

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Prädiktives Potential von Capillary Morphogenesis Gene 2  
im Serum von Kinderwunschpatientinnen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Maria Helfer

geboren am 06.05.1991 in Gornjak, Russland

Betreuer: Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

Gutachter/Gutachterin: Prof. Dr. med. Hermann M. Behre  
Apl. Prof. Dr. rer. nat. Anne Navarrete Santos  
Prof. Dr. med. Udo R. Markert (Jena)

08.10.2019

02.09.2020

## REFERAT

CMG2 wird als potenzieller Regulator der Extrazellulärmatrix-Homöostase und der Angiogenese diskutiert. Weibliche Unfruchtbarkeit ist häufig mit Störungen in Angiogenese und Implantation assoziiert. Der Implantationsprozess beinhaltet den Abbau der Extrazellulärmatrix und die Angiogenese.

In diesem Zusammenhang sollte das prädiktive Potential von CMG2 bei Kinderwunschpatientinnen untersucht werden. Ergänzend wurden in vitro Versuche zur Rolle von CMG2 bei physiologischen Prozessen durchgeführt.

Für die Zellversuche wurden die Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 verwendet. Im ersten Schritt wurde die Lokalisation des CMG2-Proteins in den Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellt. Mittels quantitativer real-time-PCR konnte die CMG2-mRNA-Expression gemessen werden. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot. Der Einfluss von CMG2 auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion wurde mithilfe eines CMG2-Knockdown untersucht. Im zweiten Schritt wurde die CMG2-Konzentration in Blutseren von 76 Kinderwunschpatientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infertilitätsbehandlung gemessen und zu den Diagnosen sowie Schwangerschaft und Abort korreliert.

In allen Zelllinien konnten die Lokalisation von CMG2 auf der Zellmembranoberfläche und eine basale CMG2-mRNA-Expression gezeigt werden. Trophoblastzellen wiesen eine stärkere CMG2-mRNA-Expression als Chorionkarzinomzellen auf. In den Zelllinien AC1-M59 und HTR-8/SVneo wurden die Vollängenvariante des CMG2-Proteins und die bekannten Splicevarianten im Western Blot dargestellt. Ein CMG2-Knockdown mittels siRNA hatte keinen Einfluss auf Vitalität und Apoptose der Zellen. Die CMG2-Konzentration in den Blutseren der Kinderwunschpatientinnen variiert unabhängig von deren Diagnosen. Nur in der fünften Woche der Infertilitätsbehandlung war eine signifikant erniedrigte CMG2-Serumkonzentration bei Schwangeren festzustellen ( $p=0,024$ , Mann-Whitney-U-Test). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der CMG2-Serumkonzentration und Aborten nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CMG2 nicht als prädiktiver Marker in unserer Kohorte von Kinderwunschpatientinnen geeignet ist. Die CMG2-Konzentration im Serum ließ keine Selektion von Risikopatientinnen und keine Aussage über das Auftreten einer Schwangerschaft oder eines Aborts zu.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	Der unerfüllte Kinderwunsch	1
1.2.	Weibliche Unfruchtbarkeit	2
1.2.1.	Ursachen für weibliche Unfruchtbarkeit	2
1.3.	Implantation	4
1.3.1.	Endometriumrezeptivität und Implantationsfenster	4
1.3.2.	Der Embryo-maternale Dialog	5
1.3.3.	Stadien der Implantation	6
1.3.4.	Plazentation	6
1.4.	Capillary Morphogenesis Gene 2 (CMG 2)	7
1.4.1.	Struktur und Splicevarianten von CMG2	7
1.4.2.	CMG2 als Anthraxtoxinrezeptor (ANTXR2)	9
1.4.3.	CMG2 und das Hyaline Fibromatose Syndrom (HFS)	9
1.4.4.	Die physiologische Rolle von CMG2	10
<b>2.</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>13</b>
3.1.	Material	13
3.1.1.	Patientenproben und Ethikvotum	13
3.1.2.	Chemikalien	13
3.1.3.	Reaktionskits	14
3.1.4.	Antikörper	15
3.1.5.	Oligonukleotide	15
3.1.6.	Puffer, Medien und Lösungen	15
3.1.7.	Geräte und Verbrauchsmaterial	16
3.2.	Zellbiologische Methoden	17
3.2.1.	Zellkultivierung	17
3.2.2.	Immunfluoreszenz	19
3.2.3.	CMG2-Knockdown mittels siRNA	19

3.2.4.	Vitalitäts-Assay	20
3.2.5.	Apoptose-Assay	20
3.3.	Molekularbiologische Methoden	20
3.3.1.	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung	20
3.3.2.	cDNA-Synthese	21
3.3.3.	Quantitative real-time-PCR	22
3.3.4.	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	22
3.3.5.	Western-Blot-Assay	23
3.4.	ELISA-Messungen	24
3.5.	Statistische Auswertung	25
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>
4.1.	Immunfluoreszenz – Lokalisation des CMG2 in Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen	26
4.2.	mRNA- und Proteinexpression von CMG2 in Zelllinien	28
4.2.1.	mRNA-Expression von CMG2	28
4.2.2.	Nachweis des CMG2-Proteins	29
4.3.	CMG2-Knockdown mittels siRNA	30
4.3.1.	Vitalitäts-Assay	32
4.3.2.	Apoptose-Assay	33
4.4.	CMG2-Expression im Serum von Kinderwunschpatientinnen	34
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>48</b>
5.1.	mRNA- und Proteinexpression von CMG2 in Zelllinien	48
5.2.	Einfluss des CMG2-Knockdown auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion	49
5.3.	CMG2-Expression im Serum von Kinderwunschpatientinnen	52
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>THESEN</b>	<b>64</b>
	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>A</b>

<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>B</b>
<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b>	<b>B</b>
<b>Danksagung</b>	<b>C</b>

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>3D</b>	dreidimensional
<b>ANGPT</b>	Angiopoetin
<b>ANTXR1</b>	Anthrax Toxin Rezeptor 1 = TEM8
<b>ANTXR2</b>	Anthrax Toxin Rezeptor 2 = CMG2
<b>ART</b>	Assistierte Reproduktionstechnik
<b>bidest.</b>	bidestilliert
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
<b>cm<sup>3</sup></b>	Kubikzentimeter
<b>CMG2</b>	<i>Capillary Morphogenesis Gene 2</i> (Kapillar-Morphogenese Gen 2)
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>Ct</b>	<i>Cycle Threshold</i> (Zyklus-Schwellenwert)
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemolumineszenz)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EF</b>	<i>edema factor</i> (Ödemfaktor)
<b>EGTA</b>	<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FSH</b>	Follikelstimulierendes Hormon
<b>fw/rev</b>	<i>forward/reverse</i> (vorwärts/rückwärts)
<b>g</b>	Gramm

<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>HCl</b>	Hydrogenchlorid
<b>HFS</b>	Hyalines Fibromatose Syndrom
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
<b>HRP</b>	<i>Horseradish-Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ISH</b>	infantile systemische Hyalinose
<b>JHF</b>	juvenile hyaline Fibromatose
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>LF</b>	Letalfaktor
<b>LH</b>	Luteinisierendes Hormon
<b>LIF</b>	<i>Leukemia inhibitory factor</i> (Leukämiehemmender Faktor)
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<b>MIDAS</b>	<i>metal ion-dependent adhesion site</i> (Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle)
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MMP-2</b>	Matrix-Metalloproteinase-2
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
<b>MT1-MMP</b>	Membran-Typ-1-Matrix-Metalloproteinase
<b>MUC</b>	Mucin
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>o.g.</b>	oben genannt
<b>p</b>	<i>probability</i> (Wahrscheinlichkeit, Signifikanzwert)
<b>PA</b>	Protektives Antigen
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PCOS</b>	Polyzystisches Ovar-Syndrom
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>PIGF</b>	<i>Placental Growth Factor</i> (Humaner plazentarer Wachstumsfaktor)
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>qPCR</b>	<i>quantitative real-time-PCR</i> (quantitative Echtzeit-PCR)

<b>RIPA</b>	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i> (Radio-Immunpräzipitation)
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RPMI</b>	Medium benannt nach „ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-PCR
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i> (kleine eingreifende RNA)
<b>SRB</b>	Sulforhodamin B
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
<b>TBS-T</b>	<i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20)
<b>TCA</b>	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
<b>TEM8</b>	<i>Tumor Endothelial Marker 8</i> (Tumor Endothel Marker 8)
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Endothelwachstumsfaktor)
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
<b>WOI</b>	<i>window of implantation</i> (Implantationsfenster)
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

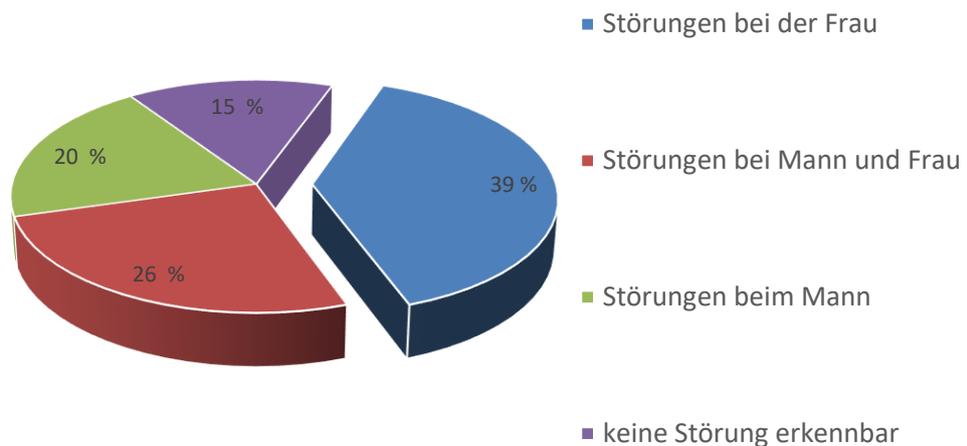
# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Der unerfüllte Kinderwunsch

Für viele Paare stellt der Wunsch nach einem Kind einen zentralen Punkt der Lebensplanung dar. Somit ist ungewollte Kinderlosigkeit häufig mit psychischen Belastungen und hohem Leidensdruck verbunden.

Zur Beschreibung des unerfüllten Kinderwunsches als Störung der Fortpflanzungsfähigkeit wird der Begriff der Infertilität verwendet. Eine Infertilität liegt laut WHO-Definition beim Ausbleiben einer Schwangerschaft innerhalb eines Jahres trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr vor (Zegers-Hochschild et al. 2009). Dabei wird die primäre Infertilität, bei der Paare noch nie eine Schwangerschaft erzielt haben, von einer sekundären Infertilität mit dem Ausbleiben einer erneuten Schwangerschaft unterschieden (Olooto et al. 2012). Schätzungsweise 9 % aller Paare weltweit sind ungewollt kinderlos. Der genaue Anteil lässt sich nur erahnen, da unterschiedliche Definitionen und Studiendesigns die Schätzungen erschweren (Inhorn und Patrizio 2015). Im Hinblick auf die Prävalenz von Infertilität in Deutschland finden sich unterschiedliche, nicht endgültig gesicherte Daten. Zeitweise gingen Schätzungen von über 15 % ungewollt kinderloser Paare aus (Juil et al. 1999; Bruckert 1991). Mittlerweile wird allerdings angenommen, dass die Zahl überschätzt wurde und tatsächlich unter 10% der Paare betroffen sind (Brähler et al. 2001; te Velde et al. 2012).

Der unerfüllte Kinderwunsch ist und bleibt trotz allem ein Problem mit globalem Ausmaß. Bezüglich der Prävalenz sind jedoch erhebliche geografische Unterschiede zu verzeichnen. 2010 waren Südasien, Subsahara-Afrika, Nordafrika/naher Osten, Zentral-/Osteuropa und Zentralasien die Regionen mit der höchsten Prävalenz. Bis auf einen Abfall der Prävalenz in Subsahara-Afrika und Südasien gab es keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Jahr 1990 (Mascarenhas et al. 2012). Damit ist der unerfüllte Kinderwunsch nach wie vor ein sehr aktuelles Thema. Die Gründe für ungewollte Kinderlosigkeit sind vielfältig. 39% sind allein auf weibliche Ursachen zurückzuführen. Bei 20% liegt eine Störung bei dem Mann vor. Zu 26% sind Ursachen bei beiden Partnern zu finden. In 15 % der Fälle ist keine Störung erkennbar (Nieschlag und Behre 2000).



**Abbildung 1** Verteilung der Ursachen für Infertilität zwischen Mann und Frau (modifiziert nach Nieschlag und Behre, 2000).

## 1.2. Weibliche Unfruchtbarkeit

Es existieren viele Faktoren, die Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit der Frau nehmen können. Die Ursachen für weibliche Unfruchtbarkeit sind dabei auf verschiedenen Ebenen lokalisiert.

### 1.2.1. Ursachen für weibliche Unfruchtbarkeit

Die Störung der Tubenfunktion, meist durch entzündliche Prozesse hervorgerufen, gilt als Hauptursache für ungewollte Kinderlosigkeit bei der Frau. Infektionen mit den häufigsten sexuell übertragbaren Erregern *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* können solche Entzündungen auslösen. Die akute Infektion verläuft häufig symptomlos. Daher besteht die Gefahr einer Chronifizierung und Funktionsstörung der Eileiter mit nachfolgender Unfruchtbarkeit (Graspeuntner et al. 2018; Rajalakshmi und Kalaivani 2016).

Ebenfalls häufig ist eine Endometriose mit weiblicher Infertilität assoziiert. Endometriose, definiert als das Auftreten endometriumartigen Gewebes außerhalb der Gebärmutterhöhle, ist eine Erkrankung, die sich häufig durch eine schmerzhafte Menstruation äußert. Die destruktive Störung führt zu anatomischen Veränderungen im kleinen Becken. Als gefürchtete Komplikation können Verwachsungen und Zystenbildungen die Fertilität einschränken (Ozkan et al. 2008).

Ein hormonelles Ungleichgewicht der Frau kann ein weiterer Grund für einen unerfüllten Kinderwunsch sein. Signalstörungen in der Hypothalamus-Hypophyse-Achse wirken sich auf die Funktion ihrer Zielorgane wie der Ovarien aus. Zu den Erkrankungen mit Einfluss auf das weibliche hormonelle Gleichgewicht zählen z.B. die Hyperprolaktinämie und Störungen der Schilddrüsenfunktion. Bei solchen Endokrinopathien sind meist die Bildung der Sexualhormone und die Follikelreifung in den Eierstöcken beeinträchtigt. Es kommt zur so genannten Anovulation (Olooto et al. 2012).

Das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS) ist eine der häufigsten Endokrinopathien der Frau mit Auswirkungen auf die weibliche Fruchtbarkeit. Es ist mit dem metabolischen Syndrom assoziiert und viele PCOS-Patientinnen leiden an einer Insulinresistenz. Es resultiert eine erhöhte ovarielle und adrenale Androgensynthese mit Störung des Menstruationszyklus. Laborchemisch zeigt sich eine Erhöhung des LH/FSH-Quotienten. Die Diagnose erfolgt nach den drei Rotterdam-Kriterien: (1) Oligo- bzw. Anovulation und/oder (2) polyzystische Ovarien und/oder (3) das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus, wobei zwei dieser drei Kriterien erfüllt sein müssen (Andrade et al. 2016). Das Vorkommen von Schwangerschaftskomplikationen bei Patientinnen mit PCOS wird auf eine Störung der Trophoblastinvasion zurückgeführt (Palomba et al. 2012).

Weibliche Unfruchtbarkeit kann auf der Ebene der Ovarien auch durch eine prämatüre Ovarialinsuffizienz bedingt sein, die ein vorzeitiges Erlöschen der Eierstockfunktion bedeutet. Sie tritt bei Frauen vor dem 40. Lebensjahr auf und die Ätiologie bleibt häufig unklar. Ursächlich können genetische Faktoren, Autoimmunerkrankungen, Chemotherapien oder eine Bestrahlung des kleinen Beckens sein (Unuane et al. 2011).

Anatomische Veränderungen im Bereich der Gebärmutter führen in der Regel zu Implantationsschwierigkeiten mit fetalen Fehlbildungen, Fehl- und Frühgeburten und somit zur ungewollten Kinderlosigkeit. Sie können angeboren (Fehlbildungen wie ein Uterus septus) oder erworben sein. Dazu zählen intrauterine Synechien, d.h. Verklebungen innerhalb der Gebärmutterhöhle, die gehäuft posttraumatisch nach einer tiefgreifenden Kürettage auftreten. Das Uterusmyom ist der häufigste benigne Tumor der Frau im reproduktiven Alter. V.a. intramural und submukös gelegene Myome können durch gestörte anatomische Verhältnisse in der Gebärmutterhöhle eine erfolgreiche Schwangerschaft verhindern (Abrao et al. 2013).

Ebenso werden Umweltfaktoren und der individuelle *lifestyle* als Ursachen für Unfruchtbarkeit und Schwangerschaftskomplikationen diskutiert. Zigarettenrauch,

Alkohol, Umweltverunreinigungen sowie die berufliche Exposition mit Chemikalien werden in diesem Zusammenhang als Einflussfaktoren angeführt (Hruska et al. 2000). Heutzutage kann eine deutliche Verschiebung der reproduktiven Phase in ein höheres Lebensalter der Frau festgestellt werden. Die Lebensplanung hat sich für viele junge Frauen geändert. Immer mehr Frauen zögern die Mutterschaft aufgrund einer längeren Schulbildung, Karriere oder aus finanziellen Gründen hinaus. Die Möglichkeit einer Kontrazeption oder eines Schwangerschaftsabbruchs lassen die individuelle Lebensplanung auf diesem Gebiet zu. Doch mit zunehmendem Alter lässt die weibliche Fertilität ebenfalls nach. Gründe dafür sind ein zunehmender Follikeluntergang, sinkende Qualität der Eizellen, hormonelle Veränderungen und höhere Raten an Defekten im Reproduktionstrakt. Es treten vermehrt chromosomale Störungen und dadurch Spontanaborte auf. Auch die Empfänglichkeit des Endometriums nimmt mit zunehmendem Alter ab (Qiao et al. 2014).

Obwohl zahlreiche Ursachen für die weibliche Unfruchtbarkeit bekannt sind, fehlt es jedoch an individuellen Biomarkern, die eine präzisere Vorhersage über den Erfolg von reproduktionsmedizinischen Therapien zulassen.

### **1.3. Implantation**

Für das Verständnis der weiblichen Unfruchtbarkeit sind Kenntnisse über die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Schwangerschaft notwendig.

Die Schwangerschaft ist ein komplexer Vorgang, der unter anderem die Ereignisse Implantation, Dezidualisierung und Plazentation des Embryos in das Endometrium beinhaltet (Cha et al. 2012).

#### **1.3.1. Endometriumrezeptivität und Implantationsfenster**

Das Endometrium ist ein dynamisches Gewebe und unterliegt zyklischen Veränderungen im Menstruationszyklus. Nach der Menstruationsblutung beginnt die Proliferationsphase. Das Endometrium proliferiert unter dem Einfluss des Östrogens, das während der Follikelreifung gebildet wird. Nach der Ovulation folgt die Sekretionsphase. Unter dem Einfluss von Progesteron aus dem Corpus luteum erfolgt die sekretorische Transformation des Endometriums (Mahajan 2015). Dabei beginnt die Differenzierung von Stromazellen des Endometriums zu Deziduazellen (Dezidualisierung). Während der Implantation dienen diese der Versorgung des Embryos mit Nährstoffen. Somit schafft die Sekretionsphase optimale Verhältnisse für die Implantation und definiert eine limitierte Zeitspanne der Endometriumrezeptivität (Das 2009; Salsano et al. 2017). Die limitierte Zeitspanne für eine Implantation, das so

genannte Implantationsfenster oder „window of implantation“ (WOI), liegt etwa zwischen dem 16. und 22. Tag eines 28-tägigen Menstruationszyklus. Außerhalb dieser Phase treten Implantationsfehler auf, die für zwei Drittel der Frühaborte verantwortlich sind. Die Chance auf eine Schwangerschaft liegt pro Zyklus bei ca. 30% (Kim und Kim 2017). Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation bildet nicht nur ein rezeptives Endometrium allein. Implantation ist abhängig von der Interaktion zwischen Blastozyste und Endometrium. Es besteht ein Embryo-maternaler Dialog (Emiliani et al. 2005).

### **1.3.2. Der Embryo-maternale Dialog**

Es wurden zahlreiche Proteine und andere Moleküle identifiziert, die von Embryo und Endometrium sezerniert werden und eine wichtige Rolle bei der Implantation spielen.

Von allen identifizierten Faktoren erscheinen *Leukemia inhibitory factor* (LIF), Cyclooxygenase (COX)-2 und HOX-A10 bzw. 11 als die wichtigsten, da sie für den Implantationsprozess unerlässlich sind (Melford et al. 2014).

LIF ist ein Zytokin der Interleukin-6-Klasse und reguliert verschiedene Zellfunktionen wie Proliferation und Differenzierung (Nicola und Babon 2015). LIF und sein Rezeptor wurden sowohl in Embryonen als auch im Endometrium nachgewiesen. Dies weist auf einen Embryo-maternalen Dialog bereits vor Anlagerung der Blastozyste hin. (Emiliani et al. 2005). LIF scheint an der Regulierung zahlreicher Vorgänge während der Implantation, einschließlich Dezidualisierung und Angiogenese, beteiligt zu sein. Ihm wird auch eine Rolle bei der Immuntoleranz gegenüber dem Embryo zugeschrieben (Rosario und Stewart 2016). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Pinopoden, strukturellen Veränderung des rezeptiven Endometriumepithels, und LIF gezeigt werden (Aghajanova et al. 2003).

COX2 ist ein Enzym, das an der Synthese von Prostaglandinen beteiligt ist. Eine erfolgreiche Implantation erfordert eine streng kontrollierte Prostaglandin-Konzentration. Die durch COX2 synthetisierten Prostaglandine sollen durch Regulierung von VEGF- und Angiopoetin-Signalkaskaden an der Angiogenese während der Implantation beteiligt sein. Dies scheint durch die Blastozyste reguliert zu werden (Matsumoto et al. 2002; Marions und Danielsson 1999).

HOX-Gene wie HOX-A10 und 11 gehören zur Familie der regulativen Gene. Sie weisen einen charakteristischen Bestandteil, die so genannte Homöobox, auf. Während der Embryonalentwicklung steuern sie die Morphogenese. HOX-Gene werden jedoch auch im Reproduktionstrakt von Erwachsenen exprimiert. Zum Zeitpunkt der Implantation steigen die Expressionslevel von HOX-A 10 und 11 enorm.

Dies deutet auf eine regulative Funktion von HOX-A 10 und 11 im Implantationsprozess hin (Taylor 2000).

Es ist anzunehmen, dass die beschriebenen Faktoren im Zusammenspiel wirken. Bis heute ist der komplexe Prozess der Implantation nur in Ansätzen verstanden.

### **1.3.3. Stadien der Implantation**

Die Implantation stellt einen multifaktoriellen, mehrstufigen Prozess dar. Dieser kann durch die Stadien Apposition, Adhäsion und Invasion beschrieben werden.

Während der Apposition befindet sich der Embryo in der Nähe des Endometriumepithels. Die Auswahl des Implantationsortes erfolgt durch eine Interaktion mit dem mütterlichen Gewebe. Epithelzellen des Endometriums bilden Protrusionen aus, die so genannten Pinopoden. Diese führen zur Entfernung von Mucin-1 (MUC-1). In diesem Bereich findet die Adhäsion statt (Kim und Kim 2017). MUC-1 bildet einen Film auf den Epithelzellen, der den Kontakt zwischen Embryo und Endometrium wie eine Barriere verhindert. Es wird vermutet, dass der Embryo die MUC-1-Expression des Endometriums beeinflussen kann (Hill 2001).

Die Adhäsion wird durch Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Cadherine unterstützt, die den Zell-Zell-Kontakt herstellen. Viele Integrine zeigen eine Zyklus-spezifische Expression im Endometriumepithel. Das Integrin  $\alpha V3\beta$  wird im WOI exprimiert und damit als potenzieller Rezeptor für die Anlagerung des Embryos betrachtet. Vor allem E-Cadherine sind im Zusammenhang mit der Implantation erforscht (Hill 2001; Melford et al. 2014). Die Invasion in das Endometrium erfordert einen enzymatischen Abbau der Extrazellulärmatrix. Dabei sind Proteinasen wie Matrix-Metalloproteinasen involviert (Bischof et al. 2000).

### **1.3.4. Plazentation**

Die ausgereifte Plazenta ermöglicht den Stoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Fetus und ist daher von elementarer Wichtigkeit für die Embryoentwicklung. Die Entwicklung des Trophoblasten als frühe embryonale Plazentastruktur beginnt bereits im Stadium der Blastozyste. Aus dem Trophoblasten entstehen Syncytio- und Zytotrophoblast (Red-Horse et al. 2004; Chang et al. 2018). Zuerst erfolgt die Invasion der Blastozyste durch das Eindringen des Syncytiotrophoblasten in das Endometriumepithel. Nachfolgend dringen Zytotrophoblastzellen ein und ordnen sich zu Säulen an, aus denen im Verlauf Zotten entstehen. Zu Beginn verläuft die Plazentation in einer sauerstoffarmen Umgebung. Um den stetig steigenden Bedarf des wachsenden Embryos an Sauerstoff und Nährstoffen sicherzustellen, ist ein Anschluss an die maternale Blutzirkulation unumgänglich. Im Verlauf der Invasion

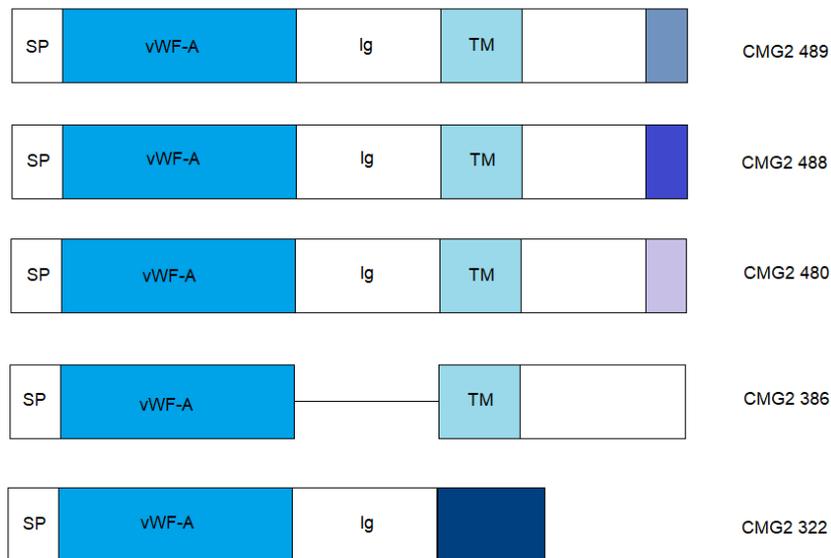
dringen Trophoblastzellen in die mütterlichen Spiralarterien ein und arrodieren diese, sodass der intervillöse Raum mit mütterlichem Blut gefüllt wird (Huppertz et al. 2009). Für die Versorgung des Embryos ist die Ausbildung eines Gefäßsystems erforderlich. Es existieren zahlreiche Faktoren mit Einfluss auf die Gefäßentwicklung in der frühen Schwangerschaft. Viele Zytokine, die u.a. durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) produziert werden, regulieren die Angiogenese. Dazu zählen Angiopoetin (ANGPT)-1 und 2, Placental Growth Factor (PlGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C, Interleukin (IL)-18 und Interferon- $\gamma$ . Auch Lymphozyten sezernieren Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , welches über die Hochregulierung von VEGF die Angiogenese beeinflusst. Zudem ist eine Rolle von Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 bei der Plazentation bekannt. Eine hohe Expression wurde in Trophoblastzellen des ersten Trimesters nachgewiesen (Rizov et al. 2017). Es ist davon auszugehen, dass weitere Angiogenesefaktoren eine essenzielle Rolle bei der Ausbildung des plazentaren Blutgefäßsystems spielen. Ein interessanter Kandidat in diesem Zusammenhang ist das Capillary Morphogenesis Gene 2 (CMG2).

#### **1.4. Capillary Morphogenesis Gene 2 (CMG 2)**

Capillary Morphogenesis Gene 2 (CMG2) ist ein auf dem Chromosomen 4q lokalisiertes Gen, das in Endothelzellen der humanen Umbilikalvene während der Kapillarausbildung in 3D-Matrices identifiziert wurde (Bell et al. 2001).

##### **1.4.1. Struktur und Splicevarianten von CMG2**

Das CMG2-Protein setzt sich aus Signalpeptid, einer von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domäne, einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne, der Transmembran-Domäne sowie einem zytosolischen Schwanz zusammen. Das Signalpeptid transportiert das Protein bei seiner Synthese in das Endoplasmatische Retikulum.



**Abbildung 2** Struktur und Splicevarianten von CMG2 (modifiziert nach Scobie et al., 2003). Abkürzungen: SP = Signalpeptid, vWF-A = von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domäne, Ig = Immunglobulin-ähnlichen Domäne, TM = Transmembran-Domäne.

CMG2 kodiert für mehrere Proteinisoformen. Durch alternatives Splicen können verschiedene Transkriptvarianten und somit unterschiedliche Proteine entstehen. Folgende Splicevarianten wurden von CMG2 beschrieben: Die Vollständigvariante CMG2 489 ist ein aus 489 Aminosäuren bestehendes Typ-1-Transmembranprotein. CMG2 488 ist bis auf die letzten 13 Aminosäuren identisch zu der Vollständigvariante. Der von Bell und Kollegen beschriebenen Isoform CMG2 386 fehlt die Immunglobulin-ähnliche Domäne. Dies führt zum Verbleib im Endoplasmatischen Retikulum. Bei CMG2 322 handelt es sich um ein sekretiertes Protein ohne Transmembran-Domäne (Scobie et al. 2003; Deuquet et al. 2012). In der Dissertation von Vargas ist eine weitere Proteinisoform beschrieben. CMG2 480 ist ein membrangebundenes, 480 Aminosäuren langes Protein, welches sich in seinen letzten 31 Aminosäuren von CMG2 489 bzw. 488 unterscheidet (Vargas 2009). CMG2-mRNA wurde in einer Vielzahl von menschlichen Normal- und Tumorgeweben nachgewiesen. Auffallend ist ein unterschiedliches Expressionsprofil der Splicevarianten in verschiedenen Geweben (Scobie et al. 2003).

#### **1.4.2. CMG2 als Anthraxtoxinrezeptor (ANTXR2)**

Ein besonderes Interesse an der Erforschung von CMG2 entstand durch dessen Identifikation als Rezeptor für das Anthraxtoxin (Scobie et al. 2003). Der Tumor Endothel Marker 8 (TEM8) bzw. Anthrax Toxin Rezeptor 1 (ANTXR1) wurde zuerst als Anthraxtoxinrezeptor identifiziert (Bradley et al. 2001). CMG2 stellt den zweiten Rezeptor dar und wird daher synonym Anthrax Toxin Rezeptor 2 (ANTXR2) genannt. Es ist strukturell sehr ähnlich zu TEM8. Die Transmembranproteine weisen eine Aminosäureübereinstimmung von insgesamt 40% auf. 60% der Aminosäuren sind in den von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domänen identisch. Die von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domäne enthält das MIDAS-Motiv (metal ion-dependent adhesion site) und ist für die Bindung des Protektiven Antigens (PA) von großer Bedeutung. PA und die Untereinheiten Letalfaktor (LF) und Ödemfaktor (EF) sind Bestandteile des Anthraxtoxins. Die Rezeptorbindung von PA führt über komplexe biochemische Prozesse zur Endozytose und damit Translokation der zur Erkrankung führenden Toxinbestandteile LF und EF in das Zytosol (Scobie et al. 2003).

#### **1.4.3. CMG2 und das Hyaline Fibromatose Syndrom (HFS)**

Weitere Beachtung in der Forschung fand CMG2 durch seine Rolle in den seltenen autosomal rezessiven Erkrankungen infantile systemische Hyalinose (ISH) und juvenile hyaline Fibromatose (JHF), die inzwischen zum Hyaline Fibromatose Syndrom (HFS) zusammengefasst werden (Deuquet et al. 2012). Mutationen im CMG2 wurden als Ursache für das HFS nachgewiesen. Charakteristisch sind hyaline Ablagerungen in der Dermis und die dadurch auftretenden papulonodulären Hautläsionen. Die Patienten weisen zudem häufig subkutane Tumoren, Zahnfleischwucherung, Gelenkkontrakturen, Osteolyse und Osteoporose auf. Die ISH ist mit einer frühen Manifestation und schweren Verläufen einhergehend. Dabei führen erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, gastrointestinale Erkrankungen und Gedeihstörungen, verursacht durch weitverbreitete Hyalinablagerungen in verschiedenen Organen, meist zum Tod innerhalb der ersten Lebensjahre (Hanks et al. 2003; Dowling et al. 2003). Der Funktionsverlust von CMG2 bei Auftreten von Mutationen ist durch die Retention des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum und den Abbau in Proteasomen verschuldet (Deuquet et al. 2009). Eine Störung der Basalmembran von Kapillargefäßen wird als Ursache für die charakteristischen perivaskulären Hyalinablagerungen diskutiert. Dies deutet auf eine Rolle des CMG2 im Aufbau der Basalmembran hin (Hanks et al. 2003).

#### **1.4.4. Die physiologische Rolle von CMG2**

Die physiologische Funktion von CMG2 ist bis heute nicht eindeutig definiert. Es existieren zahlreiche Hinweise auf eine Rolle in der Extrazellulärmatrix-Homöostase.

Bell et al. zeigten 2001 die Bindung der von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domäne von CMG2 an die Basalmembranproteine Kollagen 4 und Laminin und vermuteten eine Rolle im Aufbau der Basalmembran (Bell et al. 2001).

Zur Untersuchung der physiologischen Rolle von CMG2 wurden Gen-Knockouts bei Mäusen durchgeführt. Die Tiere waren lebensfähig und zeigten keine dermalen Manifestationen des HFS. Auffallend war die Unfähigkeit zu einer spontanen Entbindung bei trächtigen Weibchen. Als Ursache konnte eine Uterusfibrose festgestellt werden, die zu einer eingeschränkten uterinen Kontraktionsfähigkeit führte. Bei Fortschreiten der Fibrose entwickelten ältere Weibchen Fertilitätseinschränkungen mit einer Störung der uterinen Rezeptivität. Die Uterusfibrose war durch Ablagerungen von Kollagenen im Myometrium bedingt. Daraus ließ sich eine Rolle des CMG2 bei der Aufrechterhaltung der Kollagenhomöostase im Uterus ableiten. Zudem wiesen Knockout-Mäuse dilatierte Blut- und Lymphgefäße und eine Zunahme inflammatorischer Zellen im Uterus auf.

Bei der Untersuchung molekularer Mechanismen konnte CMG2 als positiver Regulator der Membran-Typ-1-Matrix-Metalloproteinase (MT1-MMP) durch Komplexbildung identifiziert werden. Die MT1-MMP trägt zum Umbau der Extrazellulärmatrix bei. Ein Defekt des Mechanismus kann als Ursache für die Kollagenakkumulation bei den CMG2-Knockout-Mäusen angenommen werden (Reeves et al. 2012; Peters et al. 2012). 2017 konnten Bürgi und Kollegen die Rolle von CMG2 bei der Regulation von Kollagen 6 in der Maus nachweisen. Es wird angenommen, dass CMG2 für den Abbau von Kollagen 6 im Lysosomen benötigt wird. Der Funktionsverlust bzw. das Fehlen von CMG2 wie bei dem HFS oder den Knockout-Versuchen führen zur Akkumulation von Kollagen 6 (Bürgi et al. 2017).

Es existieren weiterhin eindeutige Hinweise auf eine Funktion von CMG2 bei der Angiogenese. Bell et al. konnten eine verstärkte Expression von CMG2 während der Kapillarmorphogenese in 3D-Matrices nachweisen, die zur Identifikation des Gens geführt hat (Bell et al. 2001). Der Prozess der Angiogenese ist für viele physiologische Vorgänge (embryonale Entwicklung, weibliche Reproduktionsfähigkeit, Wundheilung) und pathologische Veränderungen (Tumorstadium, diabetische Retinopathie) bedeutsam. Die Angiogenese verläuft in Stadien. Zuerst erfolgt die Degradation der Extrazellulärmatrix. Danach folgen Proliferation und Migration der Endothelzellen. Schließlich entstehen neue Blutgefäße aus der Differenzierung des Gewebes. Reeves

et al. zeigten, dass CMG2 für die Proliferation der Endothelzellen und die Bildung von Kapillar-ähnlichen Netzwerken aus Endothelzellen von Bedeutung ist. Es konnte kein signifikanter Einfluss des CMG2 auf die Migration der Endothelzellen nachgewiesen werden (Reeves et al. 2010). Durch die Funktion von CMG2 als ein Regulator der Angiogenese und der Bedeutung dieses Prozesses bei der Entstehung und Progression von Tumoren wurde das Gen im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorarten untersucht. Im Zusammenhang mit Brustkrebs wurde eine niedrige CMG2-mRNA-Expression als negativer Prognosefaktor mit kürzerem Überleben der Patienten identifiziert. Ein inhibierender Effekt des CMG2 auf das Tumorwachstum konnte nachgewiesen werden (Ye et al. 2014a). Bei Untersuchungen des Prostatakarzinoms bewirkte ein Knockdown des CMG2 eine erhöhte Invasivität des Tumors. Ein Einfluss auf das Wachstum des Prostatakarzinoms konnte nicht festgestellt werden (Ye et al. 2014b). Bei Patienten mit Weichteilsarkomen erwies sich eine niedrige CMG2-mRNA-Expression ebenso wie bei Brustkrebspatienten als negativer Prognosefaktor (Greither et al. 2017). Zuletzt wurde die Rolle von CMG2 in Gliomen erforscht. Eine Überexpression des CMG2 war mit erhöhten Tumorstadien und kürzerem Patientenüberleben assoziiert (Tan et al. 2018).

Trotz umfangreicher Erforschung des CMG2 in Bezug auf seine physiologische Funktion, Infektion mit dem Anthraxtoxin, HFS und verschiedene Tumorarten wurde CMG2 noch nie im Zusammenhang mit humaner Fertilität und vor allem weiblicher Unfruchtbarkeit untersucht.

Die Regulation der Angiogenese und der Extrazellulärmatrix-Homöostase durch CMG2 lässt eine Rolle bei Erkrankungen, die zur weiblichen Unfruchtbarkeit führen und mit Angiogenese oder Implantationsstörungen assoziiert sind, vermuten. Zu diesen Erkrankungen zählen die Endometriose und das PCOS. Die Angiogenese ist zweifelsohne ein wichtiger Prozess bei physiologischen Vorgängen wie der Implantation. Somit stellt sich die Frage, ob CMG2 einen Einfluss auf die Implantation und damit auf eine erfolgreiche Schwangerschaft haben könnte.

## 2. ZIELSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine Aussage über das prädiktive Potential von Capillary Morphogenesis Gene 2 (CMG2) bei Patientinnen mit einem unerfüllten Kinderwunsch zu treffen.

Trotz umfangreicher Untersuchungen ist die physiologische Funktion von CMG2 bis heute nicht vollständig verstanden. Es wird eine Rolle bei der Regulation von Angiogenese und der Extrazellulärmatrix-Homöostase diskutiert. Daher sollen die Expression und Funktion von CMG2 in plazentären Zellen zuerst anhand von Versuchen mit den Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 erforscht werden. Im ersten Versuchsteil sollen Lokalisation und Expression von CMG2 in diesen Zelllinien analysiert, sowie die Effekte eines Knockdown auf Vitalität und Apoptose der Zellen untersucht werden.

Erkrankungen wie Endometriose und PCOS sind mit Angiogenese und Störungen der Implantation assoziiert und können zur weiblichen Unfruchtbarkeit und damit ungewollter Kinderlosigkeit führen. Im Hinblick auf die diskutierte physiologische Funktion von CMG2 stellt sich die Frage, ob CMG2 eine Rolle bei diesen Erkrankungen spielt. Der Implantationsprozess erfordert einen koordinierten Ablauf bestimmter Vorgänge, zu denen auch der Abbau von Extrazellulärmatrix und Angiogenese zählen. Der erfolgreiche Ausgang einer Schwangerschaft ist von dem korrekten Ablauf dieser Vorgänge abhängig. Störungen der Implantation können zu Aborten und somit zum unerfüllten Kinderwunsch führen. Deshalb soll im zweiten Schritt die Möglichkeit von CMG2, als Biomarker für den Eintritt einer Schwangerschaft nach ART oder eines Aborts zu fungieren, überprüft werden, indem die Serumkonzentration des löslichen CMG2-Proteins in Blutseren von Kinderwunschpatientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach einer potenziellen Konzeption mittels ART vermessen und zur Diagnose der Patientinnen sowie zum Auftreten von Schwangerschaft und ggf. Abort korreliert werden.

## 3. MATERIAL UND METHODIK

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Patientenproben und Ethikvotum

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, eine Aussage über den Vorhersagewert von CMG2 bei Patientinnen mit einem unerfüllten Kinderwunsch zu treffen. Zu diesem Zweck wurde die CMG2-Expression im Blutserum von Kinderwunschpatientinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie (Universitätsklinikum Halle) gemessen.

Für die Untersuchung der Blutseren existiert ein zustimmendes Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg („Molekulare Marker weiblicher Infertilität in Follikelflüssigkeit, Serum und Granulosazellen“; Studien-Nummer: 2013-01/ZRA). Die Auswertung der Gesundheitsdaten und ggf. Daten zum Schwangerschaftsverlauf dieser Patientinnen erfolgte pseudonymisiert.

Bei 76 Patientinnen wurden im Rahmen einer Infertilitätsbehandlung Blutproben am achten Tag des Monatszyklus unter ovarieller Stimulation mit FSH und in der zweiten Woche nach Embryonentransfer (potenzielle vierte Schwangerschaftswoche) entnommen. Bei 20 dieser Patientinnen konnten bei längerer Beobachtung Blutproben in der fünften bzw. achten Woche der Infertilitätsbehandlung (potenzielle fünfte bzw. achte Schwangerschaftswoche) gewonnen werden.

#### 3.1.2. Chemikalien

BSA	Promega (Mannheim)
Countess® Trypan Blue stain 0,4%	Invitrogen (Karlsruhe)
DAPI	AppliChem (Darmstadt)
Desoxycholat	Sigma Aldrich (Steinheim)
DMSO	AppliChem (Darmstadt)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
EGTA	AppliChem (Darmstadt)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (absolut)	AppliChem (Darmstadt)
Fixierer (Kodak)	Sigma Aldrich (Steinheim)
FKS	PAA Laboratories (Cölbe)
Formaldehyd	AppliChem (Darmstadt)
INTERFERin®	Polyplus (Illkirch, FR)
Kodak D-19 Developer	Sigma Aldrich (Steinheim)

Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
NaCl	AppliChem (Darmstadt)
NuPAGE® LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® MES-Puffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® reduzierendes Agenz (10x)	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® Transferpuffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Cölbe)
ProLong Gold antifade reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Karlsruhe)
Sulforhodamin B Sodium Salt	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TCA 10%	Roth (Karlsruhe)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Tris-HCL	AppliChem (Darmstadt)
TritonX-100	AppliChem (Darmstadt)
Tween® 20	AppliChem (Darmstadt)
Wasser für die Molekularbiologie (RNase-frei)	Roth (Karlsruhe)

### 3.1.3. Reaktionskits

Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega (Mannheim)
Countess® Cell Counting Chamber Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL- Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Freiburg)
Human anthrax toxin receptor 2 (ANTXR2)	Cusabio Biotech Co.(Wuhan,China)
ELISA Kit (antibodies-online.de: ABIN420827)	
Maxima SYBR Green qPCR Mastermix	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Protein-Assay-Dye Reagent (Bradford Reagenz)	Bio-Rad Laboratories (München)
RevertAid™ H Minus First Strand	Fermentas (St. Leon-Rot)
cDNA Synthesis Kit	
RNeasy® Mini Kit (250)	Qiagen (Hilden)

### 3.1.4. Antikörper

**Tabelle 1** Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
<b>Primärer CMG2-Antikörper</b>			
Anti-h CMG-2 (AF 2940)	1:1000 (Immunfluoreszenz) 1:500 (Western Blot)	Ziege	R&D Systems (Minneapolis, USA)
<b>Sekundärer Antikörper</b>			
Anti-goat IgG- FITC	1:100 (Immunfluoreszenz)	Hase	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-goat IgG- HRP (Sc 2020)	1:10000 (Western Blot)	Esel	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

### 3.1.5. Oligonukleotide

**Tabelle 2** Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5´-3´)	Hersteller
<b>Primer</b>		
CMG2-fw	TCCTGCAGAAGAGCCTTT	Eurofins Genomics (Ebersberg)
CMG2-rev	TGCATAATGATGGCACCAGA	Eurofins Genomics (Ebersberg)
HPRT-309	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	Sigma-Aldrich (Steinheim)
HPRT-570	CTTGCGACCTTGACCATCTT	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<b>siRNA</b>		
CMG2-376	GUCUGGGAGUGUGGCAAUUT	Eurofins Genomics (Ebersberg)
CMG2-501	CUGGAGACAGAGGCAAAUUT	Eurofins Genomics (Ebersberg)
Luciferase- siRNA	CUUACGCUGAGUACUUCAATT	Eurofins Genomics (Ebersberg)

### 3.1.6. Puffer, Medien und Lösungen

0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	Gibco by life technologies (Darmstadt)
1x MES-Puffer (Western Blot)	50 ml MES (20x) 950 ml Aqua bidest.
1x Transferpuffer (Western Blot)	50 ml Transferpuffer 20x 100 ml Methanol 850 ml Aqua bidest.
10x TBS (Western Blot)	100 ml 5 M NaCl 300 ml 1 M Tris (pH 8,0) 600 ml Aqua bidest.
1x TBST-T (Western Blot)	500 ml 1x TBS 500 µl Tween® 20

DMEM (1x) + GlutaMAX™-I	Gibco by life technologies, (Darmstadt)
PBS Dulbecco	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCL (pH7,4) 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 0,25% Desoxycholat 1:100 Protease-Inhibitor
RPMI-Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I	Gibco by life technologies, (Darmstadt)

### 3.1.7. Geräte und Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Buckinghamshire,UK)
Analysenwaage	Kern&Sohn (Balingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank IG150	Jouan (Unterhaching)
Countess™ Zellzahlmessgerät	Invitrogen (Karlsruhe)
Deckgläser	Paul Marienfelder GMBH (Lauda Königshofen)
Einweghandschuhe	Sempermed (Wien, Österreich)
Falconröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Fluoreszenzmikroskop- TE2000-E Epi	Nikon (Düsseldorf)
Gefrierbehälter	Nalgene (Hereford, U.K.)
Gefrierröhrchen	Nalgene (Hereford, U.K.)
iCycler MyiQ™ (Realtime Cyclus)	Bio-Rad Laboratories (München)
Labormikroskop Eclipse TS100-F	Nikon (Düsseldorf)
Magnetrührer	IKA® Werke (Staufen)
Magnetrührstäbchen	Roth (Karlsruhe)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Mini Trans-Blot® Filter paper	Bio-Rad Laboratories (München)
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen (Karlsruhe)
Objektträger	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Pipetboy (automatische Pipettierhilfe)	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)

Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
Plattenreader Genios	Tecan (Grödig, Österreich)
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories (München)
qPCR-Strips und Deckel	Peqlab (Erlangen)
Reaktionsgefäße	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Rollenmischgerät	Kisker (Steinfurt)
Serologische Pipetten	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Spektrometer Spectra Max 340 PC	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Sterilbank	Heraeus (Hanau)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
UV-Küvetten (UVette®)	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer	StarLab (Ahrensburg)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Western Blot Transferkammer (Mini Trans-Blot® Cell)	Bio-Rad Laboratories (München)
Western Blot Elektrophoresekammer (X Cell Sure Lock™)	Invitrogen (Karlsruhe)
Zellkultur-Plastikartikel (Zellkulturflaschen, 96-Lochplatten, 24-Lochplatten, 6-Lochplatten)	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugen 5415D	Eppendorf (Hamburg)
4-5L	Sigma (Osterode am Harz)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)

### 3.2. Zellbiologische Methoden

Für die Untersuchung der Eigenschaften von CMG2 auf molekularer Ebene wurden die folgenden drei Zelllinien verwendet:

AC1-M59 (Hybrid der AC1-Chorionkarzinom- und Trophoblastzellen des dritten Trimesters), HTR-8/SVneo (immortalisierte extravillöse Trophoblastzellen des ersten Trimesters) und JEG-3 (Chorionkarzinomzellen).

Alle Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. U. Markert vom Plazentalabor des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt.

#### 3.2.1. Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien HTR-8/SVneo und JEG-3 erfolgte in 75 cm<sup>3</sup> Kulturflaschen in je 10 ml RPMI-Medium und die Kultivierung der Zelllinie AC1-M59 in DMEM. Zu 500 ml des jeweiligen Kulturmediums wurden 50 ml fetales Kälberserum und 5 ml einer Antibiotikumlösung aus Penicillin und Streptomycin zugegeben. Die

Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (v/v) und maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde dabei alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Das Passagieren der adhärent wachsenden Zellkulturen erfolgte zweimal in der Woche bei einer Konfluenz von etwa 80% im Verhältnis 1:2 bis 1:4. Dafür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Nach Zugabe von 5 ml 0,05% Trypsin wurden die Zelllinien für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und damit von der Flasche gelöst. Durch Überführen der Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß mit 7 ml Medium wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurde die Lösung für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Zellpellet in dem jeweiligen Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Zellen im gewünschten Verhältnis in neue Zellkulturflaschen.

Die durchgeführten Versuche erforderten das Einstreuen einer definierten Zellzahl in unterschiedliche Kulturgefäße. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mit Hilfe des Countess® Cell Counting Chamber Kit. 10 µl des Countess® Trypan Blue stain 0,4% wurden mit 10 µl des resuspendierten Zellpellets versetzt und 10 µl der Lösung in die Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde von dem Countess™ Zellzahlmessgerät ermittelt. Aus dieser Angabe konnte die Zellsuspensionsmenge für das Einstreuen einer definierten Zellzahl bestimmt werden.

**Tabelle 3** Übersicht Kulturgefäße und eingestreute Zellzahl für die Versuche.

	Versuch	Zellzahl	Volumen
<b>96-Lochplatte</b>	Vitalitäts-/Apoptoseassay	5x10 <sup>3</sup>	200 µl
<b>24-Lochplatte</b>	Immunfluoreszenz	5x10 <sup>4</sup>	1 ml
<b>6-Lochplatte</b>	Molekularbiologische Methoden	2x10 <sup>5</sup>	2 ml

Die Kryokonservierung der Zelllinien erfolgte nach der Trypsinierung. Das Zellpellet wurde mit Gefriermedium (Kulturmedium mit 10% Dimethylsulfoxid) versetzt und in Gefrierrohrchen überführt. In einem Gefrierbehälter wurden die Zelllinien für 24 Stunden bei -80 °C und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Vor der Kultivierung wurden die kryokonservierten Zellen rasch aufgetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen 5 Minuten bei 1000 U/min pelletiert und im Medium resuspendiert. Es folgten weitere Zentrifugations- und

Resuspensionsschritte, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zelllinien in die Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

### 3.2.2. Immunfluoreszenz

Die Bestimmung der zellulären Lokalisation des CMG2-Proteins in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz. Dazu wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in eine 24-Lochplatte auf mit Salzsäure vorbehandelten Deckgläschen ausgestreut. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen für 2 Stunden bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gehalten, um die Membranständigkeit von CMG2 bei herabgesetztem Zellstoffwechsel besser darstellen zu können. Nach einem Waschschrift mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  PBS wurden die Zellen in  $500\text{ }\mu\text{l}$  4% Formaldehyd/PBS für 20 Minuten fixiert. Danach wurden die Zelllinien mit  $200\text{ }\mu\text{l}$  0,5% TritonX-100/PBS für 5 Minuten permeabilisiert. Die Blockierung der für den Antikörper unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für 1 Stunde mit  $1\text{ ml}$  1% BSA/PBS. Daraufhin wurden die Zellen mit  $120\text{ }\mu\text{l}$  des CMG2-spezifischen Primärantikörpers (1:1000 Verdünnung in 1% BSA/PBS) für 1 Stunde inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  PBS erfolgte die Inkubation mit je  $120\text{ }\mu\text{l}$  Sekundärantikörper (1:100 Verdünnung in 1% BSA/PBS) für 1 Stunde. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugiert. Die Zellkernfärbung wurde mit  $120\text{ }\mu\text{l}$  des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI für 5 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Zellen zweimal mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden herausgenommen und jeweils zweimal in Wasser und 96% Ethanol getaucht. Nach der Trocknung erfolgte das Eindeckeln mit ProLong Gold antifade reagent und die Detektion nach einigen Tagen.

### 3.2.3. CMG2-Knockdown mittels siRNA

Der Knockdown des Gens CMG2 erfolgte mittels Transfektion von CMG2-siRNA. Dafür wurde das Transfektionsreagenz Interferin (Polyplus) verwendet. Als Negativkontrolle wurde Luciferase-siRNA transfiziert.

Für die molekularbiologischen Methoden wurde eine definierte Zellzahl in 6-Lochplatten und für das Vitalitäts- bzw. Apoptose-Assay in 96-Lochplatten eingestreut und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde folgender Transfektionsansatz hergestellt, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten inkubiert:

Einfachansatz:	<u>6-Lochplatte</u>	<u>96-Lochplatte</u>
siRNA	$0,2\text{ }\mu\text{l}$	$0,04\text{ }\mu\text{l}$
Interferin	$10\text{ }\mu\text{l}$	$1\text{ }\mu\text{l}$
Kulturmedium	$200\text{ }\mu\text{l}$	$20\text{ }\mu\text{l}$

Dieser wurde den Zellen hinzugegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert.

### **3.2.4. Vitalitäts-Assay**

Das Sulforhodamin B-Assay wurde zur Bestimmung des Einflusses der siRNA-Behandlung auf die Zellvitalität durchgeführt. Dabei bindet das SRB an Zellproteine, wobei die anschließend gemessene Extinktion mit der Zahl vitaler Zellen korreliert. Es wurden  $5 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung in 96-Lochplatten ausgestreut und 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte die Transfektion mit siRNA. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit je 200  $\mu$ l eiskalter Trichloressigsäure für 1 Stunde bei 4 °C fixiert. Die Platten wurden anschließend fünfmal in Eiswasser gewaschen und trocken geklopft. Daraufhin wurden die Zellen mit je 100  $\mu$ l 0,4% SRB-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und die überschüssige Farblösung vorsichtig mit 1% Essigsäure ausgewaschen. Nach der Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur wurde zur Lösung der angefärbten Zellen je 300  $\mu$ l Tris (20 mM) hinzugegeben und die Platten 15-30 Minuten geschüttelt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 560 nm.

### **3.2.5. Apoptose-Assay**

Mittels Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) wurde die Wirkung der siRNA-Behandlung im Hinblick auf die Apoptoseinduktion der Zelllinien untersucht. Caspasen stellen wichtige Enzyme im Apoptosemechanismus dar. 24 Stunden nach Transfektion der siRNA wurde den Zellen je 50  $\mu$ l des Caspase-Substrats hinzugefügt. Es enthält eine DEVD-Sequenz (Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure), welche durch Caspase 3/7 gespalten wird und ein Lumineszenzsignal erzeugt. Nach 30 Minuten Inkubation unter Lichtausschluss konnte die Lumineszenz, die proportional zur Caspasekonzentration ist, gemessen werden.

## **3.3. Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1. RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung**

Die RNA-Isolation wurde mittels RNeasy® Mini Kit (Qiagen) aus den Zellpellets nach Trypsinierung und Zentrifugation durchgeführt. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Den Zellen wurde 350  $\mu$ l Lysepuffer (10 ml RLT-Puffer + 0,1 ml 2-Mercaptoethanol) und 350  $\mu$ l 70% Ethanol hinzugegeben. Die Lösung wurde auf RNeasy-Spin-Säulen pipettiert und 1 Minute bei 12000 U/min zentrifugiert. Nach Entsorgung des Durchlaufs erfolgte die Zugabe von 700  $\mu$ l RW1-Puffer und die Zentrifugation für 1 Minute bei 12000 U/min. Das Filtrat wurde verworfen und 500  $\mu$ l RPE-Puffer auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden für 1 Minute bei 12000 U/min zentrifugiert und der Durchlauf entsorgt. Der Waschschrift mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer wurde wiederholt und nach Verwerfen des Durchlaufs erneut für 1 Minute bei 12000 U/min

zentrifugiert. Danach wurden die Säulen auf neue 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt und 20 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulen pipettiert. Zur Elution der RNA erfolgte nach 1 Minute Einwirkungszeit ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 12000 U/min. Der Durchlauf enthielt die RNA der Zellen.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurden 2 µl der RNA-Lösung mit 98 µl RNase-freiem Wasser gemischt und gegen die Referenzlösung bei 260 und 280 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte wie folgt:

RNA-Konzentration in µg/ml = OD (260 nm) x 50 (Verdünnungsfaktor) x 40 µg/ml.

Eine OD (260 nm) von 1 entspricht dabei 40 µg RNA/ml Lösung. Der Quotient aus den Absorptionwerten bei 260 und 280 nm ergibt die Reinheit und sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

### **3.3.2. cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) verwendet. Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde 1 µg der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben.

Zuerst wurde folgender Hybridisierungsansatz auf Eis erstellt:

- x µl RNA (1 µg)
- 1 µl Random-Primer
- ad 11 µl RNase-freiem Wasser

Dieser Pre-Annealing-Mix wurde für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt.

Danach erfolgte die Zugabe der Reaktionslösung auf Eis:

- 4 µl 5x Reaktionspuffer
- 2 µl dNTPs
- 1,5 µl RNase-freies Wasser
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 0,5 µl Reverse Transkriptase

Der RNA-Ansatz und die Reaktionslösung wurden gut gemischt.

Für die Synthese wurde das folgende Thermocycler-Programm gewählt:

1. Schritt: 25 °C für 10 Minuten
2. Schritt: 42 °C für 55 Minuten
3. Schritt: 70 °C für 10 Minuten

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 3.3.3. Quantitative real-time-PCR

Die Messung der Expression von CMG2-mRNA in den untersuchten Zelllinien erfolgte mittels quantitativer real-time-PCR (qPCR) unter der Verwendung von Maxima SYBR Green qPCR Mastermix (Thermo Scientific).

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 7,5 µl SyBr-Green-Mix
- 5,5 µl Nuklease-freies Wasser
- je 0,5 µl Primer fw/rev
- 1 µl cDNA

Die Reaktion wurde bei folgendem Programm durchgeführt:

1. Schritt: 95 °C für 10 Minuten
2. Schritt: 95 °C für 20 Sekunden
3. Schritt: 52 °C für 30 Sekunden
4. Schritt: 72 °C für 30 Sekunden
5. Schritt: Schritt 2 bis 4 45-mal wiederholen
6. Schritt: Schmelzkurve

Als Referenzgen diente die mRNA-Expression von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), die unabhängig von äußeren Einflüssen nahezu konstant exprimiert wird. Der Fluoreszenzfarbstoff SyBr-Green interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch seine Fluoreszenz ansteigt. Dadurch kann der kontinuierliche Anstieg der Produktmenge verfolgt werden.

Für die Quantifizierung des PCR-Produkts wird bei der qPCR der Ct-Wert (Cycle Threshold) herangezogen, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt.

Durch den Einsatz von HPRT als Referenzgen wurde das relative Expressionsniveau des CMG2 mittels der  $\Delta$ Ct-Methode von Livak und Schmittgen ermittelt:

$$\Delta\text{Ct-Wert} = 2^{-(\text{Ct}(\text{CMG2}) - \text{Ct}(\text{HPRT}))}$$

### 3.3.4. Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Die Proteinisolation erfolgte aus den Zellpellets der Zelllinien. Zur Resuspension wurden dem Zellsediment 200 µl RIPA-Puffer und 2 µl eines Protease-Inhibitor-Cocktails zugesetzt und die Suspension 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 Minuten bei 4 °C und 12000 U/min zentrifugiert, um Zelltrümmer wie Membranbestandteile und DNA abzutrennen. Der Überstand enthielt die gewünschte Proteinfraction und wurde für den Western Blot verwendet.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 995 µl des mit Aqua bidest. verdünnten Bradford-Reagenz (1:5 Verdünnung) und 5 µl der Proteinprobe gemischt und für 15 Minuten inkubiert. Das Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, der an Proteine bindet und dabei das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm gegen eine Referenzlösung. Mithilfe einer Eichgerade konnte die Konzentration aus der Absorption berechnet werden.

### **3.3.5. Western-Blot-Assay**

Zur Identifikation des CMG2-Proteins aus einem Proteingemisch der Zellen wurde der Western Blot eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese erfolgte im 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen). Dafür wurde folgender Probenansatz vorbereitet und bei 70 °C für 10 Minuten denaturiert:

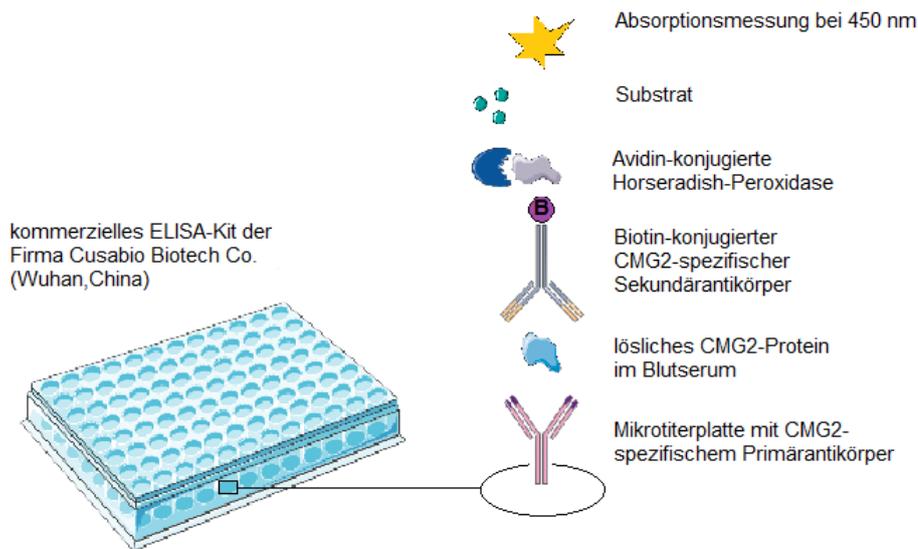
- 20 µg Protein
- 5 µl LDS Probenpuffer (4x)
- 2 µl reduzierendes Agenz (10x)
- ad 20 µl Aqua bidest.

Zudem wurde ein Molekulargewichtsstandard (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen) für die Größenbestimmung der Proteine aufgetragen und mitgeführt. Der Gellauf erfolgte in MES-Puffer (1x) bei 200 V, 150 mA und 4 °C für 1 Stunde. 10 Minuten vor Ende der Gelelektrophorese wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und danach kurz in Transferpuffer gespült. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte mittels Tank-Blot-Methode in Transferpuffer (1x) bei 200 V, 300 mA und 4 °C für 3 Stunden. Danach wurde die Membran in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Für 1 Stunde wurden mit 5% Milchpulver/TBS-T unter leichtem Schütteln unspezifische Bindungsstellen blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:500 Verdünnung in 5% Milchpulver/TBS-T) erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln. Nach drei Waschschritten mit TBS-T für je 5 Minuten wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (1:10000 Verdünnung in 5% Milchpulver/TBS-T) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit TBS-T für je 5 Minuten. Danach wurde die Membran mit dem ECL-Plus-Substrat inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert, welche das Substrat umsetzt und ein Chemolumineszenzsignal erzeugt. Die Detektion erfolgte mittels Röntgenfilm in der Dunkelkammer. Nach angemessener Belichtungsdauer wurde der Film entwickelt und fixiert.

### **3.4. ELISA-Messungen**

Die Konzentrationsbestimmung des sezernierten CMG2-Proteins im Blutserum der Patientinnen erfolgte mit einem Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) basierend auf dem Sandwich-Prinzip. Dafür wurde das kommerzielle ELISA-Kit der Firma Cusabio Biotech Co. (Wuhan,China) verwendet, das über antibodies-online.de bezogen wurde (Cat.-No.: ABIN420827). Zur Vorbereitung der Standardreihe wurde das lyophilisierte Standardprotein in 1 ml Sample Diluent aufgelöst. Die Verdünnungsreihe wurde durch 1:2-Verdünnung aus der Stammlösung in 7 Schritten erstellt. Das kommerzielle ELISA-Kit enthielt Mikrotiterplatten, die mit einem für das CMG2-Protein spezifischen Primärantikörper beschichtet waren. Zur Immobilisation des löslichen CMG2-Proteins durch seine Bindung an den immobilisierten Primärantikörper wurden je 100 µl der Standardlösung oder einer Serumprobe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Der Ansatz wurde mit einer Klebefolie bedeckt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung der ungebundenen Bestandteile der Proben durch Dekantieren der Flüssigkeit aus den Vertiefungen wurden je 100 µl (1:100 Verdünnung) des Biotin-konjugierten CMG2-spezifischen Detektionsantikörpers hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C unter einer Klebefolie inkubiert. Dieser Sekundärantikörper bindet an ein anderes Epitop des CMG2-Antigens. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und ein dreimaliger Waschschrift mit jeweils 200 µl Waschwasser (1:25 Verdünnung) und einem Zeitabstand von 1 bis 2 Minuten durchgeführt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Waschlösung abgenommen und die Platte trocken geklopft. Darauf erfolgte die Zugabe von je 100 µl (1:100 Verdünnung) einer Avidin-konjugierten Horseradish-Peroxidase (HRP) und die Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C unter Klebefolienversiegelung. Avidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Nach 1 Stunde wurde die Flüssigkeit entfernt und die Vertiefungen viermal mit je 200 µl Waschwasser und einem Abstand von 1 bis 2 Minuten gewaschen.

Danach folgte die Zugabe von jeweils 90 µl Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) und die Inkubation für 15 bis 30 Minuten bei 37 °C unter Lichtschutz. Die über den Sekundärantikörper an CMG2 gebundene Peroxidase bewirkt eine Blaufärbung des TMB proportional zur CMG2-Konzentration. Die Zugabe von je 50 µl Stopp-Lösung, um eine zu starke Farbreaktion zu verhindern, ergab einen gelben Farbumschlag. Es erfolgte die sofortige Absorptionsmessung der Proben bei 450 nm. Zur Bestimmung der CMG2-Konzentration wurde eine Standardgerade aus der Verdünnungsreihe des Standardproteins erstellt.



**Abbildung 3** Prinzip des Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Konzentrationsbestimmung des sezernierten CMG2-Proteins im Blutserum von Kinderwunschpatientinnen.

### 3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Cooperation, New York, USA). Die ermittelten Daten aus den zell- und molekularbiologischen Untersuchungen wurden mittels Student's T-Test ausgewertet. Für die statistische Auswertung der CMG2-Konzentrationen im Blutserum der Kinderwunschpatientinnen wurden bei nicht normal verteilten Datensätzen nichtparametrische Tests (Mann-Whitney U-Test, Kruskal-Wallis-Test) verwendet. Das Vorhandensein einer Normalverteilung wurde mittels Kolmogorow-Smirnow-Test widerlegt. Die CMG2-Serumkonzentrationen unterschiedlicher Zeitpunkte wurden mittels bivariater Korrelationsanalysen (Spearman-Rho) verglichen. Werte unterhalb der Signifikanzschwelle von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant eingestuft.

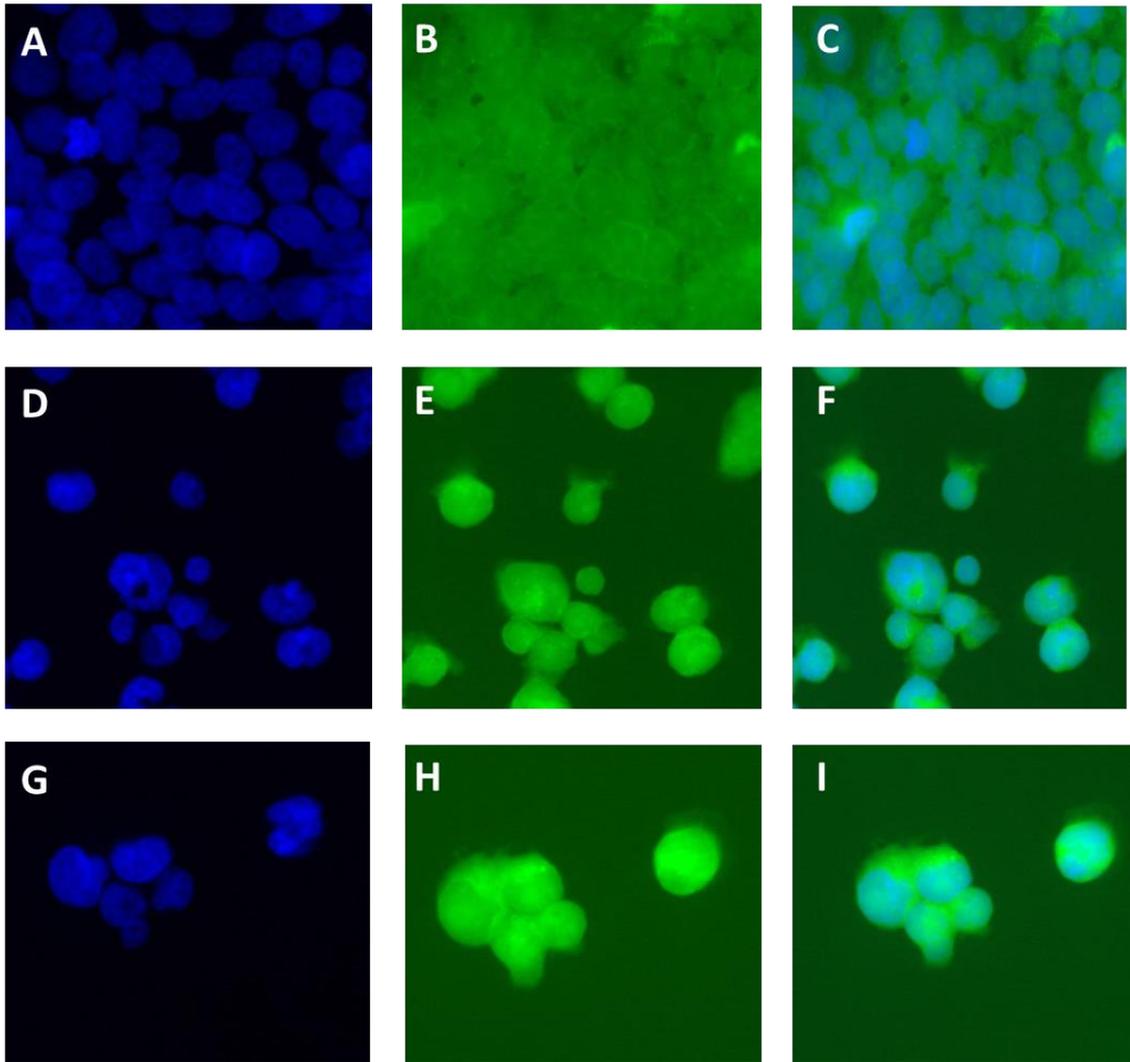
## **4. ERGEBNISSE**

In einem ersten Versuchsteil sollten Lokalisation und Expression von CMG2 in den Zelllinien AC1-M59 (Hybrid der AC1-Chorionkarzinom- und Trophoblastzellen des dritten Trimesters), HTR-8/SVneo (Trophoblastzellen des ersten Trimesters) und JEG-3 (Chorionkarzinomzellen) untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss eines CMG2-Knockdown auf die Vitalität und Apoptose der Zellen geprüft werden.

In einem zweiten Versuchsteil sollte die Serumkonzentration des löslichen CMG2 in den Blutproben von Kinderwunschpatientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie bestimmt und zur Diagnose der Patientinnen, sowie positivem Schwangerschaftstest und Abort korreliert werden.

### **4.1. Immunfluoreszenz – Lokalisation des CMG2 in Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen**

Es ist aktuell noch nicht untersucht, ob CMG2 entsprechend der Lokalisation in anderen Zelltypen auch auf der Zellmembranoberfläche der untersuchten Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien nachweisbar ist. Daher sollte zur Darstellung der Lokalisation des CMG2-Proteins in den Zellen ein indirekter Immunfluoreszenznachweis durchgeführt werden. CMG2 war in allen drei Zelllinien nachweisbar (Abbildung 4). Es wurde eine homogene zytoplasmatische Expression sowie eine schwache Färbung der Zytoplasmamembran detektiert (Abbildung 4 B, E, H). Eine Lokalisation in weiteren zellulären Kompartimenten konnte in der Immunfluoreszenz nicht detektiert werden.



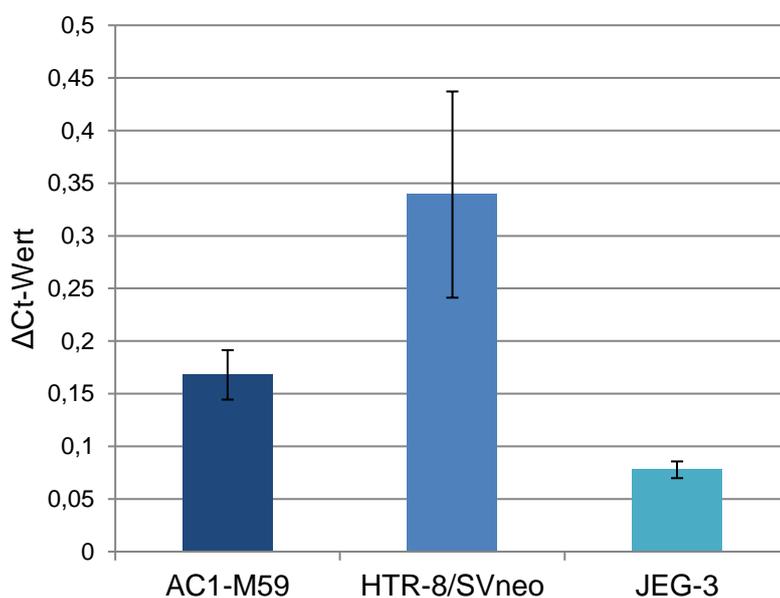
**Abbildung 4** Indirekter Immunfluoreszenznachweis von CMG2. Lokalisation des CMG2-Proteins in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3. A, D, G Zellkernfärbung mit DAPI in AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3. B, E, H CMG2-Färbung in AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3. C, F, I *merge* der DAPI- und CMG2-Färbung in AC1-M59, HTR8/Svneo und JEG-3.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse des Immunfluoreszenz-Nachweises auf eine Lokalisation von CMG2 auf der Zellmembranoberfläche hin, obwohl die Färbung im Vergleich zu anderen Membranproteinen relativ schwach ist.

## 4.2. mRNA- und Proteinexpression von CMG2 in Zelllinien

### 4.2.1. mRNA-Expression von CMG2

Der Nachweis von CMG2-mRNA wurde bereits in Plazentagewebe erbracht, es ist bisher aber ungeklärt, ob auch in den frühen Stadien der Plazentation eine CMG2-Expression in den Zellen vorliegt. Als Modellsystem wurde daher das Vorhandensein von CMG2-RNA sowie die Expressionsstärke in den o.g. drei Zelllinien überprüft, wobei die mRNA-Expression mittels quantitativer real-time-PCR gemessen wurde (Abbildung 5).



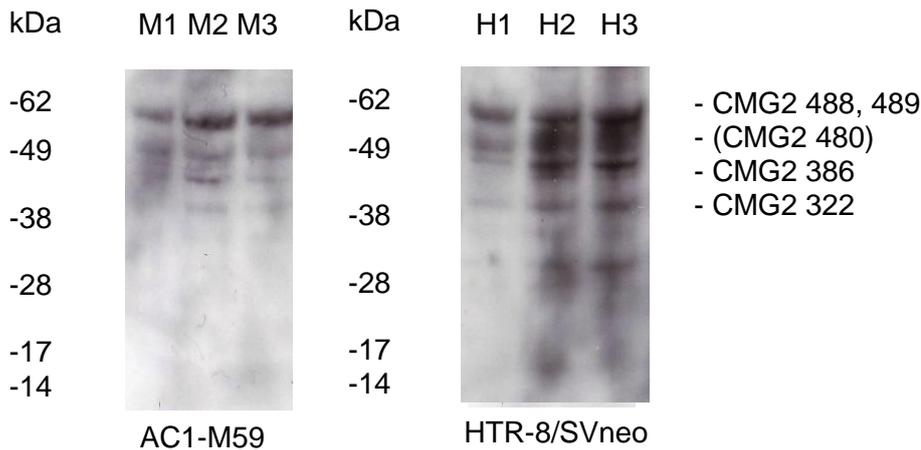
**Abbildung 5** Quantitative real-time-PCR-Messung der mRNA-Expression des CMG2 in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3. Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3.

Es ist zu erkennen, dass CMG2 in den Zellen HTR-8/SVneo im Vergleich zu der Zelllinie AC1-M59 zweimal und bezüglich JEG-3 viermal höher exprimiert wird ( $\Delta\text{Ct}$ -Mittelwert=0,339). Die zweithöchste Expression ist mit einem  $\Delta\text{Ct}$ -Mittelwert=0,168 bei AC1-M59 zu erkennen. JEG-3 weist die niedrigste CMG2-Expression der untersuchten Zelllinien auf ( $\Delta\text{Ct}$ -Mittelwert=0,078).

Insgesamt zeigt somit die Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo eine stärkere CMG2-mRNA-Expression als die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3, wobei die Expressionsstärke von AC1-M59 als Fusionszelllinie aus Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen zwischen denen der anderen beiden Zelllinien liegt.

#### 4.2.2. Nachweis des CMG2-Proteins

Die Identifikation des CMG2-Proteins aus einem Proteingemisch erfolgte mittels Western Blot in den Zelllinien AC1-M59 und HTR-8/SVneo mit jeweils drei Probenaufftrennungen. In der Zelllinie JEG-3 war das CMG2-Protein nicht in ausreichender Qualität mittels Western-Blot darstellbar.



**Abbildung 6** Western Blot.

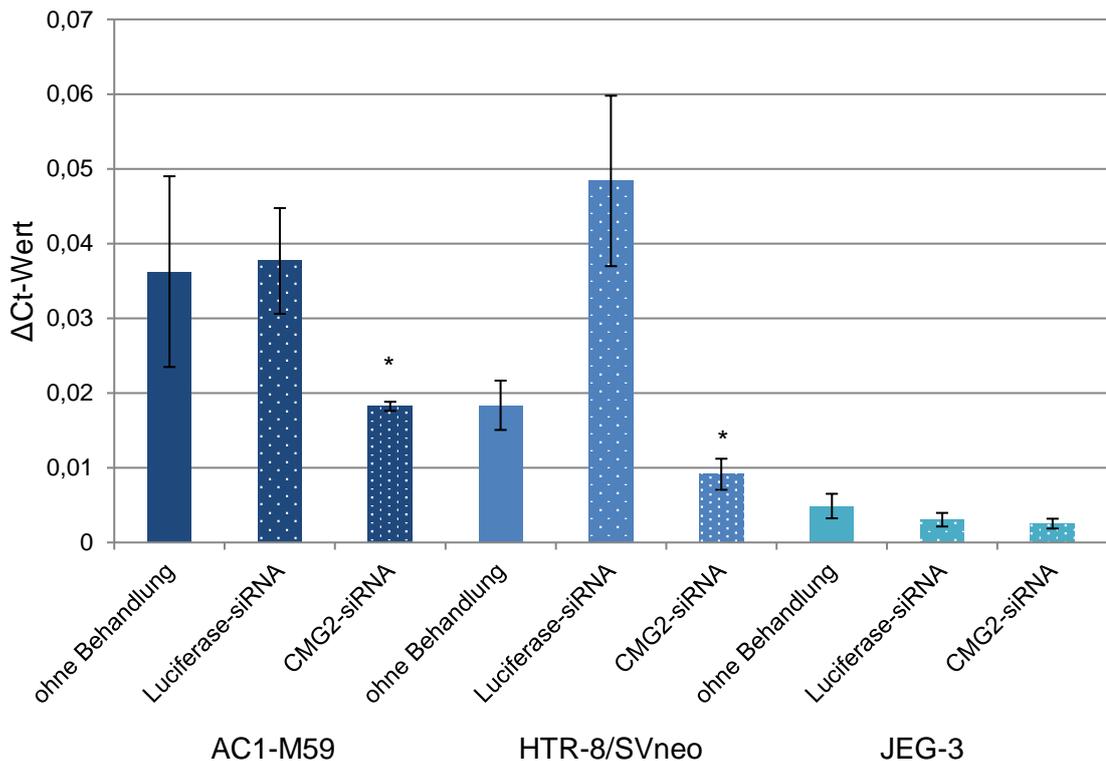
Nachweis des 54 kDa großen CMG2-Proteins in den Zellen AC1-M59 und HTR-8/SVneo. Daneben Detektion von bekannten Splicevarianten.

M1-M3 Proteinproben 1-3 der Zelllinie AC1-M59, H1-H3 Proteinproben 1-3 der Zelllinie HTR-8/SVneo.

Die zu erwartende Masse der Volllängenvariante des CMG2-Proteins liegt bei 54 kDa (Protein-Datenbank <http://www.uniprot.org/uniprot/P58335>). Der Western Blot zeigt in beiden Zelllinien deutliche Banden in diesem Bereich (Abbildung 6). Daneben sind Banden bei ca. 38, 45 und 50 kDa nachweisbar. Diese stellen wahrscheinlich die bekannten Splicevarianten von CMG2 dar. Die Masse von CMG2 322 beträgt 35 kDa. Die Variante CMG2 386 wird bei 43 kDa erwartet. Die zuletzt beschriebene Isoform CMG2 480 kann mit einer geschätzten Masse (480 Aminosäuren x 110 Da) bei 53 kDa erwartet werden. Insgesamt zeigten sich bei konstanter Belichtungszeit schwächere Banden bei den drei unabhängigen Proben aus der Zelllinie AC1-M59 als bei den drei Proben aus der Zelllinie HTR-8/SVneo. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung zu den Daten der CMG2-mRNA-Expressionsmessung, die ebenfalls auf eine schwächere CMG2-Expression in der Fusionszelllinie AC1-M59 hindeuteten.

### 4.3. CMG2-Knockdown mittels siRNA

Um auf wichtige Funktionen von CMG2 in den Zellen schließen zu können, wurde ein Knockdown mittels CMG2-siRNA durchgeführt. Nach einer Behandlung der Zelllinien über 24 Stunden erfolgte die Messung der CMG2-mRNA-Expression zur Erfolgskontrolle (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Quantitative real-time-PCR der mRNA-Expression des CMG2 in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 nach CMG2-Knockdown mittels CMG2-siRNA. Daneben CMG2-mRNA-Expressionen der Zellen ohne Behandlung und nach Behandlung mit Luciferase-siRNA als Negativkontrolle. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 6, T-Test, \* $p < 0,05$ .

In der Zelllinie AC1-M59 ist die CMG2-mRNA-Expression bei einer Behandlung mit CMG2-siRNA signifikant zweifach niedriger als bei der Transfektion mit Luciferase-siRNA als Kontroll-siRNA ( $p = 0,001$ ; T-Test).

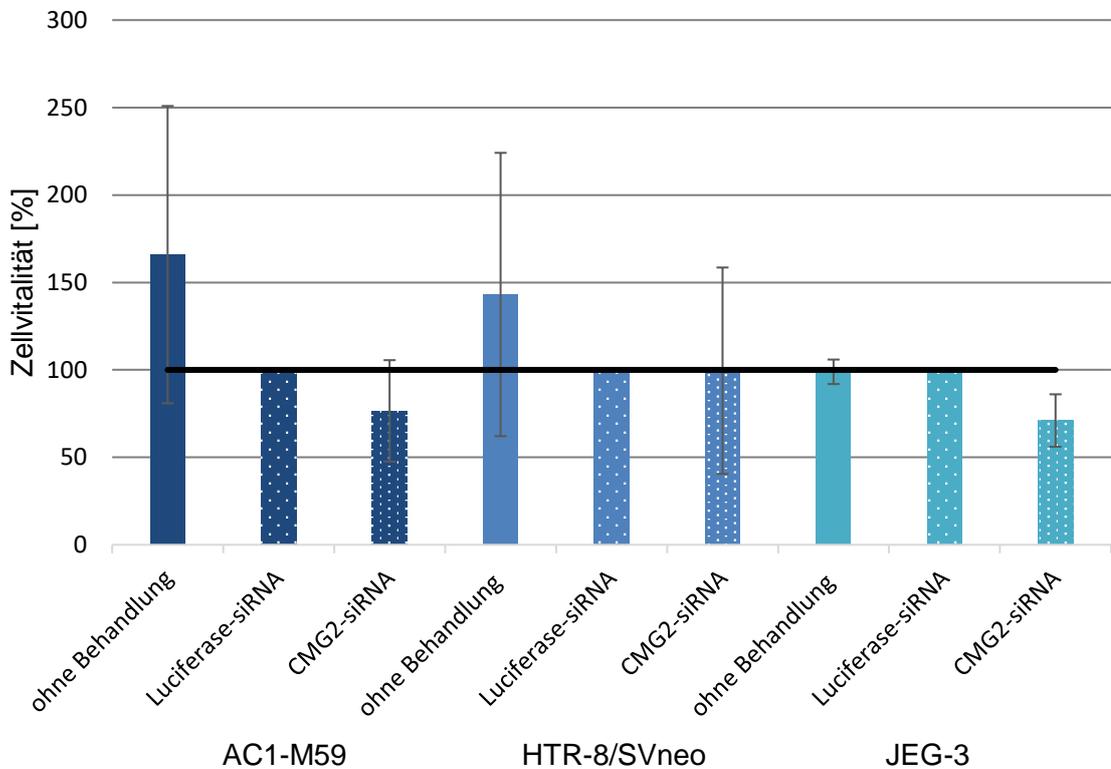
Bei den Zellen HTR-8/SVneo ist ein ähnliches Ergebnis zu beobachten. Die mRNA-Expression sinkt signifikant um das Fünffache bei einem Knockdown des CMG2-Gens durch die Behandlung mit CMG2-siRNA im Vergleich zur Negativkontrolle ( $p = 0,0003$ , T-Test). Allerdings ist die Expression bei der Behandlung mit Luciferase-siRNA im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung erhöht.

In den Zellen JEG-3 ist kein signifikanter Unterschied der CMG2-mRNA-Expression bei der Transfektion mit CMG2-siRNA und Luciferase-siRNA zu erkennen ( $p= 0,283$ , T-Test). Im Vergleich zu den Zellen ohne Behandlung ist die Expression der CMG2-mRNA in den Zellen nach der Behandlung mit CMG2-siRNA und Luciferase-siRNA verringert.

Zur Erfolgskontrolle des CMG2-Knockdown auf Proteinebene wurde ein Western Blot durchgeführt. Es wurden Proteinproben aller drei Zelllinien von Zellen ohne Behandlung, nach Behandlung mit Luciferase-siRNA und CMG2-siRNA aufgetragen. Der Western Blot lieferte ein unspezifisches Ergebnis und konnte einen CMG2-Knockdown auf Proteinebene nicht zweifelsfrei darstellen (Daten nicht gezeigt).

### 4.3.1. Vitalitäts-Assay

Der Einfluss eines CMG2-Knockdown auf die Zellvitalität wurde mittels Anfärbung vitaler Zellen durch Sulforhodamin B-Assay bestimmt (Abbildung 8).



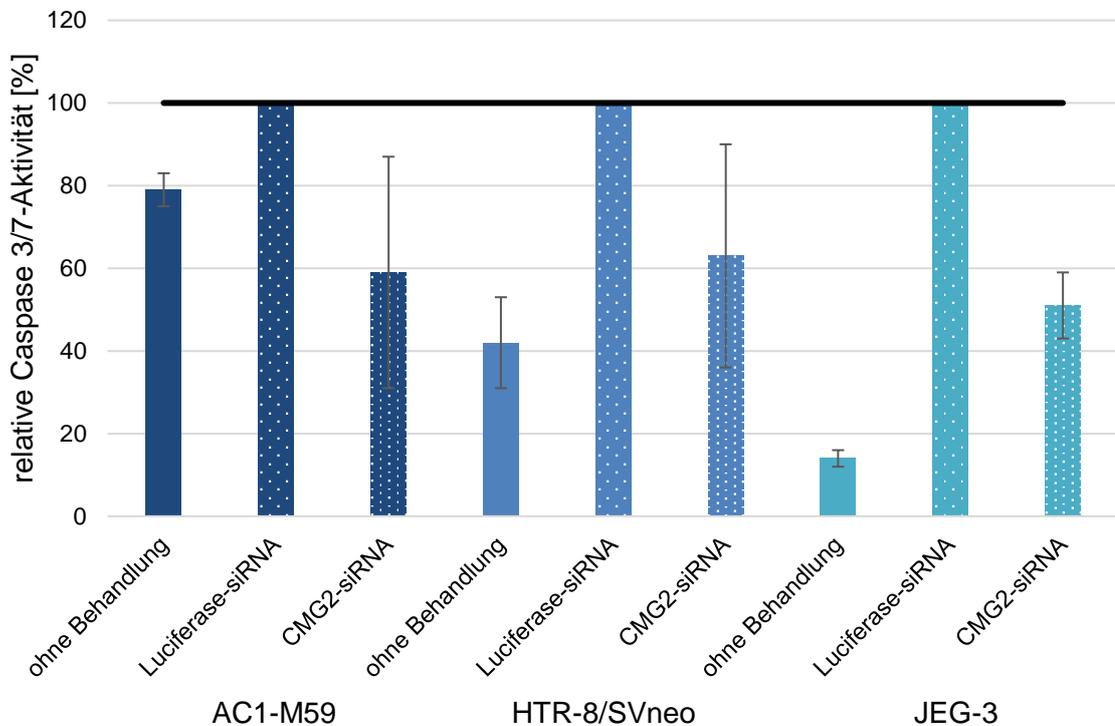
**Abbildung 8** Sulforhodamin B-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8 und JEG-3 nach der Behandlung mit CMG2-siRNA. Die Behandlung mit Luciferase-siRNA als Negativkontrolle ist auf 100% und damit als Basiswert gesetzt (schwarze Linie). Daneben die relative Vitalität ohne Behandlung. Werte <100% entsprechen einer verringerten und >100% einer erhöhten Vitalität. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, T-Test.

In den Zelllinien AC1-M59 und JEG-3 ist die Tendenz einer geringfügig verringerten Zellvitalität nach CMG2-siRNA-Behandlung zu beobachten. Es besteht jedoch keine statistische Signifikanz. Die Kontrollen ohne Behandlung weisen in AC1-M59 und HTR-8/SVneo eine Erhöhung der Anzahl vitaler Zellen um 66% bzw. 43% im Vergleich zur Behandlung mit der Luciferase-siRNA als Negativkontrolle auf.

Zusammenfassend zeigt das Assay keinen signifikanten Einfluss eines Knockdown von CMG2 auf die Vitalität der Zellen bei allen drei Zelllinien ( $p=0,502$  bei AC1-M59,  $p=0,993$  bei HTR-8/SVneo und  $p=0,568$  bei JEG-3, T-Test).

### 4.3.2. Apoptose-Assay

Um die Wirkung der siRNA-Behandlung im Hinblick auf die Apoptoseinduktion der Zelllinien zu untersuchen, erfolgte ein Apoptose-Assay, in dem die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen wird (Abbildung 9).



**Abbildung 9** Caspase3/7-Assay zur Analyse der Apoptoseinduktion in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 nach CMG2-Knockdown. Die Behandlung mit Luciferase-siRNA als Negativkontrolle ist auf 100% und damit als Basiswert gesetzt (schwarze Linie). Daneben die Apoptoserate ohne Behandlung. Werte <100% entsprechen einer verringerten und >100% einer erhöhten Apoptose. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, T-Test.

Die Zellen zeigen nach der Transfektion mit CMG2-siRNA eine im Vergleich zur Negativkontrolle tendenziell abnehmende Apoptoserate, die jedoch nicht signifikant ist. Es ist eine erhöhte Caspaseaktivität bei der Behandlung mit Luciferase-siRNA verglichen mit der Kontrolle ohne Behandlung bei allen Zellreihen festzustellen.

Insgesamt ist kein signifikanter Unterschied in der Apoptoseinduktion bei einem CMG2 Knockdown bei allen Zelllinien zu erkennen ( $p=0,341$  bei AC1-M59,  $p=0,468$  bei HTR-8/SVneo,  $p=0,051$  bei JEG-3, T-Test).

Zusammenfassend zeigt sich, dass ein Knockdown von CMG2 keinen Einfluss auf die Zellvitalität und die Apoptoseinduktion in den Zellen hat.

#### 4.4. CMG2-Expression im Serum von Kinderwunschpatientinnen

Bei 76 Kinderwunschpatientinnen im Alter von 24 bis 42 Jahren (durchschnittliches Alter 33 Jahre) wurde die Konzentration des CMG2-Proteins im Blutserum am achten Zyklustag der Infertilitätsbehandlung und in der zweiten Woche nach dem Embryonentransfer (potenzielle vierte Schwangerschaftswoche) mittels eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens (ELISA) bestimmt. Bei 20 Patientinnen war es möglich, eine CMG2-Konzentration oberhalb der Nachweisgrenze ( $\geq 5$  pg/ml) in der fünften und achten Woche der Infertilitätsbehandlung zu ermitteln. Der CMG2-Protein-Spiegel konnte in pg/ml quantifiziert werden. Auch die 10 Patientinnen, bei denen die Expression des CMG2-Proteins im Blutserum unter der Nachweisgrenze lag, wurden in die statistischen Berechnungen mit einbezogen.

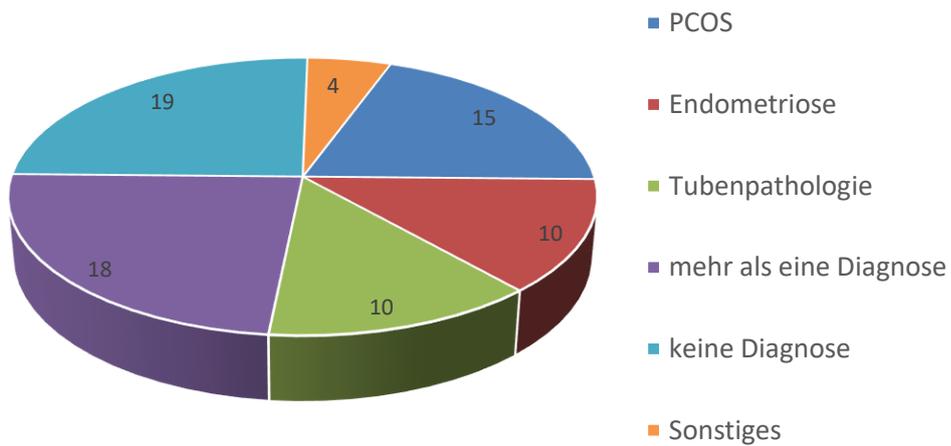
**Tabelle 4** Demographische Angaben der Patientinnen.

	Mittelwert	Minimum - Maximum	n
<b>Alter (Jahre)</b>	32,5	24 - 42	76
<b>Dauer des unerfüllten Kinderwunsches (Jahre)</b>	4,7	1 - 14	76
<b>Gewicht (kg)</b>	68,1	46 - 106	76
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24,9	18 - 41,4	76

**Tabelle 5** Untersuchter ART-Zyklus.

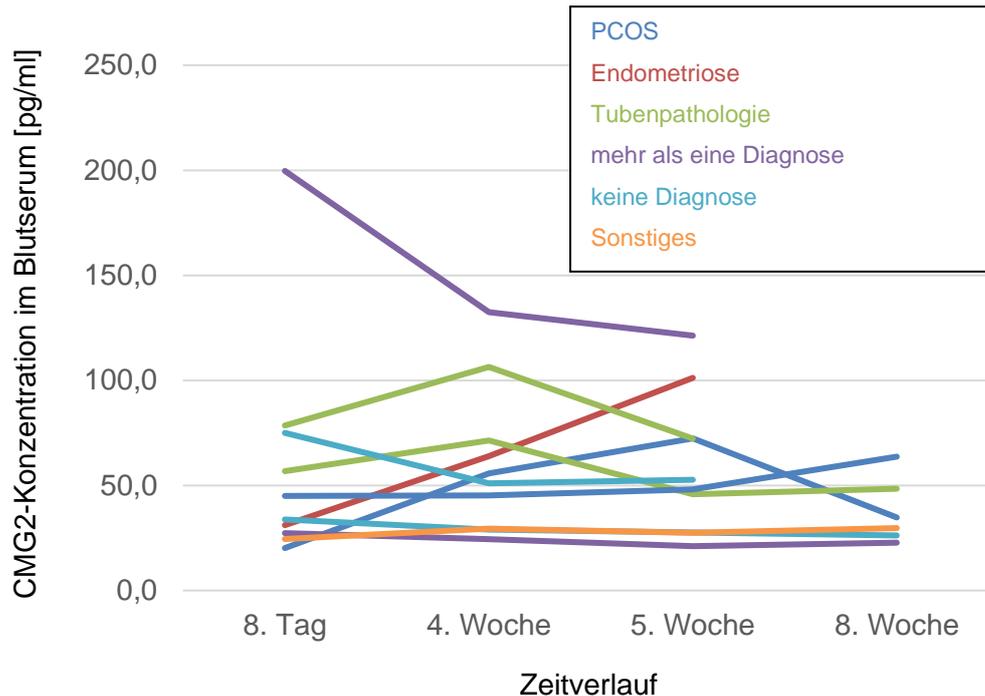
	Mittelwert	Minimum - Maximum	n
<b>Punktierte Oozyten</b>	11,1	3 - 25	76
<b>Fertilisationsrate (%)</b>	50,7	13 - 100	76
<b>Transferierte Embryonen</b>	2,3	1 - 3	76

Für die statistische Analyse wurden die 76 Frauen anhand ihrer Diagnosen in Gruppen eingeteilt. 15 Patientinnen litten an dem Polyzystischen Ovar-Syndrom. 10 Frauen wiesen eine Endometriose auf. Bei 10 Patientinnen wurde eine Tubenpathologie diagnostiziert. 18 Frauen erhielten mehr als eine reproduktionsmedizinisch relevante Diagnose. 19 Patientinnen hatten keine bekannten Vorerkrankungen. 4 Frauen ließen sich bei Erkrankungen ohne physiologischen Bezug zur Unfruchtbarkeit (z.B. psychische Erkrankungen) keiner der o.g. Gruppen zuordnen und wurden zu Sonstiges gezählt (Abbildung 10).



**Abbildung 10** Zusammensetzung der Diagnosegruppen.

Der CMG2-Protein-Spiegel im Blutserum wurde am achten Tag des Menstruationszyklus, in der vierten und zum Teil fünften und achten Woche während der Infertilitätsbehandlung bestimmt. Abbildung 11 zeigt beispielhaft den Verlauf der gemessenen CMG2-Protein-Konzentrationen bei je zwei Patientinnen (mit Ausnahme der Diagnosen Endometriose und Sonstiges) der o.g. Diagnosegruppen von dem achten Tag bis zur achten Behandlungswoche.

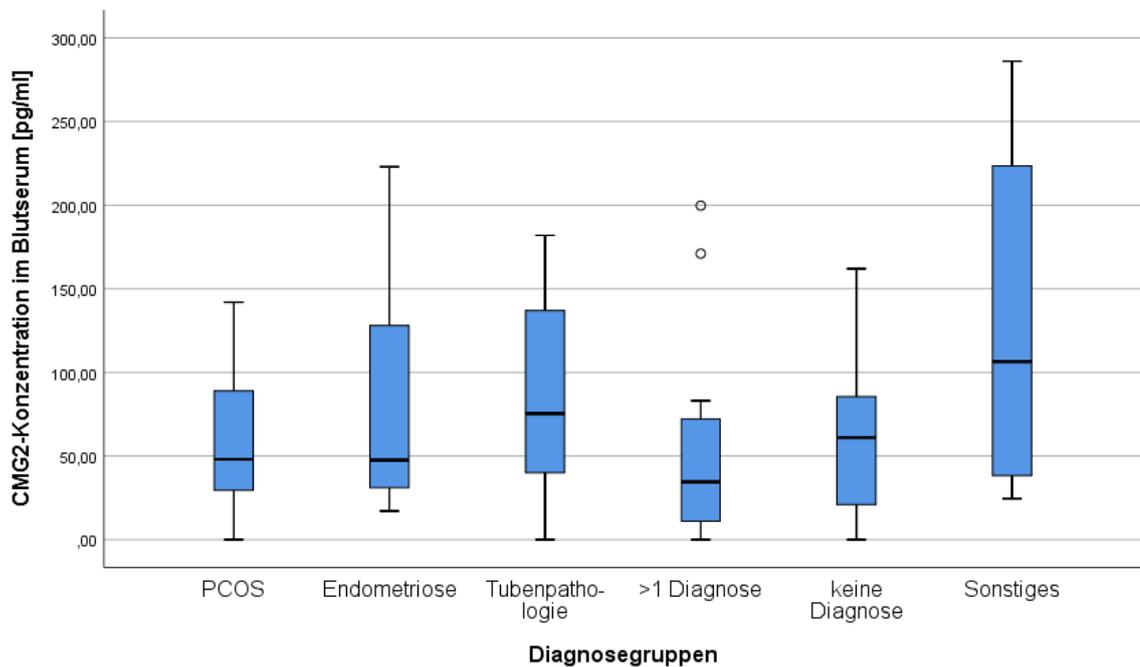


**Abbildung 11** Verlauf der CMG2-Serumkonzentration von dem achten Tag bis zur achten Behandlungswoche bei Kinderwunschpatientinnen mit verschiedenen Diagnosen.

Es ist zu erkennen, dass die CMG2-Konzentrationen der Frauen unabhängig von ihren Diagnosen ein individuelles Level aufweisen und teilweise Schwankungen im Verlauf unterliegen.

Am achten Tag der Infertilitätsbehandlung wurde bei 76 Frauen die Konzentration von CMG2 im Blutserum bestimmt. Bei 15 Patientinnen mit dem Polyzystischen Ovar-Syndrom lag die mittlere Konzentration bei 57,82 pg/ml. Der Medianwert betrug 48 pg/ml. Der Mittelwert des CMG2-Protein-Spiegels der 10 Endometriosepatientinnen lag zum Zeitpunkt der Blutabnahme am achten Tag bei 84,72 pg/ml. Der Median wurde mit 47,5 pg/ml bestimmt. Der mittlere CMG2-Spiegel der 10 Frauen mit einer Tubenpathologie wurde mit 86,47 pg/ml gemessen. Der Median lag bei 75,45 pg/ml.

Bei 18 Patientinnen konnte mehr als eine Diagnose gestellt werden. Am achten Tag der Behandlung lag ihre mittlere CMG2-Konzentration im Blut bei 51,62 pg/ml (Medianwert 34,5 pg/ml). Der CMG2-Protein-Spiegel betrug bei Frauen ohne Vorerkrankungen (n=19) im Mittel 61,48 pg/ml, der Medianwert 61 pg/ml. Die 4 Frauen mit reproduktionsmedizinisch nicht eindeutig relevanten Diagnosen wiesen einen CMG2-Mittelwert von 130,88 pg/ml und einen Medianwert von 106,5 pg/ml auf (Abbildung 12).

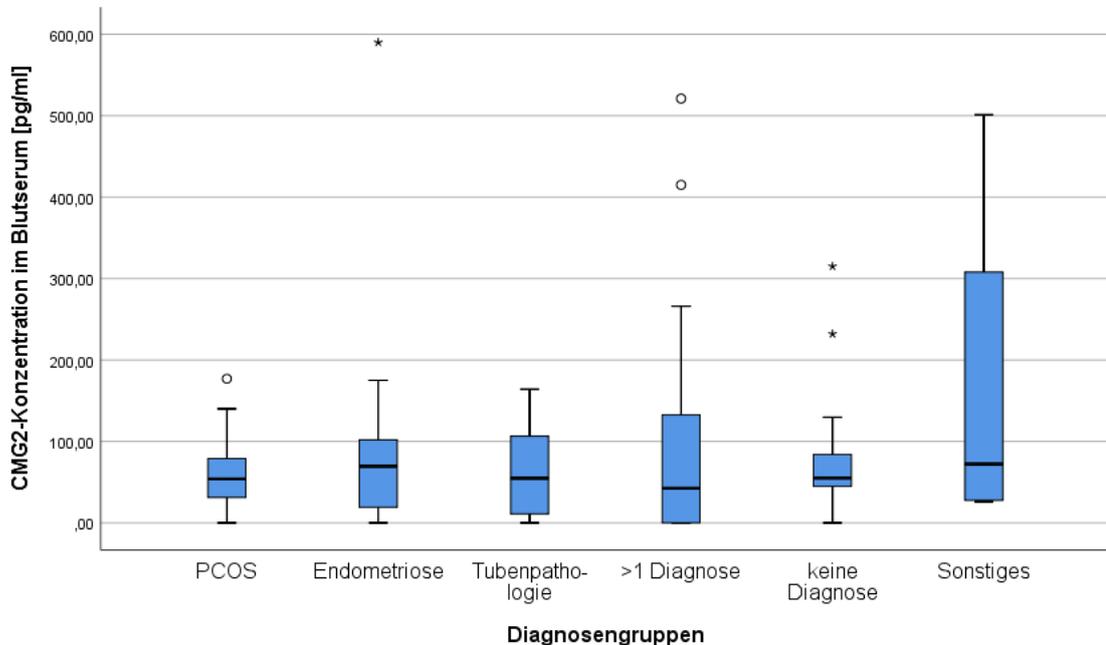


**Abbildung 12** CMG2-Konzentrationen am achten Tag im Blutserum von 76 Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit ihrer Diagnosen. In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Statistisch besteht kein signifikanter Unterschied bei den am achten Tag im Menstruationszyklus gemessenen CMG2-Protein-Werten zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen. ( $p=0,48$ , Kruskal-Wallis-Test).

Zudem wurden bei 74 Frauen CMG2-Konzentrationsmessungen in der zweiten Woche nach dem Embryonentransfer (potenzielle vierte Schwangerschaftswoche) durchgeführt. 15 Patientinnen mit dem Polyzystischen Ovar-Syndrom wiesen zu diesem Zeitpunkt einen mittleren CMG2-Serumspiegel von 63,29 pg/ml auf. Der Median lag bei 54 pg/ml. Bei 10 Frauen mit der Diagnose Endometriose wurde ein Mittelwert der CMG2-Konzentration von 117,52 pg/ml (Median 69,5 pg/ml) bestimmt. In der vierten Woche konnte bei 10 Patientinnen mit einer Tubenpathologie ein mittlerer CMG2-Wert von 60,44 pg/ml und ein Medianwert von 54,8 pg/ml gemessen werden. Bei 18 Frauen mit mehr als einer Diagnose betrug die mittlere CMG2-Konzentration zu diesem Zeitpunkt 109,94 pg/ml. Der Medianwert lag bei 42,5 pg/ml. Der CMG2-Serumspiegel von 19 Frauen in der potenziell vierten Schwangerschaftswoche ohne Vorerkrankungen sollte bestimmt werden. 2 Blutproben dieser Frauen lagen leider

nicht vor. Der Mittelwert der CMG2-Konzentration von den 17 Patientinnen war 82,04 pg/ml und der Medianwert 55 pg/ml. Die mittlere Konzentration des CMG2-Proteins im Blut der 4 Patientinnen mit sonstigen Diagnosen betrug in der vierten Behandlungswoche 167,85 pg/ml und der Median 72,2 pg/ml (Abbildung 13).

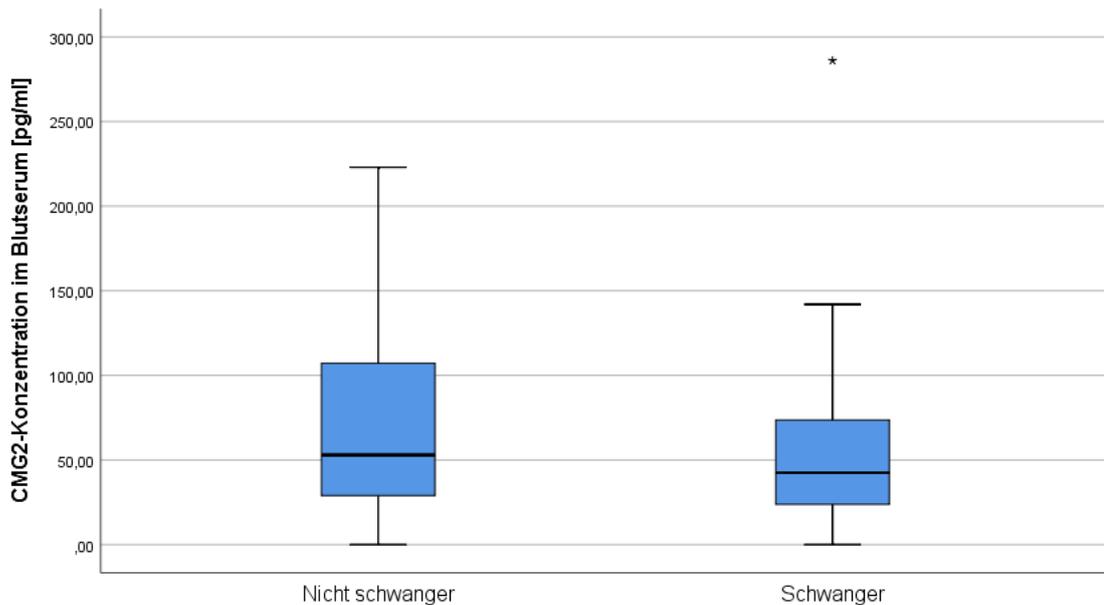


**Abbildung 13** CMG2-Konzentrationen in der vierten Behandlungswoche im Blutserum von 74 Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit ihrer Diagnosen. In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der CMG2-Blutspiegel in Abhängigkeit der Diagnosen in der vierten Woche der Infertilitätsbehandlung ermittelt werden ( $p=0,958$ , Kruskal-Wallis-Test). Auch bei den Patientinnen in der fünften und achten Woche der Behandlung war kein signifikanter Unterschied zwischen den CMG2-Konzentrationen der Diagnosegruppen feststellbar ( $p=0,759$  für die fünfte Woche,  $p=0,511$  für die achte Woche, Kruskal-Wallis-Test).

Darüber hinaus wurde die Konzentration des CMG2-Proteins im Blutserum der Patientinnen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer Schwangerschaft zu den o.g. Zeitpunkten untersucht. Bei 74 Frauen lagen uns Informationen zum Behandlungsverlauf vor. 50 Patientinnen sind durch die Infertilitätsbehandlung nicht schwanger geworden. Bei 24 Frauen konnte eine Schwangerschaft im Verlauf

festgestellt werden. Die Bestimmung der CMG2-Serumkonzentration bei schwangeren und nicht schwangeren Patientinnen am achten Tag der Behandlung ergab eine mittlere Proteinkonzentration von 72,78 pg/ml und einen Medianwert von 53 pg/ml bei nicht schwangeren Frauen. Im Vergleich dazu war der Mittelwert des CMG2-Spiegels bei Patientinnen, bei denen eine Schwangerschaft festgestellt wurde, mit 59,51 pg/ml niedriger als bei nicht schwangeren Frauen. Der Median lag bei 42,5 pg/ml (Abbildung 14).



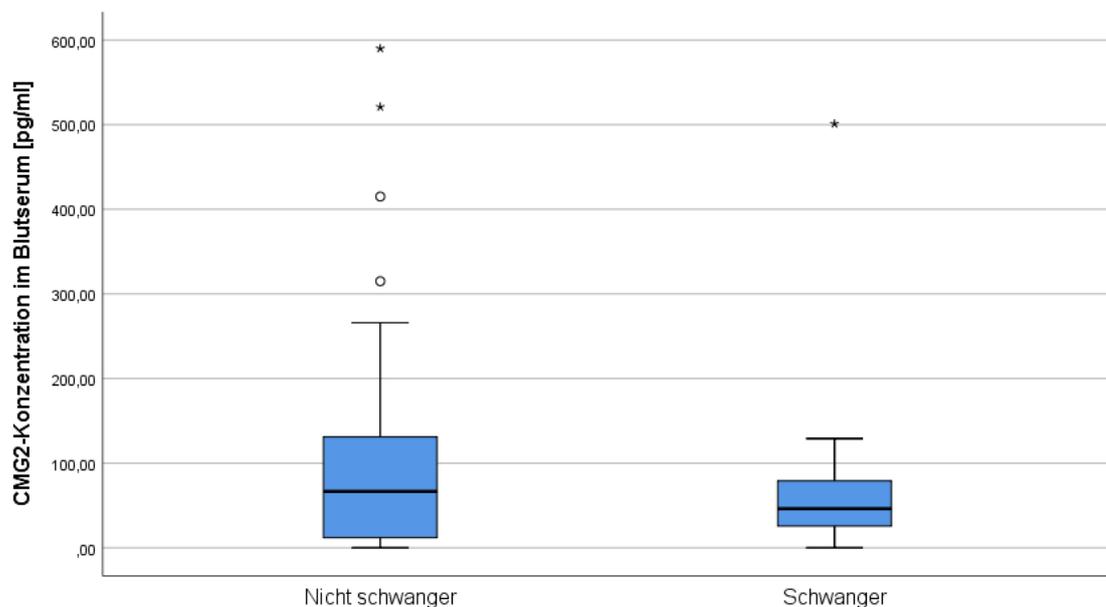
**Abbildung 14** CMG2-Konzentrationen am achten Tag im Blutserum von 74 Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Schwangerschaft.

In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Dennoch konnte kein signifikanter Unterschied der CMG2-Spiegel im Blutserum zwischen den untersuchten schwangeren und nicht schwangeren Kinderwunschpatientinnen am achten Tag der Infertilitätsbehandlung nachgewiesen werden ( $p=0,343$ , Mann-Whitney-U-Test).

Zum Blutabnahmezeitpunkt in der vierten Behandlungswoche waren 2 Blutproben von im Verlauf nicht schwanger gewordenen Patientinnen nicht vorhanden. Die 48 nicht schwangeren Frauen wiesen in der vierten Woche einen Mittelwert der CMG2-Werte

von 105,31 pg/ml auf. Als Median wurde 66,5 pg/ml bestimmt. Im Vergleich dazu betrug die mittlere CMG2-Konzentration zu diesem Zeitpunkt bei den 24 Schwangeren 67,84 pg/ml. Der Medianwert lag bei 46,1 pg/ml. Damit zeigen sich niedrigere CMG2-Serumkonzentrationen bei schwangeren Patientinnen als bei nicht schwangeren Frauen in der vierten Woche der Behandlung. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,26$ , Mann-Whitney-U-Test, Abbildung 15).

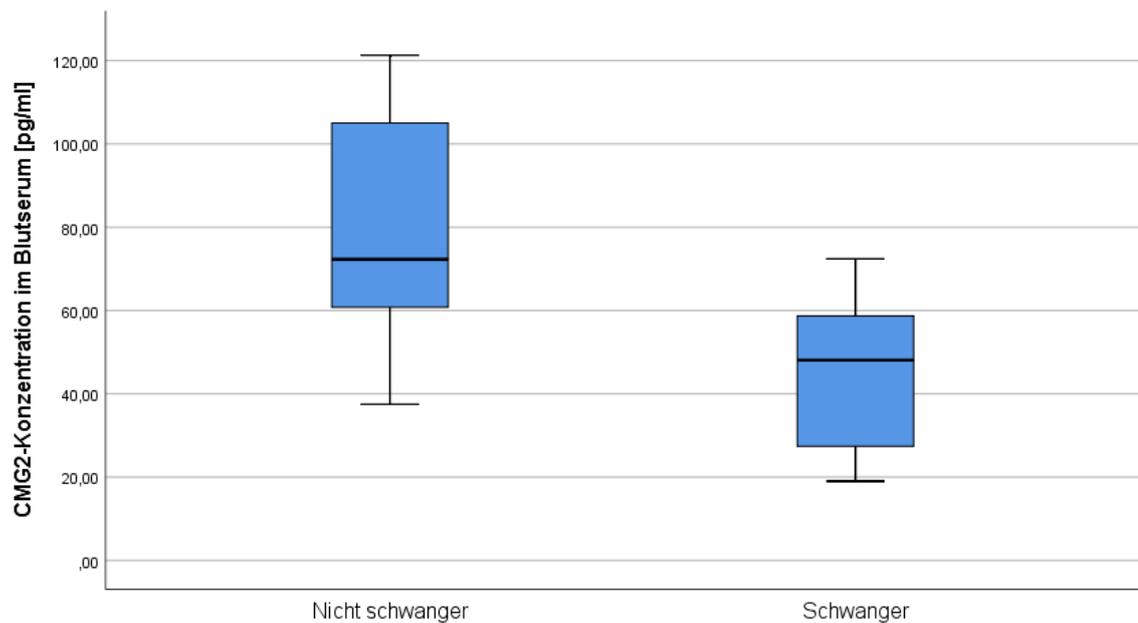


**Abbildung 15** CMG2-Konzentrationen in der vierten Behandlungswoche im Blutserum von 72 Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Schwangerschaft.

In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Bei 18 Kinderwunschpatientinnen konnten Blutproben in der fünften Woche der Infertilitätsbehandlung (potenzielle fünfte Schwangerschaftswoche) untersucht werden. 9 der Patientinnen wurden im Verlauf nicht schwanger. Bei 9 Frauen konnte eine Schwangerschaft nachgewiesen werden.

Die mittlere CMG2-Konzentration der nicht schwangeren Patientinnen betrug 79,77 pg/ml. Der Medianwert lag bei 72,3 pg/ml. Schwangere wiesen einen Mittelwert von 43,93 pg/ml und einen Median von 48,1 pg/ml auf. In der fünften Woche zeigt sich somit ein signifikant erniedrigter CMG2-Protein-Spiegel bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Patientinnen ( $p=0,024$ , Mann-Whitney-U-Test, Abbildung 16).

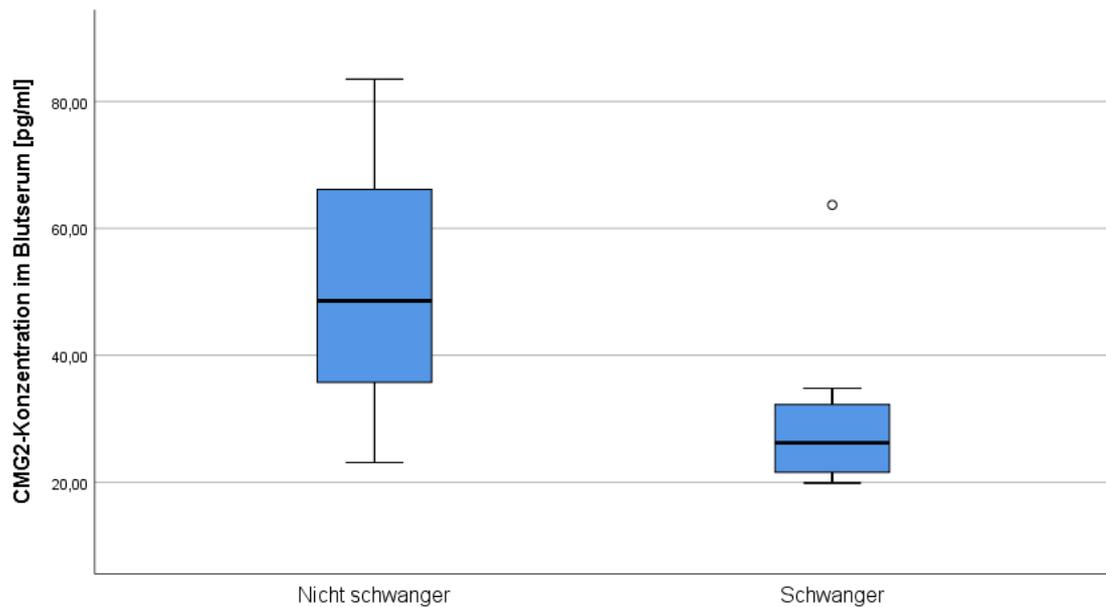


**Abbildung 16** CMG2-Konzentrationen in der fünften Behandlungswoche im Blutserum von 18 Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Schwangerschaft.

In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Von 11 Patientinnen waren Blutproben in der achten Behandlungswoche vorhanden. Davon waren 4 Frauen nicht schwanger und 7 schwanger. Bei den nicht schwangeren Patientinnen konnte ein mittlerer CMG2-Serumspiegel von 50,95 pg/ml gemessen werden. Der Medianwert betrug 48,6 pg/ml.

Die schwangeren Frauen haben einen im Vergleich niedrigeren CMG2-Mittelwert von 31,06 pg/ml und einen Median von 26,2 pg/ml geboten (Abbildung 17).



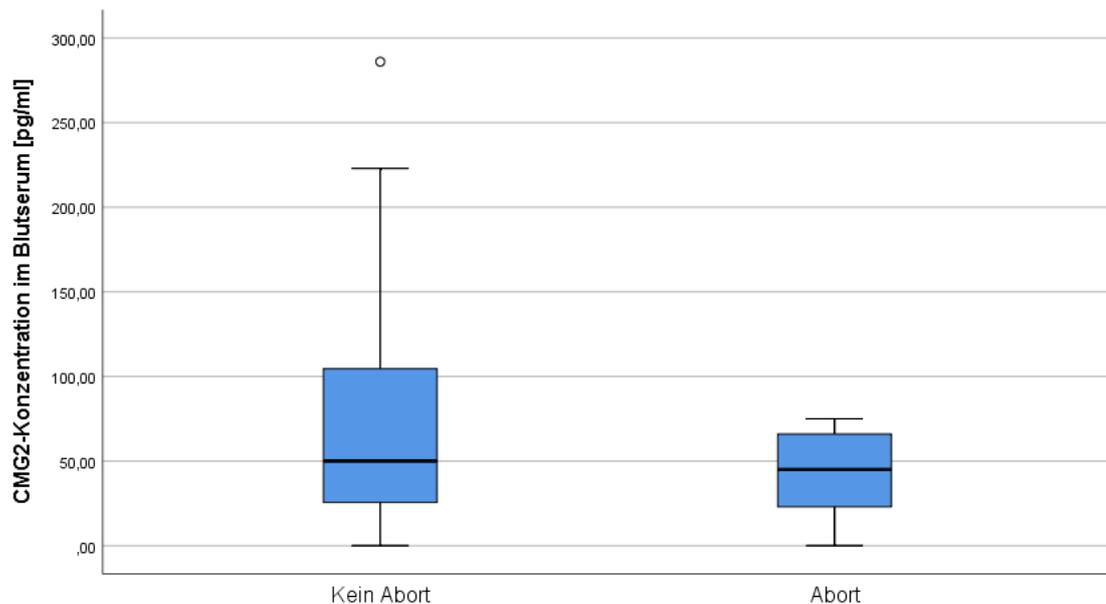
**Abbildung 17** CMG2-Konzentrationen in der achten Behandlungswoche im Blutserum von 11 Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Schwangerschaft.

In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Dennoch weisen die gemessenen CMG2-Serumkonzentrationen keinen signifikanten Unterschied bei schwangeren und nicht schwangeren Patientinnen in der achten Woche auf ( $p=0,131$ , Mann-Whitney-U-Test).

Weiterhin konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der CMG2-Konzentration im Blutserum und dem Auftreten von Aborten zu verschiedenen Zeitpunkten geprüft werden.

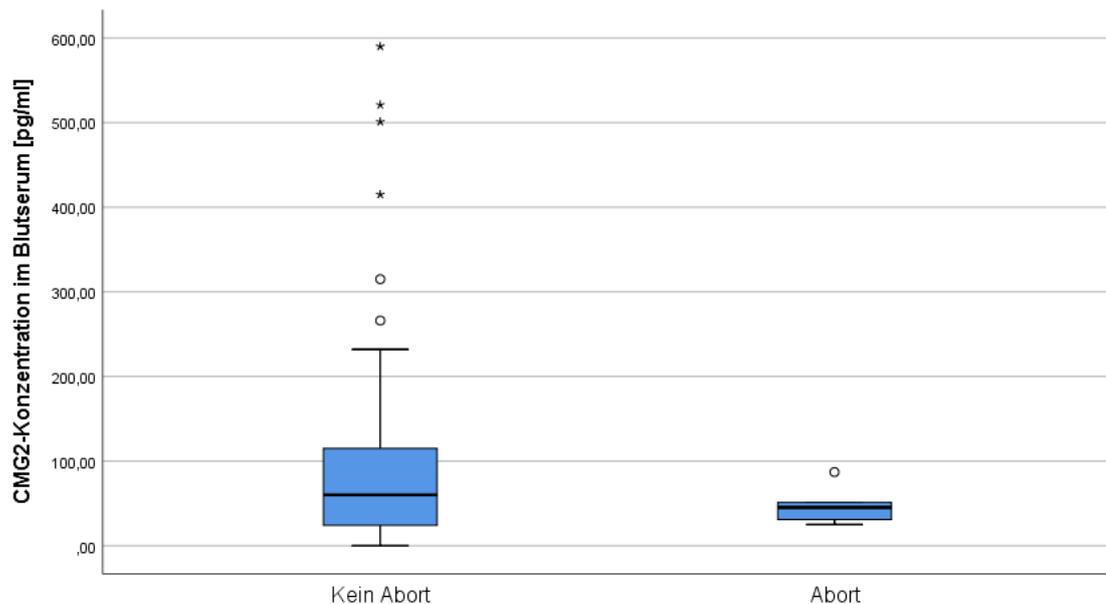
Bei 74 Patientinnen konnten Blutproben vom achten Tag der Infertilitätsbehandlung im Zusammenhang zum Auftreten eines Aborts untersucht werden. Bei 69 Frauen trat kein Abort auf. Ihr mittlerer CMG2-Serumspiegel lag bei 70,3 pg/ml. Der Median wurde mit 50 pg/ml berechnet. 5 Schwangere erlitten einen Abort. Ihr CMG2-Mittelwert betrug 41,8 pg/ml und der Medianwert 45 pg/ml (Abbildung 18).



**Abbildung 18** CMG2-Konzentrationen am achten Tag im Blutserum von 74 Kinderwunschpatientinnen im Zusammenhang zum Auftreten eines Aborts. In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied in den CMG2-Konzentrationen in Abhängigkeit des Eintretens von einem Abort am achten Tag der Behandlung ( $p=0,425$ , Mann-Whitney-U-Test).

Blutproben der vierten Behandlungswoche von 69 Patientinnen ohne Abort und von 5 Frauen mit einer Fehlgeburt konnten vermessen werden. Der CMG2-Mittelwert von Frauen ohne Abort betrug 94,71 pg/ml und der Medianwert 60 pg/ml. Patientinnen, die einen Abort erlitten haben, wiesen eine niedrigere mittlere CMG2-Konzentration von 47,84 pg/ml auf. Der Median lag bei 45,2 pg/ml. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,582$ , Mann-Whitney-U-Test, Abbildung 19).



**Abbildung 19** CMG2-Konzentrationen in der vierten Behandlungswoche im Blutserum von 74 Kinderwunschpatientinnen im Zusammenhang zum Auftreten eines Aborts. In der Box liegen 50% der Daten. Der Querstrich innerhalb der Box entspricht dem Median der CMG-Konzentration der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren den Wertebereich, in dem 95% aller Werte liegen. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt.

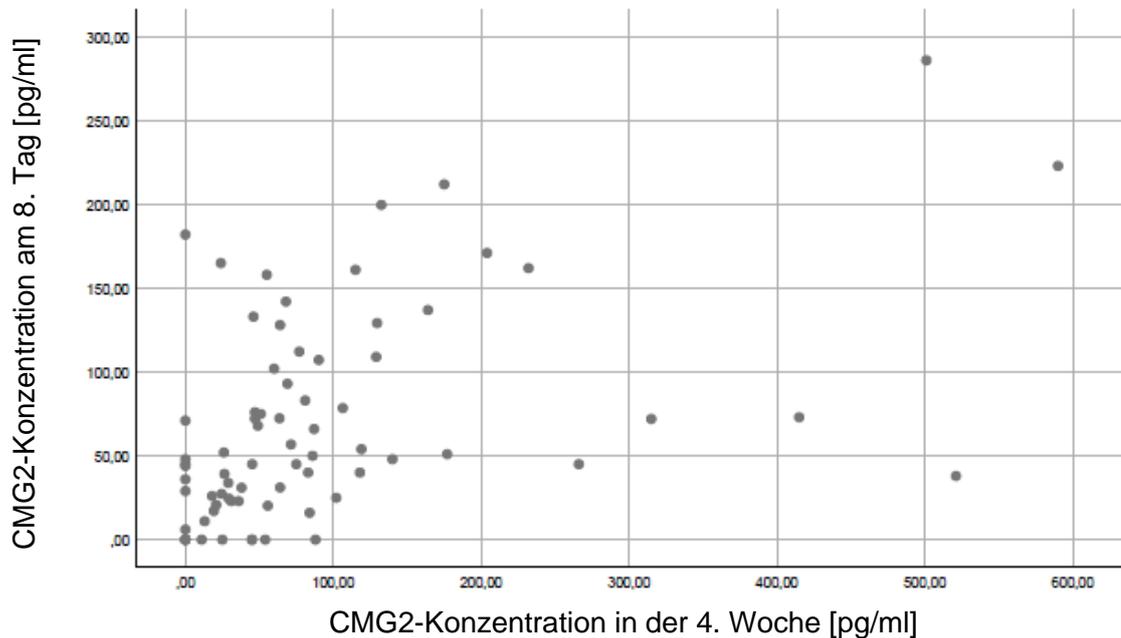
Die ermittelten CMG2-Konzentrationen im Blutserum von Patientinnen in der fünften und achten Woche der Infertilitätsbehandlung zeigten ebenso keinen statistisch signifikanten Unterschied im Zusammenhang zum Auftreten von Aborten ( $p=0,574$  für die fünfte Woche,  $p=0,206$  für die achte Woche, Mann-Whitney-U-Test).

Der Vergleich der gemessenen CMG2-Protein-Konzentrationen zu den verschiedenen Blutabnahmezeitpunkten erfolgte mit bivariaten Korrelationsanalysen (Spearman-Rho). Der Korrelationskoeffizient R und die dazu gehörenden Signifikanzwerte sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6** Rangkorrelation nach Spearman-Rho.

	4. Woche			5. Woche			8. Woche		
	n	R	p	n	R	p	n	R	p
8. Tag	74	0,532	0,000	18	0,593	0,009	11	0,636	0,035
4. Woche				16	0,841	0,000	9	0,95	0,000
5. Woche							10	0,867	0,001

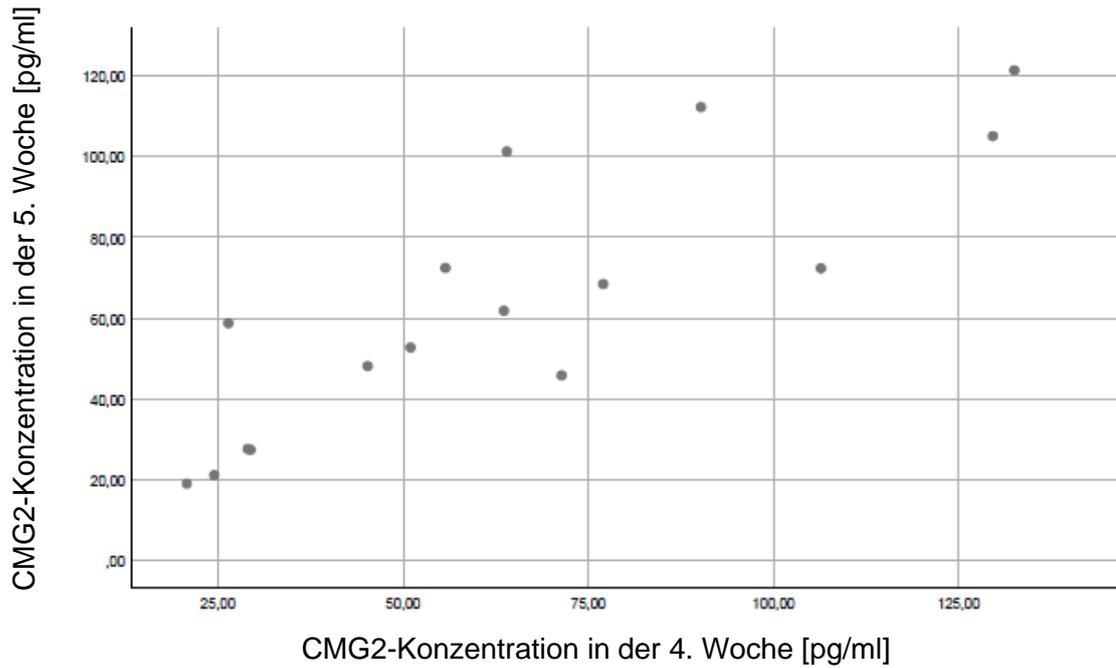
Es zeigt sich eine signifikant positive Korrelation zwischen den Messwerten am achten Tag und in der vierten Behandlungswoche ( $R=0,532$ ,  $p < 0,001$ , Abbildung 20).



**Abbildung 20** Korrelation der CMG2-Konzentrationen am achten Tag und in der vierten Behandlungswoche.

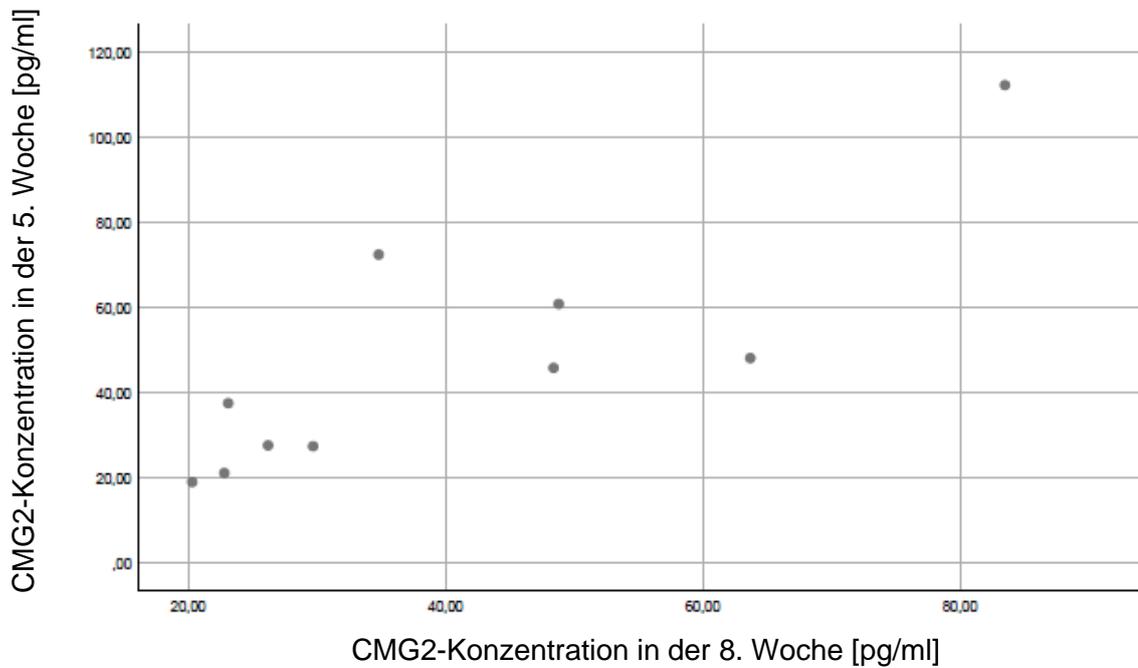
Die Korrelation der CMG2-Serumspiegel am achten Tag und in der fünften Woche ist mit  $R=0,593$  ebenfalls signifikant ( $p=0,009$ ). Die CMG2-Konzentrationen am achten Tag und in der achten Behandlungswoche korrelieren signifikant miteinander ( $R=0,636$ ,  $p=0,035$ ).

Eine signifikant hohe positive Korrelation ist zwischen den Werten in der vierten und fünften Woche der Behandlung zu sehen ( $R=0,841$ ,  $p<0,001$ , Abbildung 21).



**Abbildung 21** Korrelation der CMG2-Konzentrationen in der vierten und fünften Behandlungswoche.

Auch die Korrelation der Konzentrationen in der vierten und achten Behandlungswoche ist signifikant ( $R=0,95$ ,  $p<0,001$ ). Die CMG2-Spiegel in der fünften und achten Woche korrelieren mit  $R=0,867$  ebenfalls signifikant miteinander ( $p=0,001$ , Abbildung 22).



**Abbildung 22** Korrelation der CMG2-Konzentrationen in der fünften und achten Behandlungswoche.

Die Analyse der CMG2-Expression im Serum von Kinderwunschpatientinnen in Abhängigkeit ihrer Diagnosen zeigte keine signifikanten Unterschiede.

In der fünften Behandlungswoche wurde eine signifikant erniedrigte CMG2-Serumkonzentration bei schwangeren Patientinnen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen gemessen, eine ähnliche Verteilung war auch in der achten Woche detektierbar, wenn auch hier die Unterschiede nicht mehr signifikant waren. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der CMG2-Konzentration und einem Abort dargestellt werden.

Die zu den verschiedenen Blutabnahmezeitpunkten bestimmten CMG2-Konzentrationen zeigten jedoch eine positive Korrelation untereinander, was darauf hindeutet, dass der CMG2-Serumlevel individuell determiniert sein könnte.

## 5. DISKUSSION

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, das prädiktive Potential von CMG2 bei Kinderwunschpatientinnen zu untersuchen. Ergänzend wurden Zellversuche zur Einschätzung der physiologischen Rolle von CMG2 in Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien durchgeführt.

### 5.1. mRNA- und Proteinexpression von CMG2 in Zelllinien

Die mRNA-Expression von CMG2 wurde in Hybridzellen des AC1-Chorionkarzinoms und Trophoblastzellen des dritten Trimesters (AC1-M59), Trophoblastzellen des ersten Trimesters (HTR-8/SVneo) und Chorionkarzinomzellen (JEG-3) untersucht. Die Messung erfolgte mittels quantitativer real-time-PCR. CMG2-mRNA konnte in allen drei Zelllinien mit unterschiedlicher Expressionsstärke nachgewiesen werden. Die Trophoblastzellen des ersten Trimesters (HTR-8/SVneo) wiesen die höchste Expression auf. Die zweithöchste Expression konnte bei den Hybridzellen (AC1-M59) gemessen werden. Die niedrigste CMG2-mRNA-Expression war bei den Chorionkarzinomzellen (JEG-3) festzustellen. In den Zelllinien mit der höchsten Expression von CMG2-mRNA (AC1-M59 und HTR-8/SVneo) konnte der Nachweis von CMG2 auch auf Proteinebene durchgeführt werden. Dies erfolgte mittels Western Blot. In beiden Zelllinien konnten die Vollängenvariante des CMG2-Proteins und die bekannten Splicevarianten dargestellt werden.

CMG2 wird in einer Vielzahl von menschlichen Normal- und Tumorgeweben exprimiert. Bell und Kollegen identifizierten das Gen in Endothelzellen bei der Kapillarmorphogenese in 3D-Matrices. CMG2 konnte dabei auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Während der Kapillarmorphogenese wurde CMG2 zeitlich unterschiedlich exprimiert. Das Vorkommen von CMG2 in verschiedenen menschlichen Geweben wurde mittels RT-PCR untersucht. CMG2-mRNA konnte zu diesem Zeitpunkt nur in der Plazenta detektiert werden (Bell et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien, dass CMG2 in vielen menschlichen Geweben exprimiert wird. Scobie et al. wiesen CMG2-RNA mittels Northern Blot unter anderem in Plazenta, Herz, Skelettmuskel und Lunge nach. Bei diesen Gewebesanalysen konnten aber nicht alle Transkriptvarianten detektiert werden (Scobie et al. 2003). In ihrer Dissertation führte Vargas 2009 Expressionsanalysen aller Splicevarianten von CMG2 in normalen Geweben und in Prostatakarzinomen durch. Mittels Nested-PCR wurde CMG2 auch in dieser Arbeit in zahlreichen menschlichen Geweben einschließlich Plazenta, Darm und Lunge identifiziert. Auffallend war ein variables Expressionslevel der Splicevarianten in den verschiedenen Geweben. CMG2 488 und 489 zeigten eine ubiquitäre Expression in allen getesteten Geweben. CMG2

489 wies dabei ein deutlich höheres Expressionslevel auf. CMG 322 zeigte ein selektives Expressionsprofil. Es konnte nur in Leber, erwachsener Lunge, fetalem Muskel und einigen Darmabschnitten nachgewiesen werden. Im Prostatakarzinom zeigte CMG2 322 eine doppelt so hohe Expression wie im normalen Gewebe. Die Isoform CMG2 386 wurde in den getesteten Geweben gar nicht exprimiert. Die neue Splicevariante CMG2 480 konnte in fetalem Gehirn, Herz, erwachsener Lunge und Plazenta identifiziert werden (Vargas 2009). Im Hinblick auf die pathophysiologische Rolle von CMG2 wurde das Gen in zahlreichen Tumoren wie Mamma - und Prostatakarzinom nachgewiesen und in diesen untersucht (Ye et al. 2014b; Ye et al. 2014a). Der CMG2-Nachweis in der Plazenta erfolgte durch mehrere Forschungsgruppen (Bell et al. 2001; Scobie et al. 2003). So ist es nicht überraschend, dass in unseren Untersuchungen CMG2 auch in Trophoblastzellen, die eine frühe Form der Plazenta darstellen, auf mRNA und Proteinniveau exprimiert wird. Wie in zahlreichen anderen Tumoren konnte CMG2 in unseren Untersuchungen auch in Chorionkarzinomzellen detektiert werden (Ye et al. 2014b; Ye et al. 2014a).

Die von uns durchgeführten Messungen erfassten ein unterschiedliches Expressionslevel der CMG2-mRNA in den drei untersuchten Zelllinien. Wie bereits beschrieben, zeigen Endothelzellen während der Kapillarmorphogenese einen zeitlichen Verlauf in der CMG2-Expression (Bell et al. 2001). Dadurch lässt sich vermuten, dass auch Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen abhängig von ihrer Zellphysiologie eine zeitlich unterschiedliche Expression von CMG2 aufweisen können. Mehrere Studien konnten bei einer Expressionsanalyse der Splicevarianten von CMG2 Unterschiede in der Expression dieser Varianten in verschiedenen Geweben feststellen (Scobie et al. 2003). Es besteht die Möglichkeit, dass auch bei den von uns untersuchten Zelllinien unterschiedliche Isoformen exprimiert und detektiert wurden.

## **5.2. Einfluss des CMG2-Knockdown auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion**

Für die Untersuchung der physiologischen Funktion von CMG2 erfolgte ein Knockdown in den Zelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 mit CMG2-siRNA. Die Erfolgskontrolle des Knockdown wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time-PCR durchgeführt. Im Vergleich zur Luciferase-siRNA als Negativkontrolle zeigte sich eine signifikant verringerte CMG2-Expression in den Zelllinien AC1-M59 und HTR-8/SVneo bei der Behandlung mit CMG2-siRNA. Damit ließ sich ein erfolgreicher Knockdown in diesen Zellen feststellen. Auffallend war eine erhöhte CMG2-mRNA-Expression bei der Transfektion mit Luciferase-siRNA im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung in der Zelllinie HTR-8/SVneo. Dies weist entweder auf eine verringerte

Expression von CMG2 bei der Kontrolle ohne Behandlung oder auf eine erhöhte CMG2-Expression durch die Transfektion mit Luciferase-siRNA hin. Die Expression von CMG2 kann, wie bereits beschrieben, Schwankungen unterliegen.

In der Zelllinie des Chorionkarzinoms JEG-3 zeigte sich kein signifikanter Knockdown von CMG2 nach der siRNA-Behandlung. Daneben ist eine erniedrigte Expression der CMG2-mRNA nach der Behandlung mit CMG2-siRNA und Luciferase-siRNA zu erkennen. Möglicherweise führte die Transfektion bei einigen Zellen zur Beeinträchtigung der Zellvitalität und somit zum Absterben vor der Messung. Dies stellt eine denkbare Erklärung für die verringerte CMG2-Expression nach der siRNA-Behandlung dar. Im Western-Blot ließen sich leider keine spezifischen Effekte auf die CMG2-Expression durch siRNA-Knockdown darstellen. Möglicherweise weist das CMG2-Protein eine höhere Halbwertszeit auf als die im Experiment verwendete 24 h Detektionsdauer, sodass geringe Proteinexpressionsänderungen noch nicht darstellbar waren.

Im Hinblick auf die physiologische Funktion wurde der Einfluss eines CMG2-Knockdown auf die Zellvitalität und Apoptoseinduktion in den drei genannten Zelllinien untersucht. Die Einschätzung der Zellvitalität erfolgte mit dem Sulforhodamin B-Assay. Das Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) wurde für die Messung der Apoptoseinduktion verwendet. Für alle drei Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied in der Zellvitalität und Apoptoserate nach einem CMG2-Knockdown festgestellt werden. In allen Zelllinien war eine verringerte Anzahl vitaler Zellen nach der siRNA-Behandlung und eine erhöhte Caspaseaktivität bei der Transfektion mit Luciferase-siRNA im Vergleich zu den Zellen ohne Behandlung zu erkennen. Auch in diesen Experimenten lässt sich ein detrimental Einfluss der Transfektion auf das Zellüberleben vermuten. Bislang ist die physiologische Funktion von CMG2 nicht im Ganzen geklärt. Es existieren zahlreiche Untersuchungen zu der Rolle von CMG2 bei der Extrazellulärmatrix-Homöostase, der Angiogenese und dem Einfluss auf die Progression bestimmter Tumorentitäten. Der genaue Mechanismus und die stattfindenden Signalwege sind bis heute unklar. Es wurde ein Einfluss von CMG2 auf verschiedene zelluläre Prozesse beschrieben. Reeves und Kollegen untersuchten die Funktion von CMG2 bei der Angiogenese und führten dafür einen CMG2-Knockdown in Endothelzellen der humanen Umbilikalvene durch. Anhand von Proliferations-Assays und Zellzyklus-Analysen konnte eine verringerte Proliferation der Endothelzellen festgestellt werden. Zudem war die Fähigkeit zur Bildung Kapillar-ähnlicher Netzwerke verringert. Der Einfluss auf die Migration der Endothelzellen war gering. Der Mechanismus, über den CMG2 Einfluss auf die Endothelzellen nimmt, ist unklar. Es

wird eine Interaktion zwischen CMG2, Endothelzellen und Extrazellulärmatrix diskutiert (Reeves et al. 2010).

Bei Untersuchungen von CMG2 im Zusammenhang mit Brustkrebs wurde ebenfalls ein CMG2-Knockdown durchgeführt. Das Kristallviolett-Assay zeigte eine erhöhte Proliferation der Brustkrebszellen bei einer verringerten CMG2-Expression. Die Rolle von CMG2 bei der Adhäsion und Invasion der Zellen stellte sich komplex dar. Sowohl bei einem CMG2-Knockdown als auch bei einer Überexpression kam es zu einer verstärkten Adhäsion und einer verminderten Invasivität der Brustkrebszellen (Ye et al. 2014a). CMG2 wurde als Regulator der Adhäsion und Invasion von Prostatakrebszellen identifiziert. Der CMG2-Knockdown beeinträchtigte die Adhäsion der Zellen an die Matrix und führte zu einer verstärkten Invasion. Eine veränderte Expression von CMG2 beeinflusste nicht das Wachstum der Prostatakrebszellen in vitro und in vivo (Ye et al. 2014b). Die aktuelle Untersuchung von CMG2 in Gliomen konnte zeigen, dass CMG2 das Wachstum von Gliomzellen in vitro und in vivo fördert. Ein CMG2-Knockdown führte zu erniedrigter Vitalität und verringertem Wachstum der Gliomzellen. Messungen der Apoptoserate von Gliomzellen mit einem CMG2-Knockdown wiesen keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (Tan et al. 2018). Bei der Betrachtung der Ergebnisse anderer Forschungsgruppen ist ein in Abhängigkeit der Zellentität unterschiedlicher Einfluss von CMG2 auf Zellprozesse auffallend. Ein CMG2-Knockdown führt in Endothel- und Gliomzellen zu einer verringerten Proliferation (Reeves et al. 2010, Tan et al. 2018) und in Brustkrebszellen zu einer erhöhten Proliferation (Ye et al. 2014a). In Prostatakrebszellen ist kein Einfluss eines CMG2-Knockdown auf die Proliferation gezeigt worden (Ye et al. 2014b). Ein CMG2-Knockdown zeigt keine Effekte auf die Apoptoseinduktion in Gliomzellen (Tan et al. 2018).

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss eines CMG2-Knockdown auf die Zellvitalität, die mit der Zellproliferation assoziiert ist, und die Apoptoseinduktion von Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen festgestellt werden. In der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 zeigte sich kein signifikanter Knockdown von CMG2 nach siRNA-Behandlung. Daher werden die Ergebnisse dieser Zellen bei der Betrachtung von Zellvitalität und Apoptoseverhalten vernachlässigt. Proliferation und Invasion der Zelllinie HTR-8/SVneo wurden von Kilburn et al. bei Kontakt zu einem Matrigel (Extrazellulärmatrix) erforscht. Nach Transfer der Zellen auf die Matrix durchliefen die Zellen eine Differenzierung, die zu abnehmender Proliferation und zunehmender Invasion führte (Kilburn et al. 2000). Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass CMG2 als Rezeptor für Bestandteile der Extrazellulärmatrix Einfluss auf das Verhalten der

Trophoblastzellen nehmen kann. In dieser Arbeit konnte ein solcher Einfluss nicht nachgewiesen werden.

Sokolov und Kollegen untersuchten die Proliferation und Migration der Zelllinie JEG-3 in Abhängigkeit von Faktoren, die im ersten und dritten Trimester durch die Plazenta sekretiert werden. Paradoxe Ergebnisse erbrachten die Schlussfolgerung, dass das Verhalten von den Trophoblastzellen in vitro womöglich nicht auf das in vivo übertragbar ist. Als Grund dafür wurde das Fehlen lokaler Faktoren der Mikroumgebung in vitro diskutiert (Sokolov et al. 2015).

Der Einfluss auf die Zellprozesse durch CMG2 scheint durch seine Interaktion mit der Extrazellulärmatrix bedingt zu sein. Kürzlich zeigten Tan und Kollegen, dass CMG2 in Gliomzellen den Übergang der Zellzyklusphase G2 in die M-Phase reguliert. Ein Knockdown von CMG2 wirkte sich mit Zellzyklusarrest und verringerter Proliferation aus (Tan et al. 2018). Somit kann davon ausgegangen werden, dass CMG2 auch über die Regulation des Zellzyklus Einfluss auf Zellprozesse nehmen kann. Die beiden unterschiedlichen Regulationswege durch CMG2 könnten eine Erklärung für die Unterschiede im Proliferationsverhalten verschiedener Zelltypen darstellen.

### **5.3. CMG2-Expression im Serum von Kinderwunschpatientinnen**

Das prädiktive Potential von CMG2 wurde mit Messungen der CMG2-Serumkonzentrationen bei Kinderwunschpatientinnen mittels ELISA untersucht. Insgesamt konnten Blutseren vom achten Tag und von der vierten Behandlungswoche bei 76 respektive 74 Patientinnen vermessen werden. Bei 20 Patientinnen gelang die zusätzliche Analyse von Blutproben in der fünften und achten Woche der Infertilitätsbehandlung. Für die statistische Auswertung wurden die Frauen zuerst anhand ihrer Diagnosen in sechs Gruppen eingeteilt. Bei der Darstellung der CMG2-Konzentrationen einiger Frauen über einen zeitlichen Verlauf zeigte sich ein von der Diagnose scheinbar unabhängiges individuelles Level von CMG2. Die Serumkonzentrationen dieser Frauen unterlagen Schwankungen im Verlauf.

Um eine mögliche Abhängigkeit der CMG2-Serumkonzentrationen von den Diagnosen der Patientinnen zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von CMG2 zwischen den Diagnosegruppen zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der CMG2-Konzentrationen am achten Tag und in der vierten, fünften und achten Behandlungswoche zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Serumkonzentration von CMG2 bei Kinderwunschpatientinnen unabhängig von ihren Diagnosen variiert. Dies konnte auch im Verlauf (achter Tag bis achte Woche) ermittelt werden. Eine interindividuell verschiedene Expression von CMG2 konnte auch in

anderem Zusammenhang gezeigt werden. Martchenko et al. untersuchten CMG2 im Zusammenhang zu seiner Rolle als Anthraxtoxinrezeptor. Dabei konnten Unterschiede in der CMG2-Expression bei Individuen verschiedener geografischer und ethnischer Populationen identifiziert werden. Die auf CMG2 bezogene genetische Variation in den Populationen scheint die Ursache für eine unterschiedliche Sensitivität für das Anthraxtoxin zu sein (Martchenko et al. 2012).

Diese Ergebnisse unterstützen die individuellen Unterschiede der CMG2-Expression, die in dieser Arbeit bei Kinderwunschpatientinnen festgestellt werden konnten. Zur Ermittlung des Vorhersagewertes von CMG2 für das Vorhandensein einer Schwangerschaft wurde die Konzentration des CMG2-Proteins im Blutserum von schwangeren und nicht schwangeren Patientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied der CMG2-Spiegel im Blutserum zwischen den untersuchten schwangeren und nicht schwangeren Kinderwunschpatientinnen am achten Tag und in der vierten und achten Behandlungswoche nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich in der fünften Woche eine signifikant erniedrigte CMG2-Serumkonzentration bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht-Schwangeren. Dieses Ergebnis erscheint paradox. Viele Studien deuten auf eine physiologische Funktion von CMG2 bei der Regulation der Angiogenese und der Extrazellulärmatrix-Homöostase hin (Bell et al. 2001). Da in einer erfolgreichen Schwangerschaft Prozesse wie Angiogenese und Umbau der Extrazellulärmatrix ablaufen, wurde ein Anstieg der CMG2-Konzentration bei schwangeren Frauen erwartet.

Ein für die Angiogenese sehr wichtiger Faktor ist VEGF. Evans et al. untersuchten die Serumkonzentrationen von VEGF bei schwangeren Frauen und wiesen einen Anstieg im ersten Trimester nach (Evans et al. 1998). Dieses Ergebnis wurde auch für die CMG2-Konzentration bei Schwangeren angenommen. Hier zeigte sich allerdings ein Abfall des CMG2-Spiegels bei schwangeren Patientinnen in der fünften Schwangerschaftswoche. Die frühe Plazentaentwicklung verläuft bei relativer Hypoxie. Diese führt zu einem Anstieg von VEGF und einem niedrigen Level von PIGF in der frühen Schwangerschaft. Im Schwangerschaftsverlauf kommt es adäquat der Plazentaxygenierung zum Abfall von VEGF und zum Anstieg von PIGF. Khaliq und Kollegen gelang mittels Western Blot der Nachweis der gegenläufigen Proteinexpression von VEGF und PIGF in der Plazenta. Außerdem konnte die Regulation der PIGF-Expression durch hyper- und hypoxische Bedingungen in vitro demonstriert werden (Khaliq et al. 1999).

Der Einfluss einer Hypoxie auf die Regulation von CMG2 ist bisher nicht erforscht. Vielleicht verhält sich die CMG2-Expression wie die von PIGF und wird durch die

hypoxischen Bedingungen in der Frühschwangerschaft herunterreguliert. Dies ist eine mögliche Erklärung für die erniedrigte CMG2-Konzentration bei schwangeren Frauen in der fünften Schwangerschaftswoche. Dagegen spricht das nicht signifikante Ergebnis in der achten Behandlungswoche. Bei schwangeren Frauen ist eine tendenziell niedrigere Konzentration von CMG2 im Vergleich zu nicht schwangeren Patientinnen zu beobachten. Die nicht vorhandene Signifikanz könnte durch ein sehr kleines Patientenkollektiv zu diesem Beobachtungszeitpunkt bedingt sein.

Störungen während des Implantationsvorgangs können sich negativ auf eine eingetretene Schwangerschaft auswirken und zu einem Abort führen. Daher wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der CMG2-Serumkonzentration und dem Auftreten von Aborten zu verschiedenen Zeitpunkten geprüft. Zu allen Zeitpunkten zeigten die ermittelten CMG2-Konzentrationen im Blutserum von Patientinnen ohne Abort keinen statistisch signifikanten Unterschied zu denen von Frauen, die einen Abort erlitten. CMG2 ist als positiver Regulator der MT1-MMP identifiziert worden. MT1-MMP gilt als Hauptaktivator der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) (Reeves et al. 2012). Matrix-Metalloproteinasen sind für die Invasion im Implantationsprozess unerlässlich. In der Studie von Staun-Ram und Kollegen wurde gezeigt, dass die MMP-2 das Hauptenzym für die Trophoblastinvasion in frühen Schwangerschaftswochen (sechste bis achte SSW) ist und die invasive Kapazität der Trophoblastzellen mit der Expression von MMP-2 korreliert (Staun-Ram et al. 2004). Somit müsste auch die Expression von CMG2 mit der Trophoblastinvasion bei einer erfolgreichen Schwangerschaft korrelieren. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der CMG2-Konzentration und einer fehlerhaften Implantation mit nachfolgendem Abort festgestellt werden.

Bis jetzt wurde CMG2 noch nie im Zusammenhang mit Fertilität und weiblicher Unfruchtbarkeit erforscht. Die Untersuchungen dieser Arbeit lassen schlussfolgern, dass CMG2 im Serum von Kinderwunschpatientinnen kein prädiktives Potential zeigt und somit kein geeigneter Biomarker zur Selektion von Risikopatientinnen zu sein scheint.

Bei dem hier durchgeführten ELISA wurde die lösliche Splicevariante von CMG2 (CMG2 322) im Serum der Kinderwunschpatientinnen bestimmt. Möglich wäre, dass die Konzentration von CMG2 im Blut nicht mit der Expression im Uterus korreliert. Für eine Vorhersage wäre somit eine Bestimmung der CMG2-Expression im Uterus notwendig. Dies ist jedoch für den klinischen Alltag nicht praktikabel und verhindert den Einsatz von CMG2 als prädiktiven Marker.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Capillary Morphogenesis Gene 2 (CMG2) ist ein auf dem Chromosomen 4q lokalisiertes Gen, das für mehrere Proteinisoformen codiert. Es wurde als zweiter Anthraxtoxinrezeptor identifiziert und im Zusammenhang zum Hyaline Fibromatose Syndrom (HFS) erforscht. CMG2 wurde noch nie im Zusammenhang mit einem unerfüllten Kinderwunsch und weiblicher Unfruchtbarkeit untersucht.

Die genaue physiologische Funktion von CMG2 bleibt bis heute noch zum größten Teil unbekannt. Es wird eine Rolle in der Extrazellulärmatrix-Homöostase vermutet. CMG2 soll als Regulator der Angiogenese fungieren. Die Ursachen für weibliche Unfruchtbarkeit sind vielfältig. Es existieren Erkrankungen, die mit Angiogenese und Implantationsstörungen assoziiert sind und zur Infertilität führen. Implantation ist ein komplexer Prozess, der u.a. den Abbau der Extrazellulärmatrix und Angiogenese beinhaltet. CMG2 als Regulator der Extrazellulärmatrix und Angiogenese stellt in diesem Zusammenhang einen potenziellen Biomarker für Kinderwunschpatientinnen dar. Daher war das Ziel dieser Arbeit, eine Aussage über das prädiktive Potential von CMG2 im Serum von Kinderwunschpatientinnen zu treffen.

Zur Untersuchung der Relevanz von CMG2 bei der Implantation wurden im ersten Versuchsteil Zellversuche durchgeführt. In den Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 konnte die Lokalisation von CMG2 auf der Zellmembranoberfläche und die Expression von CMG2-mRNA in unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden. Trophoblastzellen zeigten eine stärkere CMG2-mRNA-Expression im Vergleich zu Chorionkarzinomzellen. Außerdem wurden verschiedene Proteinisoformen des CMG2 mittels Western Blot dargestellt. Nach einem CMG2-Knockdown konnte kein signifikanter Unterschied in der Vitalität und Apoptoserate der Zellen festgestellt werden. Somit konnte hier kein Einfluss von CMG2 auf diese Zellfunktionen gezeigt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Serumkonzentration von CMG2 im Blut von Kinderwunschpatientinnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach einer potenziellen Konzeption im Rahmen der ART bestimmt. Diese wurden in Abhängigkeit von Diagnose, einem positiven Schwangerschaftstest und dem Auftreten von einem Abort verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von CMG2 bei Kinderwunschpatientinnen unabhängig von ihren Diagnosen variiert. Der Vergleich der CMG2-Serumspiegel von schwangeren und nicht schwangeren Patientinnen zeigte nur in der fünften Behandlungswoche eine signifikant erniedrigte CMG2-Serumkonzentration bei schwangeren Frauen ( $p=0,024$ , Mann-Whitney-U-Test). Die

Untersuchungen konnten keinen Zusammenhang zwischen der CMG2-Konzentration und einem Abort darstellen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich CMG2 nicht als prädiktiver Marker bei Kinderwunschpatientinnen eignet. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CMG2-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von einer Schwangerschaft in der fünften Woche nach Behandlungsstart gezeigt werden. Aussagen über die Diagnose oder das Eintreten von Schwangerschaft oder Abort lässt die CMG2-Konzentration im Serum nicht zu.

## 7. LITERATUR

Abrao MS, Muzii L, Marana R (2013) Anatomical causes of female infertility and their management. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 123 Suppl 2: S18-24.

Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, Hovatta O, Landgren B-M (2003) Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertility and sterility* 79 Suppl 1:808–814.

Andrade VHLD, Mata AMOFD, Borges RS, Costa-Silva DR, Martins LM, Ferreira PMP, Cunha-Nunes LC, Silva BBD (2016) Current aspects of polycystic ovary syndrome; A literature review. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992) 62:867–871.

Bell SE, Mavila A, Salazar R, Bayless KJ, Kanagala S, Maxwell SA, Davis GE (2001) Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices; Regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *Journal of cell science* 114:2755–2773.

Bischof P, Meisser A, Campana A (2000) Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 55:65–71.

Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414:225–229.

Brähler E, Stöbel-Richter Y, Huinink J, Glander HJ (2001) Zur Epidemiologie gewollter und ungewollter Kinderlosigkeit in Ost- und Westdeutschland. *Reproduktionsmedizin* 17:157–162.

Bruckert E (1991) How frequent is unintentional childlessness in Germany? *Andrologia* 23:245–250.

Bürgi J, Kunz B, Abrami L, Deuquet J, Piersigilli A, Scholl-Bürgi S, Lausch E, Unger S, Superti-Furga A, Bonaldo P, van der Goot FG (2017) CMG2/ANTXR2 regulates extracellular collagen VI which accumulates in hyaline fibromatosis syndrome. *Nature communications* 8:15861.

Cha J, Sun X, Dey SK (2012) Mechanisms of implantation; Strategies for successful pregnancy. *Nature medicine* 18:1754–1767.

Chang C-W, Wakeland AK, Parast MM (2018) Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *The Journal of endocrinology* 236: R43-R56.

Das SK (2009) Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction (Cambridge, England)* 137:889–899.

Deuquet J, Abrami L, Difeo A, Ramirez MCM, Martignetti JA, van der Goot FG (2009) Systemic hyalinosis mutations in the CMG2 ectodomain leading to loss of function through retention in the endoplasmic reticulum. *Human mutation* 30:583–589.

Deuquet J, Lausch E, Superti-Furga A, van der Goot FG (2012) The dark sides of capillary morphogenesis gene 2. *The EMBO journal* 31:3–13.

Dowling O, Difeo A, Ramirez MC, Tükel T, Narla G, Bonafe L, Kayserili H, Yuksel-Apak M, Paller AS, Norton K, Teebi AS, Grum-Tokars V, Martin GS, Davis GE, Glucksman MJ, Martignetti JA (2003) Mutations in capillary morphogenesis gene-2 result in the allelic disorders juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *American journal of human genetics* 73:957–966.

Emiliani S, Delbaere A, Devreker F, Englert Y (2005) Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process; Implications in assisted reproductive. *Reproductive biomedicine online* 10:527–540.

Evans PW, Wheeler T, Anthony FW, Osmond C (1998) A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England)* 13:1057–1062.

Graspeuntner S, Bohlmann MK, Gillmann K, Speer R, Kuenzel S, Mark H, Hoellen F, Lettau R, Griesinger G, König IR, Baines JF, Rupp J (2018) Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the diagnosis of infectious infertility. *PloS one* 13: e0191047.

Greither T, Wedler A, Rot S, Keßler J, Kehlen A, Holzhausen H-J, Bache M, Würfl P, Taubert H, Kappler M (2017) CMG2 Expression Is an Independent Prognostic Factor for Soft Tissue Sarcoma Patients. *International journal of molecular sciences* 18.

Hanks S, Adams S, Douglas J, Arbour L, Atherton DJ, Balci S, Bode H, Campbell ME, Feingold M, Keser G, Kleijer W, Mancini G, McGrath JA, Muntoni F, Nanda A, Teare MD, Warman M, Pope FM, Superti-Furga A, Futreal PA, Rahman N (2003) Mutations in the gene encoding capillary morphogenesis protein 2 cause juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *American journal of human genetics* 73:791–800.

Hill JA (2001) Maternal-embryonic cross-talk. *Annals of the New York Academy of Sciences* 943:17–25.

Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI, Flaws JA (2000) Environmental Factors in Infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 43:821–829.

Huppertz B, Gauster M, Orendi K, König J, Moser G (2009) Oxygen as modulator of trophoblast invasion. *Journal of anatomy* 215:14–20.

Inhorn MC, Patrizio P (2015) Infertility around the globe; New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update* 21:411–426.

Juul S, Karmaus W, Olsen J (1999) Regional differences in waiting time to pregnancy; Pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. The European Infertility and Subfecundity Study Group. *Human reproduction (Oxford, England)* 14:1250–1254.

Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C, Weich H, Whittle M, Ahmed A (1999) Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression; Molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79:151–170.

Kilburn BA, Wang J, Duniec-Dmuchowski ZM, Leach RE, Romero R, Armant DR, Duniec-Dmuchowski ZM (2000) Extracellular matrix composition and hypoxia regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. *Biology of reproduction* 62:739–747.

Kim S-M, Kim J-S (2017) A Review of Mechanisms of Implantation. *Development & reproduction* 21:351–359.

- Mahajan N (2015) Endometrial receptivity array; Clinical application. *Journal of human reproductive sciences* 8:121–129.
- Marions L, Danielsson KG (1999) Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Molecular human reproduction* 5:961–965.
- Martchenko M, Candille SI, Tang H, Cohen SN (2012) Human genetic variation altering anthrax toxin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:2972–2977.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990; A systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine* 9: e1001356.
- Matsumoto H, Ma W-G, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM, Dey SK (2002) Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *The Journal of biological chemistry* 277:29260–29267.
- Melford SE, Taylor AH, Konje JC (2014) Of mice and (wo)men; Factors influencing successful implantation including endocannabinoids. *Human reproduction update* 20:415–428.
- Nicola NA, Babon JJ (2015) Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine & growth factor reviews* 26:533–544.
- Nieschlag E, Behre HM (Hrsg) (2000) *Andrologie; Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes : mit 172 Abbildungen und 43 Tabellen.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Olooto WE, Amballi AA, Banjo TA (2012) A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2 (3):379–385.
- Ozkan S, Murk W, Arici A (2008) Endometriosis and infertility; Epidemiology and evidence-based treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1127:92–100.
- Palomba S, Russo T, Falbo A, Di Cello A, Amendola G, Mazza R, Tolino A, Zullo F, Tucci L, La Sala GB (2012) Decidual endovascular trophoblast invasion in women with polycystic ovary syndrome; An experimental case-control study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97:2441–2449.

Peters DE, Zhang Y, Molinolo AA, Miller-Randolph S, Szabo R, Bugge TH, Leppla SH, Liu S (2012) Capillary morphogenesis protein-2 is required for mouse parturition by maintaining uterine collagen homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications* 422:393–397.

Qiao J, Wang Z-B, Feng H-L, Miao Y-L, Wang Q, Yu Y, Wei Y-C, Yan J, Wang W-H, Shen W, Sun S-C, Schatten H, Sun Q-Y (2014) The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options; Current status and future prospects. *Molecular aspects of medicine* 38:54–85.

Rajalakshmi R, Kalaivani S (2016) Prevalence of asymptomatic infections in sexually transmitted diseases attendees diagnosed with bacterial vaginosis, vaginal candidiasis, and trichomoniasis. *Indian journal of sexually transmitted diseases* 37:139–142.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ (2004) Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 114:744–754.

Reeves CV, Dufraigne J, Young JAT, Kitajewski J (2010) Anthrax toxin receptor 2 is expressed in murine and tumor vasculature and functions in endothelial proliferation and morphogenesis. *Oncogene* 29:789–801.

Reeves CV, Wang X, Charles-Horvath PC, Vink JY, Borisenko VY, Young JAT, Kitajewski JK (2012) Anthrax toxin receptor 2 functions in ECM homeostasis of the murine reproductive tract and promotes MMP activity. *PLoS one* 7: e34862.

Rizov M, Andreeva P, Dimova I (2017) Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 56:127–132.

Rosario GX, Stewart CL (2016) The Multifaceted Actions of Leukaemia Inhibitory Factor in Mediating Uterine Receptivity and Embryo Implantation. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)* 75:246–255.

Salsano S, Quiñonero A, Pérez S, Garrido Gómez T, Simón C, Dominguez F (2017) Dynamic expression of PGRMC1 and SERBP1 in human endometrium; An implication in the human decidualization process. *Fertility and sterility* 108:832-842.e1.

Scobie HM, Rainey GJA, Bradley KA, Young JAT (2003) Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:5170–5174.

Sokolov DI, Furaeva KN, Stepanova OI, Ovchinnikova OM, Viazmina LP, Kozonov GR, Kuzminykh TU, Selkov SA (2015) Changes in Functional Activity of JEG-3 Trophoblast Cell Line in the Presence of Factors Secreted by Placenta. *Archives of medical research* 46:245–256.

Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 2:59.

Tan J, Liu M, Zhang J-Y, Yao Y-L, Wang Y-X, Lin Y, Song K, Tan J, Wu J-R, Cui Y-H, Wang Y, Bian X-W (2018) Capillary morphogenesis protein 2 is a novel prognostic biomarker and plays oncogenic roles in glioma. *The Journal of pathology* 245:160–171.

Taylor HS (2000) The role of HOX genes in human implantation. *Human reproduction update* 6:75–79.

te Velde E, Habbema D, Leridon H, Eijkemans M (2012) The effect of postponement of first motherhood on permanent involuntary childlessness and total fertility rate in six European countries since the 1970s. *Human reproduction (Oxford, England)* 27:1179–1183.

Unuane D, Tournaye H, Velkeniers B, Poppe K (2011) Endocrine disorders & female infertility. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 25:861–873.

Vargas, Micaela: Expression analysis of TEM8 and CMG2 in normal and patient-specific prostate cancer. The University of Texas at San Antonio, College of Sciences, Department of Biology, Diss., 2009.

Ye L, Sun P-H, Malik MFA, Mason MD, Jiang WG (2014a) Capillary morphogenesis gene 2 inhibits growth of breast cancer cells and is inversely correlated with the disease progression and prognosis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 140:957–967.

Ye L, Sanders AJ, Sun P-H, Mason MD, Jiang WG (2014b) Capillary morphogenesis gene 2 regulates adhesion and invasiveness of prostate cancer cells. *Oncology letters* 7:2149–2153.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J de, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S (2009) The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO)

Revised Glossary on ART Terminology, 2009. Human reproduction (Oxford, England)  
24:2683–2687.

## 8. THESEN

- 1) CMG2 fungiert in seiner physiologischen Funktion als Regulator der Extrazellulärmatrix-Homöostase und der Angiogenese. Daher war das Ziel dieser Arbeit, das prädiktive Potential von CMG2 bei Kinderwunschpatientinnen zu untersuchen, da weibliche Unfruchtbarkeit mit diesen Prozessen einhergeht.
- 2) In den Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien AC1-M59, HTR-8/SVneo und JEG-3 konnte die CMG2-Expression auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine unterschiedliche Expressionsstärke.
- 3) Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von CMG2 wurde ein Knockdown in den Zelllinien durchgeführt. Es konnte kein Einfluss von CMG2 auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion festgestellt werden.
- 4) Die CMG2-Expression in den Blutseren von 76 Kinderwunschpatientinnen variierte unabhängig von deren Diagnosen.
- 5) Nur in der fünften Behandlungswoche konnte bei schwangeren im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen eine signifikant niedrigere CMG2-Serumkonzentration gemessen werden.
- 6) Die CMG2-Konzentration zeigte keine Abhängigkeit zum Auftreten eines Aborts.
- 7) CMG2 zeigt kein prädiktives Potential im Serum von Kinderwunschpatientinnen. Somit lässt es sich nicht als Marker zur Selektion von Risikopatientinnen und zur Abschätzung der Erfolgsaussicht reproduktionsmedizinischer Therapien im klinischen Alltag etablieren.

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Maria Helfer  
Geburtstag/-ort: 06.05.1991 in Gornjak (Russland)  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig, keine Kinder

### Beruflicher Werdegang

---

seit 06/2018 CARL-VON-BASEDOW-KLINIKUM, MERSEBURG  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Chefarzt Kurt Müller  
*Assistenzärztin*

### Ausbildung

---

seit 01/2015 ZENTRUM FÜR REPRODUKTIONSMEDIZIN UND  
ANDROLOGIE DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS HALLE  
(SAALE)  
Prof. Dr. med. H. M. Behre, Dr. rer. nat. T. Greither  
*Dissertation*

10/2011 – 11/2017 MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG  
*Medizinstudium*

09/2008 – 06/2011 GESCHWISTER-SCHOLL-GYMNASIUM  
FÜRSTENWALDE (SPREE)  
*Abitur*

---

Maria Helfer, Halle (Saale), den 29.10.2019

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

---

Maria Helfer, Halle (Saale), den 29.10.2019

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass bei mir keine früheren Promotionsversuche vorliegen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Maria Helfer, Halle (Saale), den 29.10.2019

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) angefertigt. An der Stelle möchte ich mich bei allen Menschen, die mich in dieser Zeit unterstützt haben, bedanken.

An erster Stelle möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, meinen Dank aussprechen. Weiterhin möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung und konstruktive Anregungen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Thomas Greither für die engagierte Betreuung während der Erstellung und Fertigstellung dieser Arbeit und für die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die dabei auftraten. Ich danke auch für die Einführung in die experimentellen Techniken und das wissenschaftliche Arbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie für die große Unterstützung durch das Sammeln der Blutproben bedanken.

Ebenfalls möchte ich dem gesamten Team im Forschungslabor und allen Doktoranden aus unserer Arbeitsgruppe für den stets freundlichen, kollegialen Umgang und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Insbesondere möchte ich dabei Dr. rer. nat. Maria Giebler ganz herzlich danken, die mich mit zahlreichen Ratschlägen bei der Durchführung der experimentellen Arbeit unterstützt hat.

Meiner Freundin Johanna Wittmann danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Mein herzlicher Dank gilt ihr und meinen Freunden Sarah Azinovic, Katharina Hettinger und Franziska Kupferschmied für das Zuhören, die Aufmunterungen und für viele aufbauende Worte.

Sehr dankbar bin ich meinen Eltern, die mich mit viel Verständnis und Zuspruch während des Studiums und der Doktorarbeit sehr unterstützt haben.