sie bei der Leitung von Signalen in das Innere der Zelle auf die Hilfe von Signalmolekülen angewiesen (Schaller und Parsons, 1994b). Die bekanntesten Integrinsignalwege erfolgen über die FAK (Parsons, 2003), welche direkt nach der Ligandenbindung im Zytoplasma der Zelle an die Integrine bindet und dort tyrosinphosphoryliert wird (Miyamoto et al., 1995). Von dieser Grundaktivierung aus können nun verschiedene Signalkaskaden initiiert werden, die zum Beispiel über Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3-K), Paxillin und die G-Proteine Ras, oder Rac das Zellüberleben, die Zellproliferation, die Genexpression und Zellmigration beeinflussen (Vuori, 1998). Durch den Nachweis der Kolo­kalisierung der  $\beta_1$  Integrinuntereinheit mit FAK und der von FAK mit PT konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass die Informationsübertragung in das Innere der Zelle durch Integrine in der Primärzellkultur boviner Karunkelepithelien funktioniert. Für humane Dezidualzellen wurde die Expression und Funktion von FAK mittels derselben Methode, also der Doppelmarkierung von FAK mit PT, Talin und Integrinuntereinheit  $\beta_1$ , belegt (Shiokawa et al., 1998).

Der Nachweis der Kolo­kalisierung der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit PT könnte nicht als Beweis für die Aktivierung der Integrine geltend gemacht werden. Nur die Tyrosinphosphorylierung von FAK führt tatsächlich zur Signalkaskade; eine Bindung von PT an die Integrine hingegen reduziert die Zelladhäsion durch Ablösung von den Fokalkontakten und ist damit ihrerseits wichtig für die Zellmigration (Johansson et al., 1994; Miyamoto et al., 1995; Sakai et al.,

1998; Datta et al., 2002). Bei der direkten Bindung von Phosphotyrosin an die Integrine wird die Talinbindungsstelle verwendet, und somit eine Hemmung der Talinbindung erreicht (Tapley et al., 1989). Weil es sich bei den Karunkelepithelzellen nicht um migrierende Zellen handelt, ist es nicht verwunderlich, dass an den Fokalkontakten der vorliegenden kultivierten Karunkelepithelzellen des Rindes keine Kolokalisation der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit PT nachgewiesen werden konnte. An den lateralen Zell-zu-Zell Kontakten hingegen ließ sich sogar darstellen, dass die Moleküle nicht direkt aufeinander, sondern deutlich nebeneinander exprimiert werden.

Interessant in diesem Zusammenhang sind die *in vivo* Ergebnisse dieser Arbeit. Während die migrierenden TGC deutlich PT jedoch kein Talin exprimieren, konnten in den mononukleären Trophoblastzellen deutliche Talinsignale detektiert werden. FAK zeigt im Chorion in den jungen TGC eine zytoplasmatische Färbung, wohingegen in den reiferen TGC, welche zum mütterlichen Epithel migrieren eine Membranständige Reaktion zu erkennen ist. TGC sind die einzigen fetalen Zellen, welche FAK exprimieren. Die FAK Expression ist deutlich abhängig von der Phase der Gestation, die Karunkelzellen zeigen erst ab der Mitte der Trächtigkeit ein Signal, FAK scheint demzufolge in den Maturationsprozeß des Plazentoms involviert zu sein.

Auch für  $\alpha$ -Aktinin konnte eine Kolokalisation mit der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  in der *in vitro* Kultur von bovinen Karunkelepithelien nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann als Bestätigung für die beiden zuvor getroffenen Aussagen gewertet werden, weil  $\alpha$ -Aktinin innerhalb der Fokalkontakte mehrere Funktionen erfüllt. Es dient als Gerüstmolekül, da es Integrinrezeptoren mit dem Aktinzytoskelett verbindet, kann aber durch Bindung von Signalmolekülen in das „outside-in-signaling“ mit einbezogen sein (Pavalko et al., 1995; Kansas und Pavalko, 1996; Rajfur et al., 2002).

Allerdings konnte  $\alpha$ -Aktinin im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Molekülen nicht in den Fokalkontakten zum Zellboden hin dargestellt werden, wodurch sich die Frage stellt, ob es sich bei dem gefundenen Signal um eine Fehleinschätzung auf Grund der zweidimensionalen Projektionsebene handelt und somit die Fluoreszenzreaktionen, die an den Zell-zu-Zell Grenzen, also apikal-lateral dargestellt werden können, konzentrierter erscheinen als sie in Wirklichkeit vorliegen. Diese Vermutung ist nicht sehr wahrscheinlich, denn wenn man die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz der Signalmoleküle *in vivo*, also in Gewebeschnitten von Plazentomen betrachtet, stellt sich heraus, dass  $\alpha$ -Aktinin am maternalen Epithel nur apikal und in den apikalen Anteilen der lateralen Zellgrenzen der

polarisierten Epithelzellen lokalisiert ist. Dieselbe in vivo Lokalisation lässt sich auch mittels Elektronenmikroskopie nachweisen (Lang et al., 2004). Auch bei Schaf und Schwein konnte eine apicale  $\alpha$ -Aktinin-Integrinbindung sowohl im endometrialen Epithel als auch in Zellkulturen von Epithel und trophektodermalen Zellen nachgewiesen werden (Johnson et al., 2001; Garlow et al., 2002) Im Gegensatz dazu wurden alle weiteren untersuchten Proteine hauptsächlich basal am maternalen Epithel exprimiert. Es ist also zu vermuten, dass die durch das  $\beta_1$ -Integrin ausgelösten intrazellulären Reaktionen am Zellboden der Epithelzellkultur nicht über  $\alpha$ -Aktinin ablaufen. Da apikal in vitro kein Kontaktpartner zur Verfügung steht, beschränkt sich die Kommunikation in der Zellkultur auf benachbarte Zellen, was die Lokalisation von  $\alpha$ -Aktinin an den Zell-zu-Zell Kontakten erklären würde.

Bei der Darstellung von Talin und FAK in den kultivierten Karunkelepithelzellen des Rindes fällt auf, dass es nur innerhalb der Epithelzellkolonien zu einer Kolo-kalisation der beiden Moleküle kommt. Im Randbereich der Kolonien hingegen finden sich einzelne Plaques in denen Talin unabhängig von FAK exprimiert wird. Dieser Befund lässt vermuten, dass es sich in diesem Bezirk um sehr frühe Fokalkontakte handelt, in denen die Integrine durch Talin in ihren Aktivzustand versetzt werden aber noch kein „outside-in-signaling“ über FAK stattfindet. Das entspricht der Vorstellung einer aktuellen Studie, die davon ausgeht, dass Talin eine besonders wichtige Rolle in der frühen Phase der Fokalkontakte spielt, indem es als Antwort auf Krafteinwirkung die Fokalkontakte initiiert und zu deren Stabilisation beiträgt (Giannone et al., 2003).

### **5.3 Einfluss spezieller Beschichtungen auf das Zellwachstum sowie die Integrin- und Signalmolekülexpression**

In natürlichen Geweben befinden sich Epithelzellverbände grundsätzlich auf einer Basallamina, die eine spezielle Form der extrazellulären Matrix, einem Netzwerk aus Makromolekülen darstellt. Es ist bekannt, dass sich ECM-Proteine, wie Kollagen, Laminin und Fibronectin, und die darauf gebetteten Zellen gegenseitig beeinflussen. Einerseits werden die speziellen ECM-Proteine von den Zellen sezerniert, andererseits ist die ECM essentiell für Überleben, Form, Entwicklung, Polarität und Verhalten der Zellen. Die wichtigsten ECM-Proteine in der Basallamina sind Kollagen IV und Laminin (Alberts et al., 2004b). Es ist eine universell gängige Methode Zellkulturen auf mit Matrices beschichteten Unterlagen auswachsen zu lassen, um die Zelladhäsion zu steigern und damit das Zellwachstum zu beschleunigen. Es stellte sich nun die Frage, ob die entwickelte Primärzellkultur boviner Karunkel epithelien auf unterschiedlichen Matrixbeschichtungen besser anwachsen beziehungsweise sich schneller vermehren würde.

Es zeigte sich, dass Primärzellkulturen boviner Karunkel epithelien auf beschichteten Unterlagen signifikant besser proliferierten als auf unbeschichteten Zellkulturschalen. Dabei war das Zellwachstum auf der Fibronectinbeschichtung signifikant besser als auf den mit Kollagen IV oder Laminin beschichteten Zellböden.

Die Beschichtungen erfolgten mit bovinem Kollagen IV isoliert aus Plazentazotten, mit Laminin aus der humanen Plazenta und bovinem Fibronectin, welches aus Plasmazellen isoliert wurde.

Prinzipiell war das Zellwachstum auf allen drei Matrices besser als auf der unbeschichteten Vergleichsplatte. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da viele Zelltypen auf beschichteten Unterlagen durch eine leichtere Adhäsion zu einem schnelleren Wachstum kommen. Selbst eine leichte Abnutzung der Gefäße und damit eine Aufrauung der Oberfläche führt bekannter Weise zu einem besseren Zellwachstum (Freshney, 2000b). Am besten ist die Adhäsion von Zellen, wenn sich zum Zeitpunkt der Zellaussaat schon ein biologisches Gewebe auf der Unterlage befindet. Wenn zum Beispiel bereits Zellen, sogenannte „feeder cells“ in einem Zellkulturgefäß angewachsen sind, ist die zweite Aussaat sehr viel effektiver als wenn dieselben Zellen auf ein frisches Zellkulturgefäß aufgetragen werden (Puck et al., 1955; Rexroad und Powell, 1997). Derselbe Effekt wird erzielt, wenn man die Unterlage mit Matrixprodukten wie Fibronectin oder Kollagen beschichtet (Crouch et al., 1987). Von Epithelzellen ist bekannt, dass sich ihre Adhäsionseigenschaften besonders durch das

Kollagen verbessern, von Brustdrüsenepithelzellen ist zum Beispiel nachgewiesen worden, dass ihre morphologische Entwicklung sogar stärker durch das Kollagen, als durch laktogene Hormone beeinflusst wird (Burwen und Pitelka, 1980; Berdichevsky et al., 1992). Aber auch das Laminin ist für seine adhäsionsfördernden Eigenschaften gerade bei Epithelzellen bekannt (Freshney, 2000b).

Die Beschleunigung des Zellwachstums von kultivierten Karunkelepithelzellen des trächtigen Rindes war laut der aktuellen Studie bei Fibronectin signifikant besser als bei Kollagen IV und Laminin. Das Ergebnis ist in sofern erstaunlich, als das Kollagen IV und Laminin zu jeder Zeit der Gravidität des Rindes in der Basallamina und dem unterliegenden Stroma enthalten sind (MacIntyre et al., 2002; Pfarrer et al., 2003). Deshalb sollte man davon ausgehen, dass das Vorhandensein dieser ECM-Proteine für ein Zellwachstum notwendig ist und Zellen, die auf einer unbeschichteten Platte auswachsen diese Proteine erst sezernieren müssen, bevor es zu einem normalen Zellwachstum kommen kann. In der frühen Entwicklung der Basallamina ist allerdings kaum Kollagen IV enthalten, sondern vorwiegend Laminin vorhanden (Alberts et al., 2004b). Diese Tatsache könnte bei der in vitro Situation von Bedeutung sein, da sich dort unabhängig von dem Graviditätsstatus, in welchem die Zellisolation stattgefunden hat, eine ECM neu bilden muss.

Eine aktuelle Studie aus unserer Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass diese spezielle Karunkelepithelzellkultur trächtiger Rinder beim Wachsen auf einer unbeschichteten Unterlage lediglich Laminin und Fibronectin, nicht aber Kollagen IV produziert (Zeiler, 2006). Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass das Vorhandensein des ECM-Proteins Kollagen IV auf der Zellunterlage zu einem schwächeren Adhäsionsvorteil und damit geringerem Wachstumsfortschritt führt als die gleiche Beschichtung mit Fibronectin.

Die Primärzellkultur boviner Karunkelepithelien ist allerdings in der Lage Laminin zu produzieren (Zeiler, 2006) und dennoch führt die Lamininbeschichtung nicht zu einem ähnlich starken Zellwachstum wie die Beschichtung mit Fibronectin. Die Tatsache, dass zur Beschichtung nicht bovines sondern humanes Laminin verwendet wurde, kann hier als Ursache ausgeschlossen werden, weil Laminin kein speziesspezifisches Protein ist. Bemerkenswert ist das unterschiedliche Zellwachstum auf Laminin und Fibronectin im Zusammenhang mit einer neueren Studie, laut derer die Anheftung und das Wachstum des bovinen Embryos, im Gegensatz zu Mensch und Maus, nur über Fibronectin, nicht aber über Laminin reguliert wird. In einem in vitro Versuch hefteten sich bovine Blastozysten auf

Fibronectin nicht aber auf Laminin an und wuchsen aus (Takahashi et al., 2005).

Betrachtet man die hauptsächlichen Lamininrezeptoren  $\alpha_6$  und  $\beta_1$  stellt sich aber heraus, dass die Expression der beiden im Verlauf der Gravidität zunimmt und zum Zeitpunkt der Implantation moderat erscheint (MacIntyre et al., 2002).

Sowohl das Signal der  $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$  und  $\alpha_v$  als auch das der  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta_3$  und  $\beta_5$  wanderten aus den maternalen Stammsepten in die Wachstumszone der Septenspitzen. Des Weiteren lokalisierte sich das  $\beta_1$ -Signal, das zu Beginn der Trächtigkeit im gesamten maternalen Stroma auftrat, ab dem 150. Tag auf die Basalmembranen von Epi- und Endothelien (Pfarrer et al., 2003). Vergleicht man diesbezüglich die entsprechenden Lamininrezeptoren  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$  sowie die Fibronectinrezeptoren  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  (Ruoslahti, 1991; Bosman, 1993) lässt dieser Fund nicht erklären, warum die Lamininbeschichtung einen schwächeren Einfluss auf das Zellwachstum hat als die Fibronectinbeschichtung.

Auffälliger Weise kommt der Integrinrezeptor  $\alpha_6\beta_1$  in der Karunkel epithelzellkultur und auch in den in vivo Verhältnissen des bovinen Uterus nicht nur an den Stellen vor, an denen auch Laminin exprimiert wird, sondern auch an den Zell-zu-Zell Grenzen (Zeiler, 2006). Wie schon zuvor erwähnt muss auch hier die zweidimensionale Darstellungsweise als Ursache in Betracht gezogen werden, es ist dennoch wahrscheinlich, dass an diesen Stellen eine Verbindung zu anderen Liganden besteht. Dafür kommen ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease), Fertinin und Meltrin  $\gamma$  in Frage (Nath et al., 2000).

Auch bei der Betrachtung der durch Immunfluoreszenz dargestellten Moleküle Integrinuntereinheit  $\beta_1$ ,  $\alpha$ -Aktinin, PT und Talin konnten beschichtungsbedingte Veränderungen dargestellt werden. Bei der Expression der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  und der Signalmoleküle zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Wachstumsvergleichen. Sämtliche getesteten Moleküle zeigen sich in der Immunfluoreszenz nach Wachstum auf der Fibronectinbeschichtung mit einem deutlich stärkeren Signal als auf der unbeschichteten Vergleichsplatte. Es sind allerdings bis auf die Untersuchungen des Talins keine signifikanten Unterschiede zwischen der unbeschichteten Unterlage zu den Beschichtungen mit Kollagen IV und Laminin zu erkennen. Es ist zu vermuten, dass entsprechend den Ergebnissen des Zellwachstums auch im Vergleich zu den Beschichtungen mit Kollagen IV und Laminin Veränderungen auftreten (Burrige et al., 1988), welche allerdings durch die qualitative Methode nicht detektiert werden konnten. Bekannter Weise gibt es Epithelzellkulturen, welche bestimmte Zellfunktionen nur ausüben können, wenn sie auf kollagenbeschichteten

Unterlagen auswachsen (Freshney, 2000b). Die hier verwendete Primärzellkultur zeigt zumindest in der Expression der untersuchten Proteine keine grundsätzlichen Veränderungen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Karunkelepithelzellen auf unbeschichteter Unterlage, zumindest im Bereich des Integrin-Matrix-Kontaktes, ihre ursprünglichen Eigenschaften besitzen.

An den Zell-zu-Zell Kontakten zeigte sich eine Verstärkung des  $\alpha$ -Aktinin Signals auf Fibronectin. Die Beschichtung mit Kollagen IV und Laminin konnte keine sichtbare Veränderung erzeugen. Bei PT und der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  konnte keine Veränderung an den Zell-zu-Zell Kontakten detektiert werden.

Bei der Darstellung der Fokalkontakte durch die Integrinuntereinheit  $\beta_1$ , PT und Talin kam es nicht nur zu einem stärkeren Signal sondern auch zu einer deutlichen Vermehrung der Fokalkontakte innerhalb der Zellkultur auf Fibronectinbeschichtung. Während bei der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  und bei PT die Beschichtungen mit Kollagen IV und Laminin zu keiner Veränderung führten, zeigte sich bei Talin auch bei diesen beiden Beschichtungen eine Vermehrung der FA.

Prinzipiell handelte es sich bei der Beurteilung der Expressionsstärke mittels Immunfluoreszenz um eine rein qualitative Methode, weshalb kleinere Veränderungen nicht erkannt werden können. Betrachtet man die statistische Auswertung der Zellauszählung, so sind die Unterschiede zwischen den unbeschichteten Platten im Vergleich mit Kollagen IV- und Lamininbeschichtung deutlich geringer als die zwischen den unbeschichteten Platten im Vergleich zur Fibronectinbeschichtung. Es ist anzunehmen, dass auch bei der Immunfluoreszenz ähnliche Veränderungen auftreten, die aber, da Immunfluoreszenz und -histochemie aus methodischen Gründen nicht zu quantifizieren sind, nicht detektiert wurden. Das Signal der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  entlang der lateralen Zell-zu-Zell Kontakte ist auch ohne Beschichtung schon so stark, dass keine Vergleichsmöglichkeit zu den beschichteten Platten besteht.

Betrachtet man die Darstellung der Fokalkontakte durch Talin, so zeigt sich eine deutliche Vermehrung der Fluoreszenzsignale bei der Beschichtung mit Fibronectin, welche aber auch bei den Beschichtungen mit Kollagen IV und Laminin mit der statistischen Zellvermehrung korrelierte.

Da Integrine hauptsächlich als Transmembranrezeptoren für Proteine der ECM (Parise und

Phillips, 1986) wie Kollagen, Fibronectin und Laminin (Horwitz et al., 1985) dienen und eine besondere Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung spielen (Hughes und Pfaff, 1998), entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Die Tatsache, dass bei der Darstellung von PT und der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  auf den Beschichtungen mit Kollagen IV und Laminin keine Vermehrung zu erkennen ist, sollte durch eine genauere Messmethode noch einmal überprüft werden.

Es ist bekannt, dass es nach einem Kontakt von der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit Fibronectin innerhalb kürzester Zeit zu einer Tyrosinphosphorylierung von FAK kommt, Abedi und Zachary stellen daher die These auf, dass FAK besonders in dieser Signalkette von Bedeutung ist (1995). Diese These wird durch die Befunde der vorliegenden Arbeit unterstützt, da in der *in vitro* Kultur boviner Karunkelepithelzellen ein überdurchschnittlich starker Anstieg der Fokalkontakte, durch PT dargestellt, auf Fibronectinbeschichtung festgestellt wurde.

## 5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Primärzellkultur aus Karunkelepithelzellen des trächtigen Rindes zur Untersuchung der Signalübertragung (Zellkontakte) durch Integrine geeignet ist und des Weiteren auch kryokonserviert werden kann. Anhand dieses Modells lassen sich weiterführende Untersuchungen durchführen.

Um die Untersuchungsergebnisse zu vereinheitlichen und die eventuellen Unterschiede einzelner Isolationen auszuschließen, sollte zukünftig eine Zelllinie entwickelt werden, welche dieselben Eigenschaften der Primärzellkultur aufweist. Parallel dazu wäre es interessant einen Vergleich der Isolationen aus unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien vorzunehmen. Dadurch ließen sich die Ergebnisse bei den Versuchen aus der Zelllinie besser im Zusammenhang beurteilen. Um diesen Isolationsvergleich bewerkstelligen zu können müssten standardisierte Bedingungen geschaffen werden. Zum Beispiel könnten definierte Gewebsmengen der Isolation zugeführt werden und bei der ersten Passage eine ausgezählte Menge an Zellen ausgesät werden, um die Isolationsunterschiede so gering wie möglich zu halten.

Anhand der entstandenen Zellkultur lassen sich des Weiteren Einflüsse von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Toxinen auf Wachstum und Integrinexpression

untersuchen. Dazu sollte allerdings während der Versuche kein FCS verwendet werden, um den Einfluss der Steroide aus dem Kälberserum auszuschließen. Die Untersuchung von hormonellen Einflüssen auf die Karunkelepithelzellen stünde unter direkter klinischer Relevanz, da die Plazenta des Rindes während der Trächtigkeit graviditätsaufrechterhaltende Hormone produziert.

Mittels Disintegrinen und anderen Substanzen, welche die Integrinaktivierung hemmen, könnten Funktionsversuche gemacht werden, um die biologische Wirkung der Integrinaktivierung innerhalb der Zellkultur beurteilen zu können.

Von besonderem Interesse für unsere Forschungsgruppe ist die Etablierung eines Modells, anhand dessen Kontaktstudien zwischen fetalem und maternalem Gewebe gemacht werden können. Dazu soll eine zweite Primärzellkultur aus fetalen Trophoblastzellen etabliert werden. Mittels dieser beiden Zellkulturen besteht die Möglichkeit die feto-maternale Kontaktaufnahme während der Trächtigkeit zu untersuchen. Anstatt die fetale Zellkultur auf einer mit ECM-Molekülen beschichteten Platte auswachsen zu lassen, könnte man sie auf einem Karunkelepithelzellmonolayer aussäen und die interzelluläre Kontaktaufnahme zum Beispiel über Integrine nachweisen. Besonders interessant ist die Fragestellung, ob sich bei einer solchen Kokultur eventuell TGC bilden, und ob diese dieselben Eigenschaften wie in vivo aufweisen. Ein solches Modell könnte Erkenntnisse über die eingeschränkte Migration der TGC beim Rind und Reifungsvorgänge im Karunkelepithel im Hinblick auf die Ablösung der Nachgeburt liefern. Dabei ist es nicht von Interesse eine fetale Zelllinie zu entwickeln, sondern gerade interessant Isolationen aus unterschiedlichen Graviditätsstadien zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit im Hinblick auf die feto-maternale Kontaktaufnahme besteht in der Kultivierung von fetalen Zottenexplantaten auf einer Karunkelepithelzellkultur. Mittels einer Geleinbettung könnten Schnitte gefertigt werden, um den Kontakt der Zelle mit den maternalen Epithelzellen zu untersuchen. Dieses in vitro Modell käme der in vivo Situation sehr nahe und könnte eine Möglichkeit bieten die invasiven Vorgänge besser zu untersuchen. Die Untersuchung der Integrine in diesem Modell wäre selbstverständlich nur ein Teilaspekt.

## 6 Zusammenfassung

Integrine sind eine für die Zelladhäsion wichtige Gruppe von transmembranen Glykoproteinrezeptoren aus nicht kovalenten Heterodimeren, welche einerseits mit der extrazellulären Matrix (ECM) interagieren und andererseits für Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich sind. Es wurde bereits gezeigt, dass Integrine bei der eingeschränkten Trophoblastinvasion der Rinderplazenta von großer Bedeutung sind. Um die Bedeutung der Signalübertragung über Integrine in der bovinen Plazenta genauer untersuchen zu können, wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Primärkultur aus Karunkelepithelzellen etabliert, an der die Integrinuntereinheiten  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_3$  nachgewiesen werden konnten.

Mittels der vorliegenden Arbeit werden drei Zielsetzungen verfolgt. Im ersten Teil der Arbeit sollte eine bessere Verfügbarkeit der Primärzellkultur erreicht werden, indem ein Verfahren zur Kryokonservierung der Zellen entwickelt wurde. Diese Methode wurde über den Nachweis der Zytoskelettfilamente  $\alpha$ -sm Aktin, Desmin und Zytokeratin, sowie der Expression von Fibronectin, welche mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt wurden, validiert. Es wurden jeweils die eingefrorenen mit den nativen Zellen verglichen und eine signifikante Dedifferenzierung ausgeschlossen.

In dem zweiten Teil der Arbeit sollte die Funktionalität der Integrinbindung nachgewiesen werden, da der reine Nachweis eines Integrinrezeptors nicht ausreicht, um seine Beteiligung an Signalübertragungen zu belegen. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden zum einen die typischen Fokalkontakte histomorphologisch nachgewiesen und zum anderen durch Doppelmarkierung die Kolokalisationen der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit den Signalmolekülen  $\alpha$ -Aktinin, fokale Adhäsionskinase (FAK), Phosphotyrosin (PT) und Talin, sowie die Kolokalisationen FAK mit PT und Talin detektiert. Alle genannten Moleküle wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz sowohl in der Zellkultur als auch im Gefrierschnitt der Plazentome zunächst einzeln nachgewiesen. Die Spezifität der Antikörper gegen die Integrinuntereinheit  $\beta_1$ ,  $\alpha$ -Aktinin, FAK und Talin wurde im Western blot überprüft.

In einem dritten Schritt wurde durch das Aussäen der Zellkultur auf mit Fibronectin (FN), Laminin (Lam) und Kollagen IV (Koll) beschichteten 6-Wellen im Vergleich zu unbeschichteten Wells untersucht, in wie weit unterschiedliche Matrices das Zellwachstum sowie die Integrin- und Signalmolekülexpression beeinflussen. Der Einfluss auf das Zellwachstum wurde durch eine Auszählung der mit DAPI angefärbten Kerne bestimmt. Die Integrin- und Signalmolekülexpression wurde qualitativ anhand der indirekten Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen die Integrinuntereinheit  $\beta_1$ ,  $\alpha$ -Aktinin, PT und

Talin beurteilt.

Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung der Zellkultur ließ folgende Kolokalisationen erkennen: Entlang der Zell-zu-Zell Kontakte zeigte sich die Integrinuntereinheit  $\beta_1$  sowohl mit  $\alpha$ -Aktinin als auch mit FAK kolokalisiert. Die Doppelmarkierung mit PT ergab eine enge Nachbarschaft beider Moleküle. Innerhalb der Fokalkontakte konnte die Integrinuntereinheit  $\beta_1$  mit Talin und FAK kolokalisiert werden. Des Weiteren wurden Kolokalisationen bei der Doppelmarkierung von FAK mit Talin beziehungsweise mit PT beobachtet. Als Besonderheit ließ sich darstellen, dass die Fokalkontakte am Rand der Zellkolonien zwar Talin, aber kein FAK enthalten.

Die Varianzanalyse ergab eine signifikante Verbesserung des Zellwachstums auf allen Beschichtungen im Vergleich zu der unbeschichteten (U) Unterlage (p-Werte: FN vs. U = 0,0001; Lam vs. U = 0,0013; Koll vs. U = 0,0400). Des Weiteren konnte das Wachstum auf Fibronectin als signifikant besser als auf den beiden anderen Beschichtungen nachgewiesen werden (p-Werte = 0,0001). Bezogen auf die Fokalkontakte kam es bei allen untersuchten Signalmolekülen zu einer Vermehrung auf der Fibronectinbeschichtung. Bei Talin war auch eine Vermehrung auf der Kollagen IV- und der Lamininbeschichtung zu erkennen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der Integrinbindung in der untersuchten Zellkultur nachgewiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die untersuchte Karunkel epithelzellkultur aus tragenden Rindern eine gute Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Integrinsignalübertragung darstellt. Von besonderem Interesse sind diesbezüglich feto-maternale Kontaktstudien, die Aufschluss über die Regulation der eingeschränkten Trophoblastinvasion geben können.

## 7 Summary

Integrins are a group of non covalent heterodimeric transmembrane glycoprotein receptors relevant for cell adhesion. On the one hand they interact with the extracellular matrix, on the other hand they are responsible for signal transduction into the cell. It has already been shown that integrins play an important role in the process of restricted trophoblast invasion. In order to study the importance of integrin dependent signal transduction in the bovine placenta, our group recently established a cell culture model of primary caruncular epithelial cells expressing the integrin subunits  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  and  $\beta_3$ .

The present study focuses on three aims. Firstly, we wanted to achieve a better availability of cultures by establishing a method for cryopreservation. Validation was performed by indirect immunofluorescence detecting the cytoskeletal proteins  $\alpha$ -smooth muscle (sm) actin, desmin and cytokeratin as well as fibronectin. Major dedifferentiation was ruled out by comparing frozen and native cells.

The second aim of the study was to prove the functionality of integrin binding due to the fact that the detection of integrin receptors is not sufficient to prove their participation in signal transduction. The typical focal adhesion signals were histomorphologically assessed by indirect immunofluorescence. Double labeling visualised the colocalisation of integrin subunit  $\beta_1$  with its signaling molecules  $\alpha$ -actinin, focal adhesion kinase (FAK), phosphotyrosine (PT) and talin, as well as the colocalisation of FAK with PT and talin. All molecules named above were examined in cell cultures as well as on cryosections of the placentome. The specificities of the antibodies detecting integrin subunit  $\beta_1$ ,  $\alpha$ -actinin, FAK and talin were verified by Western blot.

A third aim of the study was to investigate the effect of coating culture dishes with fibronectin (FN), laminin (Lam) or collagen IV (Coll) on cell growth as well as integrin and signal molecule expression in comparison to cultures on non coated dishes. The effect on the cell growth was determined by counting nuclei counter stained with DAPI. The integrin and signal molecule expression was assessed qualitatively by indirect immunofluorescence detecting integrin subunit  $\beta_1$ ,  $\alpha$ -actinin, PT and talin.

Double labeling showed the following colocalisations in cell culture:

Integrin  $\beta_1$  was colocalised with  $\alpha$ -actinin and FAK at lateral cell-cell borders. Double labeling of integrin subunit  $\beta_1$  with PT showed immediate contiguity of both molecules.

Within the focal adhesions integrin  $\beta_1$  was colocalised with talin and FAK. Furthermore, there were colocalisations of FAK with talin and PT, respectively. Nonetheless, focal adhesions at

the border of cell colonies expressed only Talin and no FAK. Concerning the comparison of cell growth between coated and uncoated (U) cultures the analysis of variance showed significant differences. (p-values: FN vs. U = 0.0001; Lam vs. U = 0.0013; Coll vs. U = 0.0400). Cultures on FN coated dishes had significantly higher nuclei numbers than cultures on Coll or Lam coated dishes (p-values = 0.0001). FN coating lead to an increase of focal adhesions according to the number of fluorescent signals for all signalling molecules examined. Talin expression was additionally increased on Coll and Lam coating.

The present study verified the functionality of integrin binding in a cell culture model of primary bovine caruncular epithelial cells from pregnant cows. The results presented are the basis for further studies on integrin binding and signal transduction, in general, and integrin dependent feto-maternal interaction and regulation of restricted trophoblast invasion, in particular.

## 8 Literaturübersicht

ABEDI, H und ZACHARY, I (1995): *Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. Cardiovasc Res*, 30, 4, 544-556.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K and WALTER, P (2004a): *Chapter: Integrine. Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH Verlag GmVH & Co.KGaA, S.1291 - 1296*

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

ASADA, M; IRIE, K; MORIMOTO, K; YAMADA, A; IKEDA, W; TAKEUCHI, M und TAKAI, Y (2003): *ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions. J Biol Chem*, 278, 6, 4103-4111.

AVRAHAM, S; LONDON, R; FU, Y; OTA, S; HIREGOWDARA, D; LI, J; JIANG, S; PASZTOR, LM; WHITE, RA; GROOPMAN, JE und . (1995): *Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. J Biol Chem*, 270, 46, 27742-27751.

BALLESTREM, C; HINZ, B; IMHOF, BA und WEHRLE-HALLER, B (2001): *Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. J Cell Biol*, 155, 7, 1319-1332.

BAUER, K; KRATZER, M; OTTE, M; DE QUINTANA, KL; HAGMANN, J; ARNOLD, GJ; ECKERSKORN, C; LOTTSPREICH, F und SIESS, W (2000): *Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. Blood*, 96, 13, 4236-4245.

BELKIN, AM und KOTELIANSKY, VE (1987): *Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and alpha-actinin with cytoskeletal proteins. FEBS Lett*, 220, 2, 291-294.

BELKIN, AM und RETTA, SF (1998): *beta1D integrin inhibits cell cycle progression in normal myoblasts and fibroblasts. J Biol Chem*, 273, 24, 15234-15240.

BERDICHEVSKY, F; GILBERT, C; SHEARER, M und TAYLORPAPADIMITRIOU, J (1992): *Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: The role of the alpha 2 beta 1 integrin. Journal of Cell Science*, 102, 437-446.

BERGH, J; NILSSON, K; DAHL, D; ANDERSSON, L; VIRTANEN, I und LEHTO, VP (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, NH (1954): Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. Acta Anat (Basel), 22:1-91., 1-91.*

*BJÖRKMAN, NH und SOLLEN, P (1960): Morphology of the bovine placenta at normal delivery. Acta Vet Scand, 1, 347-362.*

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

*BLANKENSHIP, TN und KING, BF (1992): Distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the cell columns and trophoblastic shell of early macaque placentas. Cell Tissue Res, 270, 2, 241-248.*

*BLANKENSHIP, TN und KING, BF (1993): Developmental changes in the cell columns and trophoblastic shell of the macaque placenta: an immunohistochemical study localizing type IV collagen, laminin, fibronectin and cytokeratins. Cell Tissue Res, 274, 3, 457-466.*

*BORDERIE, VM; LOPEZ, M; LOMBET, A; CARVAJAL-GONZALEZ, S; CYWINER, C und LAROCHE, L (1998): Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci, 39, 8, 1511-1519.*

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

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

*BRODERICK, MJ und WINDER, SJ (2002): Towards a complete atomic structure of spectrin family proteins. J Struct Biol, 137, 1-2, 184-193.*

*BRONSON, RA und FUSI, FM (1996): Integrins and human reproduction. Mol Hum Reprod, 2, 3, 153-168.*

*BURRIDGE, K und CHRZANOWSKA-WODNICKA, M (1996): Focal adhesions, contractility, and signaling. Annu Rev Cell Dev Biol, 12:463-518., 463-518.*

*BURRIDGE, K; FATH, K; KELLY, T; NUCKOLLS, G und TURNER, C (1988): Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton.*

*Annu Rev Cell Biol*, 4:487-525., 487-525.

BURWEN, SJ und PITELKA, DR (1980): Secretory function of lactating mouse mammary epithelial cells cultured on collagen gels. *Experimental Cell Research*, 126, 249-262.

CALALB, MB; POLTE, TR und HANKS, SK (1995): Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15, 2, 954-963.

CALDERWOOD, DA (2004a): Integrin activation. *J Cell Sci*, 117, Pt 5, 657-666.

CALDERWOOD, DA (2004b): Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans*, 32, Pt3, 434-437.

CALDERWOOD, DA; YAN, B; DE PEREDA, JM; ALVAREZ, BG; FUJIOKA, Y; LIDDINGTON, RC und GINSBERG, MH (2002): The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem*, 277, 24, 21749-21758.

CALDERWOOD, DA; ZENT, R; GRANT, R; REES, DJ; HYNES, RO und GINSBERG, MH (1999): The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, 274, 40, 28071-28074.

CANCE, WG; HARRIS, JE; IACOCCA, MV; ROCHE, E; YANG, X; CHANG, J; SIMKINS, S und XU, L (2000): Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 6, 6, 2417-2423.

CARMAN, CV und SPRINGER, TA (2003): Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*, 15, 5, 547-556.

CARY, LA; CHANG, JF und GUAN, JL (1996): Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci*, 109, Pt 7, 1787-1794.

CLASSEN-LINKE, I; KUSCHE, M; KNAUTHE, R und BEIER, HM (1997): Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res*, 287, 1, 171-185.

COBB, BS; SCHALLER, MD; LEU, TH und PARSONS, JT (1994): Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol*, 14, 1, 147-155.

- COLOGNATO, H und YURCHENCO, PD (2000): *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. *Dev Dyn*, 218, 2, 213-234.
- CORDELL, JL; FALINI, B; ERBER, WN; GHOSH, AK; ABDULAZIZ, Z; MACDONALD, S; PULFORD, KA; STEIN, H und MASON, DY (1984): *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)*. *J Histochem Cytochem*, 32, 2, 219-229.
- COUTIFARIS, C; OMIGBODUN, A und COUKOS, G (1998): *Integrins, endometrial maturation, & human embryo implantation*. *Semin Reprod Endocrinol*, 16, 3, 219-229.
- CRITCHLEY, DR (2000): *Focal adhesions - the cytoskeletal connection*. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 1, 133-139.
- CROUCH, EC; STONE, KR; BLOCH, M und MCDIVITT, RW (1987): *Heterogeneity in the production of collagens and fibronectin by morphologically distinct clones of a human tumor cell line: evidence for intratumoral diversity in matrix protein biosynthesis*. *Cancer Res*, 47, 22, 6086-6092.
- DAMSKY, C; SUTHERLAND, A und FISHER, S (1993): *Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation*. *FASEB J*, 7, 14, 1320-1329.
- DATTA, A; HUBER, F und BOETTIGER, D (2002): *Phosphorylation of beta 3 integrin controls ligand binding strength*. *J Biol Chem*, 277, 3943-3949.
- DWIR, O; KANSAS, GS und ALON, R (2001): *Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether*. *J Cell Biol*, 155, 1, 145-156.
- ENDERS, AC (1965): *A COMPARATIVE STUDY OF THE FINE STRUCTURE OF THE TROPHOBLAST IN SEVERAL HEMOCHORIAL PLACENTAS*. *Am J Anat*, 116:29-67., 29-67.
- FAULL, RJ; KOVACH, NL; HARLAN, JM und GINSBERG, MH (1994): *Stimulation of integrin-mediated adhesion of T lymphocytes and monocytes: two mechanisms with divergent biological consequences*. *J Exp Med*, 179, 4, 1307-1316.
- FAZLEABAS, AT; BELL, SC; FLEMING, S; SUN, J und LESSEY, BA (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.
- FISHER, SJ und DAMSKY, CH (1993): *Human cytotrophoblast invasion*. *Semin Cell Biol*, 4,

3, 183-188.

FRESHNEY, RI (2000a): Chapter: Cryopreservation. *Culture of Animal Cells*. A. John Wiley + Sons, Inc., 297 - 308

FRESHNEY, RI (2000b): Chapter: Culture Vessels. *Culture of Animal Cells*. A. John Wiley + Sons, Inc.; 77 - 88

GALABOVA-KOVACS, G; WALTER, I; AURICH, C und AURICH, JE (2004): Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology*, 61, 5, 963-976.

GARCIA-ALVAREZ, B; DE PEREDA, JM; CALDERWOOD, DA; ULMER, TS; CRITCHLEY, D; CAMPBELL, ID; GINSBERG, MH und LIDDINGTON, RC (2003): Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell*, 11, 1, 49-58.

GARLOW, JE; KA, H; JOHNSON, GA; BURGHARDT, RC; JAEGER, LA und BAZER, FW (2002): Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol Reprod*, 66, 3, 718-725.

GARRATT, AN und HUMPHRIES, MJ (1995): Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors. *Acta Anat (Basel)*, 154, 1, 34-45.

GIANNONE, G; JIANG, G; SUTTON, DH; CRITCHLEY, DR und SHEETZ, MP (2003): Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J Cell Biol*, 163, 2, 409-419.

GINSBERG, MH; LOFTUS, JC und PLOW, EF (1988): Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thromb Haemost*, 59, 1, 1-6.

GIRAULT, JA; LABESSE, G; MORNON, JP und CALLEBAUT, I (1999): The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci*, 24, 2, 54-57.

GOLDMANN, WH und ISENBERG, G (1991): Kinetic determination of talin-actin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 178, 2, 718-723.

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

GROSSER, O (1927): *Frühentwicklung, Eihautbildung und Plazentation des Menschen und der Säugetiere*.

- GUAN, JL und SHALLOWAY, D (1992): Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature*, 358, 6388, 690-692.
- GUILLOMOT, M (1999): Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. *Placenta*, 20, 4, 339-345.
- HABERMEHL, KH (1975): Chapter: Die Altersbestimmung bei Hauswiederkäuern. In: PAUL PAREY VERLAG: Die Altersbestimmung bei Haus- und Labortieren. 2. Edition., S. 62 - 63
- HANKS, SK; CALALB, MB; HARPER, MC und PATEL, SK (1992): Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 18, 8487-8491.
- HEMLER, ME (1988): Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol Today*, 9, 4, 109-113.
- HOCKING, DC; SOTTILE, J und MCKEOWN-LONGO, PJ (1998): Activation of distinct  $\alpha 5 \beta 1$ -mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. *J Cell Biol*, 141, 1, 241-253.
- HOFFMANN, B und 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.
- HORWITZ, A; DUGGAN, K; BUCK, C; BECKERLE, MC und BURRIDGE, K (1986): Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*, 320, 6062, 531-533.
- HORWITZ, A; DUGGAN, K; GREGGS, R; DECKER, C und BUCK, C (1985): The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a receptor for laminin and fibronectin. *J Cell Biol*, 101, 6, 2134-2144.
- HSU, SM; RAINE, L und FANGER, H (1981): The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75, 6, 816-821.
- HUGHES, PE; DIAZ-GONZALEZ, F; LEONG, L; WU, C; MCDONALD, JA; SHATTIL, SJ und GINSBERG, MH (1996): Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem*, 271, 12, 6571-6574.
- HUGHES, PE und PFAFF, M (1998): Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol*, 8, 9,

359-364.

HUMPHRIES, MJ; MCEWAN, PA; BARTON, SJ; BUCKLEY, PA; BELLA, J und MOULD, AP (2003): *Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. Trends Biochem Sci*, 28, 6, 313-320.

HUNT, RC und DAVIS, AA (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.

HUTTENLOCHER, A; SANDBORG, RR und HORWITZ, AF (1995): *Adhesion in cell migration. Curr Opin Cell Biol*, 7, 5, 697-706.

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

HYNES, RO (2002): *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell*, 110, 6, 673-687.

JOHANSSON, MW; LARSSON, E; LUNING, B; PASQUALE, EB und RUOSLAHTI, E (1994): *Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated beta 1 integrin. J Biol Chem*, 269, 12, 1299-1309.

JOHNSON, GA; BAZER, FW; JAEGER, LA; KA, H; GARLOW, JE; PFARRER, C; SPENCER, TE und BURGHARDT, RC (2001): *Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. Biol Reprod*, 65, 3, 820-828.

JONES, RJ; BRUNTON, VG und FRAME, MC (2000): *Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. Eur J Cancer*, 36, 13 Spec No, 1595-1606.

JULIANO, RL und HASKILL, S (1993): *Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol*, 120, 3, 577-585.

KANSAS, GS und PAVALKO, FM (1996): *The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion. J Immunol*, 157, 1, 321-325.

KASHIWAGI, H; SCHWARTZ, MA; EIGENTHALER, M; DAVIS, KA; GINSBERG, MH und SHATTIL, SJ (1997): *Affinity modulation of platelet integrin alphaIIb beta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. J Cell Biol*, 137, 6, 1433-1443.

KIM, HR; HOQUE, M und HAI, CM (2004): *Cholinergic receptor-mediated differential*

*cytoskeletal recruitment of actin- and integrin-binding proteins in intact airway smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol*, 287, 5, C1375-C1383.

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

KLISCH, K; HECHT, W; PFARRER, C; SCHULER, G; HOFFMANN, B und LEISER, R (1999a): DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta*, 20, 5-6, 451-458.

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

KOLANUS, W; NAGEL, W; SCHILLER, B; ZEITLMANN, L; GODAR, S; STOCKINGER, H und SEED, B (1996): Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*, 86, 2, 233-242.

KORNBERG, L; EARP, HS; PARSONS, JT; SCHALLER, M und JULIANO, RL (1992): Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 267, 33, 23439-23442.

KORTHAUER, U; NAGEL, W; DAVIS, EM; LE BEAU, MM; MENON, RS; MITCHELL, EO; KOZAK, CA; KOLANUS, W und BLUESTONE, JA (2000): Anergic T lymphocytes selectively express an integrin regulatory protein of the cytohesin family. *J Immunol*, 164, 1, 308-318.

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

KURTH, T (2000): Chapter: Zelloberflächen. *Grundstudium Biologie-Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution. Spektrum, Akademischer Verlag*, 12.1 - 12.8

LANG, CY; HALLACK, S; LEISER, R und 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.

LAZARIDES, E und BURRIDGE, K (1975): Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*, 6, 3, 289-298.

LEE, JO; RIEU, P; ARNAOUT, MA und LIDDINGTON, R (1995): Crystal structure of the A

*domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). Cell, 80, 4, 631-638.*

*LEISER, R (1975): [Development of contact between trophoblast and uterine epithelium during the early stages on implantation in the cow]. Zentralbl Veterinarmed [C ], 4, 1, 63-86.*

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

*LEISER, R; PFARRER, C; ABD-ELNAEIM, M und DANTZER, V (1998): Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. Trophoblas Res, 12, 21-39.*

*LESSEY, BA (1997): Integrins and the endometrium: new markers of uterine receptivity. Ann N Y Acad Sci, 828:111-22., 111-122.*

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

*LESSEY, BA; DAMJANOVICH, L; COUTIFARIS, C; CASTELBAUM, A; ALBELDA, SM und BUCK, CA (1992): Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. J Clin Invest, 90, 1, 188-195.*

*LESSEY, BA; ILESANMI, AO; LESSEY, MA; RIBEN, M; HARRIS, JE und 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.*

*LEV, S; MORENO, H; MARTINEZ, R; CANOLL, P; PELES, E; MUSACCHIO, JM; PLOWMAN, GD; RUDY, B und SCHLESSINGER, J (1995): Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. Nature, 376, 6543, 737-745.*

*LEWIS, JM und SCHWARTZ, MA (1995): Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants. Mol Biol Cell, 6, 2, 151-160.*

*LIM, YS; KIM, KA; JUNG, JO; YOON, JH; SUH, KS; KIM, CY und LEE, HS (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.*

*LODISH, H; BERK, A; MATSUDAIRA, P; KAISER, CA; KRIEGER, M; SCOTT, MP; ZIPURSKY, SL und DARNEL (2004): Chapter: Microfilaments and Intermediate Filaments.*

*In: FREEMANN AND COMPANY: Molecular Cell Biology. 779 - 816*

*LÖFFLER, G and PETRIDES, PE (1998): Chapter: Bausteine und Strukturelemente der Zelle. In: LÖFFLER, G. und PETRIDES, P. E.: Biochemie und Pathobiochemie. Springer, 6. Auflage. Edition., S. S. 3 - S. 202*

*LOLLO, BA; CHAN, KW; HANSON, EM; MOY, VT und BRIAN, AA (1993): Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. J Biol Chem, 268, 29, 21693-21700.*

*LONGHURST, CM und JENNINGS, LK (1998): Integrin-mediated signal transduction. Cell Mol Life Sci, 54, 6, 514-526.*

*MACINTYRE, DM; LIM, HC; RYAN, K; KIMMINS, S; SMALL, JA und MACLAREN, LA (2002): Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. Biol Reprod, 66, 5, 1430-1436.*

*MACLAREN, LA und WILDEMAN, AG (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.*

*MARLIN, SD und SPRINGER, TA (1987): Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell, 51, 5, 813-819.*

*MARTEL, V; RACAUD-SULTAN, C; DUPE, S; MARIE, C; PAULHE, F; GALMICHE, A; BLOCK, MR und ALBIGES-RIZO, C (2001): Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. J Biol Chem, 276, 24, 21217-21227.*

*MARTIN, KH; BOERNER, SA und PARSONS, JT (2002): Regulation of focal adhesion targeting and inhibitory functions of the FAK related protein FRNK using a novel estrogen receptor "switch". Cell Motil Cytoskeleton, 51, 2, 76-88.*

*MATTSON, MP und RYCHLIK, B (1990): Cell culture of cryopreserved human fetal cerebral cortical and hippocampal neurons: neuronal development and responses to trophic factors. Brain Res, 522, 2, 204-214.*

*MITRA, SK; HANSON, DA und SCHLAEPFER, DD (2005): Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nat Rev Mol Cell Biol, 6, 1, 56-68.*

*MIYAMOTO, S; TERAMOTO, H; COSO, OA; GUTKIND, JS; BURBELO, PD; AKIYAMA, SK und YAMADA, KM (1995): Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and*

*signaling molecules. J Cell Biol, 131, 3, 791-805.*

*MOLL, I (1993): [Cytokeratins. Markers of epithelial differentiation]. Hautarzt, 44, 7, 491-501.*

*MUGURUMA, M; MATSUMURA, S und FUKAZAWA, T (1990): Direct interactions between talin and actin. Biochem Biophys Res Commun, 171, 3, 1217-1223.*

*MURAKAMI, S; SHIBAYA, M; TAKEUCHI, K; SKARZYNSKI, DJ und OKUDA, K (2003): A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells. Journal of Reproduction and Development, 49, 6, 531-538.*

*MURPHY-ULLRICH, JE (2001): The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? J Clin Invest, 107, 7, 785-790.*

*MYKKANEN, OM; GRONHOLM, M; RONTY, M; LALOWSKI, M; SALMIKANGAS, P; SUILA, H und CARPEN, O (2001): Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. Mol Biol Cell, 12, 10, 3060-3073.*

*NATH, D; SLOCOMBE, PM; WEBSTER, A; STEPHENS, PE; DOCHERTY, AJ und 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.*

*NOBES, CD und HALL, A (1995): Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. Biochem Soc Trans, 23, 3, 456-459.*

*O'TOOLE, TE; KATAGIRI, Y; FAULL, RJ; PETER, K; TAMURA, R; QUARANTA, V; LOFTUS, JC; SHATTIL, SJ und GINSBERG, MH (1994): Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. J Cell Biol, 124, 6, 1047-1059.*

*O'TEY, CA und CARPEN, O (2004): Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. Cell Motil Cytoskeleton, 58, 2, 104-111.*

*O'TEY, CA; PAVALKO, FM und BURRIDGE, K (1990): An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. J Cell Biol, 111, 2, 721-729.*

*O'TEY, CA; VASQUEZ, GB; BURRIDGE, K und ERICKSON, BW (1993): Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. J Biol Chem, 268, 28, 21193-21197.*

*OTTO, JJ (1983): Detection of vinculin-binding proteins with an 125I-vinculin gel overlay*

*technique. J Cell Biol, 97, 4, 1283-1287.*

*OWEN, JD; RUEST, PJ; FRY, DW und HANKS, SK (1999): Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. Mol Cell Biol, 19, 7, 4806-4818.*

*PANKOV, R; CUKIERMAN, E; KATZ, BZ; MATSUMOTO, K; LIN, DC; LIN, S; HAHN, C und YAMADA, KM (2000): Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. J Cell Biol, 148, 5, 1075-1090.*

*PARAST, MM und OTEY, CA (2000): Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions. J Cell Biol, 150, 3, 643-656.*

*PARISE, LV und PHILLIPS, DR (1986): Fibronectin-binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. J Biol Chem, 261, 30, 14011-14017.*

*PARSONS, JT (2003): Focal adhesion kinase: the first ten years. J Cell Sci, 116, Pt 8, 1409-1416.*

*PATIL, S; JEDSADAYANMATA, A; WENCEL-DRAKE, JD; WANG, W; KNEZEVIC, I und LAM, SC (1999): Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail. J Biol Chem, 274, 40, 28575-28583.*

*PATRIE, KM; DRESCHER, AJ; WELIHINDA, A; MUNDEL, P und MARGOLIS, B (2002): Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. J Biol Chem, 277, 33, 30183-30190.*

*PAVALKO, FM und LAROCHE, SM (1993): Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. J Immunol, 151, 7, 3795-3807.*

*PAVALKO, FM; WALKER, DM; GRAHAM, L; GOHEEN, M; DOERSCHUK, CM und KANSAS, GS (1995): The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. J Cell Biol, 129, 4, 1155-1164.*

*PEARSON, MA; RECZEK, D; BRETSCHER, A und KARPLUS, PA (2000): Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding*

tail domain. *Cell*, 101, 3, 259-270.

PFARRER, C; EBERT, B; MIGLINO, MA; KLISCH, K und LEISER, R (2001): The three-dimensional fetomaternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopical study. *J Anat*, 198, Pt 5, 591-602.

PFARRER, C; HIRSCH, P; GUILLOMOT, M und 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 (2006): Characterization of the bovine placenta by cytoskeleton, integrin receptors, and extracellular matrix. *Methods Mol Med*, 121:323-35., 323-335.

POLTERMANN, S (2006): *The Role of Herpesviruses in Brain Tumor Development. Inaugural Diss*,

PUCK, TT; MARCUS, PI und CIECIURA, SJ (1955): Clonal growth of mammalian cells in vitro: Growth characteristics of colonies from single hela cells with and without a "feeder" layer. *Journal of Experimental Medicine*, 103, 273-289.

QUARANTA, V und JONES, JC (1991): The internal affairs of an integrin. *Trends Cell Biol*, 1, 1, 2-4.

RAJFUR, Z; ROY, P; OTEY, C; ROMER, L und JACOBSON, K (2002): Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat Cell Biol*, 4, 4, 286-293.

REDDY, KV und MANGALE, SS (2003): Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue Cell*, 35, 4, 260-273.

REES, DJ; ADES, SE; SINGER, SJ und HYNES, RO (1990): Sequence and domain structure of talin. *Nature*, 347, 6294, 685-689.

REGAUER, S; FRANKE, WW und 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.

REGEN, CM und HORWITZ, AF (1992): Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol*, 119, 5, 1347-1359.

REIMERS, TJ; ULLMANN, MB und HANSEL, W (1985): Progesterone and prostanoid

*production by bovine binucleate trophoblastic cells. Biol Reprod, 33, 5, 1227-1236.*

*REUTHER, T; KETTMANN, C; SCHEER, M; KOCHER, M; IIDA, S und KUBLER, AC (2006): Cryopreservation of osteoblast-like cells: viability and differentiation with replacement of fetal bovine serum in vitro. Cells Tissues Organs, 183, 1, 32-40.*

*REXROAD, CE und POWELL, AM (1997): Culture of blastomeres from in vitro-matured fertilized, and cultured bovine embryos. Molecular Reproduction and Development, 48, 238-245.*

*ROMBERGER, DJ (1997): Fibronectin. Int J Biochem Cell Biol, 29, 7, 939-943.*

*ROTTNER, K; HALL, A und SMALL, JV (1999): Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. Curr Biol, 9, 12, 640-648.*

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

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

*SAKAI, T; ZHANG, Q; FASSLER, R und MOSHER, DF (1998): Modulation of beta1A integrin functions by tyrosine residues in the beta1 cytoplasmic domain. J Biol Chem, 273, 14, 527-538.*

*SASAKI, H; NAGURA, K; ISHINO, M; TOBIOKA, H; KOTANI, K und SASAKI, T (1995): Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. J Biol Chem, 270, 36, 21206-21219.*

*SCHALLER, MD; BORGMAN, CA; COBB, BS; VINES, RR; REYNOLDS, AB und PARSONS, JT (1992): pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 11, 5192-5196.*

*SCHALLER, MD; HILDEBRAND, JD und PARSONS, JT (1999): Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. Mol Biol Cell, 10, 10, 3489-3505.*

*SCHALLER, MD; OTEY, CA; HILDEBRAND, JD und PARSONS, JT (1995): Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. J Cell Biol, 130, 5, 1181-1187.*

*SCHALLER, MD und PARSONS, JT (1994a): Focal adhesion kinase and associated proteins.*

*Curr Opin Cell Biol*, 6, 5, 705-710.

SCHALLER, MD und PARSONS, JT (1994b): Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 5, 705-710.

SCHALLER, MD und PARSONS, JT (1994c): Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 5, 705-710.

SCHALLER, MD und PARSONS, JT (1994d): Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 5, 705-710.

SCHLAEPFER, DD; MITRA, SK und ILIC, D (2004): Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1692, 2-3, 77-102.

SCHLESSINGER, J und LEMMON, MA (2003): SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE*, 2003, 191, RE12-

SCHMIDT, CE; HORWITZ, AF; LAUFFENBURGER, DA und SHEETZ, MP (1993): Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol*, 123, 4, 977-991.

SCHNORR, B (1996): Plazentation beim Säuger und Embryonalhüllen beim Vogel. In: *Embryologie der Haustiere*. 3. Auflage, enke Verlag, Stuttgart, 66-99.

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

SCHULER, G; WIRTH, C; KLISCH, K; PFARRER, C; LEISER, R und HOFFMANN, B (1999): Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod*, 61, 3, 797-801.

SCHWARZ, U (2003): Kräfte und Elastizität in der Zelladhäsion. In: *Tätigkeitsbericht 2003, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung*

SHATTIL, SJ; O'TOOLE, T; EIGENTHALER, M; THON, V; WILLIAMS, M; BABIOR, BM und GINSBERG, MH (1995): Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol*, 131, 3, 807-816.

SHIOKAWA, S; YOSHIMURA, Y; NAGAMATSU, S; SAWA, H; HANASHI, H; SAKAI, K; NOGUCHI, K und NAKAMURA, Y (1998): Functional role of focal adhesion kinase in the

*process of implantation. Mol Hum Reprod, 4, 9, 907-914.*

*SIMON, C; MARTIN, JC; GALAN, A; VALBUENA, D und PELLICER, A (1999): Embryonic regulation in implantation. Semin Reprod Endocrinol, 17, 3, 267-274.*

*STRAHL, H. (1906):*

*Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta. In: Hertwigs HANdbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere, vol. 1. Fischer Jena*

*SUN, CX; ROBB, VA und GUTMANN, DH (2002): Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. J Cell Sci, 115, Pt 21, 3991-4000.*

*SUNDLISAETER, E; WANG, J; SAKARIASSEN, PO; MARIE, M; MATHISEN, JR; KARLSEN, BO; PRESTEGARDEN, L; SKAFTNESMO, KO; BJERKVIG, R und ENGER, PO (2006): Primary glioma spheroids maintain tumorigenicity and essential phenotypic traits after cryopreservation. Neuropathol Appl Neurobiol, 32, 4, 419-427.*

*TADOKORO, S; SHATTIL, SJ; ETO, K; TAI, V; LIDDINGTON, RC; DE PEREDA, JM; GINSBERG, MH und CALDERWOOD, DA (2003): Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. Science, 302, 5642, 103-106.*

*TAKAGI, J; ERICKSON, HP und SPRINGER, TA (2001): C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. Nat Struct Biol, 8, 5, 412-416.*

*TAKAHASHI, M; TAKAHASHI, M; HAMANO, S; TAKAHASHI, H und 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.*

*TAPLEY, P; HORWITZ, A; BUCK, C; DUGGAN, K und ROHRSCHEIDER, L (1989): Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. Oncogene, 4, 3, 325-333.*

*VALLENIUS, T; LUUKKO, K und MAKELA, TP (2000): CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4. J Biol Chem, 275, 15, 11100-11105.*

*VINATIER, D (1995): [Integrins and reproduction]. Contracept Fertil Sex, 23, 5, 327-334.*

*VINOGRADOVA, O; VELYVIS, A; VELYVIENE, A; HU, B; HAAS, T; PLOW, E und QIN, J (2002): A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as*

*regulated by its cytoplasmic face. Cell, 110, 5, 587-597.*

*VUORI, K (1998): Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. J Membr Biol, 165, 3, 191-199.*

*WACHSSTOCK, DH; WILKINS, JA und LIN, S (1987): Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. Biochem Biophys Res Commun, 146, 2, 554-560.*

*WALIKONIS, RS; OGUNI, A; KHOROSHEVA, EM; JENG, CJ; ASUNCION, FJ und KENNEDY, MB (2001): Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. J Neurosci, 21, 2, 423-433.*

*WANG, G; JOHNSON, GA; SPENCER, TE und BAZER, FW (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.*

*WANG, HB; DEMBO, M; HANKS, SK und WANG, Y (2001): Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 20, 11295-11300.*

*WEETMAN, AP (1999): The immunology of pregnancy. Thyroid, 9, 7, 643-646.*

*WILKINS, JA; CHEN, KY und LIN, S (1983): Detection of high molecular weight vinculin binding proteins in muscle and nonmuscle tissues with an electroblot-overlay technique. Biochem Biophys Res Commun, 116, 3, 1026-1032.*

*WILLE, KH (1984): Über die pränatale Entwicklung der Dickdarm-Mukose unter besonderer Berücksichtigung ihres Epithels. Morphologische sowie histo- und zytochemische Untersuchungen am Blinddarm des Hausrindes (Bos primigenius taurus). Habilitationsschrift aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, 3-4.*

*WILLERS, I; BLANKENFELD, J und GOEDDE, HW (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, MJ; HUGHES, PE; O'TOOLE, TE und GINSBERG, MH (1994): The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. Trends Cell Biol, 4, 4, 109-112.*

*WIMSATT, WA (1951): Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance*

*of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. Am J Anat, 89, 2, 233-281.*

WOODING, FB (1982): *The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. J Reprod Fertil Suppl, 31:31-9., 31-39.*

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

WOODING, FB; MORGAN, G und ADAM, CL (1997): *Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer. Microsc Res Tech, 38, 1-2, 88-99.*

WOODING, FB und FLINT, APF (1994): *Placentation. Lamming GE (ed) Marshall's Physiology of reproduction. London Chapman and Hall 4th edn, 233-460.*

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

YAN, B; CALDERWOOD, DA; YASPAN, B und GINSBERG, MH (2001): *Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. J Biol Chem, 276, 30, 28164-28170.*

YU, H; LI, X; MARCHETTO, GS; DY, R; HUNTER, D; CALVO, B; DAWSON, TL; WILM, M; ANDEREGG, RJ; GRAVES, LM und EARP, HS (1996): *Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. J Biol Chem, 271, 47, 29993-29998.*

ZAMIR, E und GEIGER, B (2001): *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. J Cell Sci, 114, Pt; %20, 3583-3590.*

ZAMIR, E; KATZ, BZ; AOTA, S; YAMADA, KM; GEIGER, B und KAM, Z (1999): *Molecular diversity of cell-matrix adhesions. J Cell Sci, 112, Pt 11, 1655-1669.*

ZAMIR, E; KATZ, M; POSEN, Y; EREZ, N; YAMADA, KM; KATZ, BZ; LIN, S; LIN, DC; BERSHADSKY, A; KAM, Z und GEIGER, B (2000): *Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. Nat Cell Biol, 2, 4, 191-196.*

ZEILER, M (2006): *In vitro expression von Integrinen und extrazellulärer Matrix in bovinen Plazentazellen. Inaugural Diss,*

ZOLI, AP; DEMEZ, P; BECKERS, JF; REZNIK, M und BECKERS, A (1992): *Light and*

*electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. Biol Reprod, 46, 4, 623-629.*

## 9 Anhang

### 9.1 Geräte, Reagenzien

#### 9.1.1 Zellkultur

- 6-Wells: MULTIWELL\* Tissue Culture Plate 6-Well, FALCON\* 3046, Becton Dickinson GmbH, D-Heidelberg
- Augenwatte N1, 100g, Baumwolle, Kerma Verbandstoff GmbH, Hainichen, Bezug über Schubert Apotheke, D-Gießen
- Bechergläser, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Beschwerungsring Lead Donut LD-7C, Art. Nr. 317218007, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf.
- Biologisches Invers-Mikroskop Modell MBL 3100 Labormikroskop A. KRÜSS Krüss Optronic GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Brauns Wundheftseide roh auf Knäuel, Braun, D-Melsungen
- Brutschrank CO<sub>2</sub> Incubator, MCO-18AIC, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd. Made in Japan
- Collagen Type IV from bovine placenta villi, Art. Nr. CC083, CHEMICON® International, UK-Hampshire
- Cell Scraper 24 cm, Art. Nr. 38022, Renner GmbH, D-Dannstadt-Schauernheim
- Collagenase Typ I, Art. Nr. C1-28, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin Art. Nr. E15-813, PAA, D-Cölbe
- DUROPLAN-Petrischalen, Schott, 10 x 2 cm, Art. Nr. 192175548, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Edisonite®, 5 kg Art. Nr. 60137, Schnellreiniger für Instrumente, Geräte und anlagen, Heiland, Vet GmbH & Co. KG, D-Hamburg
- Fibronektin from bovine plasma cell culture, Art. Nr. F1141-5MG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Fötales Bovines Serum, 500 ml, Art. Nr. S0115, Biochrom AG seromed®, D-Berlin
- Gewebekulturflaschen 50 ml, Art. Nr. 690160, Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, D-Frickenhausen
- Hämazytometer-Deckgläser 22 x 22 mm, Art. Nr. L190.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe

- Hanks´Salzlösung, ohne Phenolrot, mit 0,35 g/l NaHCO<sub>3</sub> Art. Nr. L2045, Biochrom, D-Berlin
- Hanks´Salzlösung, ohne Phenolrot, ohne Kalzium, ohne Magnesium mit 0,35 g/l NaHCO<sub>3</sub> Art. Nr. L2045, Biochrom, D-Berlin
- HERAsafe Typ HS 12, Sicherheitswerkbank der Klasse 2, Art. Nr. 51016687, Kendro Laboratory Products GmbH, D-Langenselbold
- HERAfreze Gefrierschrank, Art. Nr. 51019574, Kendro Laboratory Products GmbH, D-Langenselbold
- IKA<sup>®</sup>-Schüttler Typ MTS 2, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, D-Staufen i. Br.
- Kohlensäure in Flasche, Art. Nr. M04584602, W. Balsler GmbH, D-Gießen
- Laminin from Human Placenta, Art. Nr. L6274, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Messpipetten Kl. B, 1 ml (E942.1), 2 ml (E943.1), 5ml (E945.1), 10 ml (E946.1) und 20 ml (E947.1), Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Nalgene Pipettenreinigungssatz, Größe D, Art. Nr. 24875201, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Objektträger: 50 SuperFrost Objektträger circa 76 x 26 mm, R. Langenbrinck D-Emmendingen
- OP-Besteck und Schlathofmesser, Medizintechnik für Human-und Veterinärmedizin, Labortechnik für Wissenschaft und Industrie, Erich Reinke e.K., D-Gießen
- PBS – siehe Lösungsprotokolle
- Penizillin/Streptomycin, 10.000 U/10.000 µg/ml, 100 ml, Art. Nr. A2213, Biochrom AG seromed<sup>®</sup>, D-Berlin
- Pipetus Standard, Art. Nr. B0101.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Purified Bovine Collgen Typ IV, Art. Nr. CC083, Source Bovine placenta villi, CHEMICON<sup>®</sup> international UK-Hampshire
- Reagenzglasgestell Art. Nr. 7475.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Rotilabo Schwimmständer dreieckig, Art. Nr. H070.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Sterilindikatorband für Heißluftsterilisation, Art. Nr. H590.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Tonne mit Deckel, 461, Art. Nr. 3253925054093, Obi, D-Gießen

- Trypsin (10 x) / EDTA-Lösung (0,5% / 0,2%) in PBS (10 x) ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  Art. Nr. L2153, Biochrom AG seromed<sup>®</sup>, D-Berlin
- Umlufttrockenschrank/Sterilisator, Heraeus, UT12, Art. Nr. 411242305, Bezug über MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Vortex Genie 2, Modell G-560E, Scientific Industries, Inc Bohemia, über MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Wasserbad Typ 1004, Nr. 10671492e, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, 30938 D-Burgwedel
- Zentrifuge Hettich Rotanta /S Typ 3510, Andreas Hettich GbH & Co. KG, D-Tuttlingen
- Zentrifugenröhrchen Nunc, 15 ml, Art. Nr. 366079, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Benzonase Reinheitsgrad I 10.000 Einheiten/Glas Art. Nr: 1.01694.0001, Merck, Darmstadt

### 9.1.2 Versuche

- Aceton pro analysis, Art. Nr. 9372.2, Carl Roth GmbH & CO. KG, D-Karlsruhe
- Acrylamide/bis Acrylamide, Art. Nr. 3574, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Albumin, bovine Fration V Powder, Art. Nr. A8022-50G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- APPAP-Komplex, Art. Nr. D0651, DakoCytomation D-Hamburg
- Brilliant Blue G, Art. Nr. B 0770, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Brom-Chlor-Indolyphosphat/Nitroblautetrazolium (BCIP/NBT), Art. Nr. 050093, KPL USA-Gaitherburg Maryland
- Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat,  $KCr(SO_4)_2 \times 12 H_2O$ , Art. Nr. 101036, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Deckgläser 24 x 24, Art. Nr. H875.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Dimethylsulphoxide (DMSO), Art. Nr. D2650, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat,  $Na_2HPO_4$ , 1 kg, Art. Nr. 1.06580.1000, Merck KgaA, D-Darmstadt

- Eisessig (Essigsäure) pro analysis, Art. Nr. 1.00063.2500, Merck KGaA, D-Darmstadt
- Ethanol pro analysis, 2,5 l, Art. Nr. 1.00983.2511, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Faltenfilter von Schleier & Schuell, Durchmesser 21 cm, Art. Nr. 311649, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- Gelatine gepulvert, Art. Nr. 104078, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Gewebeeinbettmedium proWax (Paraffin), Art. Nr. 40-005/B pro Lab, D-Lollar
- Glycerin = Glycerol, Art. Nr. 4043.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Hämatoxillin, Art. Nr. 6765015, Shandon, USA-Pittsburgh
- HiMark Unstained High Molecular Weight Protein Standard, Art. Nr. LC5688, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- Kaliumdihydrogenphosphat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 kg, Art. Nr. P018.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Kaisers Glyceringelatine, Art. Nr. 1.09242.0100, Merck KGaA, D-Darmstadt
- Kryostat 2800 Frigocut-E, Reichert-Jung, jetzt Leica Microsystems GmbH, D-Nussloch
- Lämmli Sample Buffer, Art. Nr. S-3401, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Metamorph, Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
- Methanol zur Analyse, 2,5 l, Art. Nr. 1.06009.2511, Merck KgaA, D-Darmstadt
- Handelsübliches Milchpulver
- Natriumchlorid,  $\text{NaCl}$ , 1 kg, Art. Nr. 3957.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Normal Donkey Serum, Art. Nr. S30-100, CHEMICON<sup>®</sup> International, UK-Hampshire
- Normal horse serum, Art. Nr. S-2000 Vector Laboratories, USA-Burglingame
- NuPage<sup>®</sup> 20 x Mops SDS Running buffer, Art. Nr. NP0001, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> 20 x Transferbuffer, Art. Nr. NP0006, Invitrogen GnbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> 20 x Tris-Actetat Running buffer, Art. Nr. LA0041, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> Antioxidanz, Art. Nr. NP0005, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> LDS Sample Buffer 4x, Art. Nr. NP0008, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> Nitrocellulosemembran, Art. Nr. LC2000, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe

- NuPage<sup>®</sup> Novex Bis Tris Gel 4-12%, Art. Nr. NP0321 BOX, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> Novex Tris Acetat Gel 3-8%, Art. Nr. EA03752BOX, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> Reducing Agent 10x, Art. Nr. NP0004, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> Sponge Pads, Art. Nr. EI9052, Invitrogen GmbH, d-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> X Cell Sure Lock<sup>™</sup> Mini-Cell, Art. Nr. EI0001, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- NuPage<sup>®</sup> X CellIII<sup>™</sup> Blot Module, Art. Nr. EI9051, Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe
- Objektträger Art. Nr. 1880.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Olympus BX50 Mikroskop
- PAP PEN, Immunostaining Pen extra dick, Art. Nr. MKP-2, Fa. G. Kisker GbR, D-Steinfurt
- Paraffinaufgießstation, EG 1160, Leica, D-Bensheim
- Pasteurpipetten Hirschmann, Art. Nr. 197734145, MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf
- peq Gold Protein-Marker IV Prestained Art. Nr. 27-2110, PEQLAB Biotechnologie GmbH, D-Erlangen
- Peroxidase Substatkit AEC, Art. Nr. AE002, BIOLOGO, D-Kronshagen
- pH-Meter CG 820, Art. Nr. 55395, Schott Geräte GmbH, D-Hofheim a. Ts.
- Photomikroskop Axiophot, Carl Zeis AG, D-Oberkochen
- Pikrinsäure, Art. Nr. 27745, Riedl-de Haen, d-Seelze
- Polyoxyethylensorbitan Monolaurate = TWEEN<sup>®</sup> 20, 250 g, Art. Nr. 9127.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
- Schlittenmicrotom HM 400, Mircom GmbH, d-Walldorf
- Schwarz-Weiß-Kamera Spot Insight, Visitron Systems, D-Puchheim
- Spot Insight Software, Diagnostic Instruments, Michigan, USA
- Stromgerät Standard Power Pac P25 Biometra, D-Göttingen
- Tissue Tek<sup>®</sup> O.C.C.<sup>™</sup>Compound 4584, Sakura Finetek Europe B.V., über Leica Mikrosystems GmbH, D-Nussloch
- Vakuum-Gewebeinfiltrationsapparat TP1050, Leica, D-Bensheim
- Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium mit DAPI, Art. Nr. H-1200, Alexis Deutschland GmbH, D-Grünberg

### 9.1.3 Antikörper

- Biotylylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG(H+L) Affinity Purified, Art. Nr. BA-1400, Vector Laboratories, USA-Burglingame
- Cy<sub>3</sub> Conjugated Affinity Purified Secondary Antibody, Donkey Anti-Rabbit, Art. Nr. AP 182c, CHEMICON<sup>®</sup> International, UK-Hampshire
- Cy<sub>3</sub> Conjugated Affinity Purified Secondary Antibody, Donkey Anti-mouse, Art. Nr. AP 192c, CHEMICON<sup>®</sup> International, UK-Hampshire
- Donkey Anti-Mouse Affinity Purified Secondary Antibody Fluorescein conjugated, Art. Nr. AP 192F, CHEMICON<sup>®</sup> International, UK-Hampshire
- Donkey Anti-Rabbit Affinity Purified Secondary Antibody Fluorescein conjugated, Art. Nr. AP 182F, CHEMICON<sup>®</sup> International, UK-Hampshire
- Monoclnal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4, M0851, DakaCytomation D-Hamburg
- Monoclonal Anti-alpha-Actinin Clone BM-75.2 Mouse Ascites Fluid, Art. Nr. A5044, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen
- Monoclonal Anti-Fibronectin Clone IST-3, Art. Nr. F0791, SIGMA USA-Saint Louis Missouri
- Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33, Art. Nr. M 0750, DakaCytomation D-Hamburg
- Monoclonal Mouse Anti-Human-Cytokeratin Art. Nr. E020 LINARIS D-Wertheim-Bettingen
- Monoclonal Mouse Anti-Integrin beta 1, Art. Nr. FW\$-101, Natu Tec, D-Frankfurt
- Monoclonal Mouse Anti-Phosphotyrosine Clone 4G10, Art. Nr. 05-321, Upstate biomol USA-Lake Placid NY
- Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Clone MR12/53, Art. Nr. M0737, DakoCytomation, D-Hamburg
- Monoclonal Mouse Anti-Talin Clone 8D4, Art. Nr. T3287, SIGMA USA-Saint Louis Missouri
- Monoclonal Mouse Anti-vimentin Clone Vim 3B4, Art. Nr. M 7020, DakoCytomation, D-Hamburg
- Polyclonal Rabbit Anti-Cow Cytokeratin Wide Spectrum Screening (WSS), Art. Nr. Z0622, DakaCytomation D-Hamburg
- Polyclonal Rabbit Anti-FAK (C20), Art. Nr. sc-558, SANTA CRUZ

BIOTECHNOLOGY, D-Heidelberg

- Polyclonal Rabbit Anti-Integrin beta 1, Art. Nr. AB1952, CHEMICON® International, UK-Hampshire
- Precision Plus Protein Dual Color Standarts, Art. Nr. C161-0374, BIO-RAD, USA-Philadelphia
- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse, Art. Nr. Z0259 DakoCytomation, D-Hamburg

## 9.2 Lösungen und Puffer

### 2%iges APES für Objektträgerbeschichtung

APES	10 ml
Azeton	ad 500 ml

### Bouin'sche Lösung

Gesättigte Pikrinsäure	75 ml
Formalin (36 %)	25 ml
Eisessig	5 ml

### Tris Puffer

#### Stammlösung TRIS Puffer (10x)

Tris-HCl	121,1 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### Arbeitslösung TRIS Puffer (1x)

TRIS(10x)	100 ml
NaCl	8,5 g
Triton-X-100	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

PBS PufferStammlösung 0,04M PBS:

ddH <sub>2</sub> O	300 ml
NaCl (Sodiumchloride)	16,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Potassoim Phosphate Monobasic)	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sodium Phosphate Dibasic)	2,28 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Arbeitslösung 0,02M PBS:

0,04 M PBS	250 ml
ddH <sub>2</sub> O	250 ml

pH auf 7,3 einstellen

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

0,02 M PBS	498,5ml
Tween 20	1,5ml

Antikörper-Verdünnungspuffer (AVP):

0,3% Tween in 0,02M PBS	100ml
BSA	1,0g
Glycerol	45ml

pH auf 8,0 einstellen, mit 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,5)  
in 5ml Portionen aliquotieren und einfrieren

### 9.3 Statistik: SAS-output

ZELLWACHSTUM

SUSANNE Haupt

The GLM Procedure

Class Level Information

	Class	Levels	Values
SCHICHT	4	Collagen Fibronectin Laminin Unbeschichtet	
AUSSAAT		6	1 3 4 5 6 7

Number of observations 63

ZELLWACHSTUM  
SUSANNE Haupt

The GLM Procedure

Dependent Variable: NZELLEN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	15920314.71	1990039.34	41.58	<.0001
Error	54	2584423.70			
Corrected Total	62	18504738.41			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NZELLEN Mean
0.860337	25.61217	218.7686	854.1587

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SCHICHT	3	14206447.14	4735482.38	98.95	<.0001
AUSSAAT	5	1713867.57	342773.51	7.16	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SCHICHT	3	14026334.19	4675444.73	97.69	<.0001
AUSSAAT	5	1713867.57	342773.51	7.16	<.0001

ZELLWACHSTUM  
SUSANNE Haupt

The GLM Procedure  
Least Squares Means

LSMEAN	NZELLEN		
	SCHICHT	LSMEAN	Number
	Collagen	598.54944	1
	Fibronectin	1604.70616	2
	Laminin	676.35322	3
	Unbeschichtet	421.05910	4

Least Squares Means for effect SCHICHT  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: NZELLEN

i/j	1	2	3	4
1		<.0001	0.3604	0.0400
2	<.0001		<.0001	<.0001
3	0.3604	<.0001		0.0013
4	0.0400	<.0001	0.0013	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

## Danksagung

Frau Prof. Dr. Christiane Pfarrer möchte ich herzlich für das Vertrauen beim Überlassen des Themas danken. Ihre freundliche engagierte Unterstützung war mir während der Erstellung dieser Arbeit eine sehr große Hilfe. Besonderer Dank jedoch gilt der überaus schnellen Korrektur mit vielen hilfreichen Ratschlägen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser danke ich ebenfalls für die Überlassung des Themas, für seine stets angebotene Hilfsbereitschaft und für die ausnehmend freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Frau Dr. Martina Zeiler möchte ich für die Überlassung Ihrer Zellkultur danken, ohne diese von Ihr hart erarbeitete Grundlage wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich Ihr herzlich für Ihre regelmäßige Unterstützung und Ihr persönliches Interesse an meiner Arbeit und meinem Vorankommen danken.

Frau Dr. Karen Bücher danke ich für Ihr uneingeschränkt offenes Ohr und Ihre innovativen Ideen, welche mir oftmals aus der Stagnation geholfen haben. Ihre Tür stand mir zu jeder Zeit für Frage offen.

Für Ihre freundliche Einweisung und Unterstützung im Labor danke ich Frau Sigrid Kettner, Frau Susanne Schubert-Porth und Frau Kathrin Wolf. Neben Ihrer fachlichen Hilfe haben sie es zu jeder Zeit verstanden Fröhlichkeit in die Laborräume der Anatomie zu bringen. Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie für die nette Arbeitsatmosphäre und die freundliche Aufnahme in ihre angenehme Arbeitsgemeinschaft.

Bei den Mitarbeitern der Veterinär-Physiologie möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Mikroskops bedanken. Trotz großem Andrang auf dieses Gerät wurde es mir ermöglicht dort Bilder in bester Qualität zu erstellen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dierk Brockmeier bedanke ich mich ganz herzlich für die unkomplizierte nette Hilfe beim Erstellen des statistischen Teils der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Philip Bridger, welcher mir zu jeder Zeit unterstützend zur Seite gestanden hat und für jedes meiner Probleme gerne bereit war mit nach einer Lösung zu suchen. Insbesondere durch seine Hilfe in Computerfragen hat er mir eine Unmenge an Zeit erspart. Ohne Dich und Deinen freundschaftlichen Beistand lieber Philip wäre ich das eine oder andere Mal an dieser Arbeit verzweifelt.

Zuletzt möchte ich ein paar Menschen aus meinem persönlichen Umfeld danken, welche auf unterschiedlichste Weise, zum Beispiel durch Korrekturlesen oder liebevolle Motivation, einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt Heidi und Dr. Ulrich Goebel, Hermann Heyens, Christian Goebel, Nils Olaf Haupt, Dr. Nadine Weinmann, Dr. Kirsten Brockmeier, Ilona und Wolfgang Roloff, Marion Holl, Dr. Sabine Poltermann, Christina Coenen, Silke Schmitz, Dr. Thomas Fassbender, Simin Dexler, Sylvia, Jens und Marc Haupt, Alexandra und Dr. Markus Spies, Dr. Martin Scholz, Dr. Miriam Miller, Dr. Nicole Bridger und all denen, die an mich geglaubt haben.

## **Erklärung**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5254-4



9 783835 952546