

## 7 ZUSAMMENFASSUNG (GERMAN)

**Marc Dilly**

### **Expression von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren in bovinen plazentaren Zellen *in vivo* und *in vitro***

Die vorgelegte kumulative Arbeit charakterisiert die Expression und funktionelle Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs) in bovinen Plazentazellen unter Berücksichtigung der Invasion/Migration von Trophoblastriesenzellen (TGC) und der Nachgeburtsverhaltung des Rindes.

Die bovine synepitheliochoriale Plazenta ist durch eine eingeschränkte Trophoblasteninvasion/-migration gekennzeichnet, eine Besonderheit deren regulative Mechanismen nicht vollständig geklärt sind. Die Aktivität von MMPs im extrazellulären Raum wird durch entgegenwirkende TIMPs spezifisch inhibiert, um Zellmigration und Gewebeumbau zu unterstützen und kontrollieren. MMP-9 ist während der gesamten Trächtigkeit in der bovinen Plazenta vorhanden; seine Proteolyse wird vorwiegend durch die Aktivität von endogenem TIMP-1 reguliert. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), als Regulator grundlegender Zelleigenschaften, wird in der bovinen Plazenta exprimiert und kann die Aktivität von MMP-9 in einer Vielzahl von Zellarten hoch regulieren. Ziel dieser *in vitro* Studie war es daher, den Einfluss von EGF auf die Zellmotilität, Zellproliferation sowie die Expression von MMP-9 und TIMP-1 in kultivierten bovinen Trophoblastzellen zu untersuchen.

Der Effekt von EGF auf die Expression von MMP-9 und TIMP-1 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR in einer Trophoblastzelllinie (F3) untersucht. Die proteolytische Aktivität von MMP-9 wurde mittels Zymographie bestimmt. Migrationsuntersuchungen wurden in der Boyden Chamber durchgeführt und die Zellmotilität wurde mit Hilfe von „time-lapse“ Messungen bestimmt. Zur Identifizierung der beteiligten Signalkaskaden, wurde die Phosphorylierung der mitogen-activated protein kinase (MAPK) 42/44 und Akt mittels Western Blot detektiert. EGF führte zu einem Anstieg der mRNA Expression von MMP-9 und TIMP-1 sowie zum Anstieg der proteolytischen Aktivität von MMP-9. Weiterhin stimulierte EGF die Proliferation und Migration von F3 Zellen. Die Zugabe von spezifischen Inhibitoren für die Signalwege

## ZUSAMMENFASSUNG (GERMAN)

MAPK (PD98059) und/oder Phosphoinositid-3-Kinase (LY294002) führte zu einer Reduzierung oder Aufhebung aller durch EGF induzierter Effekte und Aktivierungen in allen Experimenten.

Die Ergebnisse der *in vitro* Studie lassen vermuten, dass EGF auch für die Stimulation der Migration und Proliferation von bovinen Trophoblastenzellen *in vivo* verantwortlich ist, und somit über die Hochregulation von MMP-9 und TIMP-1 am plazentaren Gewebeumbau und dem Ablösen der Nachgeburt postpartum beteiligt sein könnte.

Die Nachgeburtshaltung (Retentio secundinarum) ist eine der häufigsten Reproduktionskrankheiten des Rindes, welche bedeutende ökonomische Verluste verursacht (z.B. reduzierte Milchleistung, geringere Fertilität). Um eine physiologische Ablösung der Nachgeburt zu ermöglichen und eine Nachgeburtshaltung zu verhindern, muss die enge feto-maternale Verbindung, welche durch die Interdigitation von fetalen kotyledonären Zotten mit maternalen Karunkeln gebildet wird, von einander getrennt werden. Membrane-type MMPs wurden als potentielle Aktivatoren für den Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) vorgeschlagen. Insbesondere MMP-14 ist fähig ECM-Substrate abzubauen und MMP-2 mittels Bindung von TIMP-2 an der Zelloberfläche zu aktivieren. Wir nehmen an, dass eine gestörte Modulation der ECM durch MMPs/TIMPs an der Ätiologie der Nachgeburtshaltung beim Rind beteiligt ist.

Diese Beteiligung wurde *in vivo* an Plazentomen von Rindern nach fristgerechter Geburt und zeitgerechten Abgang der Nachgeburt, sowie Plazentomen von Rindern nach verschiedenen Geburtseinleitungen und nach Kaiserschnitt mit Nachgeburtshaltung analysiert. Die Expression von MMP-14, MMP-2 und TIMP-2 wurde mittels quantitativer real-time PCR, Immunhistochemie, Western Blot und Zymographie untersucht.

Die relative MMP-14 mRNA Expression war in allen Gruppen ähnlich, während die Expression von MMP-2 und TIMP-2 in den meisten Tieren mit Geburtseinleitung und Nachgeburtshaltung erhöht waren. Bei Rindern mit Nachgeburtshaltung wurde MMP-14 Protein in Zellen des fetalen Mesenchyms und maternalen Stromas exprimiert, wohingegen MMP-14 in Rindern bei denen die Nachgeburt fristgerecht abgegangen war, im uninukleären Trophoblasten detektiert wurde. MMP-2 konnte in uninukleären Trophoblastenzellen und im fetalen Mesenchym nachgewiesen werden,

## ZUSAMMENFASSUNG (GERMAN)

während TIMP-2 ausschließlich in Trophoblastriesenzellen lokalisiert war. Die Enzymaktivität wurde mittels Zymographie bestätigt.

Die Koloalisation von MMP-14, MMP-2 und TIMP-2 im fetalen Kompartiment, insbesondere den Trophoblastzellen zum Zeitpunkt der Geburt, erlaubt eine Modulierung der ECM Komposition an der feto-maternalen Kontaktfläche und könnte so den fristgerechten Abgang der Nachgeburt beim Rind beeinflussen.

Schlussfolgerung: Die spezifische Expression von MMPs und TIMPs in bovinen Trophoblastzellen *in vitro* und *in vivo* weist auf eine Beteiligung des MMP/TIMP Systems bei der TGC Migration/-Invasion sowie der Ätiologie der Nachgeburtshaltung des Rindes hin. Die Fähigkeit von Wachstumsfaktoren, insbesondere EGF, Proteolysen durch MMPs und Veränderungen im MMP/TIMP System selbst zu induzieren, kann zu Veränderungen der ECM Komposition führen und somit eine Ablösung der Nachgeburt unterstützen.