



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



**Ultrastrukturelle Charakterisierung  
der Zell-Zell Interaktionen am Modell  
der beschränkten Trophoblastinvasion  
in der Rinderplazenta**

**Inaugural-Dissertation**

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

Eingereicht von

**CAROLA YVONNE LANG**

Gießen 2003

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

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

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

**Ultrastrukturelle Charakterisierung  
der Zell-Zell Interaktionen am Modell  
der beschränkten Trophoblastinvasion  
in der Rinderplazenta**

**Inaugural-Dissertation**

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

Eingereicht von

CAROLA YVONNE LANG

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2003

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser

2. Berichterstatter: Hdoz Dr. G. Schuler

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2003

*Meiner lieben Mutter gewidmet*

# INHALTSVERZEICHNIS

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** **III**

---

## **I. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT** **1**

---

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1 DIE BOVINE PLAZENTA</b>                                            | <b>1</b>  |
| 1.1.1 ALLGEMEINES ZUR ENTWICKLUNG UND TYPISIERUNG                         | 1         |
| 1.1.2 TROPHOBLASTINVASION IN DER EPITHELIOCHORIALEN RINDERPLAZENTA        | 3         |
| 1.1.3 DIE HAEMOCHORIALE HUMANE PLAZENTA UND DIE TROPHOBLASTINVASION       | 3         |
| <b>1.2 INTEGRIN-GESTEUERTE SIGNALÜBERTRAGUNG</b>                          | <b>6</b>  |
| 1.2.1 DIE INTEGRINE                                                       | 6         |
| 1.2.2 DIE REGULIERUNG UND FUNKTION DER INTEGRINE                          | 7         |
| 1.2.3 INTEGRINE UND ZELLMIGRATION                                         | 9         |
| 1.2.4 INTEGRINREZEPTOREN UND TROPHOBLASTINVASION                          | 11        |
| 1.2.5 INTEGRINE UND SIGNALÜBERTRAGUNG DURCH PROTEINKINASEPHOSPHORYLIERUNG | 12        |
| <b>1.3 DAS ZYTOSKELETT</b>                                                | <b>15</b> |
| 1.3.1 DAS ZYTOSKELETT                                                     | 15        |
| <b>1.4 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (ECM)</b>                                | <b>20</b> |
| 1.4.1 ZUSAMMENSETZUNG DER ECM UND IHRE FUNKTION                           | 20        |
| 1.4.2 DIE ECM DER TROPHOBLASTRIESENZELLEN                                 | 21        |
| <b>1.5 ZIELSETZUNG DER STUDIE</b>                                         | <b>22</b> |

## **II. MATERIAL UND METHODEN** **23**

---

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1 MATERIAL</b>                                                       | <b>23</b> |
| 2.1.1 ENTNAHME UND FIXIERUNG DER PROBEN                                   | 24        |
| <b>2.2 METHODEN</b>                                                       | <b>25</b> |
| 2.2.1 IMMUNOGOLD-METHODE                                                  | 25        |
| 2.2.2 KRYOSTATSCHNITTE UND VORBEREITUNG ZUR IMMUNHISTOCHEMIE AUF LM-EBENE | 27        |
| 2.2.3 ULTRAMIKROTOMIE UND VORBEREITUNG FÜR DIE IMMUNFÄRBUNG AUF TEM-EBENE | 28        |
| <b>2.3 PROTOKOLLE</b>                                                     | <b>29</b> |
| <b>2.4 KONTROLLEN</b>                                                     | <b>33</b> |
| <b>2.5 SCHNITT-KONTRASTIERUNG UND TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE</b>  | <b>33</b> |
| <b>2.6 FOTOGRAFIE</b>                                                     | <b>34</b> |

## **III. ERGEBNISSE** **35**

---

|                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.1 IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER ACTIN-EXPRESSION</b>                                                                | <b>35</b> |
| 3.1.1 IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER ACTIN-EXPRESSION                                                          | 37        |
| <b>3.2 IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER A-ACTININ-EXPRESSION</b>                                                            | <b>44</b> |
| 3.2.1 IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER A-ACTININ-EXPRESSION                                                      | 45        |
| <b>3.3 IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER VINCULIN-EXPRESSION</b>                                                             | <b>47</b> |
| <b>3.4 IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER PHOSPHORYLIERTEN MITOGEN-AKTIVIERTEN<br/>PROTEINKINASE (PMAPK)-EXPRESSION</b>       | <b>50</b> |
| 3.4.1 IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER PHOSPHORYLIERTEN MITOGEN-<br>AKTIVIERTEN PROTEINKINASE (PMAPK)-EXPRESSION | 52        |

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>IV. DISKUSSION</b>                                                                                       | <b>54</b> |
| <b>4.1 ALLGEMEINES ZU DEN LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN ERGEBNISSEN</b>                              | <b>54</b> |
| 4.1.1 KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODE                                                                     | 54        |
| <b>4.2 DAS ZYTOSKELETT UND DIE TROPHOBLASTMIGRATION</b>                                                     | <b>55</b> |
| <b>4.3 ASPEKTE ZUR PHOSPHORYLIERTEN MITOGEN-AKTIVIERTEN PROTEINKINASE</b>                                   | <b>59</b> |
| <b>4.4 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN TROPHOBLASTMIGRATION UND TUMORWACHSTUM<br/>BEZIEHUNGSWEISE METASTASIERUNG</b> | <b>61</b> |
| <b>4.5 INTEGRINE IM BOVINEN REPRODUKTIONSTRAKT UND TROPHOBLASTMIGRATION</b>                                 | <b>62</b> |
| <b>V. LITERATURVERZEICHNIS</b>                                                                              | <b>63</b> |
| <b>VI. ZUSAMMENFASSUNG</b>                                                                                  | <b>77</b> |
| <b>VII. SUMMARY</b>                                                                                         | <b>79</b> |
| <b>VIII. ANHANG</b>                                                                                         | <b>81</b> |
| 8.1 VERWENDETE LÖSUNGEN                                                                                     | 81        |
| <b>DANKSAGUNG</b>                                                                                           | <b>84</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>mRNA</b>                       | Messenger-Ribonukleinsäure                                                          |
| <b>Aqua bidest.</b>               | Aqua bidestillata                                                                   |
| <b>Aqua dest.</b>                 | Aqua destillata                                                                     |
| <b>ATP</b>                        | Adenosintriphosphat                                                                 |
| <b>BNC</b>                        | zweikernige Zellen (binuclear cells)                                                |
| <b>BSA-c</b>                      | acetyliertes bovines Serumalbumin                                                   |
| <b>CAM</b>                        | Zelladhäsionsmolekül (cell adhesion molecule)                                       |
| <b>CT</b>                         | Zytotrophoblastzellen (cytotrophoblast cells)                                       |
| <b>DAB</b>                        | 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid                                               |
| <b>DNA</b>                        | Desoxyribonukleinsäure                                                              |
| <b>ECM</b>                        | Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)                                        |
| <b>EGF</b>                        | Epidermaler Wachstumsfaktor                                                         |
| <b>EMT</b>                        | epithelio-mesenchymale Transformation                                               |
| <b>ERK</b>                        | extrazellulär signalregulierte Kinase                                               |
| <b>EtOH</b>                       | Ethanol                                                                             |
| <b>F</b>                          | Fibrozyt(en)                                                                        |
| <b>FAK</b>                        | fokale Adhäsionskinase                                                              |
| <b>FGF</b>                        | Fibroblasten-Wachstumsfaktor                                                        |
| <b>FITC</b>                       | Fluoresceinisothiocyanat                                                            |
| <b>FM</b>                         | fetales Mesenchym                                                                   |
| <b>GAM</b>                        | Goat-Anti-Mouse                                                                     |
| <b>GAR</b>                        | Goat-Anti-Rabbit                                                                    |
| <b>H</b>                          | Stunde (hour)                                                                       |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Wasserstoffperoxid                                                                  |
| <b>IF</b>                         | Intermediärfilament(e)                                                              |
| <b>IFAP(s)</b>                    | Intermediärfilament-assoziierte(s) Protein(e)                                       |
| <b>JNK</b>                        | c-Jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase                                             |
| <b>K</b>                          | Kapillare                                                                           |
| <b>MEK</b>                        | Proteinkinase (phosphoryliert spezifisch Threonin- und Tyrosinreste der MAP-Kinase) |
| <b>MMP</b>                        | Metalloproteinase(n)                                                                |
| <b>MS</b>                         | maternales Stroma                                                                   |
| <b>N</b>                          | Nukleus, Nuklei                                                                     |
| <b>NaBH<sub>4</sub></b>           | Natriumborohydrid                                                                   |
| <b>NaCl</b>                       | Natriumchlorid                                                                      |
| <b>OsO<sub>4</sub></b>            | Osmium                                                                              |
| <b>PBS</b>                        | phosphate buffered saline                                                           |
| <b>PCR</b>                        | polymerase chain reaction                                                           |
| <b>PDGF</b>                       | Platelet-derived growth factor                                                      |
| <b>PGF<sub>2α</sub></b>           | Prostaglandin F <sub>2α</sub>                                                       |
| <b>p. i.</b>                      | post inseminationem                                                                 |
| <b>PKC</b>                        | Proteinkinase C                                                                     |
| <b>pMAPK</b>                      | phosphorylierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase                                    |
| <b>RGD-Sequenz</b>                | Arg-Gly-Asp-Aminosäuresequenz; Erkennungsregion für Integrine, an der sie binden    |
| <b>RPM</b>                        | rotations per minute                                                                |
| <b>RT</b>                         | Raumtemperatur                                                                      |
| <b>SSL</b>                        | Scheitel-Steiß-Länge                                                                |
| <b>T</b>                          | uninukleärer Trophoblast                                                            |
| <b>TEM</b>                        | Transmissions-Elektronen-Mikroskopie                                                |
| <b>TGC</b>                        | Trophoblastriesenzellen (trophoblast giant cells)                                   |
| <b>TIMP</b>                       | Tissue inhibitor of metalloproteinase                                               |
| <b>UE</b>                         | Uterusepithel                                                                       |



# **I. Einleitung und Literaturübersicht**

## 1.1 Die bovine Plazenta

### *1.1.1 Allgemeines zur Entwicklung und Typisierung*

Das Rind besitzt eine kotyledonäre Plazenta, die durch sogenannte Plazentome charakterisiert ist. Von ihnen bilden sich im Laufe der Gravidität zwischen 70 bis 150 Stück aus. Die Plazentome bestehen aus zwei Anteilen, fetalen Kotyledonen und maternalen Karunkeln (Björkman und Sollen 1960), die sich zur Zeit der Geburt trennen, weshalb die Nachgeburt des Rindes lediglich aus fetalem Gewebe besteht – also vergleichend plazentologisch nur eine halbe Plazenta darstellt. Deshalb definierte Strahl (1906) die Rinderplazenta als *Semiplazenta multiplex sive cotyledonaria*.

Das Trophektoderm oder der Trophoblast bildet die äußere Wand der Blastozyste. Diese äußere Zellschicht bildet zusammen mit dem parietalen Mesoderm das sekundäre Chorion (Übersicht Schlafer et al. 2000). Die sich später ausbreitende Allantoisblase (Entoderm und viszerales Blatt des Mesoderms [liefert die Blutgefäße]) legt sich direkt an das Chorion und bildet so das Allantochorion. Im Bereich der Karunkeln des Endometriums kommt es zur Bildung der fetalen Kotyledonen des Chorions (Übersicht Schnorr und Kressin 2001). Diese bilden Zotten aus, die baumartig in Form von Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten mit den Krypten der Karunkel interdigitieren (Björkman 1969; Übersicht Leiser und Kaufmann 1994). Dies bezeichnet man außerdem nach der Form der fetomaternalen Interdigitation als villösen Typ der Plazentation (Übersicht Leiser und Kaufmann 1994). Die Zotten selbst bestehen aus vaskularisiertem Mesenchym, welche vom Chorionepithel (Trophoblast) umgeben sind. Die Karunkeln ihrerseits bestehen aus bindegewebigen Septen, die mit einem einschichtigen isoprismatischen Epithel, dem Uterusepithel, bedeckt sind (Björkman und Sollen 1960). Aufgrund des Erhaltes aller Gewebeschichten sowohl auf fetaler (Chorionepithel, Mesenchym und Gefäßendothelien) als auch auf maternaler (Uterusepithel, Bindegewebe des Septenstromas und Gefäßendothelien) Seite gehört die Rinderplazenta zum epitheliochorialen Plazentatyp (Grosser 1909, 1927), bei dem es unter der Geburt nicht zu einem Gewebsverlust mit Blutungen (adeziduate Plazenta, Strahl 1906) und nicht zu einer endometrialen Invasion des Trophoblasten

wie in hämochorialen Plazenten kommt (Übersicht Leiser und Kaufmann 1994; Schnorr et al. 2001). Bei Wiederkäuern ist aber eine Migration von Trophoblastzellen in das Uterusepithel (Rind) und Synzytienbildung (Schaf und Ziege) bekannt, weswegen Wooding (1992) den Begriff der synepitheliochorialen Plazenta prägte.

Innerhalb des bovinen fetalen Chorionepithels unterscheidet man zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen (Wimsatt 1951; Greenstein et al. 1958): Zum einen mononukleäre Trophoblastzellen, die der Basalmembran aufliegen und alle Charakteristika von Epithelzellen, wie beispielsweise Polarität, aufweisen. Sie nehmen über interdigitierende Mikrovilli Kontakt mit dem Uterusepithel auf und bilden so die fetomaternale Kontaktzone (Leiser 1975; Steven 1975; Kaufmann 1981). Der zweite Zelltyp sind Trophoblastriesenzellen (trophoblast giant cells, TGC), die hauptsächlich zweikernig (binuclear cells, BNC; Diplokaryozyten) vorliegen und einen DNA-Inhalt von bis zu 32 C (Klisch et al. 1999) aufweisen können. Es wird angenommen, dass sie von einkernigen Trophoblastzellen abstammen (Wimsatt 1951) und durch azytokinetische Mitose derselben entstehen (Klisch et al. 1999). Sie weisen keine Charakteristika von epithelialen Zellen auf und haben daher keinen Kontakt zur Basallamina. Außerdem beteiligen sie sich nicht an apikalen Komplexen des Epithels. Durch die fehlende Polarität sind sie in der Lage, auf das uterine Epithel hin zu migrieren (Wimsatt 1951; Davies und Wimsatt 1966), bilden dabei eine temporäre Komponente der trophektodermalen „Tight junctions“ (Wooding et al. 1980; Morgan and Wooding 1993) und fusionieren schließlich mit einzelnen Karunkelepithelzellen. Bei Schaf und Ziege kommt es dabei zur Entstehung von mehrkernigen fetomaternalen Synzytien, die beim Rind nur transient während der Implantation auftreten (Wooding 1982). Hier dominiert vielmehr die Bildung von dreikernigen Hybridzellen (Wooding 1992), die letztendlich degenerieren (Hoffmann und Wooding 1993) oder vom Trophoblasten resorbiert werden (Schuler 2000). Björkman (1968) wies auf strukturelle Unterschiede zwischen den zweikernigen TGC im Trophoblasten selbst und den mindestens dreikernigen fetomaternalen Hybridzellen im uterinen Kryptenepithel hin. Demnach besitzen die Hybridzellen des Kryptenepithels große Kerne und ein stark verringertes Zytoplasma mit nur wenigen Organellen. Sie sind mit Mikrovilli ausgestattet, die mit denen des Trophoblasts korrespondieren.

Die TGC des Trophoblasten hingegen weisen zwar ebenso große Zellkerne auf, zeichnen sich aber durch viele Zytoplasmakomponenten und fehlende Mikrovilli aus. TGC entstehen während der gesamten Gravidität bis in die letzte Woche hinein und bilden 15 - 22 % der Trophoblastzellen (Wooding 1983). Sie besitzen charakteristische Granula, die bis über 50 % des Volumens von murenen TGC einnehmen können. In ihnen sind Proteine und Glykoproteine, wie plazentäres Laktogen und graviditätsspezifische (Glyko)Proteine gespeichert, die nach der Fusion mit einer Uterusepithelzelle freigesetzt und somit an das maternale Kompartiment übermittelt werden (Wooding 1992; Klisch et al. 1999). TGC werden außerdem aufgrund ihrer verminderten Zahl am Ende der Gravidität mit der Ablösung der Plazenta in Zusammenhang gebracht, wobei man hier eine gegensätzliche Korrelation zwischen fetaler Plasmacortisolkonzentration und der Anzahl der BNC in der ovinen Plazenta nachweisen kann, so dass Cortisol die BNC Population während der späten Trächtigkeit reguliert (Ward et al. 2002).

#### *1.1.2 Trophoblastinvasion in der epitheliochorialen Rinderplazenta*

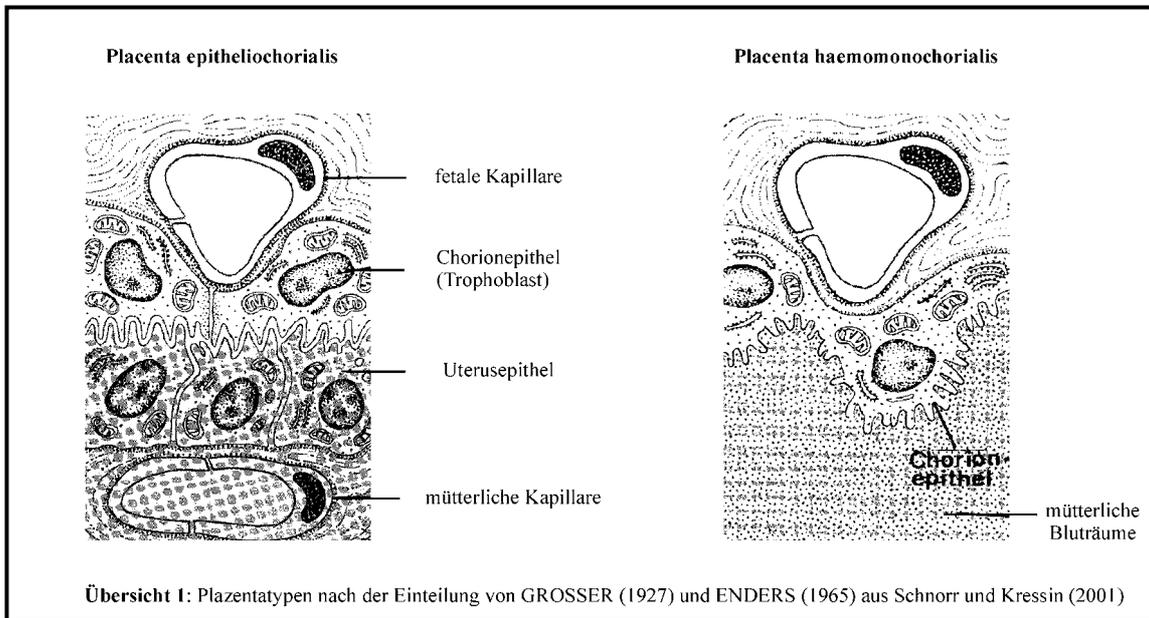
Wie bereits erwähnt, findet in der Rinderplazenta die Migration von TGC aus dem Chorionepithelverband in Richtung auf das maternale Karunkelepithel statt, die in einer Fusion mit maternalen Epithelzellen gipfelt und so zur Bildung von dreikernigen Hybridzellen führt (Wimsatt 1951; Björkman 1968; Wooding 1992; Klisch et al. 1999). Diese Migration „durch die Tight junctions des Chorions“ (Wooding 1992) mündet in der apikalen Fusion mit dem uterinen Epithel über Pseudopodien (Wathes und Wooding 1980) und endet mit der Degeneration der Hybridzellen (Wooding 1992; Hoffman und Wooding 1993). Die Endstadien werden vermutlich auf fetaler Seite durch Phagozytose von mononukleären Trophoblastzellen beseitigt (Schuler 2000).

#### *1.1.3 Die haemochoriale humane Plazenta und die Trophoblastinvasion*

Der humane Trophoblast differenziert sich in zwei Zelltypen: Einen villösen Typ, der in Zellfusion und Synzytien resultiert, und einen extravillösen Typ, der ein invasives Verhalten annimmt und Zelloberflächenmerkmale einer Endothelzelle aufweist (Morrish et al. 1998). Im Gegensatz zur epitheliochorialen Plazenta findet bei der haemomonochorialen Plazenta (Enders 1965) eine Invasion des Trophoblasten in das Endometrium statt, die große Teile des Endometriums (Uterusepithel, Bindegewebe und

Endothelien) degenerieren lässt und so einen direkten Kontakt zwischen Chorionepithel und mütterlichem Blut über folgenden Mechanismus erlaubt: Der Trophoblast proliferiert am Invasionsort und es kommt zu einer Verschmelzung der dem mütterlichen Epithel direkt anliegenden Trophoblastzellen, die als primärer Synzytiotrophoblast bezeichnet werden. Dieses Synzytium wächst im folgenden unter Zerstörung der endometrialen Stromabestandteile durch Zellfusion aus dem Zytotrophoblast (Becker et al. 1981; Benirschke und Kaufmann 1995). Innerhalb des Synzytiums treten ab dem 8. Tag p.c. zu Lakunen konfluierende Einschmelzungsherde auf, die von Trabekeln aus Synzytiotrophoblast durchzogen werden. Durch den weiter eindringenden Trophoblast kommt es zur Arrosion der maternalen Endometriumgefäße, so dass maternales Blut in die oben genannten Lakunen gelangt. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Proliferation und synzytialer Verschmelzung des Zytotrophoblasten, die die Primärzotten entstehen lässt, die wiederum durch Längenwachstum über Zellsäulen (Sekundärzottenstadium) zum Zottenbaum proliferieren (Becker et al. 1981). Ab dem 15. Tag p.c. beginnt die Ausbreitung von Mesenchymzellen, die innerhalb weniger Tage alle bis dahin rein trophoblastischen Plazentazotten „aushöhlen“. Zusätzlich erscheinen kleine Blutgefäße im Zottenbindegewebe. Die Bildung von Tertiärzotten und Ausbreitung des Zottenbaumes erfolgt über dichotome Verzweigungen und Zottenproliferation, die Verdünnung des Synzytiums sowie eine zentrifugale Verlagerung der Zottenkapillaren.

Übersicht 1 zeigt schematisch die Gegenüberstellung der Gewebserhaltung von epithelio- beziehungsweise haemomonochorialer Plazenta



## 1.2 Integrin-gesteuerte Signalübertragung

### 1.2.1 Die Integrine

Die Integrine sind Transmembranrezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, die intrazelluläre Actinfilamente über assoziierte Proteine mit extrazellulären Matrixproteinen verbinden. Sie bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen Transmembran-Glykoproteinen, nämlich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Alberts et al. 1999). Die Untereinheiten setzen sich jeweils aus einer langen extrazellulären, einer kurzen transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne unterschiedlicher Länge zusammen. Die extrazellulären Domänen beider Untereinheiten bilden zusammen die Bindungsstelle für Liganden. Es sind bis heute 24 verschiedene, durch unterschiedliches Spleißen entstandene Heterodimere bekannt, die aus 18 verschiedenen  $\alpha$ - und 9  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind (van de Flier und Sonnenberg 2001; siehe Tabelle 1). Ein Integrinheterodimer kann mehr als ein Matrixmolekül binden, wobei die Erkennung vor allem über die RGD-Sequenz (= [Arg-Gly-Asp] Aminosäuresequenz) erfolgt (Ruoslahti 1996; Alberts et al. 1999) oder über Proteine, die die RGD-Sequenz enthalten, zum Beispiel Fibronectin und Vitronectin (Übersicht Kumar 1998). Sie ist außerdem vom Vorliegen zweiwertiger Ionen abhängig, und zwar je nach Typ von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , die im extrazellulären Raum an die  $\alpha$ -Untereinheit binden. Grundsätzlich können gleiche Integrine in verschiedenen Zelltypen an verschiedene Liganden binden. Diese Tatsache lässt eine Beteiligung von weiteren zellspezifischen Faktoren bei der Integrinbindung vermuten. Nach der Bindung an die extrazelluläre Matrix (ECM) lagern sich zytoplasmatisch Talin und  $\alpha$ -Actinin an die  $\beta$ -Kette, so dass ein Komplex aus intrazellulären Anheftungsproteinen (focal adhesion complex) entsteht. Dieser verbindet sich wiederum mit Actinfilamenten, die in der Folge eine Konformationsänderung durchmachen. Eine Ausnahme stellt das  $\alpha_6\beta_4$ -Integrin dar, welches über Hemidesmosomen an Intermediärfilamente koppelt.  $\beta_2$ -Integrine sind für Zell-Zell-, nicht aber für Zell-Matrix-Wechselwirkungen verantwortlich, da ihre Liganden zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehören (Übersicht Alberts et al. 1999).

Makromoleküle der ECM können Form, Polarität, Bewegung, Stoffwechsel, Entwicklung und andere differenzierte Funktionen von Zellen über die Bindung von Integrinen beeinflussen, die intrazelluläre Signal-Übertragungskaskaden auslösen (Alberts et al. 1999). Bestimmte Integrine binden jedoch auch an lösliche Liganden wie Fibrinogen oder interzelluläre Adhäsionsmoleküle in angrenzenden Zellen (Übersicht Kumar 1998).

### *1.2.2 Die Regulierung und Funktion der Integrine*

Die Aktivität der Integrine als Bindungselement wird durch die Zelle selbst geregelt (Übersicht Garratt und Humphries 1995). Dieser Vorgang wird durch die Veränderung des zytosolischen Umfeldes, mit dem die Integrine über ihre Schwänze auf intrazytoplasmatischer Seite in Verbindung stehen, gesteuert und als „Inside-out Signaling“ definiert (Schwartz et al. 1995). Dabei spielen die  $\alpha$ -Untereinheiten eine negative Rolle in der Regulation der Integrinaktivität (La Flamme et al. 1992; Chen et al. 1994). Die mit der  $\beta$ -Kette interagierenden zytosolischen Faktoren wiederum müssen für eine erfolgreiche Signalübertragung vermutlich in größerer Zahl akkumuliert vorliegen (Lukashev et al. 1994). Auch Integrine liegen in Zelladhäsionskomplexen gebündelt vor (Geiger et al. 1995). Dabei ist die biologische Funktion der Integrine in ihrer Eigenschaft als Adhäsionsrezeptor für die Übertragung von Signalen und Änderung der mechanischen Struktur des Zytoskelettes (Miyamoto et al. 1995; Übersicht Schoenwaelder und Burridge 1999) zu verstehen. Hierbei sind Integrin-Ligandenbindung, Integrinakkumulation und die folgende Aktivierung von Signalketten unabdingbar miteinander gekoppelt. Es kann außerdem eine Aktivierung verschiedener Integrinrezeptoren einer Zelle nötig sein, um die volle biologische Wirksamkeit zu erreichen (Miyamoto et al. 1995). Integrine reagieren also mit Konformationsänderung auf Signale aus dem Zytoplasma oder der extrazellulären Umgebung und erfüllen so ihre Aufgabe als Vermittler beim Austausch von Informationen zwischen einer Zelle und ihrem umgebenden Gewebe (Garratt et al. 1995).

Tabelle 1 zeigt Integrine und ihre Liganden, Übersicht 2 eine schematische Darstellung der Integrinwirkung.

Einleitung und Literaturübersicht

| Integrin             | Ligand                                      |                                                                            |                                      |                                                                                                                                                               |
|----------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                      | ECM                                         | Gelöst                                                                     | Zell – Zell                          | Pathogen /Toxine                                                                                                                                              |
| $\alpha_1\beta_1$    | Co; Ln                                      |                                                                            |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_2\beta_1$    | Co; Ln;<br>Chad                             | MMP-1                                                                      |                                      | Echovirus 1,8; Rotavirus; Bluteigel (rLAPP)                                                                                                                   |
| $\alpha_3\beta_1$    | Ln; Rn;<br>Tsp-1<br>(Co; Fn)                |                                                                            | $(\alpha_2\beta_1; \alpha_3\beta_1)$ | Yersinia spp. (invasin)                                                                                                                                       |
| $\alpha_4\beta_1$    | Fn; Op                                      | pp-vWF; tTG; FXIII<br>Angiostatin                                          |                                      | Yersinia spp. (invasin); Rotavirus                                                                                                                            |
| $\beta_7$            | Fn                                          |                                                                            | VCAM-1;<br>MAdCAM;<br>$(\alpha_4)$   |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_5\beta_1$    | Fn                                          | tTG; Endostatin                                                            | ADAM-15,<br>17; L1                   | Yersinia spp; B. burgdorferi; Shigella spp. (ipa);<br>B. pertussis (fimD); Maul- und Klauenseuche-<br>Virus                                                   |
| $\alpha_6\beta_1$    | Ln                                          | Fisp12/mCTGF; Cyr61                                                        | ADAM-2,9                             | Papilloma-Virus; Yersinia spp. (invasin)                                                                                                                      |
| $\beta_4$            | Ln                                          |                                                                            |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_7\beta_1$    | Ln                                          |                                                                            |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_8\beta_1$    | Fn; Tn;<br>Nn                               | TGF $\beta$ 1-LAP                                                          |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_9\beta_1$    | Tn; Op;<br>Co; Ln                           | pp-vWF; tTG, FXIII<br>Angiostatin                                          | VCAM-1;<br>ADAM-12,<br>15            |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_{10}\beta_1$ | Co                                          |                                                                            |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_{11}\beta_1$ | Co                                          |                                                                            |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_v\beta_1$    | Fn; Vn                                      | TGF $\beta$ 1-LAP                                                          |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\beta_3$            | Vn; Fn,<br>vWF;<br>Op; Tn;<br>Bsp;<br>Tsp-1 | Fg; Cyr61;<br>Fisp12/mCTGF;<br>MMP2, Endostatin,<br>Angiostatin; Tumstatin | ADAM-15,<br>23;<br>CD31              | Schlangengifte (Disintegrine); Adenovirus,<br>Rotavirus; Maul- und Klauenseuche-Virus,<br>Coxsackievirus A9; Parechovirus 1; Hantavirus;<br>HIV (tat Protein) |
| $\beta_5$            | Vn; Bsp                                     | TGF $\beta$ 1-LAP; Cyr61;<br>Endostatin                                    |                                      | HIV (tat Protein)                                                                                                                                             |
| $\beta_6$            | Fn; Tn                                      | TGF $\beta$ 1-LAP                                                          |                                      | Maul- und Klauenseuche-Virus                                                                                                                                  |
| $\beta_8$            | Co; Ln;<br>Fn                               | TGF $\beta$ 1-LAP                                                          |                                      |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_{1b}\beta_3$ | Vn; Fn;<br>vWF                              | Fg; Cyr61;<br>Fisp12/mCTGF;<br>Prothrombin                                 |                                      | B. burgdorferi; Schlangengifte (Disintegrine);<br>ticks (Variabilin, Disagregin); Bluteigel (Decorsin,<br>Ornatin)                                            |
| $\alpha_i\beta_2$    |                                             |                                                                            | ICAM-1-5                             |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_M\beta_2$    |                                             | Fg; iC3b;FX                                                                | ICAM-1;<br>VCAM-1                    | B. burgdorferi, B. pertussis; C. albicans                                                                                                                     |
| $\alpha_x\beta_2$    |                                             | Fg; iC3b                                                                   |                                      | Rotavirus                                                                                                                                                     |
| $\alpha_D\beta_2$    |                                             |                                                                            | ICAM-3,<br>VCAM-1                    |                                                                                                                                                               |
| $\alpha_E\beta_2$    |                                             |                                                                            | E-Cadherin                           |                                                                                                                                                               |

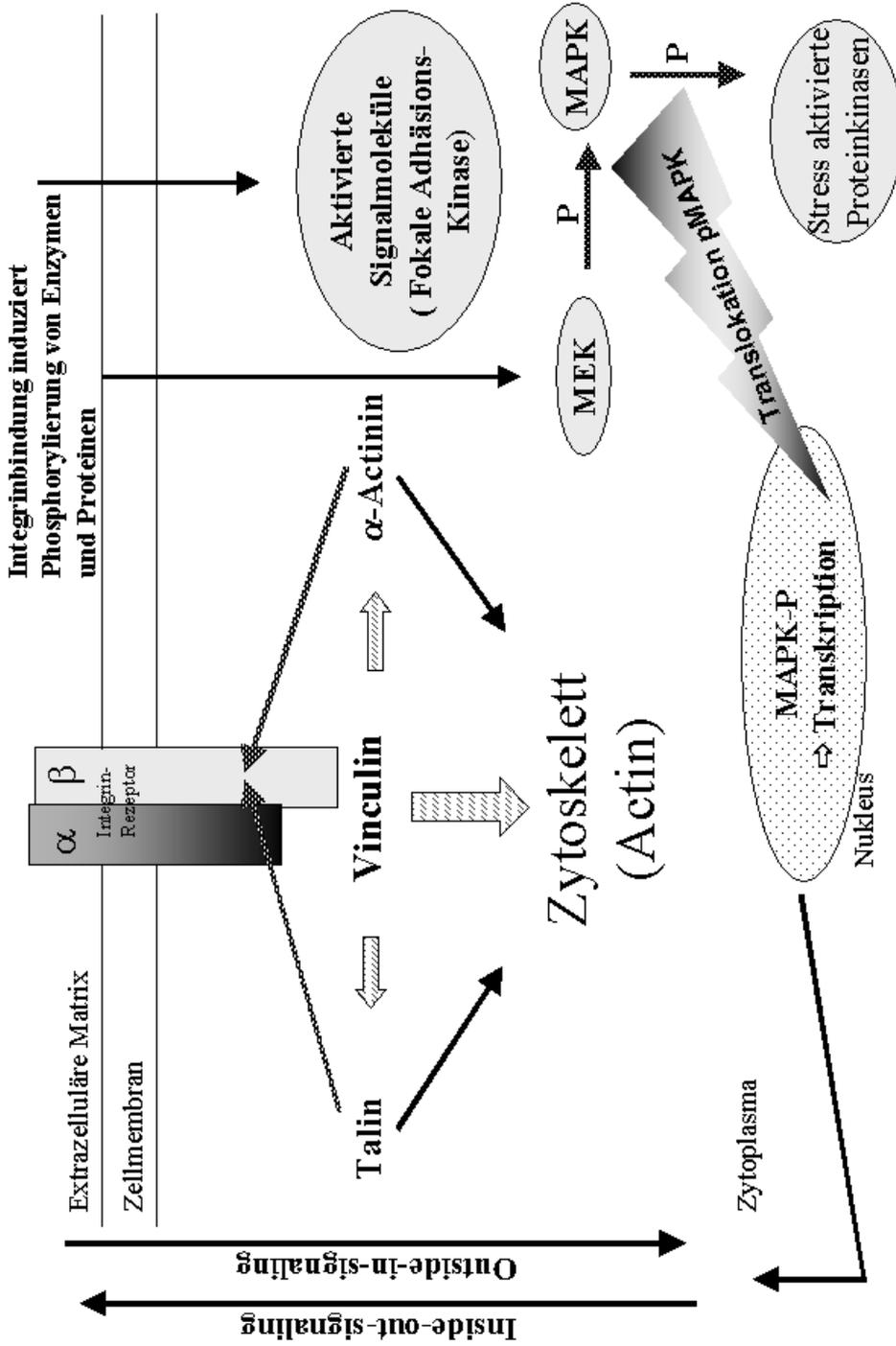
Tabelle 1: Integrine und ihre Liganden (van de Flier et al. 2001); siehe Erklärungen der Abkürzungen auf folgender Seite

Erklärung zur Tabelle 1, vorangehende Seite:

*ADAM A* Disintegrin und Metalloprotease, *B. burgdorferi* Borrelia burgdorferi, *B. pertussis* Bordetella pertussis, *Bsp* Bone sialic protein, *C. albicans* Candida albicans, *Chad* Chondroadherin, *Cyr61* Cystein-rich angiogenic protein 61, *Co* Kollagen, *Fg* Fibrinogen, *Fn* Fibronectin, *FX* Koagulationsfaktor X, *FXIII* Koagulationsfaktor XIII, *iC3b* inaktivierte Komplement Komponente C3b, *ICAM* intrazelluläres Adhensionsmolekül, *Ln* Laminin, *MAdCAM* mucosal addressin cell adhesion molecule, *mCTGF* mouse connective tissue growth factor, *MMP* Matrix Metalloproteinase, *Nn* Nephronectin, *Op* Osteopontin, *pp-vWF* prepro von Willebrand Faktor, *Rn* Reelin, *TGFβ-LAPTGFβ* latency-associated peptide, *Tn* Tenascin, *Tsp* Thrombospondin, *tTG* tissue Transglutaminase, *VCAM-1* vascular cell adhesion molecule-1, *Vn* Vitronectin, *vWF* von Willebrand Faktor

### 1.2.3 Integrine und Zellmigration

Huttenlocher et al. (1998) haben in ihrer Studie an primären Myoblasten gezeigt, dass Integrinen und N-Cadherin eine zentrale Rolle in der Regulation von Differenzierung und Migration von Zellen zukommt, da N-Cadherin die kontaktabhängige Migration von ektopisch  $\alpha_5$  und  $\beta_1$  exprimierenden und normalerweise migrierenden Myoblasten unterbindet und so Integrine und N-Cadherin bei der Regulation von Kontakt induzierter Hemmung der Migration und motiler Aktivität vermutlich synergistisch wirken. Auch den  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_6$  Integrinen wird eine Beteiligung bei der Migration und Proliferation von verschiedenen Zellen, wie vaskulären Endothelzellen oder Epithelien der Milchdrüse, zugesprochen (Kumar 1998). MacLaren und Wildemann (1995) vermuten eine Beteiligung von  $\beta_1$  bei der Migration von TGC in der bovinen Plazenta. Auch die Stimulierung der Migration humaner Trophoblastzellen über eine  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-vermittelte Aktivierung des MAP-Kinasen-Signalweges durch Insulin-like growth-factor-binding protein 1 wurde nachgewiesen (Gleeson et al. 2001).



**Übersicht 2:** Schematische Darstellung der Integrin-Zusammenhänge nach Literatur (durch die Autorin)

Integrinvermittelte Signalübertragung kann über zwei getrennte Wege erfolgen: 1. Ligandenbindung führt über Akkumulation assoziierter Proteine, wie  $\alpha$ -Actinin, Talin und Vinculin zu Konformationsänderung des Actin-Zytoskeletts, welche ihrerseits Signalwirkung für Vorgänge im Nukleus hat. 2. Integrinbindung initiiert eine Signalkette über die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinkinasen (vor allem MEK, die die MAP-Kinase spezifisch an ihren Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert). Phosphorylierte bzw. aktivierte MAP-Kinase wird in den Kern transloziert und bewirkt hier Transkriptionsänderungen. Über beide Wege kann sowohl ein Inside-out als auch Outside-in Signaling vermittelt werden.

#### *1.2.4 Integrinrezeptoren und Trophoblastinvasion*

Die Zytotrophoblastzellen (CT) der haemochorialen humanen Plazenta bilden ein polares Epithel, das basal zunächst  $\alpha_6\beta_4$  Integrin exprimiert (Damsky et al. 1992). Parallel dazu wird das  $\alpha_5\beta_1$  Integrin (Fibronektinrezeptor, Fn) hochreguliert sowie eine fibronektinreiche, zellassozierte extrazelluläre Matrix (ECM) ausgebildet. Bei der Wanderung und Invasion einzelner CT in das Endometrium kann dann die Expression von  $\alpha_1\beta_1$  Integrin, dem Kollagen/Laminin Rezeptor, und die fortgeführte Expression von  $\alpha_5\beta_1$  Fn-Rezeptor nachgewiesen werden. Eine Detektion von  $\alpha_6\beta_4$  ist nach der Invasion nicht mehr möglich. Daraus schließen Damsky et al. (1992), dass die Modulation von Adhäsions-Rezeptoren funktionell wichtig für die Entstehung der Invasivität sein könnte. Zudem konnte die gleiche Arbeitsgruppe 1994 zeigen, dass der  $\alpha_1\beta_1$  Integrinrezeptor bedeutend für die Invasion des CT zu sein scheint, da eine Antikörper-vermittelte Störung von Interaktionen zwischen Laminin oder Kollagen Typ IV und ihrem Integrinrezeptor  $\alpha_1\beta_1$  zu einer Hemmung der Invasivität von CT führen kann. Im Gegensatz dazu führte die Antikörper-vermittelte Störung der Interaktion zwischen Fibronektin und seinem  $\alpha_5\beta_1$  Rezeptor zu einer Anregung der Invasivität (Damsky et al. 1994). Fibronektin agiert also als eine Brücke zwischen der Kollagen-Matrix und  $\alpha_5\beta_1$  Integrin auf der CT-Oberfläche und vermittelt so die Migration des Trophoblasten (Aplin et al. 1999).

In der Rinderplazenta lässt sich  $\beta_1$  am Tag 24 post inseminationem basolateral an den fetalen mononukleären Trophoblastzellen und in den binukleären Zellen finden, woraus MacLaren und Wildemann (1995) eine funktionelle Beteiligung dieser Integrinuntereinheit an der Migration und Entwicklung der Zellen schließen. Nach Hirsch (2000) ist das  $\beta_1$  Integrin beim Rind in den TGC besonders in der frühen Plazentation nachzuweisen; daneben ist  $\beta_1$  basal an fetalen und maternalen Epithelien zu finden, wo es mit  $\alpha_6$  einen Rezeptor für das Laminin der Basalmembranen bilden kann. Dabei ist anzumerken, dass  $\alpha_2$ ,  $\alpha_6$  und  $\beta_1$  die einzigen Integrinuntereinheiten sind, die beim Rind von Trophoblastzellen fast während der gesamten Plazentation (80.-270. Tag) exprimiert werden (Hirsch 2000). Pfarrer et al. (2003) vermuten, dass die TGC entlang ihrer „eigenen“ im Zytoplasma ringförmig exprimierten Lamininmatrix migrieren und Zell-Zell-Kontakte mit benachbarten Zellen über das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vermitteln.

Hemberger et al. (2000) vergleichen die Trophoblastinvasion mit dem invasiven Verhalten von Tumorzellen, da sie in ihrer Studie durch cDNA Subtraktion Gene in der Nagerplazenta (= hämochoriale Plazenta) nachweisen konnten, die dem bekannten Mausgen MPS1 und Cathepsin L-Proteinen ähnlich sind. Sie vermuten daher, dass diese Gene (EPCS50, EPCS24 und EPCS68) an der Übermittlung von invasiven Eigenschaften an den Maustrophoblasten beteiligt sind. Die Trophoblastinvasion selbst steuert die Freisetzung von Proteinasen, die die extrazelluläre Matrix (ECM) degradieren. Im Trophoblasten der Maus sind dies Serinproteinasen, Matrix Metalloproteinasen und Cysteinproteinasen, die einer Reihe von auf maternaler Seite sezernierten Inhibitoren gegenüberstehen (Alexander et al. 1996). Deshalb wird die Hypothese der Hemberger'schen Arbeitsgruppe dadurch unterstützt, dass während der Tumordinvasion und Metastasierung die Degradierung von Basalmembranen häufig von denselben Proteinase impliziert wird, die auch bei der Implantation und normaler Trophoblastinvasion eine Rolle spielen (Strickland and Richards 1992; MacDougall and Matrisian 1995; Wilson et al. 1997; Edwards and Murphy 1998). IGF II stimuliert die Migration des humanen extravillösen Trophoblasten durch eine schnelle Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) (McKinnon et al. 2001).

#### *1.2.5 Integrine und Signalübertragung durch Proteinkinasephosphorylierung*

Wie Miyamoto et al. (1995) feststellten regelt die einfache Integrinaggregation Signalmoleküle, zum Beispiel Rho A, Rac1, Ras, Raf, MEK, extrazellulär signal-regulierte Kinase (ERK) und c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK). Ihre Anhäufung in fokalen Adhäsionskomplexen erfolgt durch Tyrosinphosphorylierung, wobei einige dieser Tyrosin-Proteinkinasen mit ihren Zielproteinen, zum Beispiel  $\alpha$ -Actinin, Vinculin und Talin in fokalen Adhäsionskomplexen identifiziert wurden. Außerdem kollaborieren nach Miyamoto et al. (1996) Integrine mit Wachstumsfaktoren bei der Phosphorylierung von Rezeptor Tyrosin-Kinasen und der Aktivierung von mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). So führen die Wachstumsfaktoren EGF, PDGF-BB und FGF zu einer vorübergehenden Aktivierung der ERK, die zur Klasse der MAP-Kinasen gehört, wenn die (dazugehörigen) Integrine sowohl aggregiert als auch Ligand-gebunden vorliegen. Eine Synergie zwischen Integrinen und Wachstumsfaktoren konnte ebenfalls bei der Tyrosinphosphorylierung von EGF-, PDGF- und FGF-

Rezeptoren gefunden werden. Nach Morino et al. (1995) führen schließlich die Interaktion von Matrix und Integrinen ebenfalls zu einer Phosphorylierung der p44<sup>erk-1</sup> und p42<sup>erk-2</sup> MAP-Kinasen an ihren Tyrosin-Enden. Dabei zeigen beide Kinasen eine deutlich erhöhte enzymatische Aktivität.

#### *1.2.5.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und ihre Funktionen*

Bei Säugetieren kennt man drei Arten von MAPK: 1. extrazellulär signalregulierte Kinase ERK (Erk-1 und ERK-2), 2. c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen (JNKs) und 3. p38 MAPK. Alle drei werden durch duale Phosphorylierung des TXY-Motivs aktiviert (Minden et al. 1994; Cano et al. 1995; Han et al. 1997). p38 MAPK liegt bei Säugetieren in vier Isoformen vor ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ), wovon jede individuelle Expressionsmuster zeigt (Jiang et al. 1996; Li et al. 1996; Jiang et al. 1997; Hale et al. 1999) und  $\alpha$  und  $\beta$  ubiquitär vorkommen (Jiang et al. 1996).

MAP-Kinasen werden als Regulatoren von Zellwachstum, Differenzierung, Genaktivierung (Miyamoto et al. 1996; Chen et al. 1994), zum Beispiel des plazentaren Laktogen-I-Gens in sich differenzierenden Trophoblastzellen von Ratten (Peters et al. 2000), und außerdem der Migration (Howe et al. 2001; Glading et al. 2001) vermutet. Eine Beteiligung an der Zellmigration wurde bereits für viele Zelltypen beschrieben, wie zum Beispiel die Wirkung von IGF-II an Endothelzellen (Groskopf et al. 1997), platelet-derived growth factor (PDGF) an pigmentierten Retinaepithelzellen (Hinton et al. 1998) sowie epidermal growth factor (EGF) an Brustkrebszellen (Spencer et al. 2000). Die MAPK phosphoryliert dabei direkt die Myosin-light-chain-kinase, die ihrerseits dann das für die Migration wichtige Myosin-light-chain-protein phosphoryliert (Klemke et al. 1997). Die Aktivierung der ERK tritt im Zytoplasma auf, wobei sich eine Translokation in den Zellkern anschließt, die unabdingbar für die Vermittlung der Signale ist (Übersicht Howe et al. 2001; Glading et al. 2001). Ähnlich wie die Regulierung der ERK-Aktivierung durch Integrine und die GTPase Ran, wird auch eine adhäsionsbedingte Kontrolle des nukleozytoplasmatischen Austausches der ERK auf ein intaktes Actin-Zytoskelett zurückgeführt (Aplin et al. 2001). Ein weiterer Zusammenhang zwischen MAPK und Zytoskelett zeigt sich dadurch, dass  $\alpha$ -Actinin als ein MEKK1- (Upstream-Aktivator der MAPKinasen c-Jun N-terminal Kinase, ERK und

p38) Bindungsprotein identifiziert und daher eine dieser Kinasen in fokalen Adhäsionen und „stress fibers“ ermittelt wurde (Christerson et al. 1999). Die Lokalisation der aktivierten ERK in neu gebildeten fokalen Adhäsionskomplexen in Fibroblasten von Rattenembryonen und in embryonalen Zellen von Vögeln lässt sich auf die Integrinbindung zurückführen (Fincham et al. 2000). Auf diese Weise kann die aktive ERK möglicherweise die Spezifität von anderen Zielmolekülen (Talin), die an der Bildung von Adhäsionen beteiligt sind, beeinflussen und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Regulation von Adhäsion und Konformation des Zytoskeletts. Nach Takanami-Ohnishi et al. (2001) zeigt die Graviditätsstadium-abhängige Aktivität der p38 MAPK im Uterus (vor allem in dezidualen Stromazellen zum Zeitpunkt der Geburt) der Maus einen deutlichen Anstieg am Tag 19 und während der Wehentätigkeit, wohingegen c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK) und ERK im Myometrium ab Tag 19 zu finden waren. Diese Autoren postulieren deshalb eine Beteiligung des p38 MAPK Signalweges an der Funktion der Dezidua im späten Trächtigkeitsstadium und vermuten eine Involvierung desselben am Geburtsvorgang.

## 1.3 Das Zytoskelett

### 1.3.1 Das Zytoskelett

Auf dem Zytoskelett basiert die Fähigkeit von Eukaryontenzellen, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte und gerichtete Bewegungen auszuführen. Das den Bakterien fehlende Zytoskelett ist in dem gesamten Zytoplasma verteilt, aus Proteinfilamenten aufgebaut und besitzt eine dynamische Struktur (Alberts et al. 1999).

Man unterscheidet drei Gruppen von Proteinfilamenten: 1. durch Actin gebildete, dynamische und meist in Bündeln vorliegende Actinfilamente, 2. durch Tubulin geformte, steife Mikrotubuli, die in vielen Zellen dynamisch sind und durch Anfügen und Abdissoziieren von Tubulin-Untereinheiten wachsen und 3. Intermediärfilamente, die durch Laminin und Vimentin repräsentiert werden und seilartige Struktur aufweisen. Sie sind relativ widerstandsfähig und verleihen Zellen und Geweben ihre mechanische Stabilität (Alberts et al. 1999). Zytokeratine, bestehend aus keratinartigen Proteinen, stellen dabei die vielfältigste Gruppe der Intermediärfilamente dar und sind typisch für epitheliale Zellen (Sun et al. 1978, 1979).

#### 1.3.1.1 Actin

Nach Alberts et al. (1999) enthalten alle Zellen von Wirbeltieren Actin. Weiter wird das Actinmolekül durch ein Polypeptid aus 375 Aminosäuren aufgebaut und ist eng an ein ATP-Molekül gebunden. Die gebildeten Actinfilamente sind 8 nm dick und polar. Diese Autoren unterscheiden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Actin.  $\alpha$ -Actin liegt in Muskelzellen,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Actin in Nicht-Muskelzellen vor. Generell liegt Actin bei niedriger Ionenstärke als zweilappiges, globuläres Monomer vor, das G-Actin (G = globulär). Unter physiologischen Bedingungen polymerisiert Actin jedoch unter ATP-Hydrolyse zu F-Actin (F = fibrös). Beide Formen liegen in Nicht-Muskelzellen vor und bilden die Mikrofilamente. In Muskelzellen findet man es hingegen als dünne Filamente (Voet und Voet 1994). Actin bildet sowohl stabile Strukturen wie den kontraktilen Apparat in der Muskelzelle oder den Kern der Mikrovilli als auch veränderliche Strukturen aus, die an der Zellbewegung Beteiligung finden. Die erforderliche Energie wird dabei durch die

Hydrolyse von ATP gewonnen (Alberts et al. 1999). Actinfilamente liegen nur selten einzeln vor. Meistens sind sie in Form von Netzen oder Bündeln angeordnet und bilden zusammen mit den actinbindenden Proteinen die Zellrinde, die direkt unter der Plasmamembran liegt. Das Actin-Zytoskelett ist ein unverzichtbarer Teil der Signal-Übertragungskaskaden von Zellen, weil sich sein dynamisches Geflecht aus Actinfilamenten in der Zellrinde beim Eintreffen von Signalen aus der Zellumgebung auf die Plasmamembran schnell umformen kann (Alberts et al. 1999).

Eine wichtige Bedeutung des Actin-Zytoskelettes im weiblichen Genitaltrakt liegt darin, dass die Adhäsionsbereitschaft der apikalen Plasmamembran des Uterusepithels für den Trophoblast eine essentielle Rolle, vor allem zur Zeit der Implantation des humanen Embryo, dahingehend spielt, dass epitheliale Zellen normalerweise keine apikale Adhäsion zulassen. Es muss daher eine nicht-polarisierte Oberfläche geschaffen werden, um so die Zell-Zell Adhäsion während der rezeptiven Phase zu gewährleisten (Thie et al. 1997). Dies geschieht über eine epitheliale Umwandlung von polarisiertem zu nicht-polarisiertem Phänotyp des apikalen Zellpols der Epithelzellen (Thie et al. 1997). Die normalerweise vorliegende Polarität von Epithelzellen und ihre daher mangelnde Adhäsionsbereitschaft weist auch auf eine apikale Expression von Muzinen (Muc-1) hin, die auf Grund ihrer Glykosylierung und ausgedehnten Struktur zu einer sterischen Hinderung der Zell-Zell und Zell-ECM Adhäsion führen (Denker 1993; Glasser et al. 1993; Wesseling et al. 1995; Komatsu et al. 1997). Um nun die „Depolarisierung“ zu gewährleisten wird nun zum Beispiel auch eine mit der Umwandlung des prärezeptiven zum rezeptiven Uterus einhergehende Downregulation von Muc-1 im Endometrium des Schweines vermutet (Bowen et al. 1996). Ebenso konnte eine dramatische Abnahme von Muc-1 ab Tag 9 der Gravidität beim Schaf festgestellt werden, wenn die Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und luminalem Epithel beginnt (Johnson et al. 2001). Ein feto-maternaler Kontakt ist möglicherweise über die epithelio-mesenchymale Transformation (EMT) möglich. Dieser Hypothese liegt zugrunde, dass Epithelzellen zu Mesenchymzellen transformieren und umgekehrt. Dabei besitzen Mesenchymzellen die Fähigkeit, durch die ECM zu migrieren, um zelluläre Transpositionen einzunehmen (Hay 1995). Anschließend wird gebildetes, ungewolltes Epithel wieder abgebaut (Hay 1995). Bei diesen Vorgängen aktivieren die Zellen mesenchymale Gene und deaktivieren epitheliale, so dass sie aufgrund ihrer nun erlangten Motilität über die Actinrinde mit der ECM kommunizieren. Umgekehrt

reaktivieren primäre Mesenchymzellen regulatorische epitheliale Gene, wie E-Cadherin, und exprimieren wieder ihre apikal-basale Polarität (Hay 1995).

Die Adhäsionsbereitschaft der humanen epithelialen RL95-2-Zellen für humanen Trophoblast ist abhängig von einem intakten, nicht-polarisierten Actin-Zytoskelett, apikal lokalisierten Integrinen, die an Actin gebunden sind, sowie von Kalziumsignalen an der freien Oberfläche (Thie et al. 1997). Nicht gebundene Integrine sind jedoch diffus über die Zelloberfläche verteilt und stehen nicht mit dem Actin-Zytoskelett in Verbindung (Übersicht Schoenwaelder et al. 1999).

#### *1.3.1.2 Actin-bindende Proteine und fokale Adhäsionskontakte*

Die actinbindenden Proteine heften sich an Actinfilamente und beeinflussen so ihre Eigenschaften und Funktionen. Sie sind ebenso wie Actin hauptsächlich in der Zellrinde unter der Plasmamembran lokalisiert. Die Zellrinde sorgt für die mechanische Stabilität von Eukaryotenzellen und ermöglicht Phagozytose, Zytokinese und Fortbewegung (Alberts et al. 1999).

Quervernetzende Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften organisieren bestimmte Actin-Anordnungen. Man unterscheidet hier Bündelungsproteine, wie Fimbrin und  $\alpha$ -Actinin sowie gelbildende Proteine, wie Filamin. Bündelungsproteine koppeln die Actin-Filamente in Parallelanordnung, so dass parallele Bündel entstehen. Solche Bündel bilden Fokalkontakte, das heißt Stellen, an denen die Zellaußenseite eng an die extrazelluläre Matrix (ECM) angeheftet ist. Ihre wichtigsten Transmembran-Verbindungsproteine sind die Integrine, deren äußere Domäne, wie oben bereits beschrieben, an die ECM bindet. Die zytoplasmatische Verbindung wird über Anheftungsproteine, zum Beispiel Talin, an die  $\beta$ -Kette des Integrins gewährleistet. Talin bindet seinerseits an Vinculin, das sich dann wiederum mit  $\alpha$ -Actinin zusammenlagert und so an ein Actinfilament gekoppelt wird (Alberts et al. 1999). Abhängig von der Konformation des Actin-Zytoskellettes und der Akkumulation von assoziierten Proteinen kommt es zu einer Zusammenlagerung von nicht gebundenen Integrinen in fokalen Adhäsionen (Übersicht Schoenwaelder et al. 1999).

Fokalkontakte dienen jedoch nicht nur zur Verankerung, sondern übertragen ebenso Signale der ECM an das Zytoskelett. Dabei spielen in den Fokalkontakten lokalisierte und im src-Gen codierte Tyrosin-Kinasen eine Rolle. Sie phosphorylieren verschiedene Proteine, darunter auch Bestandteile des Zytoskeletts. Auf diesem Wege regulieren sie daher Überleben, Wachstum, Morphologie sowie die Bewegung und Differenzierung von Zellen als Reaktion auf die umgebende ECM (Alberts et al. 1999).

In diesem Zusammenhang zeigten Geiger et al. (1995) in ihrer Übersicht die bestehende Verzahnung von integrinvermittelter Signalwirkung über sogenannte „Submembrane plaques of microfilament-bound adhesions“ auf, eine spezielle Domäne von sogenannten Adhärenz-Verbindungen. Dahinter verbergen sich Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhärenz-Verbindungen. Diese stehen mit Mikrofilamenten in Verbindung und bestehen an ihrer zytoskeletalen Domäne aus Actinbündeln, die vermutlich für ihre mechanische Eigenschaften verantwortlich sind. Solche Plaques sind physiologischerweise an der Membran-Mikrofilament-Grenze angeordnet, so dass man eine Beteiligung an der Verbindung von Membran und Zytoskelett vermutet. Zu ihrer Familie gehören nach Vuori (Übersicht 1998) außerdem fokale Adhäsionskomplexe, in denen Vinculin und Talin nachgewiesen werden konnte. Hauptrezeptoren für diese Signalübermittler sind einmal mehr die Integrine (siehe oben). „Focal Adhesions“ sind ebenso bei Vuori (1998) Gegenstand der Diskussion: Auch in diesem Überblick wird ihre besondere Bedeutung als Integrinligand und damit verbundener weitreichender Aktivierung von biologischen Prozessen, Vernetzung der Zelle mit der extrazellulären Matrix, Änderung von intrazellulärem pH-Wert und  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt sowie des Fettstoffwechsels und der Genexpression und schließlich der Aktivierung von Proteinkinasen hervorgehoben. Sie sind also äußerst wichtige Signalübermittler. Clark et al. (1998) fanden heraus, dass bei der Adhäsion von Rat1-Zellen eine Bindung an das ECM Protein Fibronectin stattfindet und sich fokale Komplexe bilden. Einhergehend damit kann eine von Rho und GTPasen unabhängige Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) beobachtet werden. Nachfolgende Phosphorylierungen sind jedoch von Rho abhängig, was auch für die Bildung von großen fokalen Adhäsionskomplexen mit von ihnen ausgehenden Actin Stressfibern gilt (Clark et al. 1998).

### *1.3.1.2 Mikrotubuli*

Mikrotubuli sind lange, steife Polymere aus Tubulin-Molekülen. Dabei sind mindestens sechs Formen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin bekannt, die jeweils von einem eigenen Gen codiert werden. Strukturell stellen Mikrotubuli ein zylinderförmiges Gebilde dar, in dem die Tubulin-Heterodimere um einen zentralen Raum herum angeordnet sind. Es werden 13 gestreckte Protofilamente aus sich abwechselnd angeordneten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Molekülen aufgebaut. Diese Filamente lagern sich daher parallel zu Mikrotubuli zusammen, so dass der ganze Mikrotubulus ebenso polar ist. Wie bei Actin liegen auch hier ein schnell wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minus-Ende vor. Eine weitere Parallele zu Actin ist die Koordination mit assoziierten Proteinen; in diesem Fall sind es die sogenannten MAP, Mikrotubuli assoziierten Proteine, die die labilen Mikrotubuli vor dem Zerfall schützen und die Wechselwirkung mit weiteren Zellbestandteilen vermitteln. Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli ist wichtig für ihre Aufgabenerfüllung und wird durch GTP-Hydrolyse gewährleistet. Mikrotubuli erstrecken sich über das Zytoplasma und steuern die Lage der Membran-umhüllten Organellen und auch anderer Zellbestandteile (Alberts et al. 1999).

### *1.3.1.3 Intermediärfilamente*

Der Aufbau der Intermediärfilamente (IF) stellt sich durch einen aminoterminalen Kopf, einen carboxyterminalen Schwanz und einer stabförmigen Domäne in der Mitte dar, wobei diese Mitte durch die Struktur einer  $\alpha$ -Helix charakterisiert ist. Intermediärfilamente sind widerstandsfähige, langlebige Proteinfasern, die bei fast allen tierischen Zellen im Zytoplasma vorliegen (Alberts et al. 1999). Sie stellen ein dynamisches, strukturelles Netzwerk in eukaryotischen Zellen dar. Durch ihre Anordnung verleihen auch sie den Zellen und Geweben mechanische Stabilität. Dabei umgeben sie nicht nur den Zellkern, sondern sind ebenfalls Bestandteil der Kernlamina, die direkt unter der Kernmembran liegt. Ferner erstrecken sie sich bis nach außen zur Zellperipherie und stehen so mit der Plasmamembran in Verbindung (Foisner 1997, Alberts et al. 1999). Ihr Name stammt daher, dass ihr Durchmesser mit 8 bis 10 nm genau zwischen dem der Actin- und Myosinfilamente liegt. Es werden drei Gruppen

Intermediärfilamente unterschieden: 1. Keratinfilamente, die an spezialisierten Zellverbindungen (Desmosomen und Hemidesmosomen) beteiligt sind, 2. Vimentin und Vimentin-ähnliche Filamente, die in Mesoderm-abstammenden Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen vorkommen, und 3. Neurofilamente in Nervenzellen (Alberts et al. 1999). Die Funktionen der Intermediärfilamente werden einmal durch ihre mechanischen, aber auch durch ihre dynamischen Eigenschaften vermittelt. Dabei spielen Proteinphosphorylierung (Chou et al. 1997; Inagaki et al. 1997) und die IF-assoziierten Proteine (IFAPs) eine große Rolle bei der Organisation des Intermediärfilamenten-Netzwerkes, da sie die IF untereinander und mit anderen Zytoskelettbestandteilen (zum Beispiel Actin-Mikrofilamente) verbinden (Chou et al. 1997).

## 1.4 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

### *1.4.1 Zusammensetzung der ECM und ihre Funktion*

Die extrazelluläre Matrix umgibt oder unterlegt Epithelien und die meisten organisierten Zellgruppen, wie zum Beispiel Muskeln. Sie setzt sich aus Kollagenfasern, Proteoglykanen und Multiadhäsionsproteinen zusammen (Lodish et al. 2001).

Kollagene sind die Hauptgruppe der unlöslichen Faserproteine der ECM und des Bindegewebes und die am weitesten verbreiteten und am häufigsten vorkommenden Proteine im Tierreich. Es gibt 16 verschiedene Typen, wobei sich 80 bis 90 % der im Körper vorkommenden Kollagene aus den Typen I, II und III zusammensetzen. Alle Kollagene zeichnen sich durch Glycin, Prolin und Hydroxyprolin-Sequenzen aus, die sich ständig wiederholen. Sie bilden eine charakteristische Tripelhelixstruktur und lagern sich zu langen, dünnen Fibrillen zusammen. Typ IV hingegen bildet ein zweidimensionales Netzwerk in der Basallamina aus (Lodish et al. 2001).

Proteoglykane findet man in allen Bindegeweben und in jeder ECM und gehören zur Gruppe der löslichen Proteine der ECM. Sie weisen einen hohen Gehalt an geladenen Polysacchariden auf und sind daher stark hydratisiert; diese Struktur formt das Volumen der ECM. Außerdem erlauben sie die Diffusion von kleinen Molekülen zwischen den Zellen und Geweben (Lodish et al. 2001).

Fibronektine, die zur Gruppe der Multiadhäsionsproteine gehören, sorgen für die Anheftung der Zellen an die ECM, die Kollagenfibrillen vom Typ I, II, III und V enthalten. Sie beeinflussen die Zellgestalt und die Anordnung des Zytoskeletts. Während der Embryogenese sind sie an der Wanderung und Differenzierung zahlreicher Zellarten beteiligt und fördern außerdem die Wundheilung. Ihr Aufbau besteht aus zwei ähnlichen Polypeptiden, die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Jede Kette ist 60 - 70 nm lang und 2 - 3 nm dick. Mindestens 20 verschiedene Fibronektine sind bekannt, die hochaffine Bindungsstellen für Kollagen und andere Matrixbestandteile sowie bestimmte Integrine aufweisen (Lodish et al. 2001).

Multiadhäsionsproteine binden an Zelloberflächenrezeptoren und stellen lange, flexible Moleküle dar, deren Hauptaufgabe zum einen die Anheftung von Zellen an die ECM darstellt. Zum anderen spielen sie eine Rolle bei der Einleitung von zellulären Antworten durch klassische Signalübertragungswege und sind damit bedeutsam für die Festlegung der Anordnung anderer Matrixbestandteile sowie für die Regulation der Anheftung von Zellen an die Matrix, der Zellwanderung und der Zellgestalt (Lodish et al. 2001).

Die ECM fungiert also als Koordinator der verschiedenen zellulären Funktionen innerhalb der Gewebe und sorgt für den Zusammenhalt der Zellen. Außerdem stellt sie eine Grundlage für die Wanderung von Zellen dar. Weiterhin sind einige ihrer Moleküle an der Aktivierung von Signalübertragungswegen beteiligt, wodurch sie Zellwachstum, Zellteilung und auch Genexpression regeln. Diese Effekte werden über membrangebundene Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) vermittelt, zu denen die Integrine und Cadherine gehören. Sie binden sich direkt an Matrixbestandteile oder an das Zytoskelett (Lodish et al. 2001).

#### *1.4.2 Die ECM der Trophoblastriesenzellen*

In frühen Stadien der bovinen Plazenta findet man eine homogene Lamininfärbung der TGC. Laminin ist wesentlicher Bestandteil der Basalmembranen von Epithelien und Endothelien und wird von TGC für ihre Migrationsfähigkeit benötigt. Daher verwundert es nicht, dass man die dazugehörigen Integrinuntereinheiten,  $\alpha_6$  und  $\beta_1$ , im Plazentom ebenfalls an der Basalmembran von Epithelien und Endothelien findet (Hirsch 2000).

## 1.5 Zielsetzung der Studie

Aufgrund der Bedeutung des Zytoskelettes in zellkontaktabhängigen Signalketten und den damit verbundenen Zytoskelettveränderungen soll anhand der Immunogold-Methode mit anschließender Silberverstärkung und des Immunoperoxidase / DAB Nachweisverfahrens sowohl licht- als auch transmissionselektronenmikroskopisch der Nachweis über die Lokalisation von Actin und seinen assoziierten Proteinen  $\alpha$ -Actinin und Vinculin an den verschiedenen Zellpopulationen der epitheliochorialen Rinderplazenta geführt werden. Zum Nachweis der Signalkette von Integrin-vermittelter Kinasenphosphorylierung soll anhand der gleichen Methoden das Vorkommen von phosphorylierter mitogen aktivierter Proteinkinase (pMAPK) untersucht werden.

Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der „beschränkten Trophoblastinvasion“ der Rinderplazenta diskutiert.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Material

Die Plazentome wurden von 9 milchbetonten Zweinutzungsrindern unmittelbar nach der Schlachtung auf dem Schlachthof Gießen gewonnen. Dabei sind die Graviditätsstadien der einzelnen Kühe durch Ausmessen der Scheitel-Steiß-Länge der Feten nach Habermehl (1975) bestimmt worden (siehe Tabellen 2, 3).

| Alter Monats-ende | 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       | -                                                                             | Klauenanlage erkennbar, Gaumenspalte und Brustbein schließen sich | Plazentation im Gange, linsengroße Kotyledonen           |
| 3.                | 0,17-0,30                | 13        | -                                                                             | Hodensack, Euteranlage, Magenabteilungen erkennbar                | Plazentare Verankerung vollständig                       |
| 4.                | 0,8-1                    | 24,5      | Feine Haare am Augenbogen                                                     | Klauen abgesetzt und gelb gefärbt                                 | Plazentome 6,5 : 3,5 : 2,0 cm                            |
| 5.                | 1-3                      | 32,5      | An Augenbogen, Kinn, Lippen                                                   | Zitzen bilden sich aus, Hoden treten in den Hodensack             | Plazentome 7,5 : 4,0 : 2,5 cm                            |
| 6.                | 3-8                      | 45        | An Augenbogen, Kinn, Lippen, Augenlidern, 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- und Tarsalgelenke                              |                                                                   | Plazentome 11,0: 5,0:2,8 cm                              |
| 8.                | 15-25                    | 69        | Vollständig, aber kurz behaart, Bauch- und Nabelhaar kurz und dünn            |                                                                   | Plazentome 11,0: 6,0:3,5 cm                              |
| 9.                | 30-45                    | 81        | Behaarung wird länger und vollständiger, auch an Hautnabel und Bauch          |                                                                   | Plazentome 14,0: 6,5:4,5 cm                              |

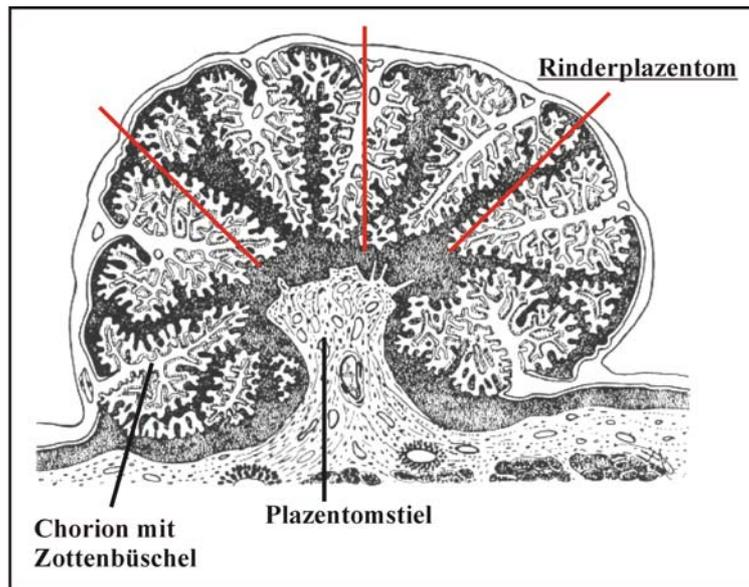
**Tabelle 2:** Wachstum und Altersbestimmung beim Rinderfetus (erstellt nach Habermehl, 1975)

### 2.1.1 Entnahme und Fixierung der Proben

Die graviden Uteri wurden in der Schlachtkette zusammen mit anhängenden Bauchorganen entnommen, die zur weiteren Verarbeitung gelangten. Nach Eröffnung der Uteri entlang der Curvatura major wurden Plazentome an unterschiedlichen Lokalisationen exzidiert. Um eine Trennung von fetalem und maternalem Gewebe soweit möglich zu vermeiden, musste auf besonders sorgfältige Behandlung geachtet werden: Es erfolgten Anschnitte der Plazentome im Abstand von etwa 1 cm (Radiärlinien in Übersicht 3), um damit die Immersionsfixation in 3 %igem gepuffertem Paraformaldehyd oder 3 %igem gepuffertem Paraformaldehyd mit Zusatz von 0,1 % Glutaraldehyd zu erleichtern. Versuchsweise wurde auch eine Perfusionsfixation mit den gleichen Fixantien durchgeführt. Dies führte jedoch meistens zur Trennung der beiden Gewebeanteile. Nach 30 min wurden aus den so fixierten Plazentomen Stücke mit einer Größe von circa 0,5 cm bis 1 cm Länge x 0,3 cm Breite x 0,3 cm Tiefe herausgeschnitten, die in frisch angesetzten Lösungen der oben genannten Fixantien für weitere 2 h nachfixiert wurden. Anschließend erfolgte die Spülung der Plazentomstücke in phosphatgepufferter (Koch-)Salzlösung (PBS) für dreimal 45 min. Einige Proben wurden zur Vorbereitung für das Peroxidasenachweisverfahren im Anschluss an die PBS-Spülung über Nacht in 18 %-ige Saccharose-PBS-Lösung verbracht und am nächsten Tag nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) bei -80 ° C gelagert.

| Rind | SSL des Fetus (in cm) | Graviditätsstadium (Monate) | Geschlecht Fetus | Einfrier-methode | Einbettung     |
|------|-----------------------|-----------------------------|------------------|------------------|----------------|
| 1    | 17                    | 3 – 4                       | w                | N <sub>2</sub>   | LR-White       |
| 2    | 20,5                  | 3 - 4                       | m                | N <sub>2</sub>   | LR-White       |
| 3    | 23,5                  | 4 - 5                       | m                | N <sub>2</sub>   | LR-White       |
| 4    | 23,5                  | 4 – 5                       | w                | N <sub>2</sub>   | Epon, LR-White |
| 5    | 41,7                  | 5 – 6                       | m                | N <sub>2</sub>   | Epon, LR-White |
| 6    | 47                    | 5 - 6                       | w                | N <sub>2</sub>   | Epon (PE)      |
| 7    | 83,6                  | 9                           | m                | N <sub>2</sub>   | Epon, LR-White |
| 8    | 90,0                  | 9                           | m                | -                | Epon (PE)      |
| 9    | 91                    | 9                           | m                | N <sub>2</sub>   | Epon, LR-White |

**Tabelle 3:** Verwendete Proben [*m/w* männlich / weiblich, N<sub>2</sub> flüssiger Stickstoff, *PE* Preembedding]

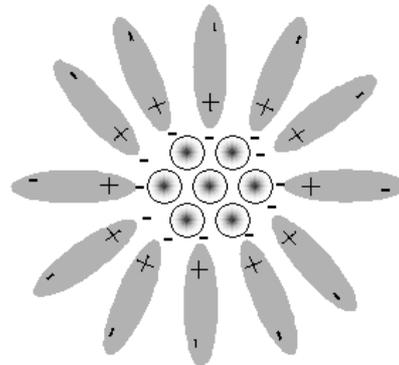


**Übersicht 3:** Rinderplazentom mit markierter Schnitfführung (modifiziert nach Schnorr und Kressin (2001))

## 2.2 Methoden

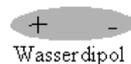
### 2.2.1 Immunogold-Methode

Die Immunogold-Methode stellt ein immunhistochemisches Nachweisverfahren für die Transmissionselektronenmikroskopie dar, bei dem der an das Epitop gebundene Primärantikörper durch goldkonjugierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Abhängig von der Größe der Goldpartikel (6, 10, 15 und 25 nm im Durchmesser sowie ultra-small, d. h.  $\leq 0,8$  nm) kann eine anschließende Silberverstärkung notwendig sein. Je nach Verwendungszweck, Epitop oder Primärantikörper, werden verschiedene Goldpartikelgrößen angewandt. Die Vorteile der ultra-small Goldpartikel liegen darin, dass ihr Eindringvermögen in das Gewebe oder die Zelle aufgrund ihrer Größe wesentlich höher ist und sie dem hydrodynamischen Widerstand, gebildet durch Wasser-Dipole, besser widerstehen, da sie weniger Angriffsfläche für Interaktionen bieten (Übersicht 4). Außerdem können mehr Goldpartikel pro Primärantikörper gebunden werden.



**Ultra small Goldpartikel:**

Relativ klein mit gering strukturiertem Wassermantel



Wasserdipol



Goldatom

**Übersicht 4:** Schematische Darstellung eines ultra-small Goldpartikels mit Wasserumlagerung (mit freundlicher Genehmigung der Firma AURION®)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Protokolle und Reagenzien der Firma Aurion® (siehe Abschnitte 2.3 und 2.3.1) verwendet, die auch für den lichtmikroskopischen Einsatz der Immunogold-Methode, mit ultra-small Goldpartikeln, mit anschließender Silberverstärkung geeignet sind. Eine erste Verwendung erfolgte an Kryoschnitten, um eine Kreuzreaktion der Antikörper mit Zellen der Rinderplazenta zu ermitteln und grundsätzliche Aussagen zur Lokalisation zu erheben. Bei positivem Ergebnis schloss sich die Immunogold-Methode mit Silberverstärkung auf transmissionselektronenmikroskopischer (TEM) Ebene an, um eine exakte Lokalisation der Proteine und Kinasen zu ermöglichen. Die Verifizierung aller so ermittelten Ergebnisse erfolgte anhand einer Immunoperoxidasefärbung mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochlorid (DAB) im Preembeddingverfahren auf TEM-Ebene. Das Immunoperoxidase / DAB Verfahren wurde anhand eines Protokolls des Institutes für Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Abteilung Prof. Dr. Kummer, durchgeführt.

### 2.2.2 Kryostatschnitte und Vorbereitung zur Immunhistochemie auf LM-Ebene

Zur Evaluierung der Antikörper (siehe Tabelle 4) wurden zunächst Gefrierschnitte von tiefgefrorenen Proben angefertigt. Die Plazentome wurden in Stücke von etwa 2x1x1 cm geschnitten und mit Tissue-Tec<sup>®</sup>-Gewebekleber auf dem Objekthalter des Kryotoms (Reichert und Jung<sup>®</sup>-Kryostat) befestigt. Anschließend wurden bei einer Temperatur von – 20° C circa 12 µm (für das Preembedding-Verfahren circa 50 µm) dicke Schnitte angefertigt, die einzeln auf je einen Chrom-Alaun-beschichteten Objektträger aufgezogen wurden.

Im Anschluss wurden die Schnitte circa eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die trockenen Schnitte wurden parallel auf drei verschiedene Arten fixiert: 1. mit Aceton-Methanol (70:30) über 10 Sekunden, 2. mit 3 % Paraformaldehyd und 3. mit dem Gemisch von 3 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd jeweils eine Stunde. Im Folgenden wurde nach dreimaliger Spülung mit PBS für je 5 Minuten nach dem Versuchsprotokoll der Firma Aurion<sup>®</sup> (siehe 2.3 und Anhang) für die lichtmikroskopische Immunogold-Methode mit anschließender Silberverstärkung am Kryoschnitt verfahren.

| <b>Antikörper</b>                                                   | <b>Isotyp</b> |      | <b>Herkunft</b> | <b>Klon</b> | <b>Hersteller</b>     | <b>Verdünnung</b> |
|---------------------------------------------------------------------|---------------|------|-----------------|-------------|-----------------------|-------------------|
| Anti-Actin                                                          | monoklonal    | IgG1 | Maus            | C4          | Chemicon <sup>®</sup> | 1:800             |
| Anti- $\alpha$ -Actinin                                             | monoklonal    | IgM  | Maus            | BM-75.2     | Sigma <sup>®</sup>    | 1:800             |
| Anti-human-Vinculin                                                 | monoklonal    | IgG1 | Maus            | HVIN-1      | Sigma <sup>®</sup>    | 1:800             |
| Monoclonal Anti-MAP Kinase, activated (Disphosphorylated ERK-1 & 2) | monoklonal    | IgG1 | Maus            | MAPK-YT     | Sigma <sup>®</sup>    | 1:800             |

**Tabelle 4:** Details der verwendeten Primärantikörper

### *2.2.3 Ultramikrotomie und Vorbereitung für die Immunfärbung auf TEM-Ebene*

Zur weiteren Verarbeitung der Proben für das elektronenmikroskopische „Post-embedding“-Verfahren wurden diese in aufsteigender Alkoholreihe je 10 min in 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 96- und dreimal in 100-prozentigem Alkohol dehydriert. Es schloß sich die Vorinkubation in Epongemisch, LR-White oder Unicryl und schließlich die Inkubation über Nacht in reinem Epon, LR-White oder Unicryl, an. Nach erneutem Wechsel des flüssigen Kunststoffes und Ausbettung in Gummi-Probengefäße beziehungsweise Gelatinekapseln erfolgte die Polymerisierung bei Verwendung von Epon für 12 bis 16 Stunden im Wärmeschrank bei 60°C, bei LR-White im Kühlschrank bei 4°C unter UV-Licht für 48 bis 72 Stunden, bei Unicryl im Gefrierschrank bei –20°C unter UV-Licht für 4 Tage.

Nach dem Trimmen der eingebetteten Materialblöcke wurden 0,5 bis 1 µm dicke Semidünnschnitte am Glasmesser des Reichert Ultracut S/FC S von Leica® mit Aqua bidest. angefertigt. Nach Trocknung der Schnitte auf unbeschichteten Objektträgern bei 60° C wurden diese anschließend mit Richardson-Blau eingefärbt und lichtmikroskopisch untersucht, um geeignete Stellen im Gewebe zur weiteren Untersuchung auszuwählen. Dadurch konnte der Block nun, reduziert auf die zu untersuchende Stelle in feto-maternalen Bezirken, neu zugeschnitten werden. Die Anfertigung von Ultra-Dünnschnitten mit einer Stärke von 60 bis 90 nm erfolgte am Diamant-Messer wiederum am Reichert Ultracut S/FC S von Leica®. Die auf Aqua bidest. schwimmenden Schnitte wurden durch Darüberhalten eines mit Chloroform getränkten Filterpapiers gestreckt und mittels einer Drahtöse im Tropfen auf die Netze aufgetragen, die zuvor in Chloroform gereinigt und mit 2 % Collodion in Amyl-Azetat beschichtet wurden. Abhängig von der Schnittgröße wurden je 5 bis 10 Schnitte auf ein 100-Grid-Nickelnetz beim Postembedding- oder 100-Grid-Kupfernetze beim Preembedding-Verfahren verbracht und über Nacht auf Filterpapier getrocknet.

## 2.3 Protokolle

### **A) Immunogold-Methode mit Silberverstärkung für die Lichtmikroskopie**

1. Fixierung des nativen 12 µm-Gefrierschnittes für 10 sec im 70:30 Aceton-Methanol-Gemisch und für je eine h mit 3 % Paraformaldehyd sowie 3 % Paraformaldehyd und 0,1 Glutaraldehyd
2. Spülung 3 x 5 min in PBS
3. Aldehydgruppenblockierung mit 0,1 % Natriumborohydrid (NaBH<sub>4</sub>) in PBS für 10 min bei Raumtemperatur (RT)
4. Proteinblock gegen die Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt: Aurion<sup>®</sup> Blocking-solution für 30 min RT
5. Waschen 3 x 10 min. in BSA-c-Puffer
6. Inkubation mit dem Primärantikörper (Ansatz in BSA-c-Puffer) über Nacht bei 4 ° C
7. Goldapplikation je nach Antikörper mit „Goat-anti-Rabbit (GAR)“ oder „Goat-anti-Mouse“ (GAM) 1:100 für mindestens 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 ° C
8. 6 x 5 min Spülung mit Aurion<sup>®</sup> BSA-c-Puffer, 3 x 5 min Spülung mit PBS und Nachfixation mit 2 % Glutaraldehyd in PBS für 8 bis 10 min bei RT
9. Spülung 1 x 5 min PBS und 5 x 2 min in Aqua dest. bei RT
10. Verstärkung des Signals durch Silber für 20-30 min, anschließend Spülung 5 x 2 min in Aqua dest. bei RT
11. Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Bläuen für 10 min unter fließend kaltem Wasser
12. Eindeckelung mit Vitro Clud<sup>®</sup>

### **B) Immunogold-Methode mit Silberverstärkung für die Elektronenmikroskopie:**

#### **1. Preembedding**

1. Fixierung der Plazentagewebeproben in 3 % Paraformaldehyd für 1 h
2. 3 x 5 min Spülung in PBS

*Schritt 1 und 2 nur bei nativem, schockgefrorenem Gewebe; bei perfusionsbeziehungsweise immersionsfixiertem Gewebe direkt mit Schritt 3 beginnen*

3. Aldehydgruppenblockierung mit 0,1 % NaBH<sub>4</sub> in PBS für 15 min
4. Waschen 2 x 5 min in PBS
5. Proteinblockierung gegen die Spezies, aus der der Sekundärantikörper kommt:  
Aurion<sup>®</sup> Blocking-solution für 30 bis 60 min bei RT
6. Waschen 3 x 10 min in BSA-c-Puffer
7. Primärer Antikörper (Ansatz in BSA-c-Puffer) über Nacht bei 4 ° C
8. Waschen 6 x 10 min in BSA-c-Puffer
9. Goldinkubation (mit ultra small [ $< 0,8$  nm] Goldpartikeln) 1:50 (Ansatz in BSA-c-Puffer) mindestens 4 h bei RT, jedoch besser über Nacht bei 4 ° C
10. Waschen 6 x 10 min in BSA-c-Puffer und 6 x 5 min in PBS und Nachfixation mit 2 % Glutaraldehyd für 30 min
11. Waschen 3 x 5 min in PBS, 5 x 2 min in Aqua bidest.
12. Silberverstärkung für 45 min, Waschen 5x 10 min in Aqua bidest.
13. EPON-Einbettung
  - a) Entwässerung:
    - 30 bis 96 %-iges reines Ethanol (EtOH) für je 5 min
    - 2 x 100 %-iges reines EtOH für je 5 min
    - 100 % EtOH + Xylol (1:1) für 5 min
    - Xylol pur 2 x 5 min
    - Xylol + Epon (1:1) für 30 min
    - Epon pur über Nacht bei RT
  - b) Einbettung:
    - Frisches Epon, Schnitte dann zwischen zwei Folien oder teflonierte Objektträger legen und über Nacht (16 h) bei 60° C im Brutschrank auspolymerisieren lassen

### **C) Immunogoldmethode für die Elektronenmikroskopie: 2. Postembedding**

*Ausgangsmaterial:* Ultradünnschnitt auf 100Grid-Nickelnetzen

1. Aldehydgruppenblockierung mit 0,05 molarem Glycin in PBS für 15 min
2. Proteinblockierung mit Aurion<sup>®</sup>-Blocking Solution für 30 min bei RT
3. Waschen 3 x 10 min in BSA-c-Puffer
4. Primärer Antikörper (Ansatz in BSA-c-Puffer) über Nacht bei 4 ° C
5. Waschen 6 x 5 min in BSA-c-Puffer bei RT

6. Goldinkubation 1:50 (Ansatz in BSA-c-Puffer) mindestens 4 h bei RT, jedoch besser über Nacht bei 4 ° C
7. Waschen 6 x 5 min in BSA-c-Puffer und 3 x 5 min in PBS und Nachfixation mit 2 % Glutaraldehyd für 5 bis 10 min bei RT
8. Waschen 1 x 5 min in PBS und 5 x 2 min in Aqua bidest.
9. Silberverstärkung für 25 min bei RT, anschließend 5 x 2 min in Aqua bidest.
10. nach visueller Kontrolle im Elektronenmikroskop eventuell Kontrastierung

In Abweichung zu den angegebenen Protokollen wurde zur Reduzierung der teilweise starken Hintergrundreaktion 0,2 % BSA-c-Puffer eingesetzt. Zusätzliche Blockierungsschritte zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurden mit 1 % und 3 % Milchpulver sowie 1 % Ziegennormalserumzusatz in 0,1 %-igem BSA-c Puffer vor der Primärantikörperinkubation durchgeführt. Es konnte jedoch keine nennenswerte Verbesserung, vor allem eine Verminderung der braunen Hintergrundreaktion, erzielt werden. Außerdem wurden lichtmikroskopische Versuchsreihen mit 0,03 %-igem Triton zur Permeabilisierung der Membranen nach erfolgter Proteinblockierung durchgeführt, die ebenfalls nicht zu einer erhöhten Antikörperpenetration führte. Beim Preembedding-Verfahren wurde die Inkubationszeit mit den Primärantikörpern auf 2 h bei RT reduziert. Desweiteren wurden für die Elektronenmikroskopie alle Puffer mit sterilen und pyrogenfreien FP 030/3 Einmal-Filtern der Firma Schleicher & Schuell® mit 0,2 µm Porendurchmesser filtriert. Es wurde ein Goat-Anti-Mouse (GAM) Fab'2 Sekundärantikörper (Goldkonjugat) verwendet.

#### **D) Indirekter immunhistochemischer Nachweis durch Immunoperoxidase / DAB**

Zur Vorbereitung der Immunhistologie unter Verwendung peroxidasemarkierter Sekundärantikörper und DAB als Substrat wurden wie unter 2.2.2 beschrieben 50 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die in Glasschälchen frei schwimmend bei Proteinblockierung mit 10 %-igem Schweinenormalserum in PBS-NaCl-Puffer nach folgendem Versuchsaufbau bearbeitet wurden:

1. Inkubation mit Primärantikörper in feuchter Kammer bei RT über Nacht
2. 3 x 5 min Waschen in PBS-NaCl-Puffer

3. Inkubation mit direkt gekoppeltem Sekundär-Anti-POX-Antikörper 1:100 in PBS-NaCl-Puffer für 1 h bei RT in feuchter Kammer
4. Waschen 1 x 5 min in PBS-NaCl-Puffer sowie 2 x 5 min in Tris-HCl-Puffer (0,05 M Tris-HCl, pH 8,6)
5. DAB-Reaktion: Nickelverstärkung (25 mM): 0,2 g Nickelammoniumsulfat in 20 ml Tris-HCl lösen, plus 250 µl DAB-Stammlösung (10 µg/ml), davon 4 ml zur 10-minütigen Vorinkubation ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %), Rest der Lösung plus 1,2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) während 45 min
6. Waschen 3 x 5 min Tris-HCl-Puffer
7. Osmieren: 1 % Osmium (OsO<sub>4</sub>) in Aqua dest., Inkubation bei RT für 20 min unter dem Abzug
8. Waschen 3 x 5 min in 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2)
9. Kontrastieren: 1 % Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer (pH 6,0) zentrifugiert bei 13 000 RPM für 10 min, Inkubation 1 h bei RT im Dunkeln
10. Waschen 3 x 5 min Maleatpuffer (pH 5,2)
11. Entwässerung: 30 bis 96 %-iges reines Ethanol (EtOH) für je 5 min  
 2 x 100 %-iges reines EtOH für je 5 min  
 100 % EtOH + Propylenoxid (1:1) für 5 min  
 Propylenoxid pur 2 x 5 min.  
     Propylenoxid + Epon (1:1) für 30 min  
     Epon pur über Nacht bei RT
12. Einbettung: Frisches Epon, Schnitte dann zwischen zwei Folien oder teflonierte Objektträger legen, über Nacht dann bei 60° C im Brutschrank auspolymerisieren lassen.

Bei diesem Nachweissystem bindet die Sekundärantikörper-gekoppelte Peroxidase an den seinerseits gebundenen Primärantikörper. An ihr schlägt sich das durch Nickelammoniumsulfat verstärkte DAB nach Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Aktivierung nieder, so dass es im Falle einer positiven Reaktion zur Entstehung eines grau-schwarzen Reaktionsproduktes kommt. Nach der Einbettung wurden geeignete Stellen lichtmikroskopisch ausgesucht und ausgeschnitten. Zur transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung wurden diese Stellen auf Blindblöcke aufgeklebt und nach Anfertigung von Ultradünnschnitten (siehe oben) untersucht.

## 2.4 Kontrollen

Bei der Immunogoldmethode mit anschließender Silberverstärkung wurden sowohl bei licht- als auch bei elektronenmikroskopischer Anwendung bei jedem Versuch zwei Kontrollen angefertigt: Die erste Kontrolle wurde statt mit Primärantikörper nur mit BSA-c-Puffer „inkubiert“, anschließend jedoch nach Protokoll (siehe oben) wie die anderen Schnitte weiter bearbeitet. Bei der zweiten Kontrolle erfolgte ebenfalls die BSA-c-Puffer Inkubation; zudem wurde jedoch auch auf die Applikation von ultra-small Goldpartikeln (= Sekundärantikörper) verzichtet, um unspezifische Bindungen des Goldes auszuschließen. Die Silberverstärkung wurde normal durchgeführt.

Die Kontrollen bei der Immunoperoxidase / DAB-Methode wurden statt mit Primärantikörper mit PBS-NaCl inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Weiterverarbeitung mit den anderen Schnitten wie im Protokoll angegeben.

## 2.5 Schnitt-Kontrastierung und Transmissionselektronenmikroskopie

Nach erstmaliger transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchung wurde in einigen Fällen die Kontrastierung mit Uranylacetat ( $\text{UO}_2\text{Ac}$ ) und Bleicitrat angeschlossen. Dabei reagiert Uranylacetat mit Nukleinsäuren und Proteinen, Bleicitrat hingegen sorgt für eine Kontrastierung von Membranen, Proteinen, Nukleinsäuren und Glykogen (Übersicht Robinson et al. 1985). Zur Durchführung wurde der LKB 2168 Ultrastainer der Firma Reichert<sup>®</sup> mit den Gebrauchslösungen Ultrastain 1 and 2 von Leica<sup>®</sup> verwendet. Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde am EM 109 von Zeiss<sup>®</sup> unter Verwendung der normalen und reduzierten 70 mm-Fotopatrone durchgeführt.

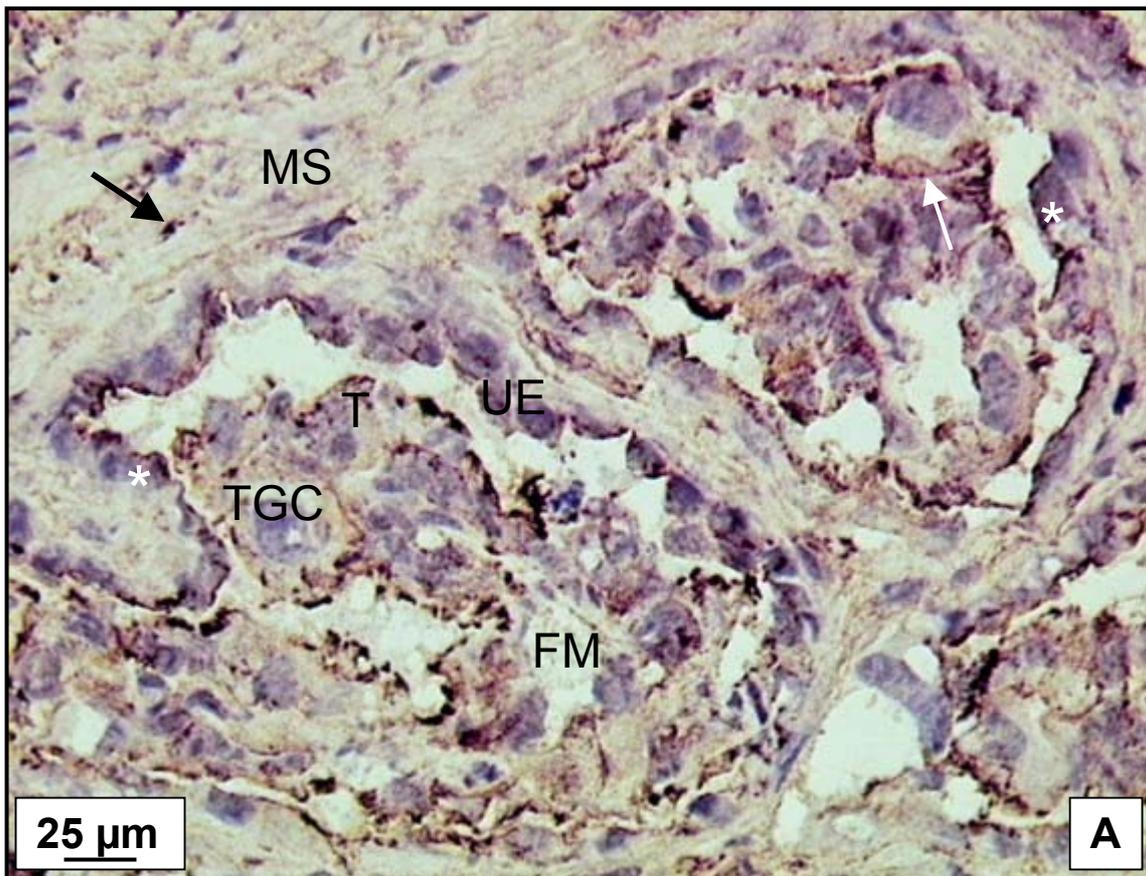
## 2.6 Fotografie

Zur Fotografie am Elektronenmikroskop EM 109 (Carl Zeiss<sup>®</sup>) dienten KODAK<sup>®</sup> EM Planfilme Nr. 4489, die mit KODAK<sup>®</sup> D 19 entwickelt wurden. Für die Bildabzüge wurde das AGFA<sup>®</sup> Brovira-Speed BN 310 RC und Brovira-Speed BH-Papier verwendet und die Abzüge im AGFA<sup>®</sup> Neutol Liquid NE Entwickler (1:9) entwickelt. Die Erstellung der Fotoabzüge wurde mit einer Vergrößerung von 2,3-fach am Vergrößerungsgerät LogE D-54 (LogEtec AG<sup>®</sup>) durchgeführt.

### **III. Ergebnisse**

#### **3.1 Immunhistologische Darstellung der Actin-Expression**

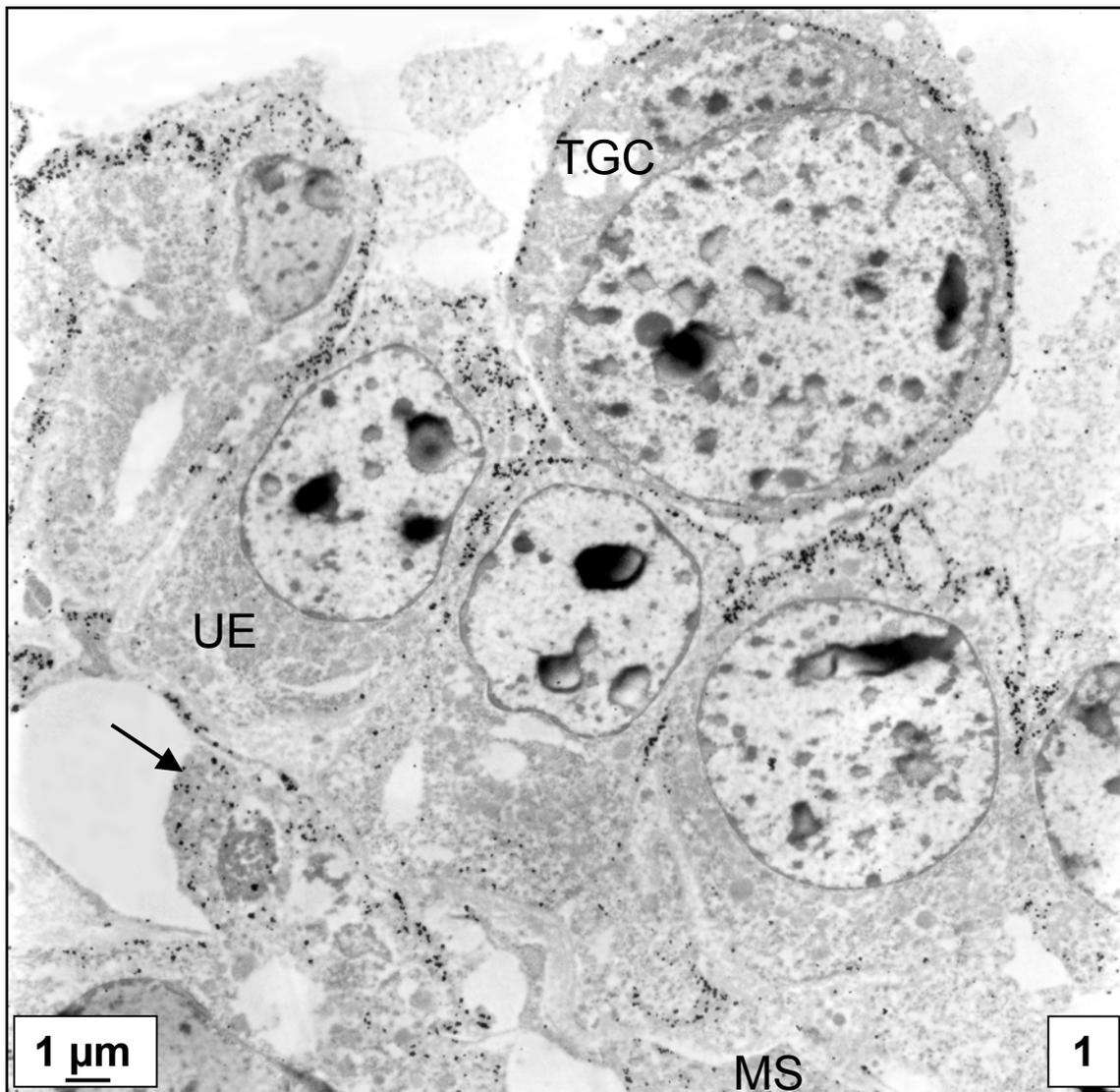
Die Färbung des globulären Actins zeigt sich licht- wie auch elektronenmikroskopisch zum einen apikal, basal und lateral in den Karunkelepithelzellen und zum anderen in Endothelzellen des maternalen Stromas (siehe Bilder A, 1, 2, 3a). Auf fetaler Seite erfolgt der Nachweis ebenfalls apikal in den mononukleären Trophoblastzellen, wobei hier eine gelegentlich starke Anhäufung von Actin apikal festzustellen ist (Bild A). In den TGC zeigt sich eine durchgehend membranassoziierte Lokalisation des Actins, die sich im Pseudopodiumbereich zu akkumulieren scheint (Bild 6). Im Zytotrophoblast (CT) (= uninukleärer Trophoblast) können einige Actin-Filamentbündel nachgewiesen werden (Bild 4). Wie auch auf maternaler Seite erscheinen einige Endothelzellen des fetalen Stromas positiv (Bild A und Bild 3a, b). Unterschiede in der Expression von Actin konnten in den verschiedenen Graviditätsstadien nicht nachgewiesen werden.



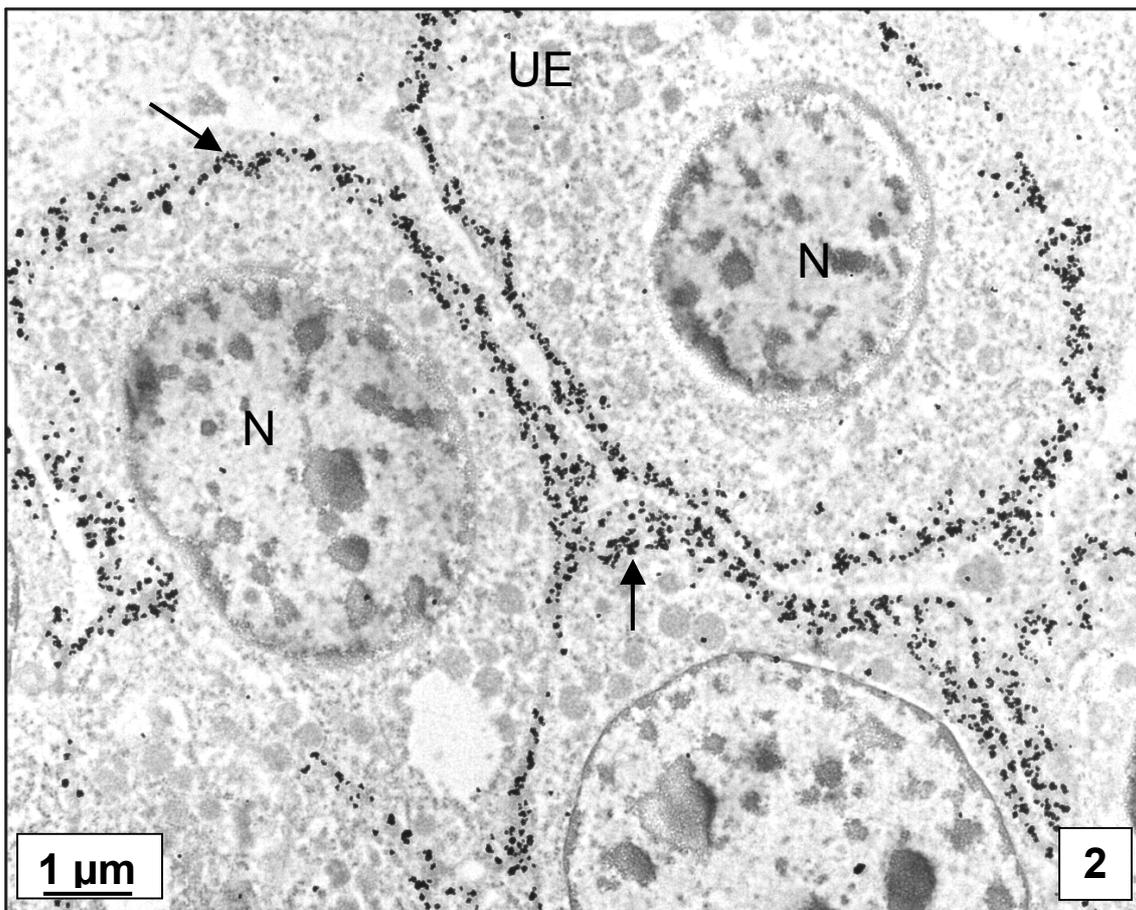
**Bild A:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Lichtmikroskopie, ca. 180. Tag: Braunschwarze Immunogoldfärbung apikal (weißer Stern) in den uterinen Epithelzellen (UE), sowie positive maternale Endothelzellen (schwarzer Pfeil) im maternalen Stroma (MS) erkennbar. Die Riesenzellen (TGC) zeigen eine membranassoziierte Anhäufung der Reaktionskomplexe (weißer Pfeil).

### 3.1.1 Immunelektronenmikroskopische Darstellung der Actin-Expression

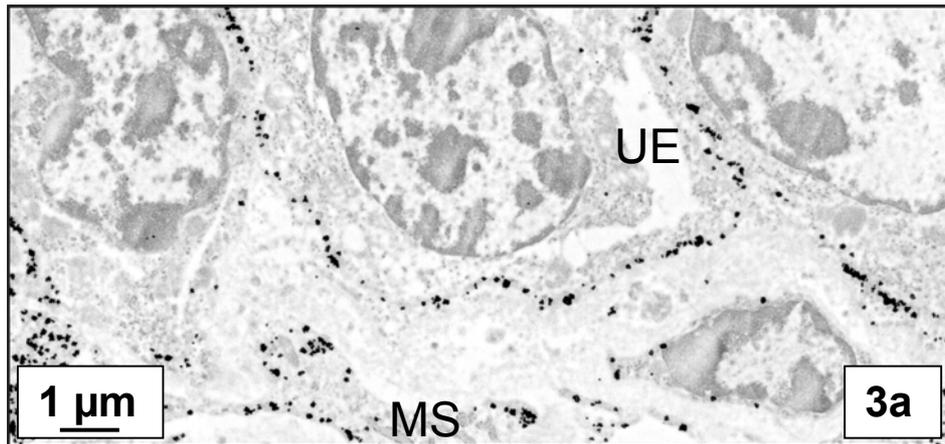
Die folgenden Abbildungen stammen von einer Probe um den 130. Trächtigkeitstag. Im Laufe der Untersuchungen konnte in späteren Stadien keine Expressionsänderung von g-Actin nachgewiesen werden, so dass auf die Darstellung verzichtet wurde.



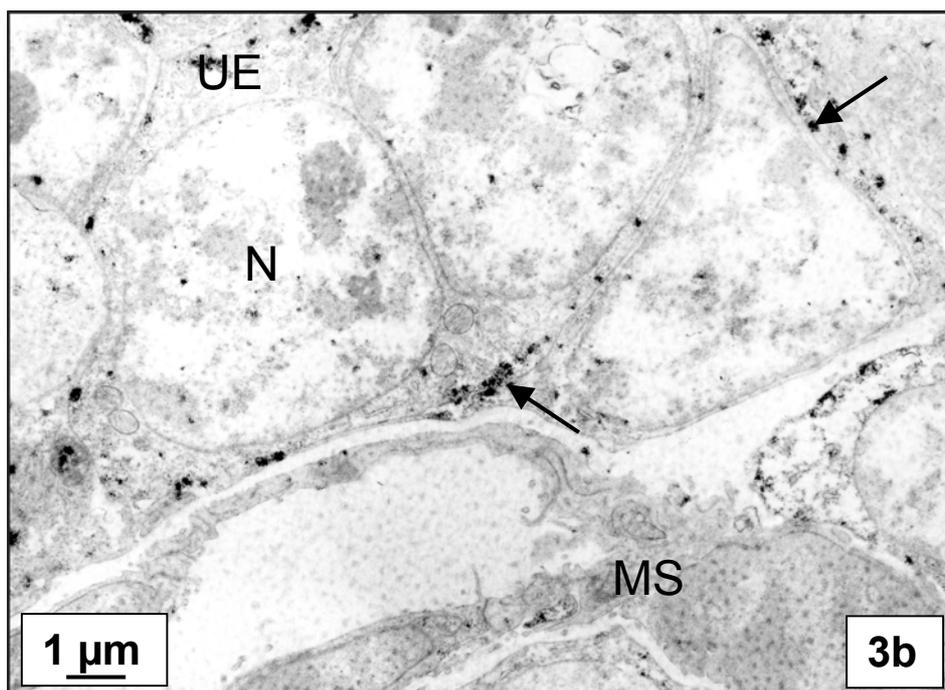
**Bild 1:** Immunogoldverfahren für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Actinnachweis im uterinen Epithel (UE), apikal, lateral und geringfügig basal, sowie in den Endothelien (schwarzer Pfeil) des maternalen Stromas (MS). Actin zeigt sich außerdem membran-assoziiert in der andockenden fetalen Riesenzelle (TGC).



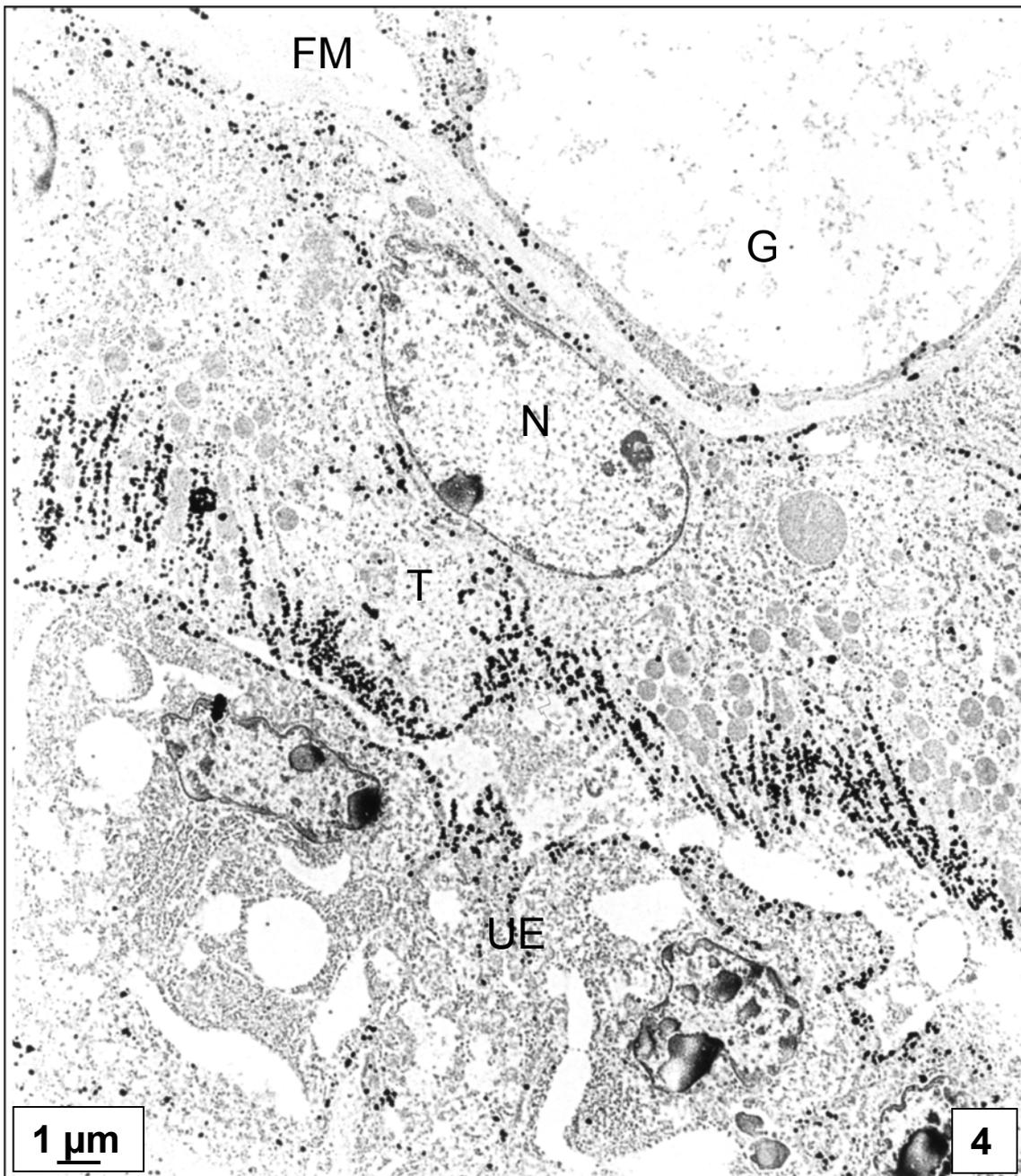
**Bild 2:** Immunogoldverfahren für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Übersicht  
Uterusepithel (UE): Actinnachweis (schwarze Pfeile) im uterinen Epithel (UE),  
apikal und lateral unterhalb der Zytoplasmamembran angeordnet. (N = Nuklei)



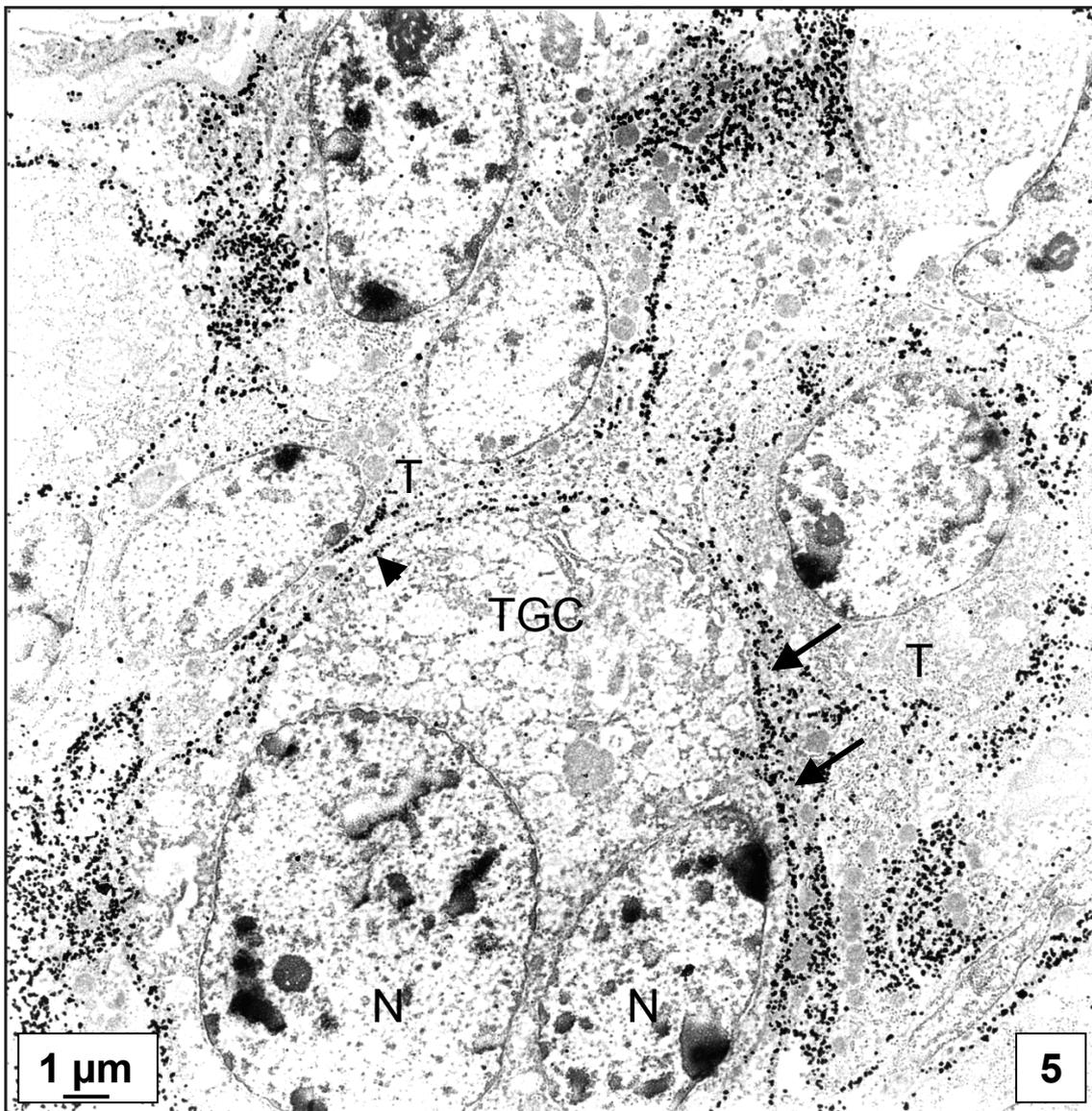
**Bild 3a:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Detail des Basalbereiches des maternalen Epithels aus Bild 1: Deutliche Reaktion im uterinen Epithel (UE) (MS = Maternales Stroma)



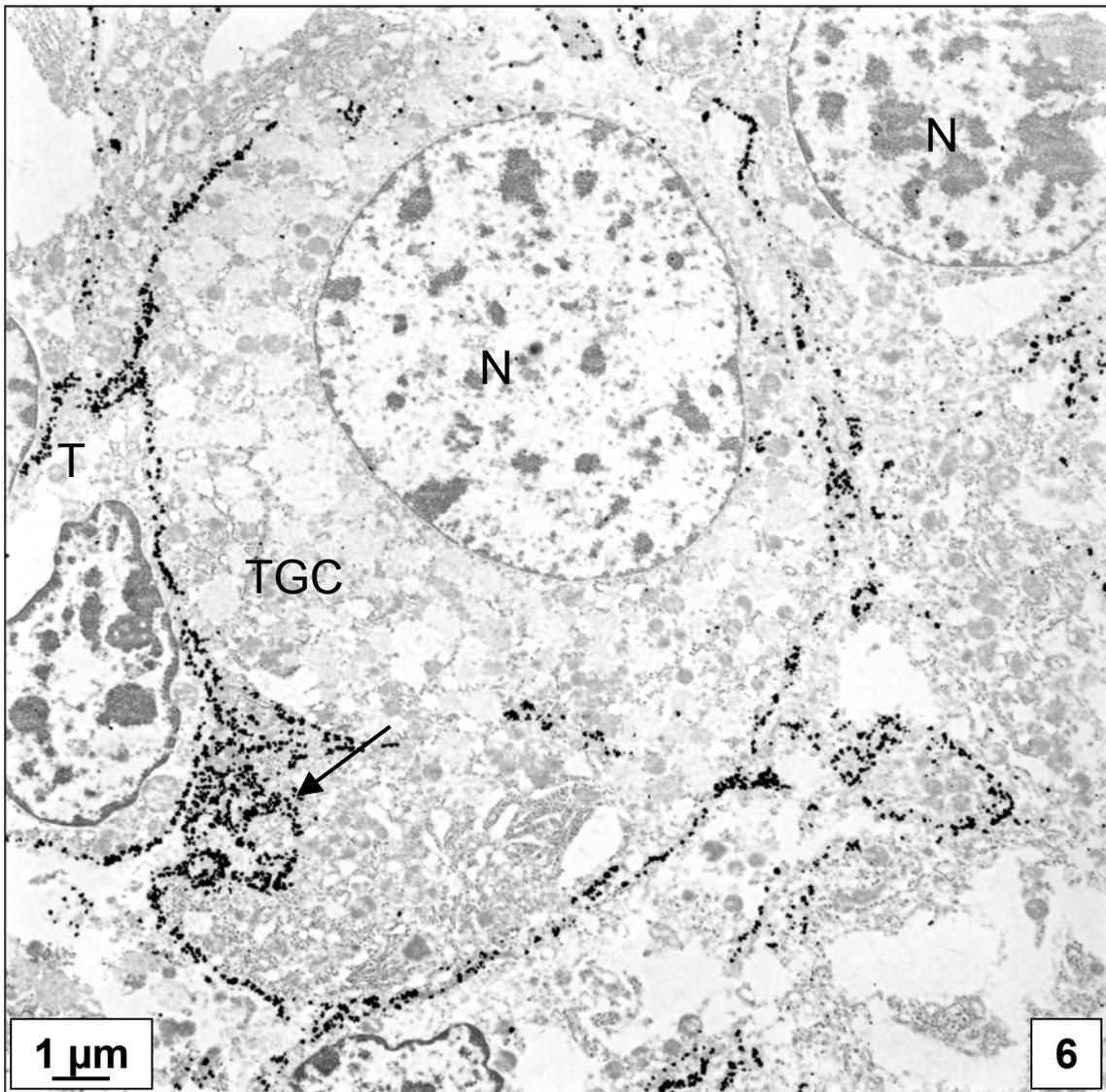
**Bild 3b:** Immunoperoxidaseverfahren, ca. 180. Tag: Vergleich der beiden Nachweisverfahren. Detail des Basalbereiches des maternalen Epithels aus Bild 1: Uterusepithel (UE) mit deutlicher Zellmembranreaktion (Pfeil), jedoch diffuser als mit dem Immunogoldverfahren. Wenig unspezifische Expression im Kern (N). (MS = Maternales Stroma)



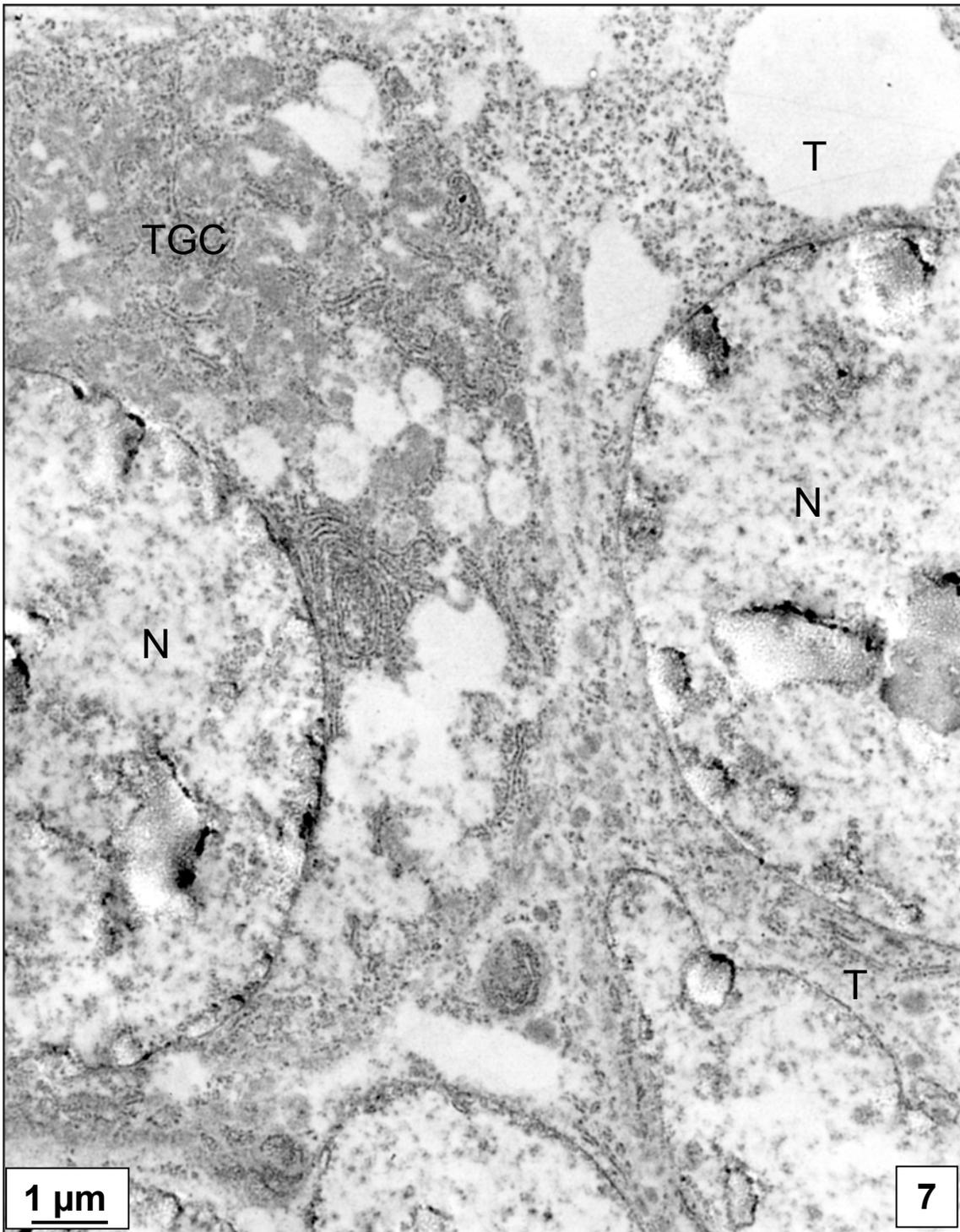
**Bild 4:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Übergang Uterusepithel (UE) / Zytotrophoblast (T) mit fetalem Mesenchym (FM) und Gefäß (G): Actinfilamente in einer mononukleären Trophoblastzelle (T); das Uterusepithel (UE) zeigt hier vermutlich durch die Präparation entstandene „artifizielle“ Vakuolen (N = Nukleus)



**Bild 5:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Übersicht Trophoblast: Binukleäre Riesenzelle (TGC) im Trophoblastzellverband (T) mit deutlicher membranassoziierter Actinreaktion (Pfeilspitze). Wiederum Actinfilamente in den mononukleären Trophoblastenzellen, vor allem an der Kontaktstelle zur TGC (schwarze Pfeile). (N = Nuklei)



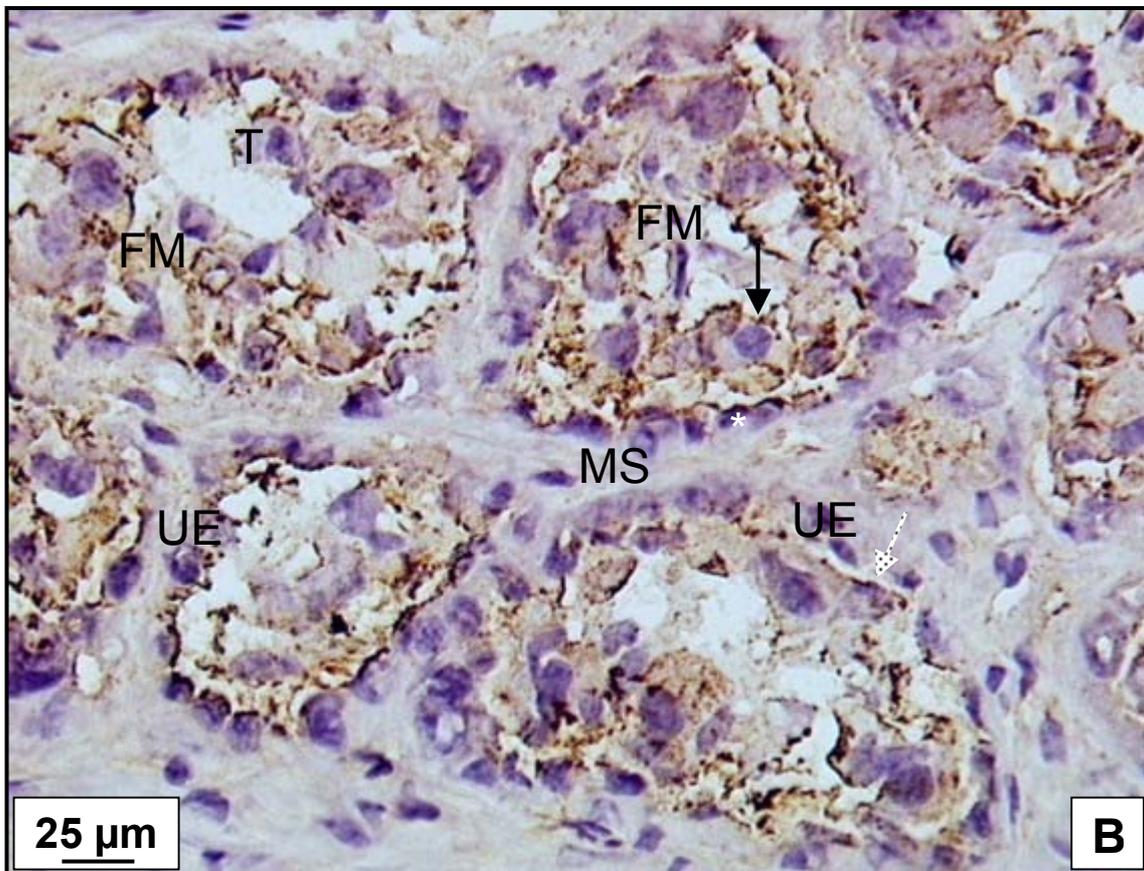
**Bild 6:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Übersicht TGC mit Pseudopodium im Zytotrophoblast: Anhäufung des Actins im Pseudopodiumbereich (schwarzer Pfeil) in Wanderungsrichtung auf das uterine Epithel. (TGC = Riesenzelle, T = mononukleärer Trophoblast)



**Bild 7:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Elektronenmikroskopie, ca. 130. Tag: Kontrolle. Trophoblastriesenzelle (TGC) mit benachbarter uninkleärer Trophblastzelle mit jeweils angeschnittenen Nuklei (N), alle ohne elektronendichte Silberpartikel. (N = Nukleus, TGC = Riesenzelle)

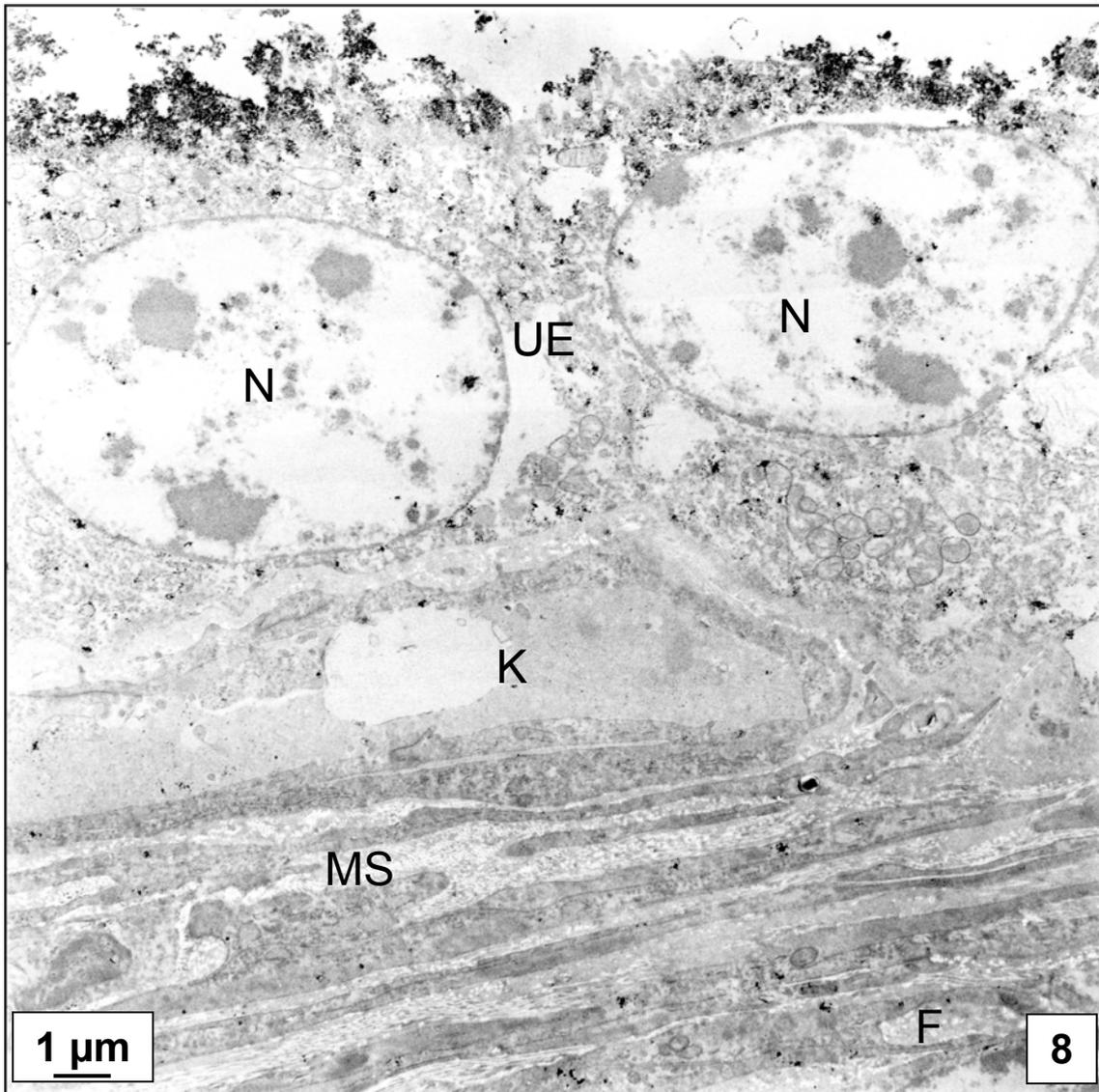
### 3.2 Immunhistologische Darstellung der $\alpha$ -Actinin-Expression

Wie bei Actin zeigt sich die Markierung von  $\alpha$ -Actinin licht- wie auch transmissionselektronenmikroskopisch apikal in Uterusepithel- und in mononukleären Trophoblastzellen. Auch die membranständige Akkumulation in den TGC tritt hier auf, so dass man von einer Kolo-kalisierung sprechen kann. Im Gegensatz zu Actin kann jedoch keine Färbung maternaler wie fetaler Endothelzellen festgestellt werden (siehe Bild B).



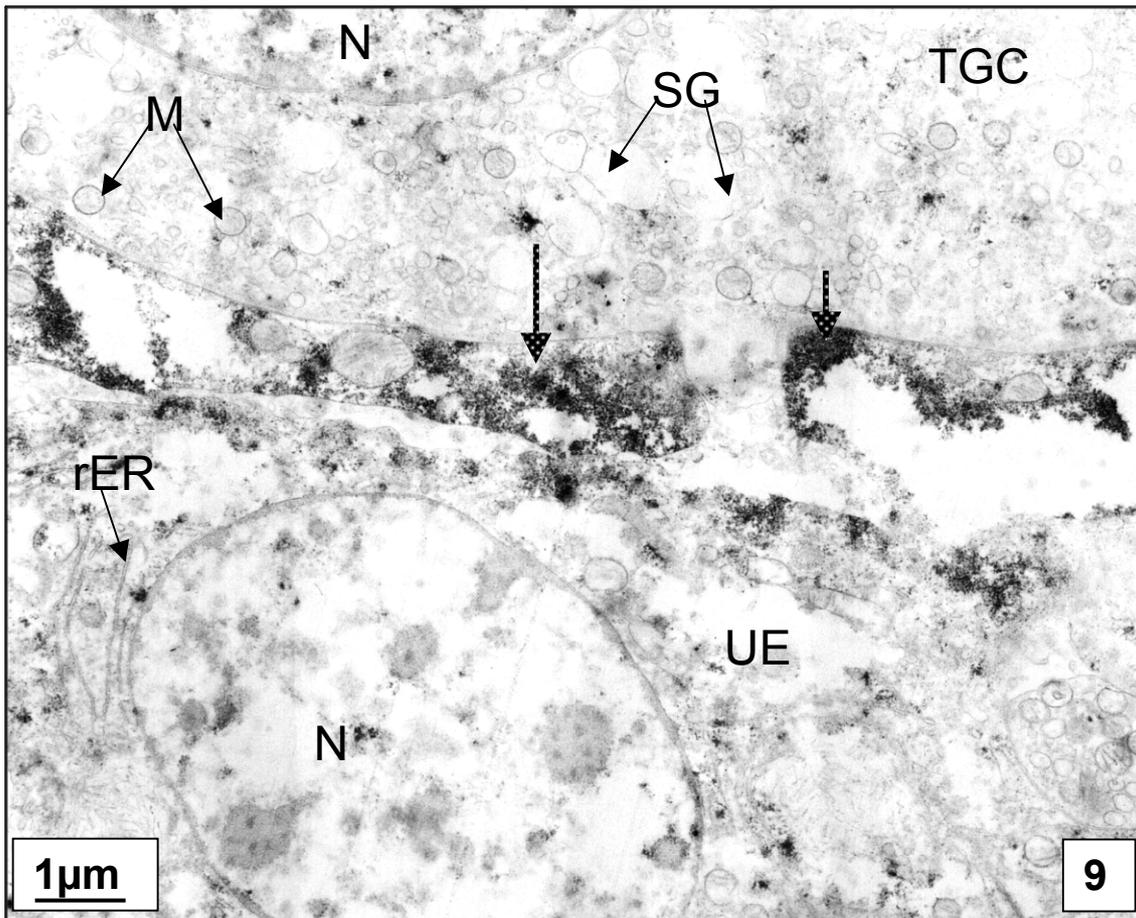
**Bild B:** Immunogoldverfahren für Lichtmikroskopie, ca. 180. Tag: Braunschwarze Silbergranula treten apikal im Uterusepithel (UE, weißer Stern) und in mononukleären Trophoblastzellen (gepunkteter weißer Pfeil) auf. Sie sind außerdem an die Zytoplasmamembran der Trophoblastriesenzellen assoziiert (schwarzer Pfeil). (MS = Maternales Stroma, FM = Fetales Mesenchym, T = Trophoblast)

### 3.2.1 Immunelektronenmikroskopische Darstellung der $\alpha$ -Actinin-Expression



**Bild 8:** Immunoperoxidaseverfahren, ca. 180. Tag:

Überblick Uterusepithel und subepitheliales Stroma: DAB-Reaktion deutlich im uterinen Epithel (UE) an gerissener feto-maternaler Kontaktzone im Bereich des Mikrovillisaums. Weniger deutliche Reaktion im Zytoplasma und einige unspezifische Reaktionsprodukte in den Kernen (N). (MS= maternales Stroma mit K = Kapillare und F = Fibrozyten)



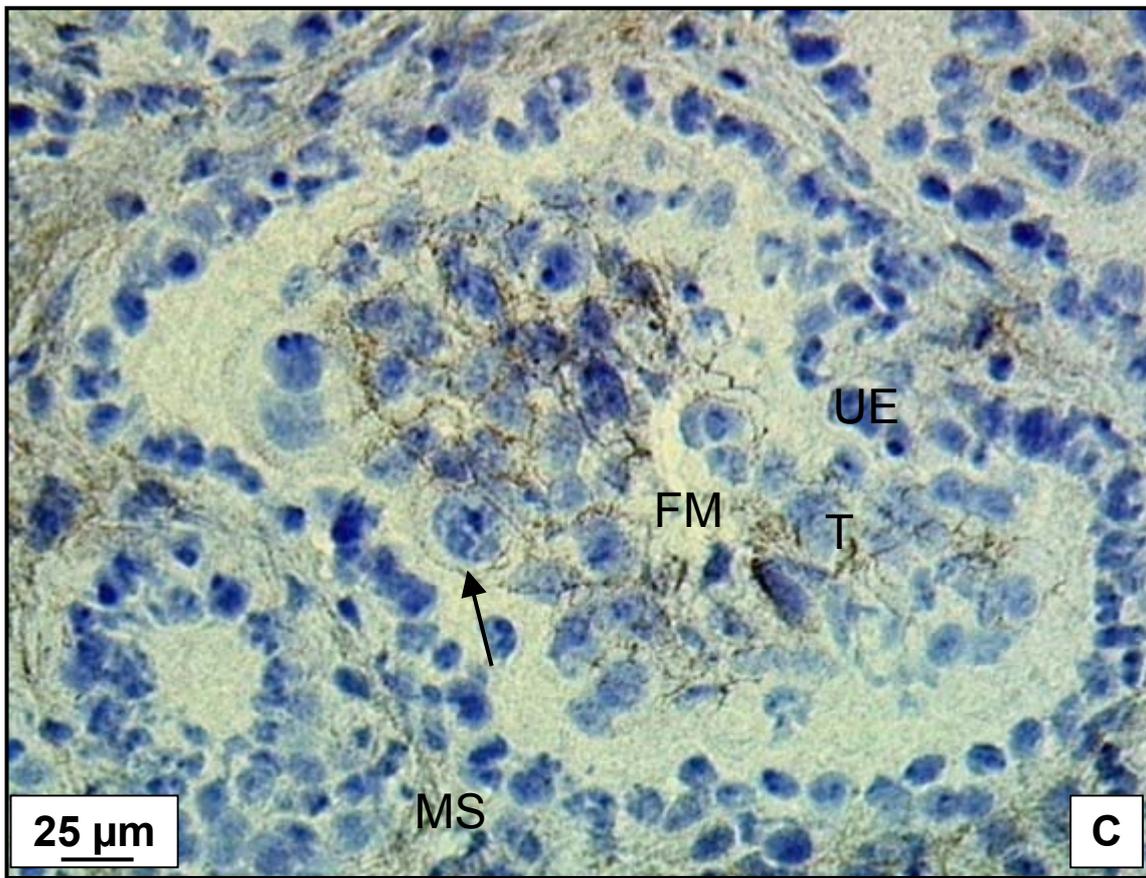
**Bild 9:** Immunoperoxidaseverfahren, ca. 180. Tag:

Übersicht der Kontaktzone: Starkes membrangebundenes DAB-Reaktionsprodukt (gepunktete schwarze Pfeile) an gerissener feto-maternaler Kontaktzone. Zytoplasmatische Reaktion im Uterusepithel und einige unspezifische Reaktionsprodukte im Kern. Riesenzelle mit mäßiger zytoplasmatischer Reaktion, ebenfalls kernunspezifische Produkte erkennbar.

(M = Mitochondrien, N = Nukleus, rER = rauhes endoplasmatisches Retikulum, SG = Sekretgranula, UE = Uterusepithel, T = Trophoblast)

### 3.3 Immunhistologische Darstellung der Vinculin-Expression

Lichtmikroskopisch kann im Unterschied zu den vorangegangenen Detektionen Vinculin nur vereinzelt apikal im maternalen Epithel nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt) und erscheint sonst wiederum deutlich membranassoziiert in den TGC mal apikal, mal basal an mono- und binukleären Trophoblastzellen. Ferner ist der Nachweis sowohl in maternalen als auch fetalen Endothelzellen zu erkennen. Diese Lokalisation kann transmissionselektronenmikroskopisch mit der Immunogoldmethode mit anschließender Silberverstärkung nicht reproduziert werden, da eventuell spezifische Reaktionen von der starken Hintergrundreaktion nicht abgegrenzt werden konnten. Dies wird allerdings auf die Methodik zurückgeführt, da mittels des Immunoperoxidase-Verfahrens eine deutlich positive Reaktion im Zytoplasma der mononukleären Trophoblastzellen membranassoziiert nachgewiesen werden kann.

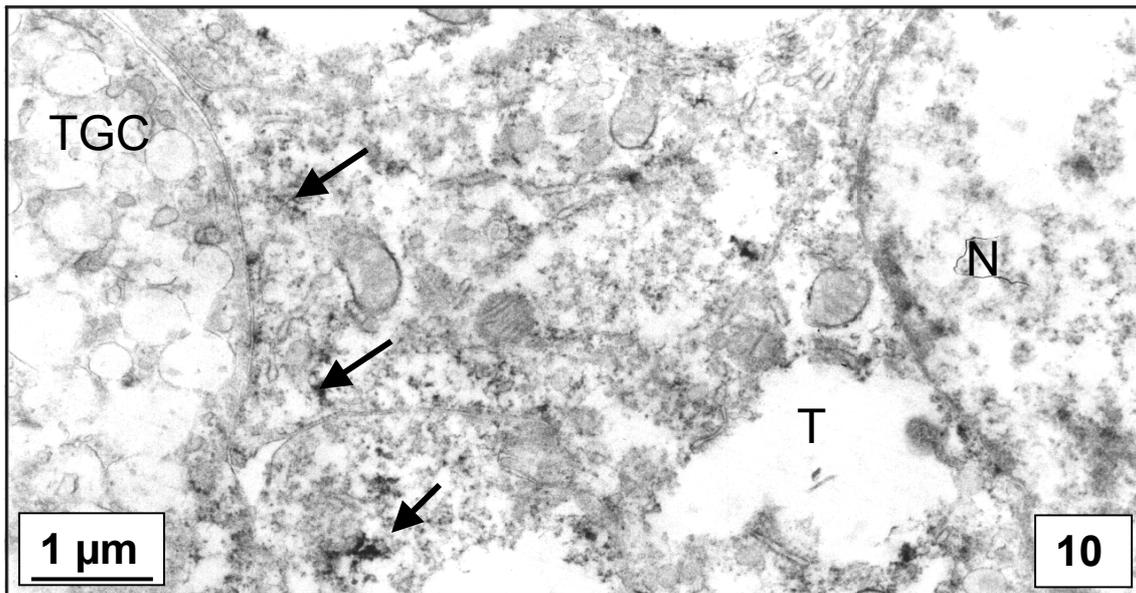


**Bild C:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Lichtmikroskopie, ca. 180.

Tag: Vinculin liegt deutlich membranassoziiert in Trophoblastriesenzellen (schwarzer Pfeil) vor. Es kann außerdem in maternalen Endothelzellen (weißer Pfeil) erkannt werden.

(FM = fetales Mesenchym, MS = Maternales Stroma, UE = Uterines Epithel, T = Trophoblast)

### 3.3.1 Immunelektronenmikroskopische Darstellung der Vinculin-Expression

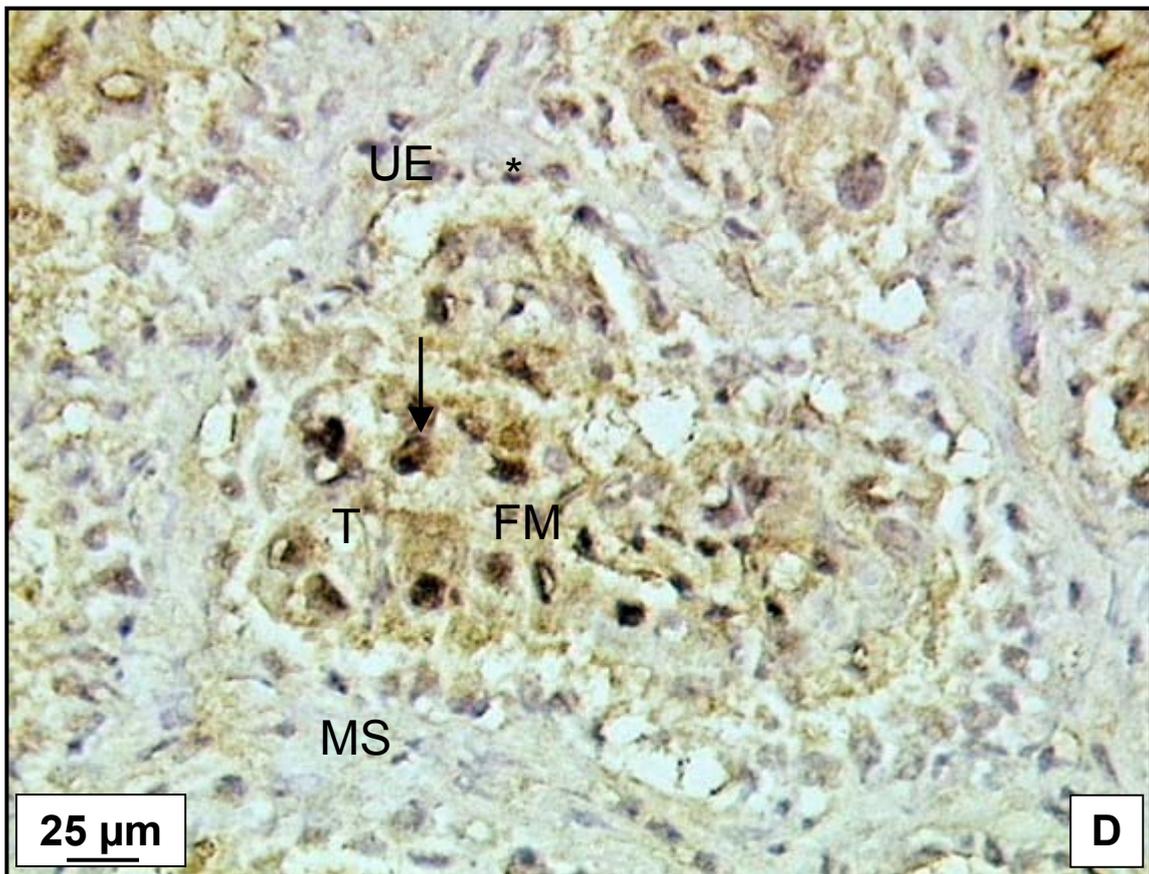


**Bild 10:** Immunoperoxidaseverfahren, ca. 180. Tag:

Deutlicher Nachweis (Pfeile) des Vinculins nahe einer Riesenzelle im Zytoplasma einer mononukleären Trophoblastzelle. (N = Nukleus, TGC = Riesenzelle, T = mononukleärer Trophoblast )

### 3.4 Immunhistologische Darstellung der phosphorylierten Mitogen-aktivierten Proteinkinase (pMAPK)-Expression

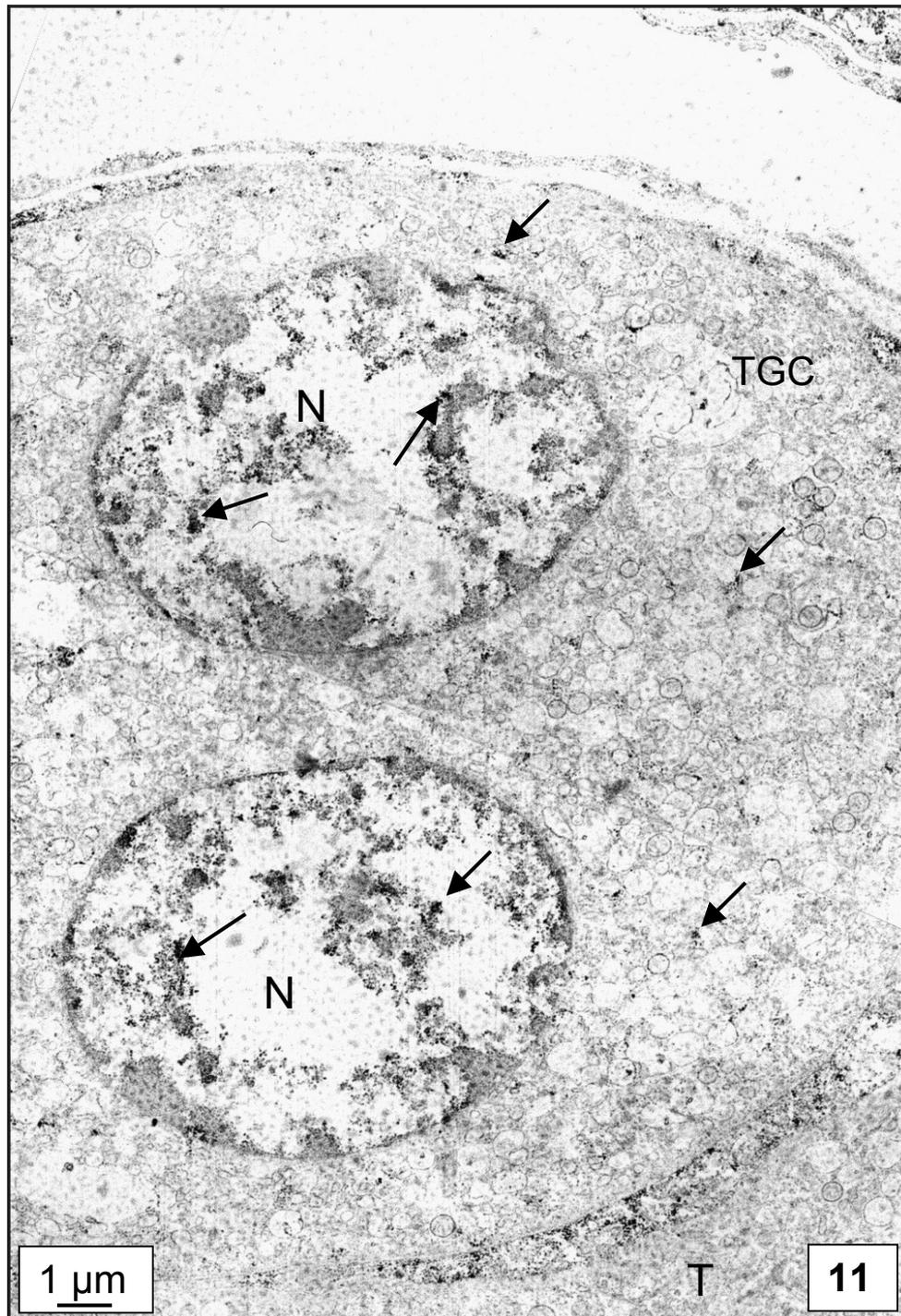
Lichtmikroskopisch wird die aktivierte, das heißt phosphorylierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase deutlich als braun-schwarze, dichte Anhäufungen über den Kernen vor allem im Trophoblasten detektiert. Hier sind sowohl die mono- als auch die binukleären Zellen markiert. Die schwächere zytoplasmatische Reaktion wird auf das Vorkommen der pMAPK im Zytoplasma zurückgeführt. Desweiteren tritt ganz vereinzelt eine Markierung auch in den Kernen der maternalen uterinen Epithelzellen auf. Eine Detektion im maternalen Stroma erfolgt nicht (siehe Bild D). Der eindeutige transmissionselektronenmikroskopische Nachweis mittels Immunogoldmethode mit Silberverstärkung scheiterte aufgrund vieler unspezifischer Reaktionen, weswegen auf eine Darstellung verzichtet wurde. Anhand der Immunfärbung mit dem Immunoperoxidase / DAB-Verfahren zeigen sich jedoch sowohl in den Kernen als auch im Zytoplasma, hier zum Teil auch membranassoziiert, des gesamten Trophoblasten eindeutige Reaktionsprodukte. Auch bei phosphorylierten Mitogen-aktivierten Proteinkinase konnte keine Abhängigkeit der Expression vom Graviditätsstadium erkannt werden.



**Bild D:** Immunogoldverfahren mit Silberverstärkung für Lichtmikroskopie, ca. 180.

Tag: pMAPK ist als deutliche nukleäre Reaktion (schwarzer Pfeil) in Trophoblastzellen (T) zu erkennen. Vereinzelt findet sie sich auch in den Kernen des Uterusepithels (UE, schwarzer Stern). (FM = fetales Mesenchym, MS = Maternales Stroma)

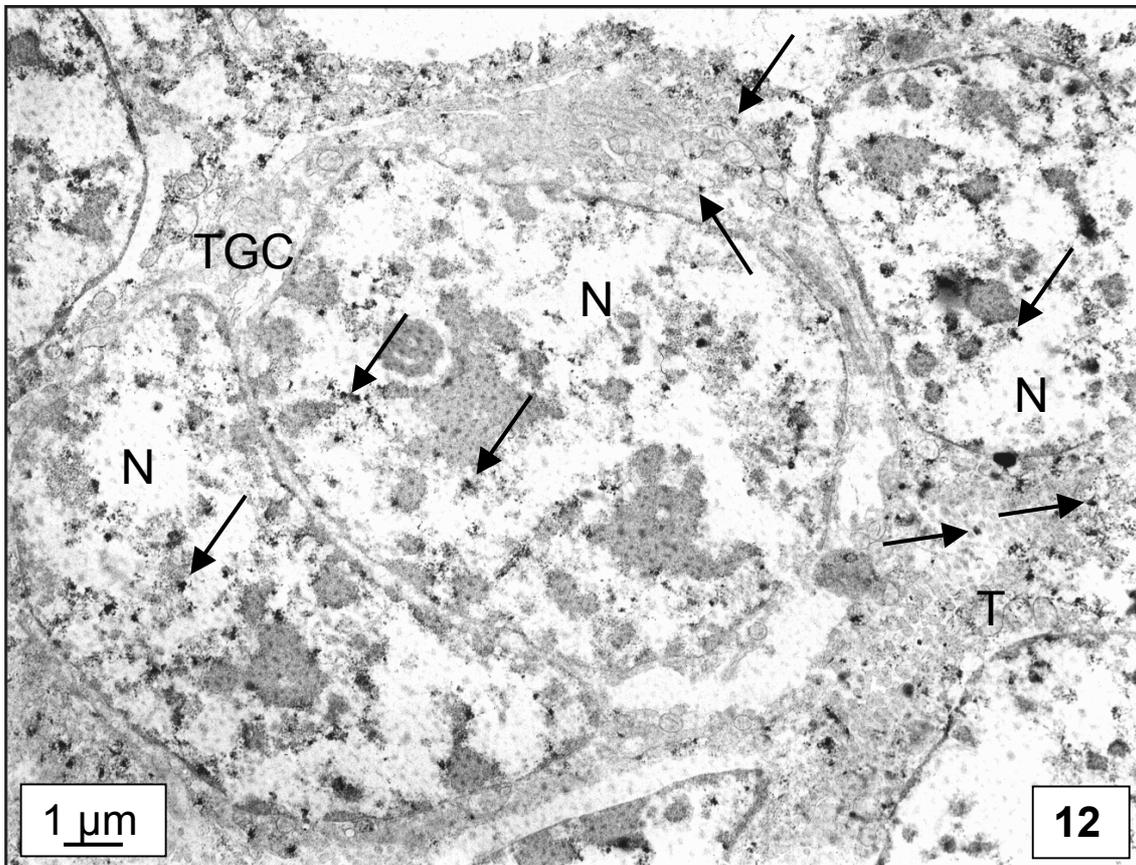
3.4.1 Immunelektronenmikroskopische Darstellung der phosphorylierten Mitogen-aktivierten Proteinkinase (pMAPK)-Expression



**Bild 11:** Immunoperoxidaseverfahren, ca. 180. Tag:

Übersicht einer binukleären Riesenzelle (TGC): DAB-Reaktionsprodukt im Zytoplasma, aber vor allem im Kern (siehe Pfeile) zu sehen. Der Trophoblast

(T) weist hier keine, der interzelluläre Raum eine schwache Reaktion auf, die jedoch nicht als spezifisch zu betrachten ist.



**Bild 12:** Immunoperoxidaseverfahren, ca. 180. Tag:

pMAP Kinase deutlich in den Nuclei (N, Pfeile) der Riesenzelle (TGC) und membranständig im Zytoplasma (ebenfalls Pfeile) zu erkennen. Im Zytotrophoblast (T) findet sich diese in Zytoplasma und Kern (N, Pfeile).

## **IV. Diskussion**

### 4.1 Allgemeines zu den licht- und elektronenmikroskopischen Ergebnissen

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Plazentome des Rindes zwischen Tag 90 und Tag 270 der Gravidität. Innerhalb dieses Zeitraumes konnten an den verschiedenen „Stadien“ keine qualitativen Unterschiede in den Detektionen festgestellt werden.

#### *4.1.1 Kritische Betrachtung der Methode*

Zur Evaluierung der Funktionalität der Antikörper wurden Kryoschnitte verwendet, weil die zur Antikörperbindung benötigten Epitope meist besser erhalten sind, als in Paraffinschnitten. Zur Erhaltung des Gewebes wurde eine Schnittdicke von 12 µm gewählt; dennoch war teilweise eine artifizielle Trennung der fetalen Zotten (Trophoblast) und maternalen Krypten (Karunkelepithel) nicht zu vermeiden.

Im Laufe der Vorversuche kristallisierte sich außerdem die Fixierung des Gewebes mit 3 % Paraformaldehyd für 1 Stunde im Vergleich zu 3 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd für 1 Stunde beziehungsweise Aceton-Methanol (70:30) für 10 Sekunden als beste Vorgehensweise heraus, da die Bindung der Primärantikörper, insbesondere von Vinculin, nicht wie bei Aceton-Methanol beeinträchtigt wurde, und gleichzeitig auch zu einer besseren morphologischen Gewebeerhaltung führte. Aus den gleichen Gründen wurde auch auf elektronenmikroskopischer Ebene der Fixierung mit 3 % Paraformaldehyd vor 3 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd der Vorzug gewährt.

Als Einbettmedium für die Elektronenmikroskopie wurde LR-White verwendet, da man es für immunhistochemische Versuche aufgrund seiner Antikörperdurchlässigkeit sowohl im Pre- als auch im Postembedding-Verfahren anwenden kann. Es war jedoch erheblich weicher als Epon, was gelegentlich zu Schwierigkeiten bei der Anfertigung von Ultradünnschnitten führte. Nach Anwendung des Immunoperoxidase / DAB

Verfahrens wurden die Proben jedoch wegen der besseren Verarbeitungsmöglichkeit mit Epon eingebettet.

Die Verwendung von 0,03 %-igem Triton X zur Membranpermeabilisierung bei den lichtmikroskopischen Versuchsreihen konnte keine Verbesserung der Reaktionsintensität bei den verschiedenen Antikörpern erzielen. Desweiteren zeigt sich bei einer Konzentration von 1- und 3 %-igem Milchpulver plus 1 % Ziegennormalserum in 0,1 % BSA-c-Puffer zur Unterdrückung unspezifischer Reaktionen, dass es insbesondere bei Actin zu keiner Primärantikörperbindung mehr kam. Hintergrundreaktionen konnten ebenfalls nicht abgeschwächt oder verhindert werden. Lediglich der Einsatz von 0,2 %-igem BSA-c-Puffer führte zu einer leichten Verbesserung der Hintergrundreaktionen.

#### 4.2 Das Zytoskelett und die Trophoblastmigration

Licht- wie elektronenmikroskopisch zeigt sich der Nachweis des globulären Actins apikal, basal und lateral in uterinen Epithelzellen und in Endothelzellen des maternalen Stromas. Auf fetaler Seite wird es ebenso apikal in mononukleären Trophoblastzellen und membranassoziiert, besonders in Pseudopodien der Trophoblastriesenzellen exprimiert. Da, wie bereits erwähnt, die TGC des Rindes in Richtung Uterusepithel migrieren (Wimsatt 1951; Davies und Wimsatt 1966) und schließlich zu dreikernigen Hybridzellen mit dem maternalen Epithel fusionieren (Wooding 1992; Klisch et al. 1999), scheinen die mechanischen Eigenschaften des Actinzytoskeletts auch bei diesem Prozess eine Rolle zu spielen, da Änderungen in der Zellgestalt, -verankerung und Motilität mit der dynamischen Reorganisation des Actin-Zytoskeletts assoziiert sind (Übersicht Small et al. 1999; Steven et al. 1999; Pavalko und Otey 1994).

Die Zellform ist während der Entwicklung durch zytoskeletale Reorganisation charakterisiert, die eng mit der Entstehung von Verbindungsstrukturen koordiniert ist. Diese verbinden das Zytoskelett mit extrazellulären Liganden durch transmembrane Interaktionen. Dabei sind sowohl Actin als auch die Intermediärfilamente mit Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen assoziiert (Übersicht Small et al. 1999).  $\alpha$ -Actinin als  $\beta$ -Untereinheitsligand fungiert als Verknüpfungprotein und induziert Actin-Konfor-

mationsänderungen (Alberts et al. 1999), worin die Bedeutung der hier vorliegenden apikalen Kolo-kalisation von Actin und  $\alpha$ -Actinin sowohl im maternalen Epithel der Karunkel als auch des Trophoblasten in der Gewährleistung der direkten Übertragung der Signalwirkung über Integrine auf das Zytoskelett zu suchen ist. In diesem Zusammenhang zeigt sich eine Übereinstimmung mit Ergebnissen aus humanen RL95-2-Zellen (Thie et al. 1997), die ebenfalls eine periphere Actinrinde besitzen. Thie et al. (1997) weisen einem unpolariertem Actinsystem, wie es also auch vermutlich in den TGC der Rinderplazenta vorliegt, eine essentielle Bedeutung für die Adhäsivität des Trophoblasten zu. Im Gegensatz dazu ist diesem aber in den TGC der Rinderplazenta wohl nur eine Bedeutung für das eigene Migrationsverhalten zuzusprechen.

Johnson et al. (2001) und Garlow et al. (2002) zeigen die Bildung von fokalen Adhäsionen, gebildet durch zytoskelettale Reorganisation, auf zytoplasmatischer Seite an der Kontaktstelle zwischen 1.) immortalisierten ovinen maternalen luminalen Epithelzellen und primären Trophoblastzellen (Johnson et al. 2001) und 2.) an porzinen maternalen luminalen Epithelzellen und Konzeptus-Trophoblastzellen (Garlow et al. 2002). Dabei zeigte sich, dass sich innerhalb einer Stunde nach Zugabe von Osteopontin-beschichteten Kügelchen zu kultivierten ovinen maternalen luminalen Epithelzellen und primären Trophoblastzellen intensive Talinaggregate ausbildeten. Ähnliche Aggregate konnten an den primären Trophoblastzellen nachgewiesen werden. Diese fokalen Adhäsionen sind das Ergebnis der Integrinaktivierung, induziert durch Bindung an Osteopontin in der extrazellulären Matrix und Aggregation von zytoskelettalen Proteinen (Talin,  $\alpha$ -Actinin) (Garlow et al. 2002).

Die Hypothese der epithelio-mesenchymalen Transformation, nach der Mesenchymzellen Migrationsfähigkeit durch die extrazelluläre Matrix (ECM) besitzen (Übersicht Hay 1995), liefert dahingehend interessante Aspekte, dass sich bei embryonalen Mesenchymzellen in der Migration das Actin apikal befindet, bei Polarität der Epithelzellen hingegen basal (Hay 1991). Dass bei den hier vorliegenden Ergebnissen Actin licht- wie elektronenmikroskopisch sowohl im Uterusepithel als auch in mononukleären Trophoblastzellen meist apikal nachgewiesen werden konnte, könnte für eine epitheliomesenchymale Transformation sprechen. Ferner ist elektronenmikroskopisch jedoch auch die basale und basolaterale Anordnung von Actin deutlich

zu erkennen, so dass hier offensichtlich polarisierte Uterusepithelzellen vorliegen.

Lichtmikroskopisch erscheint Vinculin teils apikal und lateral und membranassoziiert in Trophoblastzellen, elektronenmikroskopisch kann es vor allem im Bereich der Kontaktzone zwischen mononukleären Trophoblastzellen und TGC nachgewiesen werden. Diese Anordnung weist einerseits auf einen Verankerungspunkt der Trophoblastzellen untereinander, andererseits auf einen Fixationspunkt bei der Migration und Fusion der TGC hin. An motilen Fisch-Keratinocyten konnte gezeigt werden, dass die gebildeten fokalen Adhäsionen statische vinculinhaltige Gebilde sind, die der Anheftung dienen und mit einem feinen diagonalen Actinnetzwerk unterlegt sind (Small et al. 1995). Auf diese Weise kann Vinculin seine Aufgabe als „Vernetzungspunkt“ zwischen Talin,  $\alpha$ -Actinin, Actin und der Integrin  $\beta$ -Untereinheit bei der Signalübertragung in fokalen Adhäsionen wahrnehmen (Clark and Brugge 1995; Garratt und Humphries 1995).

Im Falle von Madin-Darby bovinen Nierenzellen (MDBK) konnte von Palovuori und Eskelinen (2000) gezeigt werden, dass Vinculin und  $\alpha$ -Actinin nach Injektion in konfluierende Zellen sofort in Adhärenz- und Tight Junctions inkorporiert werden. Fokale Adhäsionen blieben unverändert, jedoch verschwanden Zell-Zell Kontakte innerhalb einer Stunde nach Injektion und es entstanden 5- bis 13-kernige Polykaryonten, die kurze Zellmembranfragmente mit injizierten Proteinen (wie Actin, beta-Catenin etc.) enthielten. Im Gegensatz zur Fusion führte die mikroinjizierte FITC-markierte Vinculin-Kopfdomäne zur Ablösung der Zellen vom Substrat, was ihre hohe Affinität zu Talin vermuten lässt (Palovuori und Eskelinen 2000). Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen vermuten diese Autoren, dass ein Überschuss an  $\alpha$ -Actinin und Vinculin zu einer Loslösung der Zell-Zell Adhäsionverbindungen vom intrazellulären Zytoskelett erfolgt und dadurch die Fragmentierung der Verbindungskomplexe und anschließende Zellfusion verursacht wird (Palovuori und Eskelinen 2000). Dieser Mechanismus könnte auch für die TGC der Rinderplazenta aufgrund der Lokalisation von  $\alpha$ -Actinin und Vinculin bei der Fusion mit dem Uterusepithel in Betracht gezogen werden, da die migrierenden unpolarisierten TGC (Wimsatt 1951; Davies und Wimsatt 1966) eine temporäre Komponente der trophoctodermalen Tight junctions bilden, bis sie schließlich mit dem Uterusepithel fusionieren (Wooding et al. 1980; Morgan and

Wooding 1993). Außerdem ist vermutlich eine Anhäufung von zytoplasmatischen Proteinen (z. B. ZO-1, 2 und 3,  $\alpha$ -Catenin, AF-6) unter den Tight junctions für die Vernetzung der transmembranen Proteine (z. B. Occludin, Claudin) verantwortlich, die wiederum eine Verbindung zu dem um die Tight junctions angeordneten Actinzytoskelett herstellen und für die Übermittlung regulatorischer Signale zur Kontrolle der parazellulären Barriere sorgen (Übersicht Fanning et al. 1999).

Der invasive Trophoblast kann selbst die Freisetzung von Proteinasen steuern, die dann die ECM degradieren; am Beispiel der Maus sind dies Serinproteinasen, Matrix Metalloproteinasen (MMP) und Cysteinproteinasen, die auf maternaler Seite einer Vielzahl von Inhibitoren gegenüberstehen (Alexander et al. 1996). Das relative Verhältnis von MMP und ihren Gewebeinhibitoren (TIMP) ist dabei nach Canning et al. (2001) eine wichtige Determinante der Trophoblastinvasion in den Uterus sowie der Tumorinvasion und Metastasierung, die durch Änderungen der Sauerstoffkonzentrationen reguliert werden. Diese Arbeitsgruppe zeigte an humanen MDA-MB 231 metastatischen Brustkrebszellen und HTR-8/Svneo Zellen einer humanen Plazenta aus dem ersten Trimester, dass eine niedrige Sauerstoffkonzentration in vitro die Invasivität von Trophoblast- und Tumorzellen erhöht, und dass umgekehrt die Unterdrückung der MMP signifikant die hypoxisch bedingte Hochregulierung der Invasivität herabsetzt. Auch beim Rind wird vermutet, dass die Balance zwischen proteolytischen Enzymen und ihren Aktivatoren und Inhibitoren offensichtlich eine essentielle regulatorische Rolle in der Entwicklung der Plazenta spielt (Walter und Boos 2001): MMP-2 wird in der frühen Gravidität im maternalen Stroma in Septen und Krypteneingängen stark exprimiert, reduziert sich dann aber mit fortschreitender Trächtigkeit weitestgehend auf die Krypteneingänge. Auch das diesem Areal gegenüberliegende Chorionepithel ist MMP-2 positiv. MMP-9 zeigt sich im Chorionepithel mit der Ausnahme der TGC und im maternalen Epithel und Stroma. Die Riesenzellen hingegen exprimieren über die gesamte Gravidität TIMP-2 (Walter und Boos 2001). Auch bei der Maus werden MMP-2 und 9 im endometrialen Stroma während der frühen Gravidität und der  $\text{ö1}$ -induzierten Dezidualisierung exprimiert (Bany et al. 2000). Dieses Signal wird jedoch im Verlauf der Gravidität zunehmend schwächer und ist gänzlich in den Regionen verschwunden, in denen die Dezidualisierung bereits stattgefunden hat (Bany et al. 2000). Ab dem 8. Tag der

Gravidität und 72 Stunden nach der Induktion der Dezidualisierung waren MMP-2 und -9 noch hauptsächlich in der Region der nicht dezidualisierten Stromazellen, die an das Myometrium angrenzen, nachzuweisen, in Implantations-segmenten zeigten sie sich außerdem in TGC (Bany et al. 2000).

#### 4.3 Aspekte zur phosphorylierten Mitogen-aktivierten Proteinkinase

Die phosphorylierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase (pMAPK) ist lichtmikroskopisch in vereinzelt Kernen des uterinen Epithels und in den Kernen aller Trophoblastzellen nachzuweisen. Im Elektronenmikroskop kann sie wiederum im Zytoplasma und Kernen der mononukleären Trophoblastzellen als auch im Zytoplasma der TGC, sowohl in Membrannähe als auch verteilt und in ihren Kernen, detektiert werden. Dabei erscheint eine Anhäufung in den Kernen als offensichtlich. Die Anwesenheit von pMAPK in Membrannähe wurde bereits nachgewiesen (Glading et al. 2001; Howe et al. 2001). Diese Lokalisation der ERK-1 und -2 wird als Ursache für die Aktivierung der Migration von Trophoblastzellen interpretiert, da die Tyrosinphosphorylierung und enzymatische Aktivität über die Ligation von  $\beta_1$  Integrin gesteuert scheint (Morino et al. 1995). Die vorliegenden Ergebnisse für die Lokalisation des Actins in den TGC der Rinderplazenta lässt vermuten, dass die Integrität des Actinzytoskeletts hier ebenfalls gegeben und dadurch die durch die ERK-1 und ERK-2 gesteuerte Aktivierung der Migration von Trophoblastzellen gewährleistet ist (Morino et al. 1995). Es erscheint daher ferner möglich, dass dies der Mechanismus ist, über den  $\beta_1$  Integrin an der Migration von TGC beteiligt ist, was bereits von MacLaren und Wildemann (1995) vermutet wurde. Howe et al. (2001) unterstreichen diese Annahme, indem sie die Lokalisation von ERK an membran- und integrinassoziierten Stellen als potentiell bedeutend für Zellausbreitung und -bewegung ansehen. Des Weiteren konnten Wei et al. (1998) an P388D1 Makrophagen nachweisen, dass eine Regulation der Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinase durch die zytoplasmatische Domäne der  $\alpha_6$  Integrinuntereinheit stattfindet. Interessanterweise postulieren sie in diesem Zusammenhang die Beeinflussung der  $\alpha_6\beta_1$ -vermittelten Migrationsfähigkeit von P388D1 Makrophagen auf Laminin-1 (Wei et al. 1998).

Da die Translokation der MAPK nach der Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung in den Zellkern unerlässlich für die Signalübertragung ist (Übersicht Howe et al. 2001; Glading et al. 2001), verwundert der hier vorliegende zytosolische und nukleäre Nachweis in den Trophoblastzellen nicht. Dabei wird die Regulierung der Aktivität der ERK auf Integrine und die GTPase Ran, der adhäsionsbedingte Austausch der ERK zwischen Zytoplasma und Zellkern ebenfalls auf ein intaktes Actin-Zytoskelett zurückgeführt (Aplin et al. 2001). Es kann daher auch für das Rind angenommen werden, dass die MAPK nicht nur als Mediator der Zellmigration sondern auch als Regulator von Zellwachstum, Differenzierung und Genaktivierung dient (Miyamoto et al. 1996; Chen et al. 1994). Insbesondere für die Aktivierung des plazentären Laktogen-Gens, wie bei Ratten in sich differenzierenden Trophoblastzellen nachgewiesen (Peters et al. 2000), könnte sie eine Rolle spielen, da plazentäres Laktogen in TGC des Rindes detektiert werden konnte (Wooding 1987) und für die Stimulation des Fetuswachstums und Entwicklung der Mammarydrüsen verantwortlich ist (Blank et al. 1977; Porter 1980; Talamantes et al. 1980).

Eine Rolle in der Geburtseinleitung beim Rind könnte nach Pru et al. (2001) dem Raf-1/MEK-1/ERK1/2 Signalweg zugeordnet werden, da er regulatorische Wirkung auf die Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ )-Sekretion besitzt: Nach Behandlung boviner Endometriumszellen mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 kommt es zu einer totalen Unterdrückung der Phorbolster-induzierten Sekretion von  $PGF_{2\alpha}$ . Dieser Signalweg wird außerdem in bovinen Endometriumszellen durch Proteinkinase C (PKC)-induzierte Phosphorylierung von Raf-1 und anschließender Aktivierung von MEK-1 und ERK1/2 induziert. Diese Autoren schlussfolgern daraus, dass der PKC-Raf-1/MEK-1/ERK1/2 Signalweg für die Phorbolster-induzierte Aktivierung Sekretion von  $PGF_{2\alpha}$  in diesen Zellen erforderlich ist.

#### 4.4 Zusammenhänge zwischen Trophoblastmigration und Tumorwachstum beziehungsweise Metastasierung

Die Proteinprodukte klassischer Onkogene und ihre zellulären Gegenstücke, die mit humanen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden, beeinflussen das Actin-Zytoskelett (Übersicht Frame und Brunton 2002). Oncogenes Src verursacht den Verlust von organisiertem Actin und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsionen (Fincham et al. 1995; Hamaguchi et al. 1993; Matsuyoshi et al. 1992). Weiterhin verursacht die Gegenwart von einem kinase-defekten v-Src-Protein in Fibroblasten die Stabilisation von „stress fibers“ und ihrer assoziierten fokalen Adhäsion, was in einer verminderten Migration resultiert (Fincham und Frame 1998; Fincham et al. 2000). Zudem werden Verbindungen zwischen den Integrin Vitronektin-Rezeptoren und Actin in Src-defizienten Fibroblasten gestärkt, was die Rolle des Src's bei der Auflösung von Integrin-Actin Verbindungen widerspiegelt (Felsenfeld et al. 1999).

Die Trophoblastinvasion während der hämochorialen Plazentation bei Mensch oder Nagern sowie invasive Prozesse während des Tumorwachstums als auch bei der Metastasierung sind durch die Expression spezifischer Integrinrezeptoren, zum Beispiel  $\alpha_3\beta_1$ , charakterisiert (Damsky et al. 1994, Lohi et al. 2000). Da auch in der bovinen Plazenta gleiche Integrine nachgewiesen werden konnten (MacLaren und Wildemann 1995; Kimmins und MacLaren 1999; Hirsch 2000, MacIntyre et al. 2002), liegt die Vermutung nahe, dass hier ähnliche Regulationsprozesse an der Invasion und Fusion des Trophoblastepithels mit dem Uterusepithel beteiligt sind. Desweiteren spielen bei diesem tumorähnlichen Vordringen des Trophoblasten in das Uterusepithel wiederum Proteinkinasen eine große Rolle: So zum Beispiel zeigten Ilić et al. (2001), dass die membran-assoziierte pY397 FAK ein Marker für die Zytotrophoblastinvasion in humanem Plazentagewebe in vivo und in vitro darstellt, weil sie nahe der Oberfläche der Uteruswand im Zytotrophoblast detektiert werden konnte und ihre (Auto-) Phosphorylierung eine kritische Komponente des migrations- beziehungsweise invasionsvermittelnden Signalweges des Zytotrophoblasten zu sein scheint.

#### 4.5 Integrine im bovinen Reproduktionstrakt und Trophoblastmigration

$\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  Integrine konnten im bovinen Endometrium im luminalen Epithel anhand immunhistochemischer Nachweismethoden detektiert werden, wobei eine zyklusabhängige Expression von  $\alpha_3$ ,  $\alpha_v$  und  $\beta_3$  nachgewiesen wurde (Kimmins und Mac Laren 1999). Ferner wurde anhand der PCR-Methode die mRNA der  $\beta_1$  und  $\alpha_5$  Untereinheiten in Rinderembryonen nachgewiesen (Mac Laren und Wildemann, 1995). Es zeigte sich außerdem erstens lateral und basolateral in mono- und binukleären Trophoblastzellen und zweitens im Bereich der Basalmembran die Expression von  $\beta_1$  (Mac Laren und Wildemann, 1995), wodurch eine Beteiligung von  $\beta_1$  an der Migration von TGC vermutet wird. Hirsch (2000) wies die Expression von  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  basal an fetalen und maternalen Epithelzellen,  $\alpha_6$  in TGC,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_6$  in maternalen sowie  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  und  $\beta_1$  in fetalen Endothelien und  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$  im maternalen Bindegewebe nach. Dabei konzentriert sich das Auftreten von  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$  vor allem auf die Septenspitzen, was mit der Bedeutung des Vitronektin-Rezeptors  $\alpha_v\beta_3$  für die Proliferation- und Differenzierungsfähigkeit der Zellen assoziiert wird. Neueste Untersuchungen zeigten nach MacIntyre et al. (2002) eine Downregulation von  $\alpha_1$  im bovinen Trophoblast nach Abschluss der Anheftungsphase, während die Expression von  $\alpha_6$  ab Tag 18 bis 24 ansteigt und auf hohem Niveau bestehen bleibt; des weiteren exprimiert eine Subpopulation von binukleären Trophoblastzellen  $\alpha_3$ . In der gleichen Studie konnte im uterinen Epithel die kontinuierliche Expression von  $\alpha_3$  und  $\alpha_6$  nachgewiesen werden, wohingegen  $\alpha_1$  nach Abschluss der Modifikation des luminalen Epithels down reguliert wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Fusion der TGC mit dem maternalen Epithel eine Änderung der Integrinexpression im subepithelialen Stroma verursacht (MacIntyre et al. 2002). Auf Grund des oben geschilderten Vorkommens der Integrine im bovinen Reproduktionstrakt kann ihre Beteiligung an der Regulation der Trophoblastriesenzellmigration nicht ausgeschlossen werden, da sie als Transmembranrezeptoren vielfältigste Einflüsse auf Zytoskelett und Proteinkinasen besitzen (Miyamoto et al. 1995; Übersicht: Schoenwaelder et al. 1999). Ergänzend hierzu konnten Sutherland et al. (1993) eine durch die Entwicklung gesteuerte Regulation der Integrinexpression während der Implantation des Mausembryo in das lamininreiche Uterusstroma nachweisen.

## V. Literaturverzeichnis

ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (1999). Kapitel 16: Das Cytoskelett, Kapitel 19.4: Rezeptoren für die extrazelluläre Matrix auf Tierzellen. In: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, Seiten 932-959; 1175-1181

ALEXANDER C M, HANSELL E J, BEHRENDTSEN O, FLANNERY M L, KISHNANI N S, HAWKES S P, WERB Z (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122:1723-1736

APLIN J D, HAIGH T, JONES C J P, CHURCH H J, VICOVAC L (1999). Development of cytotrophoblast columns from explanted first trimester human placental villi: Role of fibronectin and integrin  $\alpha_5\beta_1$ . *Biol Reprod* 60:828-838

APLIN A E, STEWART S A, ASSOIAN R K, JULIANO R L (2001). Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 153:273-282

BANY M B, HARVEY M B, SCHULTZ G A (2000). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. *J Reprod Fertil* 120:125-134

BECKER V, SCHIEBLER T H, KUBLI F (1981). Kapitel: Entwicklung der Plazenta. In: Die Plazenta des Menschen. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart und New York, Seiten 20-36

BENIRSCHKE K, KAUFMANN P (1995). Chapter 6: Early development of the human placenta. In: Pathology of the human placenta, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, pages 49-55

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

BJÖRKMANN N H (1968). Fine structure of cytotrophoblastic and trophoblastic giant cells in the bovine placenta. *J Ultrastruct Res* 24:249-258

BJÖRKMANN N (1969). Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placenta. *Anat Rec* 163: 17-30

BLANK M S, CHAN J S D, FRIESEN H G (1977). Placental lactogens, new developments. *J Steroid Biochem* 8:403-414

BOWEN J A, BAZER F W, BURGHARDT RC (1996). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoblast in vivo. *Biol Reprod* 55:1098-106

CANNING M T, POSTOVIT L-M, CLARKE S H, GRAHAM C H (2001). Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp Cell Res* 267:88-94

CANO E, MAHADEVAN L C (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20:117-122

CHEN Q, KINCH M S, LIN T H, BURRIDGE K, JULIANO R L (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 269:26602-26605

CHEN Y P, O' TOOLE T E, SHIPLEY T, FORSYTH J, LA FLAMME S E, YAMADA K M, SHATTIL S J, GINSBERG M H (1994). "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 269: 18307-18310

CHOU Y-H, SKALLI O, GOLDMAN R D (1997). Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions, *Curr Opin Cell Biol* 9:49-53

CHRISTERSON LB, VANDERBILT CA, COBB MH (1999). MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell Motil Cytoskel* 43:186-98

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

CLARK E A, KING W G, BRUGGE J S, SYMONS M, HYNES R O (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the Rho family of GTPases. *J Cell Biol* 142:573-586

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

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

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

DENKER H-W (1993). Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool* 266:541-558

EDWARDS D R, MURPHY G (1998). Cancer. Proteases – Invasion and more. *Nature* 394:527-528

ENDERS AC (1965). A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. *Am J Anat* 116:29-68

FANNING A S, MITIC L L, ANDERSON J M (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 10:1337-1345

FELSENFELD D P, SCHWARTZBERG P L, VENEGAS A, TSE R, SHEETZ M P (1999). Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol* 1:200-206

FINCHAM V J, FRAME M C (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J* 17:81-92

FINCHAM V J, BRUNTON V G, FRAME M C (2000). The SH3 domain directs actomyosin-dependent targeting of v-Src to focal adhesions via phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 20:6518-6536

FINCHAM V J, JAMES M, FRAME M C, WINDER S J (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J* 19:2911-2923

FINCHAM V J, WYKE J A, FRAME M C (1995). v-Src-induced degradation of focal adhesion kinase during morphological transformation of chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 10:2247-2252

FOISNER R (1997). Dynamic organisation of intermediate filaments and associated proteins during the cell cycle. *BioEssays* 19:297-305

FRAME M C, BRUNTON V G (2002). Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *12:36-43*

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

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

GEIGER B, YEHUDA-LEVENBERG S, BERSHADSKY A D (1995). Molecular interactions in the submembrane plaque of cell-cell and cell-matrix adhesions. *Acta Anat* 154: 46-62

GLADING A, ÜBERALL F, KEYSE S M, LAUFFENBURGER D A, WELLS A (2001). Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 276:23341-23348

GLASSER SR, MULHOLLAND J (1993). Receptivity is a polarity dependent special function of hormonally regulated uterine epithelial cells. *Microsc Res Technol* 25:106-120

GLEESON L M, CHAKRABORTY C, McKINNON T, LALA P K (2001). Insulin-like growth factor-binding Protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 via mitogen-activated protein kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2484-93

GREENSTEIN JS, MURRAY RW, FOLEY RC (1958). Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anat Rec* 132: 321-341

GROSKOPF J C, SYU L-J, SALTIEL A R, LINZER D I H (1997). Proliferin induces endothelial cell chemotaxis through a G protein-coupled, mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinol* 138:2835-2840

GROSSER O (1909). *Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen*. Braumüller, Wien

GROSSER O (1927). Kapitel III: Placentation. In: *Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere*, 5. Band, herausgegeben von Jaschke RT, Deutsche Frauenheilkunde, Geburtshilfe, Gynäkologie und Nachbargebiete in Einzeldarstellungen, J. F. Bergmann Verlag, München, Seiten 95-110

HABERMEHL K H (1975). Die Altersbestimmung beim Hauswiederkäuer. In: *Die Altersbestimmung bei Haus- und Labortieren*. 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, Seiten 62-63

HALE K K, TROLLINGER D, RIHANEK M, MANTHEY C L (1999). Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  in inflammatory cell lineages. *J Immunol* 162:4246-4252

HAMAGUCHI M, MATSUYOSHI N, OHNISHI Y, GOTOH B, TAKEICHI M, NAGAI Y (1993). p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J* 12:307-314

HAN J, JIANG Y, LI Z, KRAVCHENKO V V, ULEVITCH R J (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386:296-299

HAY E D (1991). *Cell biology of extracellular matrix*. New York, Plenum Press, p 428

HAY E D (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 154:8-20

HEIDEMANN S R, KAECH S, BUXBAUM R E, MATUS A (1999). Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *J Cell Biol* 145:109-122

HEMBERGER M, HIMMELBAUER H, RUSCHMANN J, ZEITZ C, FUNDELE R (2000). cDNA subtraction cloning reveals novel genes whose temporal and spatial expression indicates association with trophoblast invasion. *Developm Biol* 222:158-169

HINTON DR, HE S, GRAF K, YANG D, HSUEH W A, RYAN S J, LAW R E (1998). Mitogen-activated protein kinase activation mediates PDGF-directed migration of RPE cells. *Exp Cell Res* 239:11-15

HIRSCH P (2000). Immunhistochemische Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Expression von Zytokeratinen, extrazellulären Matrixproteinen und Integrinen im Plazentom des Rindes. Dissertation aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen

HOFFMAN L H, WOODING F B P (1993). Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *Exp Zool* 266: 559-577

HOWE A K, APLIN A E, JULIANO R L (2001). Anchorage-dependent ERK signaling – mechanisms and consequences. *Curr Opin Gen Developm* 12:30-35

HUTTENLOCHER A, LAKONISHOK M, KINDER M, WU S, TRUONG T, KNUDSEN K A, HORWITZ A F (1998). Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. *J Cell Biol* 141:515-526

ILIĆ D, GENBAČEV O, JIN F, CACERES E, ALMEIDA E A C, BELLINGARD-DUBOUCAUD V, SCHAEFER E, DAMSKY C H, FISHER S J (2001). Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 159:93-108

INAGAKI M, INAGAKI N, TAKAHASHI T, TAKAI Y (1997). Phosphorylation-dependent control of structures of intermediate filaments: a novel approach using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *J Biochem.* 121:407-414

JIANG Y, CHEN C, LI Z, GUO W, GEGNER J A, LIN S, HAN J (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 $\beta$ ). *J Biol Chem* 271:17920-17926

JIANG Y, GRAM H, ZHAO M, NEW L, GU J, FENG L, PADOVA F D, ULEVITCH R J, HAN J (1997). Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 $\delta$ . *J Biol Chem* 272:30122-30128

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

KAUFMANN P (1981). Functional anatomy of the non-primate placenta. *Placenta* 1: 13-28,

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

KLEMKE R L, CAI S, GIANNI A L, GALLAGHER P J, de LANEROLLE P, CHERESH D A (1997). Regulation of cell motility by MAP kinase. *J Cell Biol* 137:481-492

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

KOMATSU M, CARRAWAY C A C, FREGIEN N L, CARRAWAY K L (1997). Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex. *J Biol Chem* 272:33245-33254

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

LA FLAMME S E, AKIYAMA S K, YAMADA K M (1992). Regulation of fibronectin receptor distribution. *J Cell Biol* 117: 437-447

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

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

LI Z, YONG J, ULEVITCH R J, HAN J (1996). The primary structure of p38 $\gamma$ : A new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228:334-340

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY S L, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J E (2001). Kapitel 22: Integration von Zellen in Geweben. In: *Molekulare Zellbiologie*, 4. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Seiten 1055-1073

LOHI J, OIVULA J, KIVILAAKSO E, KIVILUOTO T, FRÖJDMAN K, YAMADA Y, BURGESSON R E, LEIVO I, VIRTANEN I (2000). Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for  $\alpha_3\beta_1$  integrin. *APMIS* 108:161-72

LUKASHEV M E, SHEPPARD D, PYTELA R (1994). Disruption of integrin function and induction of tyrosine phosphorylation by the autonomously expressed  $\beta_1$  integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 269: 915-918

MACDOUGALL J R, MATRISIAN L M (1995). Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 14:351-362

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

MACLAREN L A, WILDEMANN A G (1995). Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression and localisation of the  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod* 53:153-165

MATSUYOSHI N, HAMAGUCHI M, TANIGUCHI S, NAGAFUCHI A, TSUKITA S, TAKEICHI M (1992). Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118:703-714

McKINNON T, CHAKRABORTY C, GLEESON L M, CHIDIAC P, and LALA P K (2001). Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF Type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3665-3674

MINDEN A, LIN A, McMAHON M, LANGE-CARTER C, DÉRIJARD B, DAVIS R J, JOHNSON G L, KARIN M (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266:1719-1723

MIYAMOTO S, TERAMOTO H, COSO O A, GUTKIND J S, BURBELO P D, AKIYAMA S K, YAMADA K M (1995). Integrin function: Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131:791-805

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

MIYAMOTO S, TERAMOTO H, GUTKIND J S, YAMADA K M (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: Roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135:1633-1642

MORINO N, MIMURA T, HAMASAKI K, TOBE K, UEKI K, KIKUCHI K, TAKEHARA K, KADOWAKI T, YAZAKI Y, NOJIMA Y (1995). Matrix/Integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44<sup>erk-1</sup> and p42<sup>erk-2</sup>. J Biol Chem 270:269-273

MORRISH D W, DAKOUR J, LI H (1998). Functional regulation of human trophoblast differentiation. J Reprod Immunol 39:179-195

PALOVUORI R, ESKELINEN S (2000). Role of vinculin in the maintenance of cell-cell contacts in kidney epithelial MDBK cells. Eur J Cell Biol 79:961-74

PAVALKO F M, OTEY C A (1994). Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton. Proc Soc Exp Biol Med 205:282-93

PETERS T J, CHAPMAN B M, WOLFE M W, SOARES M J (2000). Placental lactogen-I gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. J Endocrinol 165:443-456

PFARRER C, HIRSCH P, GUILLMONT, LEISER R (2003). Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. Placenta, im Druck

PORTER D G (1980). Fetomaternal relationship: the actions and the control of certain hormones. Placenta 1:259-274

PRU J K, RUEDA B R, AUSTIN K J, THATCHER, W W, GUZELOGLU A, HANSEN A (2001). Interferon-tau suppresses prostaglandinF<sub>2α</sub> secretion independently of the mitogen activated protein kinase and nuclear factor B pathways. Biol Reprod 44:261268

ROBINSON D G, EHLERS U, HERKEN R, HERRMANN B, MAYER F, SCHÜRMAN F-W (1985). Kapitel 2.2.5: Kontrastierung von Schnitten. In: Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie / eine Einführung für Biologen und Mediziner, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Seite 64-67

RUOSLAHTI E (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann Rev Cell Biol* 12:697-715

SCHLAFER D H, FISHER P J, DAVIES C J (2000). The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci* 60-61:145-160

SCHNORR B, KRESSIN M (2001). Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch, 4. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Seiten 69, 83-89

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

SCHULER G (2000), Kapitel VI: Untersuchung zur Bedeutung der Apoptose für Morphogenese und Funktion der Plazentome des Rindes. In: Plazentare Steroide beim Rind: Biosynthese und Beziehung zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome. Habilitationsschrift aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität

SCHWARTZ M A, TOKSOZ D, KHOSRAVI-FAR R (1996). Transformation by Rho exchange factor oncogenes is mediated by activation of an integrin-dependent pathway. *EMBO* 15:6525-6530

SMALL J V, HERZOG M, ANDERSON K (1995). Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J Cell Biol* 129:1275-1286

SMALL J V, ROTTNER K, KAVERINA I (1999). Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 11:54-60

SPENCER KSR, GRAUS-PORTA D, LENG J, HYNES NE, KLEMKE RL (2000). Erb 2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by Erb 2 family RTKs. *J Cell Biol* 148:385-397

STEVEN DH (1975). Comparative placentation. Academic Press, New York

STRAHL H Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta, (1906). In Hertwigs Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere, Band1, Fischer, Jena

STRICKLAND S, RICHARDS W G (1992). Invasion of the trophoblasts. *Cell* 71:355-357

SUN T T, GREEN H (1978). Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell* 14:469-476

SUN T T, SHIH C H, GREEN H (1979). Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2813-2817

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

TAKANAMI-OHNISHI Y, ASADA S, TSUNODA H, FUKAMIZU A, GOTO K, YOSHIKAWA H, KUBO T, SUDO T, KIMURA S, KASUYA Y (2001). Possible involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in decidual function in parturition. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1155-1161

TALAMANTES F, OGREN L, MARKOFF E, WOODARD S, MADRID J (1980). Phylogenetic distribution, regulation of secretion and prolactin like effects of placental lactogens. *Fed Proc* 39:2582-25-87

THIE M, HERTER P, POMMERENKE H, DÜRR F, SIECKMANN F, NEBE B, RYCHLY J, DENKER H-W (1997). Adhesiveness of the free surface of a human endometrial monolayer for trophoblast as related to actin cytoskeleton. *Molec Hum Reprod*, (3) 4:275-283

VAN DE FLIER A, SONNENBERG A (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tiss Res* 305:285-298

VOET D, VOET J G (1999), Kapitel 34.3: Molekulare Physiologie – Bewegung: Muskeln, Cilien und Geißeln. In: *Biochemie*. 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1992, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio, Seite 1139

VUORI K (1998). Topical Review: Integrin Signaling: Tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J. Membrane Biol.* 165, 191-199

WARD J W, WOODING F B P, FOWDEN A L (2002). The effects of cortisol on the binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. *Placenta* 23:451-458

WALTER I, BOOS A (2001). Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. *Placenta* 22:473-83

WATHES D C, WOODING F B (1980). An electron microscopic study of implantation in the cow. *Am J Anat* 159(3):285-306

WEI J, SHAW L M, MERCURIO A M (1998). Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by the cytoplasmic domain of the  $\alpha_6$  integrin subunit. *J Biol Chem* 273:5903-5907

WESSELING J, VAN DER VALK SW, VOS HL, SONNENBERG A, HILKENS J, (1995). Episialin (Muc-1) overexpression inhibits integrin mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol* 129:255-265

WILSON C L, HEPPNER K J, LABOSKY P A, HOGAN B L, MATRISIAN L M (1997). Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1402-1407

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

WOODING F B P (1982). The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *J Reprod Fert Suppl* 31:31-39

WOODING F B P, BECKER J F (1987). Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tiss Res* 247:667-673

WOODING F B P, (1980). Electron microscopic localisation of binucleate cells in sheep placenta using phosphotungstic acid. *Biol Reprod* 22: 357-365

WOODING F B P (1983). Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta* 4: 527-540

WOODING F B P (1992). Current topic: The synepitheliochorial placenta of ruminants: Binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13: 101-113

ZHENG D-Q, WOODARD A S, FORNARO M, TALLINI G, LANGUINO L R (1999). Prostatic carcinoma cell migration via  $\alpha_v\beta_3$  integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Research* 59:1655-1664

## VI. Zusammenfassung

Die Expression von zytoskelettalen Filamenten und ihren assoziierten Proteinen wurde an Rindern in der zweiten Trächtigkeitshälfte (90. bis 270. Tag) mittels indirekter immunhistochemischer Nachweisverfahren (Immunogoldmethode mit anschließender Silberverstärkung und Immunoperoxidase-DAB-System) unter Verwendung monoklonaler Antikörper ermittelt und licht- wie auch elektronenmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden Kryostatschnitte und Ultradünnschnitte aus unterschiedlichen Bereichen der einzelnen Plazentome angefertigt. Die Befunde wurden im Zusammenhang mit der „eingeschränkten Trophoblastinvasion“ in der Rinderplazenta diskutiert.

Globuläres Actin konnte licht- und transmissionselektronenmikroskopisch apikal und lateral in den Epithelzellen des Endometriums und in den Endothelzellen des maternalen Stromas nachgewiesen werden. Auf fetaler Seite wurde globuläres Actin apikal in den mononukleären Trophoblastzellen sowie unipolar membranassoziiert mit zusätzlichen Akkumulationen im Bereich der Pseudopodien in den TGC nachgewiesen. Auch fetale Endothelzellen wiesen Actin auf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die TGC der Rinderplazenta vermutlich ein unpolarisiertes Actinsystem ihrer peripheren Actinrinde besitzen. Diesem wird eine essentielle Bedeutung für die Adhäsivität des Trophoblasten zugeschrieben.

*$\alpha$ -Actinin* zeigte sich licht- wie auch transmissionselektronenmikroskopisch kolokalisiert mit Actin, das heißt apikal in Uterusepithel- und in mononukleären Trophoblastzellen. Auch die membranständige unpolare Akkumulation in den TGC trat hier auf. Im Gegensatz zu Actin konnte jedoch keine Färbung maternaler wie fetaler Endothelzellen festgestellt werden. Vermutlich führt ein  *$\alpha$ -Actinin*- und Vinculin-Überschuss vermutlich zu einer Loslösung der Zell-Zell Adhäsionverbindungen vom intrazellulären Zytoskelett und dadurch zur Fragmentierung der Verbindungskomplexe und anschließender Zellfusion.

*Vinculin* konnte lichtmikroskopisch im Unterschied zu den vorangegangenen Detektionen nur vereinzelt apikal im maternalen Epithel nachgewiesen werden und erschien ansonsten wiederum deutlich membranassoziiert in den TGC und apikal sowie

lateral an mononukleären Trophoblastzellen. Ferner war der Nachweis sowohl in maternalen als auch fetalen Endothelzellen zu erkennen. Transmissionselektronenmikroskopisch konnte Vinculin mittels des Peroxidase/DAB-Verfahrens als eine deutlich positive Reaktion im Zytoplasma des mononukleären Trophoblasten membranassoziiert nachgewiesen werden. Diese Anordnung lässt einerseits auf einen Verankerungspunkt der Trophoblastzellen untereinander, andererseits auf einen Fixationspunkt bei der Migration und Fusion der TGC schließen.

Die *phosphorylierte Mitogen-aktivierte Proteinkinase* (pMAPK) konnte lichtmikroskopisch deutlich als braun-schwarze, dichte Anhäufungen über den Kernen vor allem im Trophoblasten detektiert werden. Hier waren sowohl die mono- als auch die binukleären Zellen markiert. Desweiteren trat auch ganz vereinzelt eine Markierung in den Kernen der uterinen Epithelzellen auf. Eine Detektion im maternalen Stroma erfolgte nicht. Transmissionselektronenmikroskopisch zeigten sich im gesamten Trophoblasten sowohl in den Kernen als auch im Zytoplasma, hier zum Teil auch membranassoziiert, eindeutige Reaktionsprodukte. Dieses Expressionsmuster lässt vermuten, dass die aktivierte MAPK in den Kern transloziert wurde. Diese Translokation ist erforderlich, um die Signalwege (Inside-out Signalling) zu starten, die zu Zellwachstum und Zellmigration, Zelldifferenzierung und Genaktivierung führen. Deshalb unterstützt das Auftreten von aktivierter MAPK in den Kernen der bovinen Trophoblastzellen unsere Arbeitshypothese dahingehend, dass der MAPK Signaltransduktionsweg in die Regulation der Migration von Trophoblastzellen involviert ist.

Die spezifische Lokalisation von Actin,  $\alpha$ -Actinin, Vinculin und phosphorylierter MAPK an der fetomaternalen Kontaktzone und in den TGC der Rinderplazenta lässt darauf schließen, dass die vermuteten integrinvermittelten Signaltransduktionswege stattfinden. Deshalb ist weiterhin anzunehmen, dass zytoskelettale Bestandteile und Proteinkinasen bei der Regulation der Migration von TGC in der Rinderplazenta interagieren und daher auch als Modell für andere invasive Prozesse (zum Beispiel Tumorstadium und Metastasierung) dienen könnten.

## VII. Summary

Cytoskeletal filaments and their associated proteins were localized in bovine placentomes from day 90 until near term (day 270) by indirect immunohistochemical methods (immunogold-silver-enhancement technique and immunostaining with peroxidase/DAB). Monoclonal antibodies against globular actin,  $\alpha$ -actinin, vinculin and phosphorylated mitogen activated protein kinase (pMAPK) were applied to cryosections and ultra thin sections and investigated by light- and transmission electron microscopy. The results were discussed in regard to the phenomenon of “restricted” trophoblast invasion in bovine placenta.

Globular actin was detected in apical and lateral location in uterine epithelial cells and in endothelial cells of the maternal stroma. In the fetal compartment globular actin occurred apically in mononuclear trophoblast cells and membrane-associated in TGC. Fetal endothelial cells were also positive. The findings suggest that bovine TGC possess an unpolarized actin system within their peripheral actin cortex, which may play an essential role for the adhesiveness of bovine trophoblast cells.

$\alpha$ -actinin was colocalised to actin in both maternal and fetal epithelial cells. In contrast to actin,  $\alpha$ -actinin was not found in maternal and fetal endothelial cells. It can be assumed, that an  $\alpha$ -actinin and vinculin (see below) overflow may detach cell-cell adhesions from the cytoskeleton and causes fragmentation of the cell-cell connections which will and result in cell fusions.

Lightmicroscopically, vinculin was detected apically in single uterine epithelial- and endothelial cells and furthermore occurred distinctly membrane-associated in TGC. It appeared also apically and lateral in mononuclear trophoblast cells and in fetal endothelial cells. On transmission electron microscopical level vinculin showed a membrane-associated positive reaction in the cytoplasm of mononuclear trophoblast cells. These localisations lead to the conclusion, that vinculin may anchor the trophoblast cells and may serve as a fixing point during migration und fusion of the TGC.

## Summary

Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (pMAPK) was observed lightmicroscopically as dense nuclear clusters in both kinds of trophoblast cells and to much lesser extent in some uterine epithelial cells. Transmission electron microscopically, the majority of immunopositive material was detected in the nuclei of both kinds of trophoblast cells, whereas only few accumulations were found in the cytoplasm. This pattern clearly shows that phosphorylated (activated) MAPK has been translocated into the nuclei. This translocation is necessary for signal transduction pathways (inside-out signalling) leading to cell growth and migration, cell differentiation and gene activation. Therefore nuclear localisation of activated MAPK in the bovine trophoblast cells corroborates our working hypothesis that the MAPK pathway is involved in the regulation of trophoblast migration.

The specific localisation of actin,  $\alpha$ -actinin, vinculin and phosphorylated MAPK at the feto-maternal contact interface and in TGC in the bovine placenta suggests, that the assumed integrin-mediated signal transduction pathways may take place. Therefore it is very likely, that cytoskeletal filaments with their associated proteins and protein kinases cooperate in the regulation of TGC migration. This fact supports our hypothesis that the restricted trophoblast invasion of the cow may serve as a model for other invasive processes like tumor growth and metastasis.

## VIII. ANHANG

### 8.1 Verwendete Lösungen

#### a) Aurion<sup>®</sup>- Lösungen

1. Blocking-solution (Fertigprodukt der Firma Aurion<sup>®</sup>)

2. BSA-c- Puffer 0,1 % - ig pH 7,4

Für 500 ml : 100 ml PBS - Stammlösung

+ 300 ml Aqua (bi-) dest.

+ 5 ml BSA-c - Lösung

pH mit HCl 0,1 % - ig auf 7,4 wenn nötig einstellen

mit Aqua (bi-) dest. auf 500 ml auffüllen

3. A) Silberverstärkung für Licht- und Elektronenmikroskopie

Enhancer und Developer (Fertigprodukte der Firma Aurion<sup>®</sup>) auf Raumtemperatur

erwärmen und 1:1 ansetzen

#### b) Fixantien

##### **70:30 Aceton-Methanol Gemisch**

Für 100 ml: 70 ml Aceton + 30 ml Methanol

##### **Glutaraldehyd 2 %-ig in PBS – Gebrauchslösung (Stammlösung 20 %-ig)**

1. Für 50 ml: 4 ml Glutaraldehyd + 46 ml PBS – Gebrauchslösung

2. Für 50 ml 0,1%-ig in 3 %-igem Paraformaldehyd: 0,2 ml Glutaraldehyd

+

49,8 ml Paraformaldehyd

**Paraformaldehyd 3 %-ig in PBS - Gebrauchslösung**

Für 100ml : 3 g Paraformaldehyd in 50 ml kochendem Aqua (bi-) dest. auflösen

Lösung mit wenigen Tropfen 1 molarer NaOH klären und abkühlen lassen  
+ 20 ml PBS - Stammlösung

pH auf 7,4 einstellen (je nachdem entweder mit HCl 0,1 % - ig oder  
mit NaOH)

auf 100 ml mit Aqua (bi-) dest. auffüllen

**c) Puffer**

**I. PBS-Puffer**

*1. PBS-Puffer pH 7,4*

Gebrauchslösung: 1 Teil PBS - Stammlösung + 4 Teile Aqua (bi-) dest.

*2. PBS-NaCl-Puffer pH 7,4*

PBS (0,005 M): 28,75 ml Stammlösung A + 96,2 ml Stammlösung B

+ 22,4 g NaCl plus Aqua bidest. ad 5000 ml, pH auf 7,4 einstellen

Na-Cl-Konzentration: 0,48 %

Antikörperansatz mit PBS-NaCl: doppelte Salzkonzentration (0,9 %, also 44,8 g auf 5  
Liter PBS)

**II. Tris-HCl-Puffer**

121,1 g Tris (Sigma<sup>®</sup>) als Stammlösung ansetzen

Davon 50 ml + Aqua dest. (ad 950 ml), pH-Wert auf 8,6 mit HCl einstellen.

Dann mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen.

**d) Natriumborohydrid (NaBH<sub>4</sub>) 0,1 %-ig**

0,1 g NaBH<sub>4</sub> ad 100 ml PBS – Gebrauchslösung

**e) Glycin 0,05 M**

0,37 Gramm auf 100 ml PBS-Puffer

**f) 0,03 %-ige Triton X-Lösung**

21 µl Triton X auf 70 ml PBS-Puffer

**g) Richardson-Blau**

Lösung I (1 % Azur) + Lösung II (1 % Methylenblau & 1 % Borax)

Gebrauchslösung: Ansatz beider Lösungen 1:1

**h) Sterile 2 % Collodion in Amyl Azetat-Lösung**

1 Tropfen auf eine mit Aqua bidest. gefüllte große Petrischale geben: Dünner Folienfilm entsteht, auf den die Netze aufgelegt werden

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Rudolf Leiser möchte ich für die Überlassung des Themas im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ sehr herzlich danken. Seine stete Unterstützung, insbesondere bei der Auswahl der Fotos, und die beeindruckend schnellen Korrekturen dieser Arbeit waren mir eine sehr große Hilfe. DANKE.

Ganz besonderer Dank gebührt Frau Dr. Christiane Pfarrer für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die zahlreichen Anregungen bei Poster- und Vortragsgestaltungen und die unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ohne ihr großartiges Engagement wäre meine persönliche Entwicklung in den letzten zwei Jahren wohl nicht in dieser Form vorangeschritten. DANKE.

Herzlich danken möchte ich gerne Frau Sigrid Kettner, Frau Susanne Schubert-Porth, Frau Olga Dakischew und Frau Kathrin Wolf, aber auch allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie für die meist fröhliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre jederzeit gewährte tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei labor- und fototechnischen Aufgaben, sowie die zahlreichen leckeren Frühstücksrunden und netten Überraschungen. Im besonderen gilt dies auch für meine Kollegen Frau Stefanie Hallack und Ralph Brehm, die mir nicht nur in den Anfängen mit Rat, Tat und Material zur Seite standen und deren Freundschaft ich heute nicht mehr missen möchte. Ein herzliches Dankeschön Frau Martina Zeiler für ihre zahlreichen Anregungen, dem guten Auge beim Korrekturlesen und die tollen Gespräche „am Rande der Diss“. Außerdem gebührt mein Dank Frau Tamara Fischbach aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität, die mich durch ihr technisches Know-how vor mancher Katastrophe bewahrte. Ihr alle habt mir durch Eure kollegiale und freundschaftliche Unterstützung über manches Tief hinweggeholfen und zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen. DANKE.

Desweiteren danke ich außerordentlich Frau Dr. Elvira Hinsch und Herrn Dr. Klaus-Dieter Hinsch, die aufopferungsvoll unser Graduiertenkolleg leiteten und stets ein offenes Ohr und Ratschläge für die Graduierten hatten. DANKE.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) danke ich sehr für die erteilte Förderung des Graduiertenkollegs und der Graduierten selbst. Ohne diese wäre eine Promotion für mich nicht möglich gewesen. DANKE.

Meiner Familie, jedoch insbesondere meiner lieben Mutter und Andreas gilt mein herzlichster Dank für die uneingeschränkte Unterstützung, das Verständnis und die Liebe, durch die sie mich all die Jahre vorgebracht und motiviert haben. Sie haben den größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit und an meinem persönlichen Erfolg. DANKE.