

Anna Schneider

Dr. med.

Die Regulation und Expression implantationsrelevanter Gene im Zytotrophoblasten durch Endometriumstromazellen und Dezidua in einem Co-Kulturmodell

Fach/Einrichtung: Frauenheilkunde

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Strowitzki

Während der Invasion des Trophoblasten in das mütterliche Endometrium erfolgen auf beiden Seiten multiple Veränderungen, welche *in vivo* nicht untersucht werden können. Mithilfe eines Co-Kulturmodells wurde die Genexpression von Zytotrophoblastzellen nach Co-Kultur mit endometrialen Stromazellen, mit Überstand von endometrialen Stromazellen sowie mit Überstand von Schwangerschaftsdezidua analysiert, um den Einfluss von endometrialem Stroma und Dezidua auf den Zytotrophoblasten zu untersuchen.

Für die Durchführung der vorgesehenen Versuche war die Gewinnung von verschiedenen Zell- und Gewebearten notwendig: Stromazellen, Schwangerschaftsdezidua und Trophoblastgewebe. Endometriale Stromazellen wurden isoliert und unter *in-vitro* Bedingungen kultiviert, bis die Zellen konfluent waren. Die Hälfte der Stromazellen wurde mit den Steroidhormonen 17 β -Östradiol und Progesteron über 12 Tage behandelt. Der Dezidualisierungserfolg wurde anhand des Prolaktinspiegels im Überstand überprüft. Trophoblastgewebe, gewonnen von Abruptiones der 6.- 9. Schwangerschaftswoche, wurde von dem ebenfalls enthaltenen Deziduagewebe getrennt und gründlich gewaschen. Die einzelnen Trophoblastzotten (1-2 mm groß) wurden mit einem Skalpell von der Trophoblastmasse abgetrennt und mit einer Pinzette auf den Stromzellrasen gegeben. Jede Petrischale wurde mit 30-40 Trophoblastzotten versehen. Explantate vom Trophoblasten des ersten Trimenons wurden in sechs verschiedenen Co-Kulturbedingungen kultiviert: mit dezidualisierten und nicht dezidualisierten Stromazellen, mit Überstand von dezidualisierten sowie von nicht dezidualisierten Stromazellen und zusätzlich mit 24-Stunden-Überstand von Schwangerschaftsdezidua. Die Co-Kultur mit Trophoblastzotten auf kollagenbeschichteten Petrischalen (ohne Stromzellrasen) mit serumfreiem Medium wurde bei dieser Studie als endogene Kontrolle benutzt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die ausgewachsenen Zytotrophoblastzellen jeder Versuchsgruppe selektiv mit einer IVF-Pipette unter dem Lichtmikroskop isoliert und für verschiedene molekularbiologische Untersuchungen eingesetzt. Zur Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR wurde aus diesen Zellen RNA und zur Durchführung von Western Blots Proteine isoliert. Um eine Stromzellkontamination des Zytotrophoblasten auszuschließen, wurden parallel zur Co-Kultur auch Stromzellmonokulturen untersucht. Zusätzlich erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung von Trophoblastzotten nach Co-Kultur mit endometrialen Stromazellen sowie

von Schwangerschaftsdezidua, um das Vorkommen und die genaue Verteilung von Glycodelin beurteilen zu können.

Nach Aufreinigung und cDNA-Synthese erfolgte die quantitative Real-Time PCR in Doppelbestimmung, um die Genexpression von Glycodelin, Hypoxia responsive factor-2, IGFBP-3, INSL-4, LOX, SLC2A3 und HSD11B2 zu analysieren. Mithilfe von Western Blot wurde die Produktion von Glycodelin in verschiedenen implantationsrelevanten Zell- und Gewebearten auf Proteinebene untersucht.

Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend, dass im Zytotrophoblasten des ersten Trimenons von den untersuchten Genen in allen Gruppen das Glycodelin sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene deutlich hochreguliert wird. Diese Expression unterliegt dem direkten Einfluss von endometrialen Stromazellen bzw. Schwangerschaftsdezidua, während die Stromazellen selbst kein Glycodelin produzieren. Die höchste und damit signifikante Regulation von Glycodelin auf RNA-Ebene wurde bei der Co-Kultur vom Zytotrophoblasten auf dezidualisierten endometrialen Stromazellen sowie beim Zytotrophoblasten mit 24-Stunden-Überstand von Schwangerschaftsdezidua beobachtet. Eine Regulation von anderen Genen im Zytotrophoblasten, welche mit der Implantation in Verbindung gebracht werden, wie Hypoxia responsive factor-2, IGFBP-3, INSL-4, LOX, SLC2A3 und HSD11B2, konnte nicht nachgewiesen werden. Auf Proteinebene konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Glycodelin im Zytotrophoblasten nach der Co-Kultur mit 6 verschiedenen Bedingungen produziert wird, nicht jedoch in den endometrialen Stromazellen. Dabei findet sich ein signifikanter Unterschied in der Glycodelinproduktion im Zytotrophoblasten mit 24-Stunden-Dezidua-Überstand im Vergleich zum Zytotrophoblasten mit serumfreiem Medium auf kollagenbeschichteten Petrischalen. Auch immunhistochemisch lassen sich deutliche Unterschiede im Expressionsmuster von Glycodelin in den untersuchten Gewebearten bzw. Zellen feststellen: während die dezidualisierten endometrialen Stromazellen kein Glycodelin exprimieren, zeigen sich sowohl im Trophoblastengewebe nach Co-Kultur mit Stromazellen als auch in Dezidua der Frühschwangerschaft sehr hohe Glycodelinkonzentrationen.

Ein direkter Einfluss von endometrialem Stroma und Dezidua auf den invasiven Zytotrophoblasten wird hier erstmalig anhand eines Gens, Glycodelin gezeigt. Glycodelin ist auch als progesteron-associated endometrial Protein oder Placenta Protein 14 bekannt. Es ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa und wird durch Progesteron reguliert. Seine Bedeutung während der Implantation liegt vor allem in der Immunsuppression. Andere Zytotrophoblastogene müssen im Weiteren noch untersucht werden, um ein genaues Bild des Einflusses vom Endometrium auf den Trophoblasten zu erhalten.

Der Prozess der Implantation besteht aus einem komplexen Geflecht einer Vielzahl mütterlicher und embryonaler Faktoren, die zusammen eine Kommunikation aufbauen, die letztendlich in einer erfolgreichen Schwangerschaft resultiert. Die Wissenschaft ist zwar in der Lage viele der Faktoren zu identifizieren, klinische Konsequenzen wurden aber noch nicht

generiert. Das Wissen über die Bedeutung verschiedener Faktoren, wie z.B. Glycodelin, die bei der Implantation von Bedeutung sind, legt den Gedanken nahe, bei Patientinnen mit Implantationsstörungen diese Faktoren entweder zuzugeben oder deren Produktion auf molekularbiologische Art zu stimulieren. Inwiefern es in der Zukunft neue Möglichkeiten geben wird, die Implantationsrate von Embryonen durch wissenschaftlich basierte Interventionen zu erhöhen, ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit.