

**Untersuchungen zum Einfluss endometrialer
Claudin3- und Claudin10-Defizienz auf die
Implantation und Embryoentwicklung anhand
von Knockout-Mausmodellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Susanne Grund
aus Castrop-Rauxel

April 2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74919

URN: urn:nbn:de:hbz:464-20211108-142415-1

Alle Rechte vorbehalten.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ruth Grümmer

2. Gutachter: Prof. Dr. Alexandra Gellhaus

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2021

Science is simply the word we use to describe a method of organising our insatiable curiosity

- Tim Minchin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
1. Einleitung.....	13
1.1 Mechanismen zur Etablierung einer Schwangerschaft.....	13
1.1.1 Der rezeptive Uterus und die Embryoimplantation in Mensch und Maus	13
1.1.2 Dezidualisierung.....	17
1.1.3 Die Differenzierung des Trophoblasten und die frühe Plazentation in der Maus ...	19
1.2 Tight Junctions.....	21
1.2.1 Aufbau und Funktion der Tight Junctions.....	21
1.2.2 Claudine	25
1.2.3 Cldn3 und Cldn10.....	29
1.2.4 CldnKO-Mausmodelle zur Aufklärung der Claudin-Funktionen und deren Rolle in der Pathologie	31
1.3 Die Bedeutung von TJ-Proteinen im zyklischen Endometrium sowie in der Schwangerschaft	33
2. Zielsetzung	36
3. Material und Methoden	38
3.1 Material.....	38
3.1.1 Verbrauchsmaterial	38
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	39
3.1.3 Kits	40
3.1.4 Geräte	40
3.1.5 Puffer.....	41
3.2 Methoden.....	42
3.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten.....	42
3.2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung	42
3.2.1.2 Zucht der Mausstämme	43
3.2.1.3 Gewichtsbestimmung postnataler und adulter Tiere.....	43

3.2.1.4	Terminierte Verpaarung und Plug-Check	44
3.2.1.5	Zyklusbestimmung	44
3.2.1.6	Ultraschalluntersuchungen an der Maus	45
3.2.1.7	Gewebeentnahme.....	45
3.2.2.	Histologische Methoden	46
3.2.2.1	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	46
3.2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	47
3.2.2.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	48
3.2.2.4	Mikroskopie.....	50
3.2.3.	Molekularbiologische Methoden	50
3.2.3.1	Genotypisierung.....	50
3.2.3.2	Transkriptomanalyse.....	52
3.2.4	Statistik.....	53
4.	Ergebnisse.....	54
4.1	Lokalisation des Cldn3-Proteins im zyklischen Endometrium und bei der Plazentabildung in der WT-Maus	54
4.1.1	Lokalisation von Cldn3 im zyklischen Endometrium.....	54
4.1.2	Lokalisation von Cldn3 in der Dezidua und in der Plazenta der frühen Schwangerschaft.....	55
4.1.3	Lokalisation von Cldn3 in der Dezidua der reifen Plazenta der späten Schwangerschaft.....	56
4.2	Untersuchungen zur Rolle von endometrialem Cldn3 in einem Cldn3KO-Mausmodell.....	59
4.2.1	Nachweis des endometrialen Cldn3-Knockouts mittels Immunfluoreszenzfärbungen	59
4.2.2	Auswirkung der Cldn3-Deletion auf die Fertilität	60
4.2.3	Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Implantation, Dezidualisierung und Embryoentwicklung	63
4.2.3.1	Die Cldn3-Deletion beeinträchtigt Dezidualisierung und Trophoblastinvasion	63
4.2.3.2	Beeinträchtigung der frühen Plazentation durch Cldn3-Deletion.....	67
4.2.3.3	Die Cldn3-Deletion beeinträchtigt das Embryowachstum, nicht jedoch die reife Plazenta	68

4.2.3.4	Untersuchung des Schwangerschaftsverlauf der Cldn3KO-Tiere mittels Ultraschall.....	70
4.2.3.5	Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Vaskularisierung der Dezidua	72
4.2.4	Cldn4 als mögliches kompensatorisches Protein in Cldn3KO-Mäusen	75
4.2.4.1	Cldn4 im zyklischen Endometrium von Cldn3KO- und WT-Mäusen	76
4.2.4.2	Cldn4-Expression während der Implantation und Plazentabildung in Cldn3KO- und WT-Mäusen	77
4.2.5	Differentielle Genregulierung in der Dezidua der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zur WT-Maus	80
4.3	Untersuchungen zur Rolle von Cldn10 in einem Endometrium-spezifischen KO- Mausmodell	85
4.3.1	Expression von Cldn10 im zyklischen Endometrium.....	85
4.3.2	Erzeugung des Knockouts durch Einkreuzung des Cre-Gens in die gefloxt Mauslinie.....	86
4.3.3	Nachweis des Endometrium-spezifischen Knockouts	89
4.3.4	Reproduktionseffizienz der Cldn10KO-Mäuse	93
5. Diskussion	98
5.1	Mausmodelle	98
5.2	Auswirkungen der Cldn3-Deletion auf die Reproduktion	100
5.2.1	Cldn3-Expression im zyklischen Endometrium und in der Schwangerschaft bei WT- Mäusen	100
5.2.2	Auswirkungen der Cldn3-Deletion auf die Fertilität	102
5.2.3	Auswirkung der Cldn3-Deletion auf die Dezidualisierung und Trophoblastinvasion	103
5.2.4	Auswirkung der Cldn3-Deletion auf das embryonale Wachstum und die Plazentation	108
5.2.5	Cldn3-Deletion hat keinen Einfluss auf die Vaskularisierung der Dezidua	109
5.2.6	Cldn4 als mögliches kompensatorisches Protein in Cldn3KO-Mäusen	110
5.2.7	Differentielle Genregulierung in der Dezidua der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zur WT-Maus	112
5.3	Auswirkungen einer endometrialen Cldn10-Deletion auf die Reproduktion	116

5.3.1 Erzeugung eines Endometrium-spezifischen Cldn10-Knockouts mittels des Cre-lox-Systems	116
5.3.2 Einfluss der Cldn10-Deletion im Endometrium auf die Fertilität.....	117
5.4 Schlussfolgerung	120
6. Zusammenfassung.....	122
7. Summary.....	123
8. Literaturverzeichnis	124
9. Anhang.....	137
Publikationen.....	142
Danksagung.....	143
Lebenslauf	144
Erklärung	145

Abkürzungsverzeichnis

BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
bTJ	bicellular tight junction
CAM	cell adhesion molecule
CEACAM	carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules
Cldn	Claudin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days <i>post coitum</i>
EC	ectoplacental cone, Ektoplazentarkonus
ER	estrogen receptor, Östrogenrezeptor
FGF	fibroblast growth factor
FHHNC	Hypomagnesiämie-Hyperkalziurie-Nephrokalzinose
FOXO	forkhead box O1
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HE	Hematoxylin-Eosin
HH	Hedghog
Hox	Homöobox
ICM	inner cell mass
Ig	Immunglobulin
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein
ihh	Indian hedgehog
Il	Interleukin
Jam	junction adhesion molecule
Klk	kallikrein (related peptidase)
LIF	leukemia inhibitory factor
MAGUK	membrane associated guanylate kinase
MAP kinase	mitogen-activated protein kinase
marvel	MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane linking
MDCK	Madin-Darby canine kidney-Zellen
MET	mesenchymal-epithelial transition

MLCK	myosin light chain kinase
MW	Mittelwert
NISCH	Neonatales Ichtyose-Sklerosierende-Cholangitis
OAP1	outer surface protein-associated protein 1
PBS	phosphate buffer saline
pc	<i>post coitum</i>
PDZ	primary decidual zone, primäre Dezidua
PDZ-Domäne	P ost synaptic densioty protein, D rosophila disc large tumor suppressor, z onula occludens-1 protein domain
Pgf	placental growth factor
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Plac	placenta specific protein
Plet	placenta expressed transcript
PR	progesterone receptor, Progesteronrezeptor
PRL	Prolaktin
Psg	pregnancy specific glycoprotein, Schwangerschafts-spezifisches Glykoprotein
RIF	recurrent implantation failure
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDZ	secondary decidual zone, sekundäre Dezidua
TAMP	tight junction associated marvel proteins
TER	transepithelial resistance, transepithelialer Widerstand
TGC	trophoblast giant cell, Trophoblastriesenzelle
TJ	tight junction
tTJ	tricellular tight junction
uNK	uterine natürliche Killerzellen
WNK	with no lysine kinase
YAP	Yes-associated protein
ZNS/PNS	zentrales/peripheries Nervensystem
ZO	<i>zonula occludens</i>
ZONAB	ZO-1 associated nucleic acid binding protein

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Embryoimplantation bei Maus und Mensch.	16
Abb. 2: Schematische Darstellung der am Aufbau von Tight-Junctions beteiligten Proteine.	24
Abb. 3: Molekulare Struktur der Claudine.	27
Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Endometriumgewebe von WT-Mäusen in unterschiedlichen Phasen des Östruszyklus.	55
Abb. 5: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Implantationskammern von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 10,5 dpc.	57
Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Plazentagewebe von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 17,5 dpc.	58
Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Endometriumgewebe von WT-Mäusen (a-b) und Cldn3KO-Mäusen (c-d).	60
Abb. 8: Darstellung der Fertilitätsparameter von Cldn3KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen.	62
Abb. 9: Postnatale Gewichtsentwicklung (a) und Gewichte adulter Tiere (b) von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen.	62
Abb. 10: Anzahl und Gewichte der Implantationskammern von Cldn3KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 6,5 pc und 8,5 pc.	64
Abb. 11: Histologische Untersuchung der Implantationskammern von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 8,5 pc.	66
Abb. 12: Histologische Untersuchung der Implantationskammern von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 10,5 pc.	68
Abb. 13: Histologische Untersuchung der Plazenten von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 14,5 pc (a, b) und 17,5 pc (c, d).	69
Abb. 14: Gewichte der Embryonen und korrespondierenden Plazenten von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 17,5 pc.	70
Abb. 15: Ultraschalluntersuchungen von Implantationskammern zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen.	71
Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 und CD31 an Implantationskammern von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 10,5 dpc.	73
Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 und CD31 an Plazentagewebe von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 17,5 dpc.	74
Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbungen für CD31 an Implantationskammern von WT- und Cldn3KO-Mäusen zum Zeitpunkt 8,5 dpc.	75
Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Endometriumgewebe von WT- (a-h) und Cldn3KO-Mäusen (i-p) in unterschiedlichen Phasen des Östruszyklus.	77

Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Implantationskammern von WT- und Cldn3KO-Mäusen an 8,5 dpc.	78
Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Implantationskammern von WT-(a,c) und Cldn3KO-(b,d) Mäusen an 10,5 dpc.	79
Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 in Plazentagewebe von WT- (a) und Cldn3KO-Mäusen (b) an 17,5 dpc.....	80
Abb. 23: Gesamtzahl regulierter Gene und Darstellung der in der Cldn3KO-Maus regulierten Gene als Volcano Plot.	81
Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn10 an Endometriumgewebe von Wildtyp Mäusen in unterschiedlichen Phasen des Östruszyklus.	86
Abb. 25: Etablierung der Genotypisierung hinsichtlich des „flox“- und Cre-Gens.	87
Abb. 26: Kreuzungsschema zur Generierung einer Endometrium-spezifischen Cldn10KO-Maus (Cldn10 ^{fl/fl} PR ^{Cre/+}).	88
Abb. 27: Verteilung der Genotypen bei der Zucht der Cldn10KO-Mäuse und Geschlechterverteilung in der F ₃ -Generation.	89
Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn10 an Endometriumgewebe von WT-Mäusen (a-b) und Cldn10KO-Mäusen (c-d).	90
Abb. 29: Immunfluoreszenzfärbung für Cldn10 an Gewebe von Implantationsstellen an Tag 6,5 pc von WT- (a, c) und Cldn10KO-Mäusen (b, d).	91
Abb. 30: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn10 an Kolongewebe von WT-Mäusen (a-b) und Cldn10KO-Mäusen (c-d).....	92
Abb. 31: Wurfgrößen der Cldn10KO-Mäuse und entsprechender Kontrollen.	94
Abb. 32: Uteri der Cldn10KO-Mäuse und WT-Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten der frühen Schwangerschaft von 5,5 dpc bis 8,5 dpc.....	95
Abb. 33: Schwangerschaftsraten der Cldn10KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen.	96
Abb. 34: Histologische Untersuchung der Implantationskammern von Tag 5,5 pc bis 8,5 pc von Cldn10KO- im Vergleich zu WT-Mäusen.	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der CldnKO-Mausmodelle und deren assoziierte humane Krankheitsbilder.	33
Tab. 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	38
Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	39
Tab. 4: Verwendete kommerzielle Kits.	40
Tab. 5: Verwendete Geräte.	40
Tab. 6: Mausstämme und ihre Herkunft.....	43
Tab. 7: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.....	49
Tab. 8: PCR-Ansätze zur Genotypisierung der Mäuse mithilfe des Gewebe-PCR-Kit Extract-N-Amp™.	51
Tab. 9: Primersequenzen zur Genotypisierung der Mäuse.....	51
Tab. 10: PCR-Programm zur Genotypisierung.	52
Tab. 11: Darstellung der jeweils 20 stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene in der Cldn3KO-Maus im Vergleich zu WT-Maus.	82
Tab. 12: Auflistung einer Auswahl an regulierten Genen in der Dezidua der Cldn3KO-Maus.	83
Tab. 13: Auflistung der in dem Transkriptom-Assay enthaltenen und untersuchten Claudine.	84
Tab. 14: Gesamtliste der differenziell regulierten Gene in der Dezidua der Cldn3KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus.....	137

1. Einleitung

Für die erfolgreiche Etablierung einer Schwangerschaft stellt die Implantation des Embryos in das maternale Gewebe einen der ersten kritischen Schritte dar. Hierdurch wird der direkte Kontakt zwischen Embryo und Endometrium hergestellt, der zur Ausbildung einer engen Symbiose zwischen dem kindlichen und mütterlichen Organismus führt, bei der eine Vielzahl zeitlich und räumlich präzise regulierter Mechanismen auf struktureller und molekularer Ebene stattfinden müssen. In der Anpassung an diese Herausforderungen besitzt das Endometrium außergewöhnlich plastische Eigenschaften. Im Rahmen des hormonellen Zyklus erfährt es drastische physiologische Umstrukturierungen, die das Endometrium in einen rezeptiven Zustand bringen, der die Embryoimplantation ermöglicht. Während der Implantation reguliert das endometriale Stroma die Trophoblastinvasion und versorgt den Embryo mit Nährstoffen. Einhergehend mit der strukturellen Veränderung des Endometriums findet eine wesentliche Änderung der Zusammensetzung der Zell-Zellkontakte im endometrialen Epithel und Stroma statt, welche einen wichtigen Beitrag zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft leistet. Fehlregulationen bei diesen Prozessen können zu einer gestörten Implantation und einer fehlerhaften Ausbildung der Plazenta führen, was schwerwiegende Folgen für Mutter und Kind haben kann.

1.1 Mechanismen zur Etablierung einer Schwangerschaft

1.1.1 Der rezeptive Uterus und die Embryoimplantation in Mensch und Maus

Die Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) setzt sich aus endometrialen Stromazellen, luminalen und glandulären Epithelien, Immunzellen und Endothelzellen, die die Vaskulatur des Endometriums bilden, zusammen. Unter gesunden physiologischen Umständen durchläuft das Endometrium unter der hormonellen Kontrolle von Progesteron und Östrogen eine zyklische Remodellierung (de Ziegler et al., 1998; Gellersen und Brosens, 2014). In der meisten Zeit des Zyklus ist das Endometrium nicht rezeptiv und eine Blastozystenimplantation ist nicht möglich. Dies

kann nur in einem relativ kurzen Zeitraum geschehen, der als Implantationsfenster („implantation window“) bezeichnet wird. Beim Menschen beginnt diese rezep tive Phase am neunten Tag nach der Ovulation und dauert zwischen drei und fünf Tagen an (Wilcox et al., 1999). In der Maus ist das Implantationsfenster kürzer und dauert weniger als 24 Stunden an, beginnend an Tag 4,5 pc (Gellersen und Brosens, 2014; H. Wang und Dey, 2006). Nach diesem Zeitraum ist eine Implantation der Blastozyste nicht mehr möglich (Cha und Dey, 2014). Transplantationsexperimente konnten zeigen, dass die Blastozyste in eine Vielzahl von Geweben implantieren kann, in den Uterus jedoch nur bei korrekter hormoneller Vorbereitung des Gewebes oder Beschädigung des luminalen endometrialen Epithels (Cowell, 1969; Fawcett et al., 1947; Kirby, 1963). Bei Frauen, die sich einer Fruchtbarkeitsbehandlung mit künstlicher Befruchtung unterziehen, wird vermutet, dass das Fehlschlagen der Embryoimplantation (recurrent implantation failure, RIF) an einer fehlerhaften Synchronisierung des Embryos und des rezep tiven Uterus liegt (C. T. Valdes et al., 2017). Hierbei scheint die Regulation der Länge des Implantationsfensters durch Östrogen ein wichtiger Faktor zu sein (Ma et al., 2003).

Auch wenn sich die physiologischen Vorgänge bei der Implantation im Menschen und in der Maus in gewissen Punkten unterscheiden, ist das grundlegende Prinzip sehr ähnlich. Im Rahmen einer hormonell gesteuerten physiologischen und molekularen Umstrukturierung des Endometriums wird das Gewebe auf die Implantation des Embryos vorbereitet. Diese Schritte sind essenziell für die erfolgreiche Etablierung einer Schwangerschaft und diese zu verstehen trägt dazu bei, Komplikationen in der Schwangerschaft oder in der assistierten Reproduktion entgegenzuwirken. Die frühen Vorgänge bei der Implantation des Embryos können allerdings beim Menschen aus ethischen Gründen nicht untersucht werden. Hier fungiert die Maus aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Menschen als guter Modellorganismus.

In Mausstudien konnten einige Signalmoleküle identifiziert werden, die als autokrine, parakrine und juxtakrine Faktoren agieren, die die uterine Rezeptivität regulieren (H. Wang und Dey, 2006): Hierbei stellen Östrogen und Progesteron die Hauptfaktoren dar, die sowohl in der Maus als auch im Menschen eine Schlüsselrolle spielen (Ozturk und Demir, 2010). Deren Effekte werden im Endometrium hauptsächlich durch die nukleär lokalisierten Rezeptoren ER α und PRA und PRB vermittelt (Couse und

Korach, 1999; Mulac-Jericevic et al., 2000). Als wichtiger Faktor wurde auch die Expression des Zytokins LIF (leukemia inhibitory factor) postuliert, das bei der Implantation zunächst in den uterinen Drüsen exprimiert wird, und das dann spezifisch an Tag 4 pc in Stromazellen, die die Blastozyste umgeben, induziert wird (Song et al., 2000; Stewart et al., 1992). Ebenso konnten die Homöobox-Proteine Hoxa10 und Hoxa11 in den Stromazellen während der rezeptiven Phase gefunden werden (Hsieh-Li et al., 1995; Satokata et al., 1995). Eine Beteiligung der HH(hedgehog)-, WNT- und BMP(bone-morphogenetic-protein)-Signaltransduktionswege an der Herstellung der uterinen Rezeptivität konnte ebenfalls gezeigt werden (H. Wang und Dey, 2006).

Der Implantationsprozess wird sowohl beim Menschen als auch bei der Maus in drei Abschnitte unterteilt (Enders und Schlafke, 1969): Die Apposition, bei der sich die Blastozyste unter Bildung von lockeren Bindungen am luminalen Epithel anlagert, die Adhäsion, bei der festere Bindungen gebildet werden und die Invasion des Embryos, bei der das Epithel überwunden wird und der Trophoblast in das endometriale Stroma einwächst.

Beim Menschen adhärirt der polare Trophoblast an das Uterusepithel und penetriert durch das Epithelium in das darunterliegende Stroma (Aplin und Ruane, 2017; Fisher und Damsky, 1993). Die äußeren Trophoblastzellen verschmelzen zum Synzytiotrophoblasten, die inneren bilden den Zytotrophoblasten (Turco und Moffett, 2019).

Bei der Maus positioniert sich die Blastozyste auf der antimesometrialen Seite des Uterus, wobei an den voraussichtlichen Implantationsstellen der Wnt/ β -Signalweg aktiviert wird, welcher notwendig für die Implantation ist (Mohamed et al., 2005). Das luminale Epithel schließt sich um die Blastozyste und bildet so die Implantationskammer. Für diese „closure reaction“, die auch blastozystenunabhängig in scheinchwangeren Tieren stattfinden kann (H. Wang und Dey, 2006), sind Mitglieder der Familie der SMAD-Proteine essenziell (Rodriguez et al., 2016). Die Epithelzellen, die mit dem Trophektoderm in Verbindung stehen, unterlaufen einige Stunden nach der Adhäsion den Prozess der Apoptose oder wie neuere Studien zeigen der Entose (Enders und Schlafke, 1969; Li et al., 2015; Parr und Parr, 1989). Die Epithelzellen, die nicht mit dem Trophektoderm in Verbindung stehen, kommen mit den gegenüberliegenden Epithelzellen der Implantationskammer in Kontakt und gehen ein oder zwei Tage später ebenfalls durch Apoptose zugrunde (Joswig et al., 2003;

Welsh und Enders, 1991a). Die muralen Trophoblastzellen differenzieren zu primären Trophoblastriesenzellen (trophoblast giant cells, TGCs), die mit dem Stroma des Endometriums in Kontakt treten und dieses invadieren (Bevilacqua et al., 2014).

Diese Prozesse bei der Adhäsion und frühen Embryoimplantation von Maus und Mensch sind schematisch in Abb. 1 dargestellt.

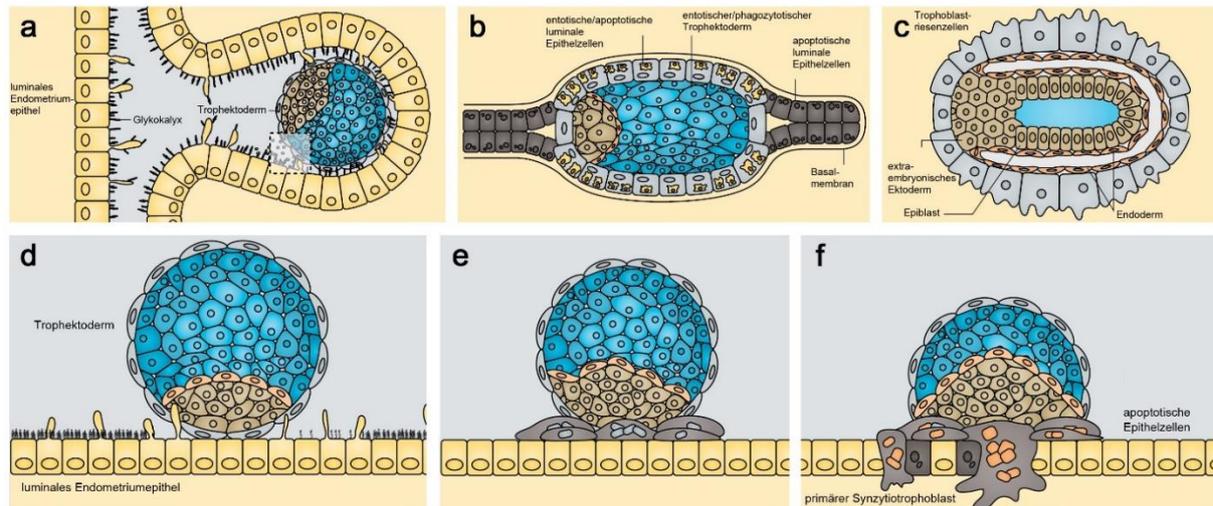


Abb. 1: Embryoimplantation bei Maus und Mensch. Bei der Maus umschließt das luminaire Epithel nach der Apposition die Blastozyste und bildet die Implantationskammer (a). Die Epithelzellen, die mit dem Trophoblasten in Berührung kommen, gehen innerhalb eines Tages zugrunde (b). Anschließend invadieren Trophoblastriesenzellen in das Endometrium (c). Beim Menschen adhärirt die Blastozyste punktuell an das luminaire Epithel (d), es bildet sich die *trophoblastic plate* (e), und der Trophoblast invadiert durch das Epithel in das darunterliegende Stroma (f). Verändert nach Aplin und Ruane (2017).

Auf molekularer Ebene konnten einige Moleküle identifiziert werden, die an der Apposition, bzw. Adhäsion der Blastozyste beteiligt sind, von denen einige Beispiele folgend genannt werden sollen.

Einige Vertreter der CAM (cell adhesion molecules)-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Implantation. Eine Vielzahl von Integrinen konnte im humanen luminalen und glandulären Epithel nachgewiesen werden (Klentzeris et al., 1993; Lessey et al., 1992), wobei einige eine hormonell regulierte zyklische Abhängigkeit zeigen (Achache und Revel, 2006; Lessey et al., 1994), und auch im humanen Trophoblasten sind Vertreter der Integrine exprimiert (J. Wang und Armant, 2002). Dem Integrin $\alpha V \beta 3$ wird eine besondere Wichtigkeit zugeschrieben, da dessen Inhibition bzw. Knockdown *in vitro* und *in vivo* zu einer Reduktion der Embryoadhäsion führt (Illera et al., 2000; Kaneko et al., 2011) und dessen veränderte Expression mit ungeklärter Unfruchtbarkeit assoziiert wird (Tei et al., 2003). Neben Integrinen werden auch L-

Selektin und E-Cadherin im rezeptiven Endometrium, bzw. im Trophoblasten exprimiert (H. Wang und Dey, 2006).

Es wird vermutet, dass der Trophinin-Tastin-Bystin-Komplex, welcher in letzter Konsequenz nach Bindung im Trophektoderm ein Proliferationssignal und im Epithel Apoptose auslösen soll, einer der entscheidenden Mechanismen der Trophoblastenadhäsion sein soll (Aplin und Ruane, 2017; Tamura et al., 2011). Trophinin wird im murinen Trophoblasten und im humanen rezeptiven Uterus exprimiert, jedoch führt ein Trophinin-Defizit nicht zur Unfruchtbarkeit (Nadano et al., 2002).

Weitere für die Embryoimplantation essenzielle Moleküle stammen aus der Familie der Zytokine (LIF, IL-6 und IL-1) und der Prostaglandine (Achache und Revel, 2006).

1.1.2 Dezidualisierung

Ein wesentlicher Prozess bei der Etablierung der Schwangerschaft ist die Dezidualisierung des endometrialen Stromas. Der Dezidua werden eine Reihe von Funktionen zugesprochen, wie den Embryo mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die seine Entwicklung unterstützen, zu versorgen, seine Invasion zu kontrollieren und ihn immunregulatorisch vor der maternalen Immunabwehr zu schützen (Ramathal et al., 2010).

Eine regelrechte Ausbildung der Dezidua ist zudem der Grundstein für die Entwicklung der Plazenta und deren Anschluss an die maternale Vaskulatur und somit für die Ernährung des Embryos im weiteren Verlauf der Schwangerschaft (Plaisier, 2011; Watson und Cross, 2005; Welsh und Enders, 1987, 1991b)

Die Dezidualisierung ist ein Prozess, der sowohl beim Menschen als auch in der Maus stattfindet und in beiden Organismen vergleichbare Funktionen erfüllt. Eine fehlerhafte Dezidualisierung kann in beiden Organismen zu einer beeinträchtigten Implantation, einer Wachstumsretardierung des Embryos und einer fehlerhaften Ausbildung der Plazenta führen, was oft fatale Folgen für Mutter und den sich entwickelnden Fötus hat. Auch hier dient die Maus daher als ein guter Modellorganismus für Untersuchungen an der Dezidua *in vivo*.

Beim Menschen wird der Prozess der Dezidualisierung bzw. die Prä-Dezidualisierung (Rock und Bartlett, 1937) humaner endometrialer Stromazellen bereits post-ovulatorisch in der Sekretionsphase unter dem Einfluss vom Progesteron auch ohne

die Anwesenheit einer Blastozyste initiiert, und bildet sich zu Beginn einer Schwangerschaft durch den Kontakt mit dem frühen Embryo vollständig aus (Gellersen und Brosens, 2014). Die hormonelle Regulation erfolgt über die Steroidhormonrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren für eine Reihe von Genen wirken, die für die Dezidualisierung von Bedeutung sind. An Mausmodellen wurde untersucht, welche downstream aktivierten Gene von Progesteron und Östrogen einen Einfluss auf die Dezidualisierung haben können. Zum einen zeigen PR-Knockout-Mäuse den Phänotypen eines nicht-rezeptiven Uterus, der bei artifizierlicher Dezidualisierung keine Reaktion zeigt (Conneely et al., 2001; Lydon et al., 1995). ER α -Knockout-Mäuse hingegen zeigen einen unterentwickelten Uterus, der eine Blastozystenadhäsion nicht unterstützt (Lubahn et al., 1993). Einige downstream regulierte Gene, die eine Rolle bei der Dezidualisierung spielen, sind beispielsweise der Transkriptionsfaktor C/EBP β , Hoxa10 und -11, BMP2, Wnt4, Ihh (indian hedgehog) und COUP-TFII (Ramathal et al., 2010). Einige Regulatoren, die nicht primär unter dem Einfluss von Progesteron wirken, sind FoxO1 (forkhead box O1), welches für Induktion der Dezidualmarker Prolaktin und IGFBP-1 wichtig ist (J. J. Kim et al., 2005) und die Interleukine Il-11 bzw. dessen Rezeptor Il-11R α (Ramathal et al., 2010). Eine weitreichende Zusammenstellung an Genen und Molekülen, die an der Dezidualisierung beteiligt sind, finden sich in K. Y. Lee et al. (2007) und Gellersen und Brosens (2014).

Die Dezidualisierung der murinen Stromazellen startet erst mit der Adhäsion des Trophoblasten an Tag 4,5 pc, initiiert durch Signale des Trophektoderms, die über das luminale Epithel an das Stroma weitergeleitet werden (S. Zhang et al., 2013). Die Stromazellen, die den Trophoblasten umgeben, bilden die primäre Dezidua (primary decidual zone, PDZ), die eine sehr kompakte und avaskuläre Zellschicht darstellt und als erste Schutzbarriere für den Embryo angesehen wird (Enders und Schlafke, 1969; Mori et al., 2016; Rogers et al., 1983). Die Zellen der PDZ sind hochproliferativ und entwickeln im Laufe der Differenzierung eine Polyploidie, was letztendlich zur Apoptose führt und vermutlich die Lebensspanne der Deziduazellen reguliert, um eine spätere Ausbreitung der Plazenta zu ermöglichen (Ramathal et al., 2010). An Tag 5,5 pc ist die Differenzierung der PDZ abgeschlossen und die sekundäre Dezidua (secondary decidual zone, SDZ), die den Embryo und die PDZ umschließt, beginnt sich vom antimesometrialen zum mesometrialen Pol hin zu differenzieren (Mori et al.,

2016). Die SDZ zeigt ab Tag 5,5 pc einen lockereren Zellverband und ist von kleineren Gefäßen durchzogen. Im weiteren Verlauf der Implantation wird die Dezidua in die antimesometriale und mesometriale Dezidua unterteilt. Ab Tag 7,5 pc ist die mesometriale Dezidua von größeren Blutgefäßen durchzogen und bildet somit die Grundlage für den späteren Anschluss der embryonalen Versorgung an die maternale Blutzirkulation. Die antimesometriale Dezidua degeneriert im Zuge der Plazentation und bildet ungefähr ab Tag 10,5 pc nur noch eine dünne Schicht, die den Embryo auf antimesometrialer Seite umgibt.

Endometriale Stromazellen weisen eine fibroblastenartige Morphologie auf. Im Zuge der Dezidualisierung ändern sie ihre Morphologie in große, runde und multinukleäre Zellen, die reich an Glykogen und Lipiden sind (Mori et al., 2016).

Es wird postuliert, dass es sich bei der Dezidualisierung um einen Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) handelt, die sich anhand von Markermolekülen wie E- und N-Cadherin, snail, Vimentin und Zytokeratin beobachten lässt (X. H. Zhang et al., 2013). Auch die Expression diverser Zell-Zellkontaktproteine in der Dezidua bietet einen Anhaltspunkt für diese These (Grund und Grümmner, 2018).

1.1.3 Die Differenzierung des Trophoblasten und die frühe Plazentation in der Maus

Zum Zeitpunkt der Implantation, an Tag 4,5 pc, besteht der murine Embryo aus drei Anteilen, dem Trophoblasten, dem primitiven Endoderm und dem Epiblasten. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Differenzierung des Trophektoderms, wobei die Zellen des polaren Trophektoderms, die in Kontakt mit der inneren Zellmasse (ICM) stehen, und der murale Trophoblast unterschiedliche Zelltypen formen. Das murale Trophektoderm differenziert zu den primären oder muralen Trophoblastriesenzellen (m-TGCs), die durch Projektionen durch das luminale Epithel in das Stroma invadieren (Dickson, 1963). TGCs sind große, polyploide aber mononukleäre, sekretorische Zellen, die den Prozess der Endoreduplikation durchlaufen, was eine vielfache Replikation der DNA ohne anschließende Mitose darstellt (Hu und Cross, 2010). Das polare Trophektoderm proliferiert unter dem Einfluss von FGF4 und dem nodal-Signaltransduktionsweg der ICM und bildet Stammzellen, die später weitere Zelltypen des Trophoblasten ausbilden (Rai und Cross, 2014). Die Proliferation des polaren Trophoblasten ist zunächst nach innen zur Blastozyste hin gerichtet und bildet das extraembryonische Ektoderm, bis die anhaltende Proliferation ab Tag 7,5 pc dazu

führt, dass sich das Wachstum in Richtung mesometriale Seite des Endometriums ausweitet. Diese Zellpopulation bildet den Ektoplazentarkonus (Rai und Cross, 2014). Dieser wird als der invasive Teil des Trophoblasten gesehen und beinhaltet verschiedene Zellpopulationen, die sich grob in die inneren und äußeren Zellen einteilen lassen, wobei die inneren Zellen weiter proliferieren und undifferenziert bleiben. Diese Zellen tragen später zur Entwicklung des Spongiotrophoblasten bei (Bevilacqua et al., 2014). Die äußeren Zellen des Ektoplazentarkonus bilden sekundäre Trophoblastriesenzellen aus, die mit der Dezidua kommunizieren und wichtig sind für die Aufnahme von Nährstoffen, Interaktionen mit der Dezidua, Sezernierung regulatorischer Hormone, Angiogenese und Immunregulation der maternalen Immunabwehr (Bevilacqua et al., 2014). Insgesamt gibt es verschiedene Subpopulationen an TGCs, die sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten und aus unterschiedlichen embryonalen Geweben differenzieren und von essenzieller Bedeutung bei dem Anschluss des embryonalen an den maternale Kreislauf sind (Hu und Cross, 2010), was in etwa ab Tag 10,5 pc geschieht.

1.2 Tight Junctions

In höheren Organismen ist es notwendig, zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen eine Kompartimentierung einzelner biologischen Einheiten vorzunehmen. Dieses wird durch Epithelien, Endothelien und Mesothelien gewährleistet. Um eine effektive Diffusionsbarriere, aber auch einen gezielten Transport von Molekülen durch die verschiedenen Kompartimente zu ermöglichen, bilden die Zellen verschiedene Zell-Zellkontakte aus, die sich in ihrer Beschaffenheit und Funktion unterscheiden. Zu diesen Zell-Zellkontakten gehören Tight junctions (TJ), Adherens junctions, Desmosomen und Gap junctions (Garcia et al., 2018). Diese verschiedenen Kontaktsysteme tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität in Epithelzellen, deren Stabilität und Integrität, und der Regulation des parazellulären Transports bei, was einen beträchtlichen Einfluss auf die Physiologie und Umstrukturierung von Geweben und deren Homöostase hat. Im Folgenden sollen der Aufbau und die Funktion einer Gruppe dieser Kontakte, nämlich der TJ, näher beschrieben werden.

1.2.1 Aufbau und Funktion der Tight Junctions

Tight junctions (TJ) rückten mit der Entwicklung der Elektronenmikroskopie ins Licht der Aufmerksamkeit und wurden erstmals durch elektronenmikroskopische Analysen von Epithelien als Fusionspunkte in den Zellmembranen benachbarter Zellen beschrieben und *zonulae occludentes* genannt (Farquhar und Palade, 1963). Schon damals vermutete man, dass diese Zellverbindungen die parazelluläre Passage von Molekülen regulieren bzw. verhindern, und dass es sich um ein dichtes Netz aus Transmembranproteinen handelt (Claude und Goodenough, 1973; Staehelin, 1974), wobei die Anzahl der Stränge und die Komplexität der Netzwerke mit der Dichtigkeit der Barriere assoziiert wurde (Claude, 1978). In den letzten Jahren wurden immer mehr Erkenntnisse über den Aufbau und die Funktion der TJ gewonnen und deren Wichtigkeit und Einfluss auf die Physiologie von Geweben, Homöostase und Gewebsumstrukturierungen erkannt.

TJ stellen die am apikalsten gelegenen Zell-Zellkontakte in Epithelzellen dar und befinden sich an den lateralen Membranen angrenzender Zellen. Die schon früh postulierte Barrierefunktion der TJ stellte sich als hoch komplex heraus. So sind TJ

nicht nur Diffusionsbarrieren, sondern regulieren spezifisch die parazelluläre Passage von Molekülen, abhängig von ihrer Größe und Ladung („gate function“) (Anderson und Van Itallie, 2008). Zum anderen erhalten sie die Polarität und Organisation von (Epithel-)Zellen aufrecht, indem sie durch ihre Verankerung in der Zellmembran eine Barriere bilden, die andere Membrankomponenten daran hindert, sich vom apikalen Pol der Zelle zum basalen Pol zu bewegen („fence function“) (Diamond, 1977). Neben der Barrierefunktion sind TJ durch ihre intrazellulären Anteile an Signalkaskaden beteiligt, die die Dynamik des Zytoskeletts, den Vesikeltransport, die Proteinsynthese und die Zellproliferation beeinflussen (Harder und Margolis, 2008). Bisher wurden 40 unterschiedliche Proteine identifiziert, die an dem Aufbau der TJ beteiligt sind, wobei die genaue Zusammensetzung der TJ stark an die physiologischen Anforderungen der Gewebe angepasst ist (Van Itallie und Anderson, 2006). Dabei lassen sich die TJ-Proteine in zwei Gruppen aufteilen:

1. Transmembranproteine, welche über den interzellulären Spalt den Kontakt zu benachbarten Zellen herstellen und so die selektive Permeabilitätsbarriere schaffen. Die Hauptkomponenten dieser Transmembranstränge sind zum einen drei Vertreter der MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane linking) domain Proteine Occludin, Tricellulin und marvelD3 (Zihni et al., 2016), die auch unter dem Begriff TJ associated marvel proteins (TAMP) zusammengefasst werden (Raleigh et al., 2010), und zum anderen die Claudine, die aufgrund ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit in Kapitel 1.2.2 genauer betrachtet werden. Diesen Proteinen ist gemein, dass sie vier Transmembrandomänen besitzen und zwei extrazelluläre Schleifen aufweisen, C- und N-Terminus befinden sich auf der cytosolischen Seite. Occludin (von lat. *occludere*, abschließen) wurde zum ersten Mal als Komponente der TJ von Furuse et al. in der Hühnerleber identifiziert (Furuse et al., 1993). Occludin ist in einer Vielzahl an Geweben, wie den Speicheldrüsen, den Sertoli-Zellen, der Niere, der Haut, der Leber, dem Oesophagus, und auch in Zellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert und wird u.a. durch Phosphorylierung von Serin/Threonin und Tyrosin reguliert (Feldman et al., 2005). Das C-terminale Ende von Occludin ist in der Lage an die junctional plaque Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 zu binden (Furuse et al., 1994; Itoh et al., 1999b) und den basolateralen Transport eines Reporterproteins, sowie den Prozess der Endozytose zu regulieren (Matter und Balda, 1998). Andere Bindungspartner sind, indirekt oder direkt, Proteine der JAM-Familie, sowie das relativ

kürzlich entdeckte JEAP und CLMP (Feldman et al., 2005). Occludin ist somit an der Barrierebildung der TJ und an der Erhaltung der Zellpolarität von Epithelien beteiligt. Ein weiterer Vertreter der MARVEL domain Proteine ist Tricellulin (auch marvelD2 genannt). Tricellulin hat die Besonderheit, speziell, aber nicht ausschließlich, in den TJ an den Kontaktpunkten dreier Epithelzellen (trizelluläre TJ, tTJ, im Gegensatz zu den bizellulären TJ, bTJ) exprimiert zu sein (Ikenouchi et al., 2005). Dabei tragen sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende des Tricellulin zu seiner Lokalisierung in tTJs über die Ausbildung von Homodimeren mit sich selbst und Heterodimeren mit Occludin bei (Westphal et al., 2010).

MarvelD3 wurde in Ko-Lokalisation mit Tricellulin und Occludin gefunden und identifiziert. Es wird vermutet, dass marvelD3 nicht an der Herstellung der TJ beteiligt ist, jedoch einen Einfluss auf deren Ionenpermeabilität besitzt (Steed et al., 2009). Die Funktionen der drei Proteine der TAMP-Familie scheinen zum einen diverse Überlappungen aufzuweisen und sich gegenseitig zu kompensieren, jedoch zeigt jedes der drei Proteine distinkte Funktionen. Beispielsweise konnte für marvelD3 gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu Occludin und Tricellulin nicht direkt an ZO-1 binden kann (Raleigh et al., 2010).

Neben den TAMP und den Claudinen gehören auch Proteine aus der Familie der Immunglobuline (Ig-type) zu den Transmembranproteinen der TJ. Einen großen Teil dieser Proteine bilden die JAMs (junctional adhesion molecules). Diese durchziehen die Membran im Gegensatz zu den TAMP nur einmal. JAMs werden in Epithelien und Endothelien einer Vielzahl von Geweben exprimiert, aber auch in Leukozyten, Zellen des männlichen Reproduktionstraktes, Fibroblasten und im ZNS und PNS (Kummer und Ebnet, 2018). Zu der Gruppe der JAM gehören JAM-A, JAM-B, JAM-C und die etwas entfernter verwandten JAM4 und JAM-L (Hirabayashi et al., 2003; Moog-Lutz et al., 2003). Die JAM-Proteine können untereinander homo- und heterophile Interaktionen eingehen, aber auch mit Integrinen oder junctional plaque Proteinen wie ZO-1 interagieren (Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Kummer und Ebnet, 2018).

2. Zytosolische Proteine, auch junctional plaque components genannt, die sowohl mit den transmembranen Komponenten der TJ, als auch mit F-Aktin und Mikrotubuli interagieren und zur Regulierung von zellulären Signalwegen beitragen. Sie fungieren somit als Adapterproteine, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen (Zihni et al., 2016). Hierbei kann zwischen Proteinen, die eine bzw. mehrere PDZ-Domänen

enthalten, und Proteinen, die keine PDZ-Domäne enthalten, unterschieden werden (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Die PDZ-Domäne ist wichtig für das Clustering und Verankern der Transmembranproteine (E. Kim et al., 1995), sodass Proteine, die mehrere PDZ-Domänen besitzen, als Gerüst fungieren, um Proteine des Zytoskeletts und der Signaltransduktion zusammenzubringen.

Ein prominenter Vertreter der PDZ-Domänen-enhaltenden Proteine sind die ZO-Proteine (*zonula occludens*). Sie gehören zu der Familie der MAGUK-Proteine (membrane associated guanylate kinase) und beinhalten die Isoformen ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Diese Proteine binden an Claudine, JAMs und Occludin und können so als regulatorische Schalter für die Ligandenbindung fungieren und zur TJ-Bildung und Signaltransduktion beitragen (Zihni et al., 2016). Proteine der TJ, die keine PDZ-Domäne besitzen sind beispielsweise Cingulin, welches mit den ZO- und JAM-Proteinen sowie F-Aktin interagiert, Symplekin oder die Rab-Proteine (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Eine Übersicht der verschiedenen TJ-Proteine und ihre Assoziationen untereinander ist in Abb. 2 gezeigt.

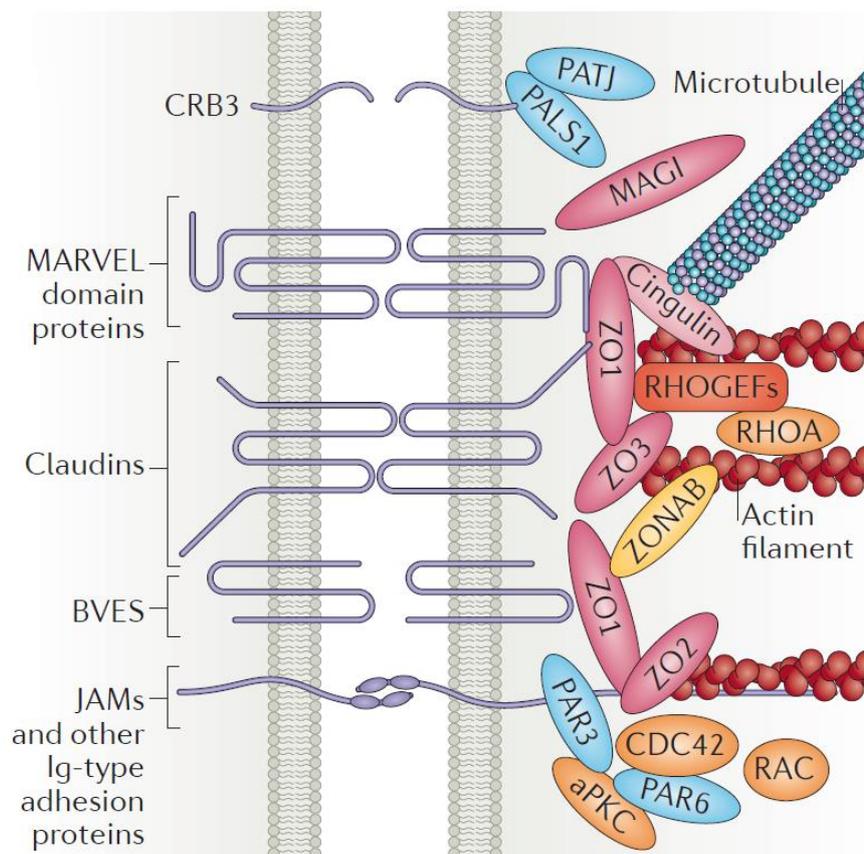


Abb. 2: Schematische Darstellung der am Aufbau von Tight-Junctions beteiligten Proteine. Verändert nach Zihni et al. (2016).

1.2.2 Claudine

Die Familie der Claudine stellt die größte Proteinfamilie der TJ-Proteine dar. Bislang wurden im Menschen 26 und in der Maus 27 Isoformen identifiziert (Zihni et al., 2016), in Spezies wie dem Pufferfisch sogar 56 (Loh et al., 2004). Claudin-Homologe konnten auch in Invertebraten inklusive *C.elegans* und *Drosophila* gefunden werden (Asano et al., 2003; Wu et al., 2004). Die ersten Claudine, Cldn1 und Cldn2, wurden von der Arbeitsgruppe um Furuse 5 Jahre nach dem Fund von Occludin charakterisiert und nach dem lateinischen Wort für „schließen“, *claudere*, benannt (Furuse et al., 1998). Ein Grund für die Ausbildung der Vielfalt innerhalb der Claudinfamilie können Genduplikationen sein, da, obwohl die Gene für Claudine über das Genom verteilt sind und sogar auf den Sexualchromosomen vorkommen, einige Claudingenpaare sehr eng beieinander liegen, so beispielsweise Cldn3 und -4, Cldn6 und -9 und Cldn8 und -17 (Kollmar et al., 2001; Lal-Nag und Morin, 2009). Von einigen Claudinen ist bekannt, dass sie Splice-Varianten aufweisen, die zu einer unterschiedlichen Funktion der Claudine führen können. Cldn5, -10, -14, -18 und -19 haben jeweils zwei Varianten, von allen anderen Claudinen ist nur eine Form bekannt. Auch die Anzahl der Introns variiert von null (beispielsweise Cldn3, -4, -8 und -17) bis zu vier Introns (Cldn15, -16 und -19) (Lal-Nag und Morin, 2009).

In den letzten Jahrzehnten gab es einige verschiedene Herangehensweisen, Claudine in Gruppen zu unterteilen. Zum einen haben verschiedene Publikationen Claudine unter Berücksichtigung der Spezies nach ihrer phylogenetischen Verwandtschaft eingeteilt. Dabei teilten Krause et al. die Claudine in zwei Gruppen: die nah verwandten „klassischen“ Claudine (Cldn1-10, -14, -15, -17 und -19) und die unterschiedlicheren „nicht-klassischen“ Claudine (Cldn11-13, -16, -18 und -20-24) (Krause et al., 2008). Andere phylogenetische Gruppierungen haben die Claudine in acht Subgruppen (A-H) und vier Clustern (I-IV) geteilt (zur Übersicht s. Günzel und Fromm (2012)). Mit wachsender Einsicht in die Funktion der Claudine gewinnt die funktionelle Einteilung in „abdichtende“ Claudine und porenbildende Claudine, bzw. Claudine mit diverser oder ungeklärter Funktion, an Relevanz (Günzel und Fromm, 2012).

Allen Claudinen gemein ist die grundlegende Proteinstruktur. Claudine besitzen ein Molekulargewicht von 22-27 kDa und zählen wie bereits erwähnt zu den Transmembranproteinen der TJ. Sie weisen vier hydrophobe Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen, wobei die erste größer ist als

die zweite, und zytosolisch lokalisierte C- und N-Termini auf (Turksen und Troy, 2004). Die erste extrazelluläre Schleife beinhaltet etwa 52 Aminosäuren und zeigt unter den verschiedenen Claudinen eine hohe Variabilität in der Sequenz der Aminosäuren, wobei zwei hoch konservierte Zysteine vermutlich Disulfidbrücken bilden, um so die Stabilität zu erhöhen. Ebenfalls enthält die erste extrazelluläre Schleife geladene Aminosäuren, die zu der Ionenselektivität der TJ-Barriere, bzw. deren Ionenkanalfunktion beitragen (Colegio et al., 2002; Van Itallie und Anderson, 2006), wobei sich ein experimenteller Austausch der extrazellulären Domänen von verschiedenen Claudinen sowohl auf den transepithelialen Widerstand (TER) als auch auf die Ionenselektivität auswirkt, und die erste extrazelluläre Domäne allein für diese Ionenselektivität zuständig ist (Colegio et al., 2003; Furuse et al., 2001).

Die zweite extrazelluläre Domäne beinhaltet 16-33 Aminosäuren und ist vermutlich für die Oligomerisation von Claudinen innerhalb einer Zelle und somit für die regelrechte Ausbildung des TJ-Strangs verantwortlich (Gupta und Ryan, 2010). Konservierte Aminosäuresequenzen sind in der zweiten extrazellulären Domäne nur schwer auszumachen (Krause et al., 2008).

Der intrazelluläre C-Terminus von Claudinen zeigt ebenfalls eine hohe Varianz unter den einzelnen Claudinen. Die letzten zwei Aminosäuren fungieren als PDZ-binding-Domäne, mit denen Claudine an Proteine des junctional plaque Komplexes, wie beispielsweise ZO-1, -2 und -3 binden können (Itoh et al., 1999a). Über diese Interaktion soll das Bindeglied zwischen parazellulärem Transport und intrazellulärer Signaltransduktion geschaffen werden. Der strukturelle Aufbau der Claudine wird in Abb. 3 gezeigt.

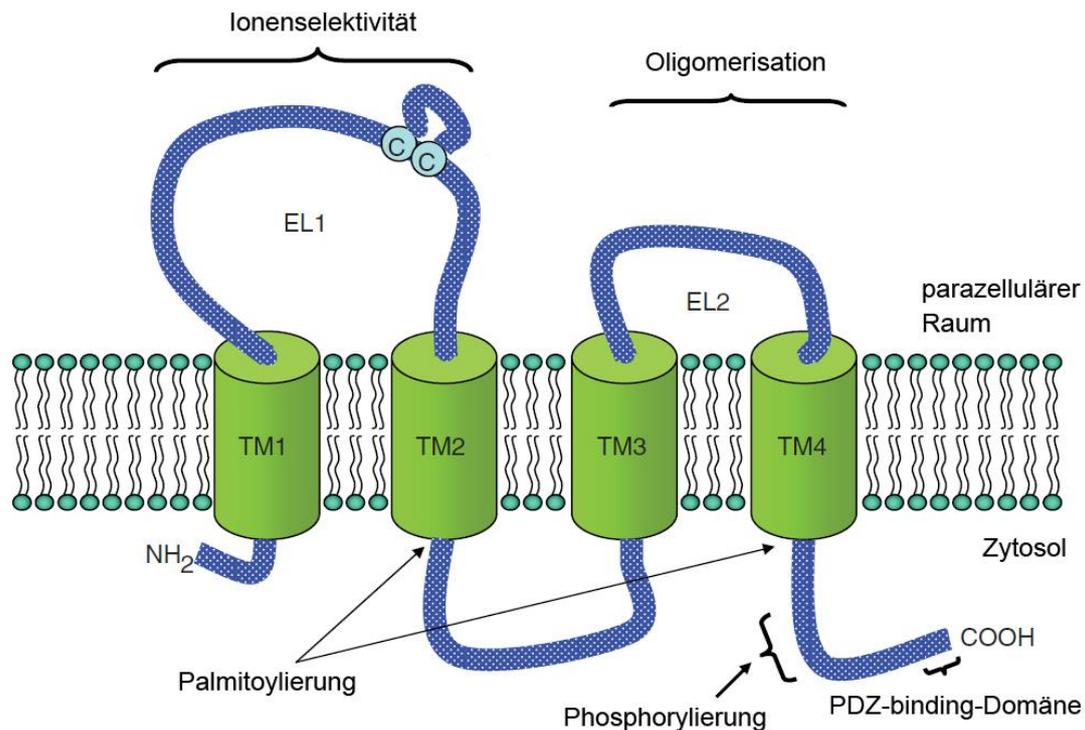


Abb. 3: Molekulare Struktur der Claudine. Claudine bestehen aus vier Transmembrandomänen (TM1-4) und zwei extrazellulären Schleifen (EL1-2). N- und C-Terminus liegen cytosolisch, wobei der C-Terminus eine PDZ-binding-Domäne besitzt. Verändert nach Lal-Nag und Morin (2009).

Die Epithelien vieler Gewebe weisen ein sehr spezifisches Expressionsmuster von Claudinen auf. Dabei können in einer Zelle mehrere Claudine exprimiert sein, wobei die Expression einzelner Claudine auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt oder ubiquitär sein kann. Beispiele für Claudine, die in vielen Geweben vorkommen, sind Cldn1 (z.B. Epidermis, distales Nephron, Gallenbalse, Ovarpeithel, Choroidplexusepithel), Cldn2 (z.B. Krypten des Darmes, proximaler Tubulus, Ovarpeithel, Innenohr) oder Cldn7 (diverse Darm- und Nephronsegmente). Andererseits ist die Expression von Cldn5 typisch für Endothelzellen und die Expression von Cldn6 beispielsweise auf embryonale Gewebe beschränkt (Krause et al., 2008). Für eine umfassende Übersicht der Claudin-Expression in den verschiedenen Organen und Geweben s. Turksen und Troy (2004).

Die Komposition der Claudine bedingt stark die Permeabilität und Dichtigkeit der TJ. Das wird u.a. dadurch herbeigeführt, dass Claudine untereinander verschiedene Arten von Interaktionen eingehen können. Zum einen können Claudine homophile Bindungen eingehen, bei denen sich Claudine gleicher Art zusammenlagern, zum anderen heterophile Bindungen, bei denen sich unterschiedliche Claudine zusammenlagern (Gupta und Ryan, 2010). Hinzu kommt, dass diese Bindungen

innerhalb einer Zelle (*cis*) oder zwischen zwei benachbarten Zellen (*trans*) eingegangen werden können und dass sich Claudine in diesen beiden Konfigurationen unterschiedlich verhalten können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cldn1, -2 und -3 in der *cis*-Konfiguration miteinander interagieren konnten, in der *trans*-Konfiguration Cldn3 mit Cldn1 und -2 interagieren konnte, Cldn1 und -2 untereinander jedoch nicht (Furuse et al., 1999; T. S. Lim et al., 2008). In vielen Studien konnten Interaktionen verschiedenster Claudine gezeigt werden (zur Übersicht s. Günzel und Fromm (2012)). Auch wenn das Gesamtbild der Bindungsaffinitäten der Claudine untereinander noch lückenhaft ist, zeichnet sich jedoch ab, dass die Vielfalt der Interaktionen der Claudine wesentlich die Struktur und Funktion von Geweben und Zellen beeinflussen. Der Zusammenhang zwischen der Claudinzusammensetzung und der Funktionalität der Gewebe wird besonders deutlich im Gewebe von Darm und Niere, wo die unterschiedlichen Segmente der Organe für verschiedene Funktionen verantwortlich sind und jedes Organsegment ein sehr spezifisches Set an Claudinen exprimiert (Amasheh et al., 2011).

Wie bereits erwähnt können Claudine funktional in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die Funktion einer Reihe von Claudinen konnte in verschiedenen transfizierten Zellmodellen und Knockout-Mausmodellen als eindeutig abdichtend und barrierebildend beschrieben werden. Zu diesen Claudinen gehören Cldn1, -3, -5, -11, -14 und -19. Anderen Claudinen, wie Cldn2, -10a und -10b, -15 und -17, konnte hingegen eine eindeutige porenbildende Funktion zugewiesen werden. Die Funktionsbeschreibungen der übrigen Claudine sind entweder inkonsistent oder noch nicht vorhanden (Günzel und Fromm, 2012).

Die Expression von Claudinen sowie deren abdichtende und porenbildende Funktion in den verschiedensten Geweben sind sehr dynamisch, um auf physiologische Gegebenheiten in den Organen schnell reagieren zu können. Dies tritt vor allem im Hinblick darauf auf, dass Claudine in einigen sehr plastischen Geweben exprimiert sind, die starken physiologischen Schwankungen unterworfen sind, wie Niere, Darm oder Endometrium. Das wird beispielsweise angedeutet durch die kurze Halbwertszeit von Cldn4, die bei etwa 4 Stunden liegt (Van Itallie et al., 2004). Die Regulation von Claudinen wird auf posttranslationaler Ebene oft durch Phosphorylierung erreicht. Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA), MAP-Kinase, Threonine/Serine Kinase WNK4 (with no lysine kinase), sowie die MLCK

(myosin light chain kinase) konnten am C-Terminus von Claudinen gefunden und charakterisiert werden (Günzel und Fromm, 2012). Hierbei bestimmt der Phosphorylierungsstatus einzelner Aminosäuren (oftmals des C-Terminus) beispielsweise den Einbau der Claudine in die TJ (Tanaka et al., 2005). Phosphorylierung findet beispielsweise durch die Proteinkinase A bei Cldn3 und -5 statt (D'Souza et al., 2005; Soma et al., 2004), Cldn1 bis -4 werden ebenfalls durch WNK4 phosphoryliert (Yamauchi et al., 2004). Neben der Phosphorylierung scheint auch die S-Acylierung, bzw. Palmitoylierung ein möglicher Regulationsmechanismus für Claudine zu sein. Bei Cldn14, bei dem vier Bindungsstellen am C-Terminus identifiziert wurden, ist eine Palmitoylierung der zwei konservierten Zysteine notwendig, um das Protein erfolgreich in den TJ zu verankern (Van Itallie et al., 2005).

1.2.3 Cldn3 und Cldn10

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die beiden Claudine Cldn3 und -10 gelegt. Diesen Claudinen werden unterschiedliche Funktionen zugesagt. Während Cldn3 zu den barriereformenden und abdichtenden Claudinen gezählt wird (Milatz et al., 2010), bildet Cldn10 ladungsselektive Ionenkanäle (Krug et al., 2012).

Das Cldn3-Protein umfasst 220 Aminosäuren beim Menschen und 219 Aminosäuren bei der Maus. Die Lokalisierung des Proteins im Genom unterscheidet sich bei Mensch und Maus. Während das humane Cldn3 auf Chromosom 7 liegt, ist es bei der Maus auf Chromosom 5 lokalisiert. Cldn3, wie auch das strukturverwandte Cldn4, besitzt nur ein Exon und keine Introns.

Sowohl in der Maus als auch im Menschen wird Cldn3 ubiquitär exprimiert und wurde in einer Vielzahl von Geweben gefunden, darunter in den Epithelien von Leber und dem Gastrointestinaltrakt, dem Corneaepithel, dem Duktusepithel des Pankreas, Niere, Gallenblase, Innenohr, der Epidermis der Haut und in der Lunge (Turksen und Troy, 2004). Nicht nur in Epithelien, sondern auch in Endothelien ist Cldn3 exprimiert und hat einen signifikanten Anteil an der Regulation der TJ-Permeabilität in der Blut-Hirn-Schranke (Wolburg et al., 2003).

Cldn3 kann mehrere Typen von Interaktionen eingehen. Es kann beispielsweise homophile Bindungen mit sich selbst, oder heterophile Bindungen mit Cldn1, -2 und 5, aber nicht mit Cldn4 eingehen (Daugherty et al., 2007).

Die Vermutung, dass Cldn3 eine barriereformende Komponente der TJ ist, wird durch einige Studien gestützt. So konnte in mit humanem Cldn3 transfizierten MDCK II Zellen ein Anstieg des parazellulären Widerstands (R^t) und korrelierend eine Verringerung der Permeabilität der Monolayer-Zellschicht für Moleküle der Größe 332 Da und 4 kDa beobachtet werden. Die Überexpression von Cldn3 in diesen Zellen hatte außerdem eine Veränderung der TJ-Strangstruktur zufolge (Milatz et al., 2010). Ein Knockdown von Cldn3 MKN28-Zellen, einer gastrointestinalen Adenokarzinomzelllinie, führte zu einer Verringerung des R^t (Hashimoto et al., 2008). Mit humanem Cldn3 transfizierte murine Fibroblastenzellen (NIH/3T3) und humane Lungenepithelzellen (IB3.1) zeigten einen tendenziell erhöhten R^t , wohingegen die Überexpression in NIH/3T3-Zellen keinen Effekt auf die Permeabilität hatte, in IB3.1-Zellen hingegen einen negativen Effekt (Coyne et al., 2003). Eine Auswirkung der Cldn3-Überexpression auf die Wasserdurchlässigkeit konnte nicht beobachtet werden (Milatz et al., 2010).

Cldn10 existiert im Gegensatz zu Cldn3 in zwei verschiedenen Splice-Varianten, Cldn10a und Cldn10b, von denen jeweils noch andere Subvarianten in Mensch und Maus gefunden werden konnten (Günzel et al., 2009; Van Itallie et al., 2006). Die Splice-Varianten entstehen durch alternative Nutzung entweder des Exons 1a oder 1b. Das Gen für Cldn10 liegt im Menschen auf Chromosom 13, in der Maus auf Chromosom 14, das Protein umfasst ca. zwischen 200 und 230 Aminosäuren.

Die Expression und Funktion von Cldn10 hängen stark von der Isoform ab. Während Cldn10b in vielen Geweben nachgewiesen werden konnte, darunter am prominentesten im proximalen Tubulus und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife in der Niere (Breiderhoff et al., 2012; Van Itallie et al., 2006), scheint die Expression von Cldn10a auf die Niere begrenzt zu sein (Milatz, 2019; Van Itallie et al., 2006)

Die Splice-Varianten von Cldn10 weisen Unterschiede in der ersten Transmembrandomäne und in der ersten extrazellulären Schleife auf. Wie bereits beschrieben bedingt die Aminosäuresequenz bzw. die Ladung der darin befindlichen Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife die Ladungsselektivität des durch manche Claudine geformten Ionenkanals.

Cldn10a besitzt sieben positiv und nur eine negativ geladene Aminosäure in der ersten extrazellulären Schleife, womit es vermutlich als Anionenkanal fungiert (Milatz, 2019). Die Expression von Cldn10a in wenig permeablen MDCK C7-Zellen resultierte in einer

Verringerung des transepithelialen Widerstands sowie einer Erhöhung der Permeabilität von NO_3^- im Gegensatz zu dem des Anionenpyruvat, was vermuten lässt, dass Cldn10a die Anionenpräferenz moduliert (Günzel et al., 2009).

Die erste extrazelluläre Schleife von Cldn10b beinhaltet vier positive und fünf negativ geladenen Aminosäuren. In den meisten Zellkulturmodellen, in denen eine Cldn10b Expression induziert wurde, konnte eine Verringerung des TER gemessen werden, die auf einer erhöhten Präferenz von Natriumionen gegenüber Chloridionen basierte. Weitere Charakterisierungen führten zu der Erkenntnis, dass der von Cldn10b geformte Kationenkanal eine Präferenz für monovalente Kationen gegenüber divalenten Kationen besitzt (Günzel et al., 2009; Milatz, 2019).

1.2.4 CldnKO-Mausmodelle zur Aufklärung der Claudin-Funktionen und deren Rolle in der Pathologie

Viele Studien zur Aufklärung der Funktion von Claudinen werden *in vitro* durchgeführt. Dabei werden oftmals Zelllinien, wie verschiedene Vertreter der MDCK-Zelllinie (Madin-Darby canine kidney) oder Caco-2-Zellen (isoliert aus humanem Kolon-Adenokarzinom) verwendet, die unter bestimmten Kulturbedingungen epitheliale Verbände bilden und Zellkontakte ausbilden (Volpe, 2011). Ebenfalls können epitheliale Zelllinien wie beispielsweise die humane Atemwegsepithelzelllinie IB3.1 verwendet werden (Coyne et al., 2003). Der Vorteil dieser *in vitro*-Modelle ist, dass zum einen native Zellen untersucht werden können, zum anderen durch Transfektion eine Überexpression oder durch Knockdown eine Unterexpression der Claudine hervorgerufen werden kann.

Während hier die reine Funktion der Proteine untersucht werden kann, ist deren Rolle in physiologischen Systemen jedoch viel komplexer, und die Auswirkungen von Über- und Unterexpression auf die Gewebe, Organe und den ganzen Organismus kann in *in vitro*-Modellen nicht hinreichend eingeschätzt werden. Daher ist es unerlässlich, die Funktion der TJ-Proteine *in vivo* zu untersuchen, wofür in den letzten Jahren mit zunehmender Verfügbarkeit von Mechanismen zur genetischen Manipulation eine Vielzahl von Knockout-Mausmodellen erzeugt wurde. Ebenfalls ist es möglich, mit diesen Mausmodellen Krankheiten des Menschen zu simulieren, bei denen Mutationen oder Fehlfunktionen von Claudinen beteiligt sind. Im Folgenden sollen einige Beispiele genannt werden:

Die Deletion zweier Nukleotide des Cldn1-Gens, die zu einer Frameshift-Mutation mit vorgezogenem Stopp-Codon führen, führt zur Ausbildung des NISCH (Neonatales Icthyose-Sklerosierende-Cholangitis)-Syndrom, bei dem ein Cldn1-Defizit in der Leber und in der Haut vorliegt (Hadj-Rabia et al., 2004). Cldn1-defiziente Mäuse zeigen einen erhöhten Wasserverlust durch eine defekte Hautbarriere und versterben innerhalb der ersten 24 Stunden (Furuse et al., 2002). Cldn1 trägt also wesentlich zur Bildung der Hautbarriere und Integrität der TJ der Haut bei.

Cldn5 ist ein Hauptbestandteil in den TJ der Blut-Hirn-Schranke (Itoh et al., 1999a). Cldn5-defiziente Mäuse sterben innerhalb der ersten 24 Stunden aufgrund einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für kleine wasserlösliche Moleküle (Nitta et al., 2003). Mutationen des Cldn9-Gens wurden in Patienten mit erblich bedingter autosomal rezessiver Taubheit gefunden, was zu einer Dislokation des Proteins und somit zu nicht funktionalen TJ führte. Die fehlerhafte Ausbildung der TJ-Barriere beeinträchtigte die peri- und endolymphatische Ionenkomposition (Sineni et al., 2019). Auch diverse Mutationen des Cldn14-Gens konnten mit Beeinträchtigungen des Hörvermögens in Verbindung gebracht werden (K. Lee et al., 2012). Während Cldn9KO-Mäuse durch Verlust der Haarsinneszellen taub waren (Nakano et al., 2009), verloren Cldn14-defiziente Mäuse das Hörvermögen in der dritten Lebenswoche (Ben-Yosef et al., 2003).

Tab. 1 zeigt eine Zusammenfassung von KO-Mausmodellen zur Untersuchung der Funktion der Claudine und deren assoziierten Krankheiten.

Tab. 1: Liste der CldnKO-Mausmodelle und deren assoziierte humane Krankheitsbilder.

Cldn	Phänotyp des KO-Modells	Quelle	assoziierte humane Krankheit	Quelle
Cldn1	Wasserverlust durch defekte Hautbarriere	(Furuse et al., 2002)	Neonatales Ichtyose-Sklerosierende-Cholangitis(NISCH)-Syndrom	(Hadj-Rabia et al., 2004)
Cldn5	erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für kleine Moleküle	(Nitta et al., 2003)		
Cldn7	Geschwürbildung der Magenmukosa und Entzündung	(Ding et al., 2012)		
Cldn9	Taubheit	(Nakano et al., 2009)	erblich bedingte autosomal rezessive Taubheit	(Sineni et al., 2019)
Cldn10	Polyurie, Polydipsie, Hypermagnesiämie durch KO im TAL	(Breiderhoff et al., 2012)	HELIX-Syndrom	(Hadj-Rabia et al., 2018)
Cldn11	Beeinträchtigung der Spermatogenese, Verminderte Leitgeschwindigkeit im ZNS	(Gow et al., 1999)		
	Taubheit	(Gow et al., 2004)		
Cldn14	Taubheit	(Ben-Yosef et al., 2003)	erblich bedingte autosomal rezessive Taubheit	(K. Lee et al., 2012)
Cldn16	Hyperkalzurie, Hypomagnesiämie	(Will et al., 2010)	Hypomagnesiämie-Hyperkalziurie-Nephrokalzinose(FHHNC)-Syndrom	(Yamaguti et al., 2015)
Cldn19	Barrieredefekt der Schwann-Zellen renaler Verlust von Magnesium und Calcium	(Miyamoto et al., 2005) (Hou et al., 2009)	Hyperkalzurie, Hypomagnesiämie, Nephrokalzinose	(Konrad et al., 2006)

1.3 Die Bedeutung von TJ-Proteinen im zyklischen Endometrium sowie in der Schwangerschaft

Das Endometrium ist eines der plastischsten Gewebe des Organismus. Unter hormoneller Kontrolle erfährt es regelmäßig eine drastische Umstrukturierung auf morphologischer und molekularer Ebene, bei der es zum einen in den rezeptiven Zustand gebracht wird, um sich auf eine mögliche Schwangerschaft vorzubereiten, und zum anderen im Falle einer Befruchtung die Implantation des Embryos reguliert und für dessen Versorgung zuständig ist. Einhergehend mit diesen strukturellen und funktionellen Veränderungen konnten in den letzten Jahren Veränderungen der Struktur und Zusammensetzung von Zell-Zellkontakten beobachtet werden, um die an

das Endometrium gestellten Anforderungen zu erfüllen (Grund und Grümmer, 2018). Die differenzielle Regulation von TJ-Proteinen bzw. Claudinen konnte sowohl für den Menschen als auch für die Maus bzw. die Ratte nachgewiesen werden. Im menschlichen Endometrium konnten bisher Cldn1, -2, -3, -4, -5 und -7 nachgewiesen werden. Dabei konzentrierte sich die Expression hauptsächlich auf das glanduläre Epithel, eine Lokalisation der Claudine im luminalen Epithel konnte nicht oder nur schwach nachgewiesen werden (Buck et al., 2012; Gaetje et al., 2008; Pan et al., 2007; Sobel et al., 2006). Dagegen konnte *in vitro* und *in vivo* keine Expression von Claudinen in endometrialen Stromazellen nachgewiesen werden (Someya et al., 2013). Hinsichtlich der Regulierung dieser Claudine während des Menstruationszyklus beim Menschen gibt es widersprüchliche Beobachtungen. Während in einer Studie keine Regulation von Cldn1- und -5, aber eine erhöhte Expression von Cldn3, -4 und -7 während der Mitte der Sekretionsphase im Vergleich zur Proliferationsphase und frühen Sekretionsphase berichtet wurde (Gajda et al., 2008), konnten andere Arbeitsgruppen keine Regulation von Cldn3 und -4 nachweisen (Buck et al., 2012; Pan et al., 2007; Pan et al., 2009). In der Maus konnte bislang eine Expression von Cldn1, -3, -7 und -10 nachgewiesen werden (Liang et al., 2013; Schumann et al., 2015; X. Wang et al., 2004), jedoch wurde bisher nur für die Ratte eine zyklische Regulierung von Claudinen im Östruszyklus berichtet. Dabei konnte keine Claudin-Expression während des Metöstrus nachgewiesen werden, jedoch eine basale/apikale Lokalisationsverschiebung von Cldn1, -3, -5 und -7 im luminalen Epithel der anderen Östrusphasen (Mendoza-Rodriguez et al., 2005).

Zu Beginn der Interaktion des Embryos mit dem Endometrium konnten Claudine sowohl im endometrialen Epithel als auch in der sich bildenden Dezidua in Nagern gefunden werden. Cldn1 und -4 konnten in Ko-Lokalisation mit ZO-1 in der Ratte in apikaler Konzentration von Tag 1-6 pc in der lateralen Membran von endometrialen Epithelzellen mit einem starken Anstieg der Expression an Tag 6 pc gefunden werden (Nicholson et al., 2010; Orchard und Murphy, 2002). Die Expression von Cldn7 nimmt hingegen von Tag 1 pc an ab, bis es zum Zeitpunkt der Implantation nicht mehr vorhanden ist (Poon et al., 2013). In Mäusen sind zum Zeitpunkt der Implantation Cldn3, -7 und -10 im luminalen Epithel (Cldn3 und -7) und im glandulären Epithel (Cldn10) lokalisiert, wobei es hier zu intrazellulären Lokalisationsverschiebungen vom basalen zum apikalen Pol der Zelle kommt (Liang et al., 2013; Schumann et al., 2015). Obwohl das Stroma im zyklischen Endometrium keine Claudinproteine aufweist, wird

die Expression der Claudine in der Dezidua in den ersten Stadien der Schwangerschaft interessanterweise zeitlich differenziert induziert. So konnte von unserer Arbeitsgruppe eine Induktion von Cldn10 ab Tag 4,5 pc in murinen Deziduazellen der PDZ nachgewiesen werden, die sich mit der Bildung der sekundären Dezidua fortsetzte, sowie eine Induktion von Cldn3 ab Tag 6,5 pc in der sekundären Dezidua (Schumann et al., 2015).

Diese zeitlich und räumlich sehr differenzierte Regulation der Claudine während der Etablierung einer Schwangerschaft legt einen großen Beitrag der Proteine bei den funktionellen und strukturellen Anpassungen des Endometriums an die Anforderungen der Schwangerschaft nahe. Jedoch ist deren spezifische Funktion für die Etablierung und den Erhalt der Schwangerschaft bisher unbekannt.

2. Zielsetzung

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl an Studien die Relevanz von Zell-Zellkontakten, u.a. der Claudine, bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen darstellen. Auch im Hinblick der Funktionsaufklärung der Claudine konnten viele neue Erkenntnisse gewonnen werden. Bei den drastischen Veränderungen des Endometriums während der Schwangerschaft wurde die Wichtigkeit der Anpassung der TJ-Zusammensetzung an die Anforderungen einer Etablierung der Schwangerschaft immer deutlicher. Hier konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die Claudine 3, 7 und 10 zum Zeitpunkt der Embryoimplantation an Tag 4,5 pc im luminalen und glandulären Epithel des murinen Endometriums nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine zeitlich und räumlich präzise regulierte Induktion von Cldn3 und -10 in den endometrialen Stromazellen während der Dezidualisierung (Schumann, 2015). Über die Funktion dieser Claudine für die Schwangerschaft ist jedoch wenig bekannt.

Daher sollte in der hier vorliegenden Arbeit zum einen anhand eines Knockout-Mausmodells die Auswirkung einer Cldn3-Deletion auf die Fertilität der Tiere untersucht werden. Dabei sollten Fertilitätsparameter wie Wurfgrößen, Geschlechterverteilungen und zyklische Aktivität des Endometriums überprüft werden. Des Weiteren sollte die Auswirkung dieser Deletion auf die regelrechte Bildung der Dezidua, sowie auf die Embryoimplantation, die Plazentation und die Embryoentwicklung mit Hilfe von histomorphologischen und immunhistochemischen Methoden analysiert werden. Da bereits bekannt ist, dass Cldn3-defiziente Mäuse fertil sind (Kooij et al., 2014), sollte ein weiteres Ziel dieser Arbeit sein, die Expression des strukturverwandten Cldn4 als möglichen kompensatorischen Mechanismus für das Fehlen von Cldn3 zu untersuchen. Mithilfe von Transkriptomanalysen sollen zusätzlich differenzielle Genexpressionen in der Dezidua der Cldn3KO-Maus aufgezeigt werden, um so potenzielle Moleküle zu identifizieren, auf deren Regulation die Deletion von Cldn3 einen Einfluss hat.

Neben dem Cldn3 sollte auch erstmalig die Funktion des endometrialen Cldn10 für die Reproduktion untersucht werden. Da globale Cldn10KO-Mäuse nicht überlebensfähig sind, sollte in dieser Arbeit ein Mausmodell erzeugt werden, das einen Endometriums-spezifischen Knockout von Cldn10 besitzt. Dazu wurde das Cre-lox-

System verwendet und eine „gefloxt“ Cldn10-Mauslinie mit einer Cre-Mauslinie gekreuzt, bei der das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Progesteronrezeptor-Promotors steht. Nach erfolgreicher Herstellung einer konditionalen Cldn10KO-Maus sollte diese Maus im Hinblick auf ihre Fertilität untersucht werden. Da noch keine Daten über die Auswirkung eines Endometrium-spezifischen Knockouts von Cldn10 existierten, war bislang unklar, ob diese Mäuse fertil sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen, Handschuhe, Küvetten, Reaktionsgefäße, Wägeschalen etc., sowie Einstreu für die Käfige und Zubehör für die Tierhaltung wurden in Standard-Laborqualität bezogen.

Tab. 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläschen (versch. Größen)	Engelbrecht, Edermünde, D
Einbettformen Macro	Roth, Karlsruhe, D
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe, D
Einmalskalpelle	Servoprax, Wesel, D
Macrosette Einbettkassette	Simport Scientific
Objektträger (76x26 mm)	Engelbrecht, Edermünde, D
Tierkäfige (Typ Blue-Line)	Tecniplast, Hohenpeißenberg, D

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck oder Carl Roth in Analysequalität bezogen.

Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Firma
Aceton	Honeywell Riedel-de Haen
Agarose	Biozym Scientific
Borsäure	Sigma-Aldrich
Citronensäure	Carl Roth
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
DPBS	PAN Biotech
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Enthaarungscreme	Pilca
Eosin Y disodium salt	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich
Ethanol, 96 %	Apotheke Universitätsklinikum Essen
Fluoromount-G®	Southern Biotech
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth
GelRed®	Biotium
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
Isopropanol	Carl Roth
Methanol	J.T. Baker
Paraplast Tissue Embedding Medium	Mc Cormick Scientific
PBS, pH7,4	Gibco™
RNaseZap™	Merck
Shandon™ Instant Hematoxylin Kit	Thermo Scientific
Shandon™ Xylene Substitute	Thermo Scientific
Shandon™ Xylene Substitute Mountant	Thermo Scientific
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek™
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich

3.1.3 Kits

Tab. 4: Verwendete kommerzielle Kits.

Kit	Firma	Produktnummer
Extract-N-AMP™ Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich	XNAT2-1KT
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	74104
Affymetrix Clariom™ S Assay, mouse	Applied Biosystems™	902930

3.1.4 Geräte

Tab. 5: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Firma
Binokular	SMZ1270	Nikon
Feinwaage	ABJ-NM/ABS-N	Kern
Heizblock	ThermoStat plus	Eppendorf
Homogenisator	Ultra TurraxT10 basic	IKA
Image Analyzer	Chemidoc™	Bio-Rad
Kryostat	CM3050	Leica
(Fluoreszenz-)Mikroskop	DM4000 B	Leica
(Fluoreszenz-)Mikroskop	EclipseNi	Nikon
Mikrotom	RM2235	Leica
pH Meter	SevenExcellence™	Mettler Toledo
photometer	Biophotometer	Eppendorf
Thermocycler	T3000	biometra
Ultraschallgerät	Vevo®2100	Visualsonics, Fujifilm
Waage	500 g/ 0,01 g	Dipse
Zentrifuge	5415 R	Eppendorf

3.1.5 Puffer

- Citratpuffer: 2,1 g/l (0,21% (w/v)) Citronensäure, pH6

- TBE: 89 mM Tris
 89 mM Borsäure (H₃BO₃)
 2 mM EDTA

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

3.2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierhaltung und Zucht der für diese Arbeit verwendeten Mäuse erfolgte im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen. Hier wurden die Tiere in einem 12h/12h hell-dunkel Rhythmus in sterilen, individuell belüfteten (IVC) Käfigen des Typs Blue-Line (Tecniplast) bei konstanter Temperatur von 22 ± 1 °C und einer Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10\%$ unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Versuchstiere erhielten Zugang zu standardisiertem Futter und Wasser *ad libitum*. Als Enrichment wurde den Mäusen Zellstoff und Häuschen zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden zweimal pro Woche in saubere Käfige überführt.

Alle genetisch modifizierten Mausstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, beruhen auf dem genetischen Hintergrund des C57/Bl6-Stamms, der hier als Wildtypkontrolle definiert wurde. Die C57/Bl6-Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor des UK Essen gezüchtet. Zusätzlich wurde eine Cldn3KO-Maus verwendet, die freundlicherweise von Prof. Dr. Müller, Klinik für Pädiatrie m. S. Nephrologie, Charité Berlin, zur Verfügung gestellt wurde (für Informationen zur Generierung dieses Stamms s. Schröder, (2013)). Die Cldn3KO-Mäuse wurden homozygot gezüchtet. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Cldn3KO-Mäusen, bei denen es sich um eine konventionelle Knockoutlinie handelt, bei der das Protein im ganzen Organismus deletiert ist, sind solche Cldn10KO-Mauslinien nicht überlebensfähig (Seker et al., 2019). In dieser Arbeit wurde sich deswegen das Cre-lox-System zunutze gemacht, welches es ermöglichte, das Protein spezifisch im Endometrium auszuknocken. Zur Herstellung dieser konditionalen KO-Mäuse wurde zum einen ein Cldn10flox-Stamm (ebenfalls zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Müller) verwendet, bei der durch homologe Rekombination in den embryonalen Stammzellen eine loxP-Site in das murine Genom eingebracht wurde, die Exon 2 und 3 des Cldn10-Gens flankiert. Durch dieses Verfahren sind beide Splice-Varianten des Proteins, Cldn10a und Cldn10b, im Knockout eingeschlossen (Breiderhoff et al., 2012). Mäuse, die homozygot das gefloxtete Gen trugen (Cldn10^{fl/fl}), wurden über drei Generationen mit einer Mauslinie gekreuzt, bei denen das Gen für die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Progesteronrezeptor-Promotors gestellt wurde (PRcre/+, zur Verfügung

gestellt von Prof. DeMayo, Department of Molecular and Cellular Biology, Michigan State University), um so Mäuse zu erzeugen, die einen Endometrium-spezifischen Knockout des *Cldn10* aufweisen (*Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}*).

Folgende Tabelle enthält eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen und ihrer Herkunft:

Tab. 6: Mausstämmen und ihre Herkunft.

Mausstamm	Genetischer Hintergrund	Herkunft
WT	C57/Bl6	Zentrales Tierlabor UK Essen, Prof. Hilken
<i>Cldn3KO</i>	C57/Bl6	Klinik für Pädiatrie m.S Nephrologie Charité Berlin, Prof. Müller
<i>Cldn10^{fl/fl}</i>	C57/Bl6	Klinik für Pädiatrie m.S Nephrologie Charité Berlin, Prof. Müller
<i>PR^{Cre/+}</i>	C57/Bl6	Department of Molecular and cellular Biology Michigan State University, Prof. DeMayo

3.2.1.2 Zucht der Mausstämmen

Zur Zucht der Mäuse wurde ein Männchen mit einem oder zwei Weibchen dauerhaft unter den Standardbedingungen (s. oben) zusammen in einem Käfig gehalten. Die Jungtiere wurden im Alter von ca. vier Wochen von den Elterntieren getrennt, durch Ohrlochstanzen markiert, bei Bedarf genotypisiert (s. Kapitel 3.2.3.1 Genotypisierung), und in einem Alter von frühestens acht Wochen ebenfalls zu Zuchtzwecken verpaart. Das Zuchtschema, das angewendet wurde um die *Cldn10KO*-Mäuse (*Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}*) zu erhalten, ist in Kapitel 4.3.2 beschrieben.

3.2.1.3 Gewichtsbestimmung postnataler und adulter Tiere

Zur Beurteilung der Entwicklung der Mäuse, entweder ab direkt nach der Geburt (P1) oder im adulten Zustand, wurden die Tiere auf einer Waage, die die Bestimmung des Gewichts auf 10 mg genau ermöglichte (Dipse 500 g/ 0.01 g), gewogen. Dies geschah bei täglichen Messungen immer zu einer konstanten Uhrzeit, um tagesabhängige Schwankung möglichst gering zu halten.

3.2.1.4 Terminierte Verpaarung und Plug-Check

Zur Verpaarung wurde ein Männchen mit ein bis zwei weiblichen Tieren nach 17:00 Uhr zusammengesetzt und über Nacht in einem Käfig belassen. Die Auswahl der Weibchen erfolgte dabei ohne Bestimmung des Zyklusstadiums. Die erfolgreiche Verpaarung wurde am nächsten Morgen bis spätestens 9:00 Uhr durch Vorhandsein eines Vaginalpropfs, dem sogenannten Plug-Check, überprüft. Bei erfolgreicher Verpaarung bilden koagulierte Sekrete der männlichen Sexualdrüsen einen festen Propfen, der die Vaginalöffnung der Mäuse verschließt und etwa 8 bis maximal 24 Stunden sichtbar ist. Der Zeitpunkt des Vorhandenseins eines Vaginalpropfs wurde als 0,5 days *post coitum* (dpc) definiert und die Weibchen von den Männchen getrennt. Weibchen, die am selben Tag einen Vaginalpropf aufwiesen, wurden zusammen in einem Käfig gehalten. Tiere nach negativem Plug-Check wurden mindestens zwei Wochen nicht wieder verpaart, um eine eventuelle Schwangerschaft trotz Fehlen des Vaginalpropfs und damit falsch bestimmte Schwangerschaftszeitpunkte auszuschließen. Für Verpaarungen wurden Tiere im Alter von 8 Wochen bis zu einem Jahr verwendet.

3.2.1.5 Zyklusbestimmung

Um die Zykluslänge zu bestimmen, wurde täglich das Stadium des Östruszyklus weiblicher Tiere bestimmt. Die Zykluslänge war dabei die Anzahl der Tage, in denen ein Tier einmal den Zyklus durchlaufen hatte (Östrus bis Östrus). Die weiblichen Tiere eines Mausstammes, deren Zyklus bestimmt wurde, wurden zusammen in einem Käfig gehalten, um äußerliche Einflüsse des Haltungsraumes für alle Tiere vergleichbar zu machen. Die Bestimmung des Zyklusstadiums wurde durch die zytologische Auswertung eines Vaginalabstrichs durchgeführt. Der Abstrich wurde täglich zu einer konstanten Uhrzeit angefertigt, indem ein Glasstäbchen (Durchmesser 4 mm), welches mit sterilem PBS-Puffer (Gibco™ PBS, pH 7,4) befeuchtet wurde, in die Vaginalöffnung des Tieres eingeführt wurde und das Glasstäbchen anschließend auf einem beschichteten Objektträger in einem Tropfen PBS-Puffer ausgestrichen wurde. Zur besseren Evaluation der Präparate wurden die Zellen durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt. Der Objektträger wurde dafür bei Raumtemperatur an der Luft trocknen gelassen und die Zellen anschließend in einer Aceton/Methanol Mischung (1:1) für 5 Minuten fixiert. Eine Färbung der Zellkerne erfolgte durch 3-minütige Inkubation in einer Hämatoxylin-Färbelösung (Instant

Hematoxylin Kit, Shandon) mit anschließender Bläuung der Präparate für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Präparate für 2 Minuten in einer Eosin-Färbelösung (s. Tab. 3) inkubiert, 3x kurz in 96 %-igem Ethanol, 1 Minute in Isopropanol und 2x 5 Minuten in HistoClear Xylol-Ersatz (Shandon™ Xylene Substitute) gewaschen und anschließend mit Eindeckmedium eingedeckt (Shandon™ Xylene Substitute Mountant). Die Bestimmung der Zyklusphase erfolgte dann durch Evaluation der Zellzusammensetzung des Abstrichs gemäß Byers et al. (2012).

3.2.1.6 Ultraschalluntersuchungen an der Maus

Die in dieser Arbeit durchgeführten Ultraschalluntersuchungen wurden am IMCES Imaging Center des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden die Mäuse wie in Kapitel 3.2.1.4 terminiert verpaart und unmittelbar vor der Ultraschalluntersuchung durch zervikale Dislokation getötet. Da unmittelbar danach die Gewebeentnahme erfolgte, konnte so den Tieren die Strapazen einer Narkose erspart werden. Um ein rauschfreies Ultraschallbild zu erhalten, wurde den Tieren ventral das Fell zunächst mit einem elektrischen Rasierer rasiert und dann wurde dieser Bereich zusätzlich mit einer herkömmlichen Enthaarungscreme (Pilca) enthaart. Die Tiere wurden mit der Bauchseite nach oben an allen vier Extremitäten mit hautfreundlichem Tape auf einer Wärmeplatte fixiert. Für die Untersuchung wurde ein auf Kleintiere spezialisiertes Ultraschallgerät (Vevo®2100, Visualsonics, Fujifilm) verwendet. Dabei wurde Ultraschallgel auf die haarfreien Stellen aufgetragen und Bilder der Implantationskammern bzw. Embryonen aufgenommen. Nach der Ultraschalluntersuchung wurden die Implantationskammern entnommen, in PBS-Puffer (Gibco™ PBS, pH 7,4) gewaschen und dann zur weiteren Verwendung für Gewebeschnitte wie unten beschrieben eingebettet.

3.2.1.7 Gewebeentnahme

Zur Gewebeentnahme wurden die Tiere zum gewünschten Schwangerschaftszeitpunkt durch zervikale Dislokation getötet. Zur Entnahme der Uteri, bzw. der Embryonen und Plazenten wurde die Bauchhöhle eröffnet und der Uterus caudal an der Zervix abgetrennt, vom Mesometrium freigeschnitten und das Ovar mit den *Tubae uterinae* entfernt. Die Implantationsstellen an Tag 6,5 und 8,5 pc wurden in mit PBS-Puffer gefüllten Petrischalen vereinzelt, an Tag 17,5 pc wurden die

Embryonen und Plazenten vom Myometrium und der Fruchtblase getrennt. Als Kontrollgewebe für die immunhistochemischen Färbungen wurde ebenfalls Kolangewebe entnommen. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Gewebe in PBS-Puffer (Gibco™ PBS, pH 7,4) gespült. Das Wiegen der Implantationskammern an Tag 6,5 und 8,5 pc, sowie der Embryonen und Plazenten an Tag 17,5 pc erfolgte mithilfe einer Feinwaage (ABJ-NM/ABS-N, Kern).

Für die spätere RNA-isolierung wurde Gewebe der Implantationsstellen von Tag 8,5 pc der WT- und Cldn3KO-Tiere unter RNase-freien Bedingungen (Behandlung der sterilen Instrumente mit RNaseZap™) entnommen und die Implantationsstellen isoliert. Als nächster Schritt wurde die Dezidua vom Myometrium getrennt. Dieser Schritt wurde hier zusätzlich durchgeführt, damit bei der späteren Expressionsanalyse möglichst nur die Expressionsänderungen der Dezidua gemessen wurden und eventuelle Einflüsse des Myometriums vernachlässigt werden konnten. Zur Präparation der Dezidua wurde das Myometrium an der mesometrialen Seite mit einer Federschere durchtrennt und die Dezidua mit dem darin enthaltenen Embryo isoliert. Eine Isolation des Embryos ist in diesem Stadium allerdings nicht möglich. Das Deziduagewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2. Histologische Methoden

3.2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Einbettung der Gewebe in Paraffin und Anfertigung von Gewebeschnitten

Zur Einbettung der Gewebe in Paraffin wurden die entsprechenden Gewebe nach der Entnahme in Einbettkassetten über Nacht in 4 % Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie unter Leitungswasser gewaschen und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Protokoll dehydriert:

- 2x 70 % Ethanol für je 1 h
- 2x 96 % Ethanol für je 1 h
- 2x Isopropanol für je 1 h
- 1x Xylol Ersatzmittel (Shandon™ Xylene Substitute) über Nacht
- 1x Xylol Ersatzmittel (Shandon™ Xylene Substitute) für 1 h
- 1x flüssiges Paraffin bei 60 °C über Nacht

Nachdem die Gewebe folgend in Paraffin eingebettet wurden, wurden sie mit einem Mikrotom (Leica RM2235) mit einer Schnittdicke von 7 µm in Serie geschnitten und auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden über Nacht in einem Wärmeschrank bei 50 °C getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Kryoeinbettung der Gewebe und Anfertigung von Gewebeschnitten

Nach der Präparation wurden die Gewebe in Einbettformen (Einbettformen Macro, Roth) in Tissue-Tek ® O.C.T.TM Compound (Sakura FinetekTM) Einbettmedium überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kryoblöckchen zum Schutz vor Austrocknung in konventioneller Alufolie eingewickelt und bei -20 °C gelagert.

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Gewebe mittels eines Kryostats (Leica CM3050) in 7 µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanisierte Objektträger überführt. Die Gewebeschnitte wurden auf den Objektträgern auf einer Wärmeplatte angetrocknet und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Begutachtung wurden die Gewebeschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die eine etablierte Standardfärbung für histologische Präparate darstellt, gefärbt. Bei dieser Färbung wird u.a. die Nukleinsäure in Zellkernen durch das Hämatoxylin bei niedrigem pH-Wert (pH 3-4) rötlich-braun gefärbt und durch Anhebung des pH-Wertes durch Wasser (pH 7) gebläut. Mit einer Gegenfärbung mit dem Farbstoff Eosin werden die eosinophilen Zellkörper rot-rosa gefärbt. Für die HE-Färbung wurden Paraffinschnitte verwendet.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert (zweimal je 10 Minuten in ShandonTM Xylene Substitute) und anschließend mittels einer absteigenden Alkoholreihe gewässert (je 3 Minuten in Isopropanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, Aqua dest.).

Die Schnitte wurden dann für 3-4 Minuten in einer Hämatoxylin-Lösung (Instant Hematoxylin Kit, Shandon) inkubiert und unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gebläut. Zur Zellkörperfärbung wurden die Schnitte nachfolgend für 2 Minuten in Eosin gegengefärbt, kurz mehrmals in 96 % Ethanol gewaschen, für zweimal 5

Minuten in Shandon™ Xylene Substitute zum Eindecken vorbereitet und anschließend in Shandon™ Xylene Substitute Mountant eingedeckt.

3.2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben geschnitten und anschließend entparaffiniert und gewässert. Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate zunächst in Citratpuffer (pH 6) überführt und für 5-10 Minuten in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach etwa 30-minütigem Abkühlen der Schnitte in Citratpuffer wurden diese zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen der Antikörper wurde 1 % BSA in PBS verwendet. Die Schnitte wurden dazu 30 Minuten in der BSA/PBS-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit in PBS verdünntem Sekundärantikörper inkubiert. Dies geschah aufgrund der Lichtempfindlichkeit der fluoreszierenden Sekundärantikörpern in einer lichtgeschützten feuchten Kammer. Nach der Sekundärantikörperinkubation wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Kernfärbung in eine DAPI-Lösung (1:200 in PBS) überführt und für 10 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend für 5 Minuten mit PBS gewaschen, kurz in Aqua dest. überführt und anschließend mit Fluoromount-G™ Eindeckmedium eindeckt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Schnitte im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Tab. 7 enthält eine Liste der Primär- und dazugehörigen Sekundärantikörper, die für die Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten verwendet wurden.

Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten

Die Kryoschnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur wenige Minuten aufgetaut und zur Fixierung in 96 % Ethanol bei -20 °C überführt und für 5 Minuten inkubiert. Um Reste des Einbettmediums zu entfernen, wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurde hier gleichermaßen wie bei Paraffinschnitten eine 1 %-ige BSA Lösung in PBS verwendet und für 30 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die

Primärantikörperinkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C lichtgeschützt über Nacht.

Die Schnitte wurden zur Entfernung des Primärantikörpers dreimal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und für eine Stunde mit in PBS verdünntem entsprechenden Sekundärantikörper lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Kernfärbung in einer DAPI-Lösung (1:200 in PBS) für 10 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS für 5 Minuten und anschließender Überführung der Schnitte in Aqua dest., wurden diese mit Fluoromount-G™ Eindeckmedium eingelegt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Schnitte im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Tab. 7 enthält eine Liste der Primär- und dazugehörigen Sekundärantikörper, die für die Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten verwendet wurden.

Tab. 7: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

Primär-antikörper	Host/Klon	Firma	Verdünnung	Methode
Cldn3	rabbit polyclonal	abcam (ab15102)	1:100	Kryo
Cldn4	rabbit polyclonal	GeneTex (GTX15104)	1:100	Paraffin
Cldn10	rabbit polyclonal (H-58)	SantaCruz (sc-25710)	1:100	Kryo
Cldn10	rabbit polyclonal	Invitrogen (#38-8400)	1:100	Kryo
CD31	rat polyclonal (SZ31)	Dianova (DIA-310)	1:50	Paraffin-/Kryo
Sekundär-antikörper				
Alexa Fluor™ 488	goat anti rabbit IgG	Invitrogen (A32731)	1:200	Paraffin-/Kryo
DyLight™ 550	donkey anti rat IgG	Invitrogen (SA5-10027)	1:200	Paraffin-/Kryo

Kontrollen für Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Fluoreszenzfärbungen an Paraffin- und Kryoschnitten wurden bei jeder Färbung sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente Kolongewebe, in welchem nachgewiesenermaßen Cldn3, -4 und -10 exprimiert sind (Holmes et al., 2006). Eine Färbung wurde nur dann als erfolgreich angesehen, wenn das Kolongewebe spezifisch angefärbt war.

Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt nach den oben beschriebenen Protokollen behandelt, mit dem einzigen Unterschied, dass die Inkubation mit dem jeweiligen

Primärantikörper ausgelassen wurde. Diese Kontrolle wurde für jedes gefärbte Gewebe und mit jedem verwendeten Sekundärantikörper durchgeführt. Bewegte sich das Fluoreszenzsignal dieser Kontrolle auf Hintergrundniveau, wurde die Färbung mit dem Primärantikörper als spezifisch angesehen.

Bei Doppelinkubationen mit verschiedenen Primärantikörpern wurden ebenfalls zum einen Kontrollen durchgeführt, bei dem beide Sekundärantikörper zusammen ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Zum anderen wurde, um eine Kreuzreaktion der Sekundärantikörper mit dem jeweils anderen Primärantikörper auszuschließen, ein Primärantikörper mit dem jeweils anderen Sekundärantikörper inkubiert. War das Fluoreszenzsignal dieser Kontrollen auf Hintergrundniveau, wurden die Färbungen mit dem Primärantikörper als spezifisch angesehen. Zusätzlich wurden für jeden Sekundärantikörper und jedes Gewebe Isotypkontrollen angefertigt, bei denen der Primärantikörper durch unspezifische Antikörper desselben Ig-Typs ersetzt wurden.

3.2.2.4 Mikroskopie

Die Aufnahme der Bilder der histologischen Schnitte wurde zum einen an dem Leica DM4000 B Mikroskop und zum anderen an dem Nikon Eclipse Ni Mikroskop mit der entsprechenden Software durchgeführt. Die Fluoreszenzbilder wurden nachträglich in der Fluoreszenzfarbe der jeweiligen Sekundärantikörper eingefärbt. Die Auswertungen, wie die Ausmessung des Ektoplazentarkonus, wurde mit der Software ImageJ durchgeführt.

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Cldn10KO-Mäuse wurde Gewebe aus Ohrlochstanzen verwendet. Die Entnahme der Stanzen erfolgte mit einer Ohrlochzange, welche nach jedem Tier mit 70 % Ethanol gereinigt wurde. Die Gewebeproben wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen, für 30 Minuten mit offenem Deckel bei Raumtemperatur gelagert, um eventuelle Ethanolrückstände zu entfernen und ggf. bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Isolation der genomischen DNA aus dem Gewebe erfolgte nach Herstellervorgaben mit dem Gewebe-PCR-Kit Extract-N-Amp™ (Sigma-Aldrich). Die DNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Die PCR zur Amplifizierung der DNA wurde ebenfalls mit dem genannten Kit durchgeführt. Dazu wurden folgende PCR-Ansätze pipettiert:

Tab. 8: PCR-Ansätze zur Genotypisierung der Mäuse mithilfe des Gewebe-PCR-Kit Extract-N-Amp™. Der PCR ReadyMix ist Bestandteil des Kits, die DNA-Proben wurden aus Ohrlochstanzen zur Markierung der Mäuse gewonnen. Das Reaktionsvolumen eines Ansatzes betrug 20 µl.

	Menge
PCR ReadyMix	10 µl
Primer (10pmol/µl)	je 1 µl
DNA	4 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Für jede PCR wurde ein Ansatz als H₂O-Kontrolle mitgeführt, bei der die DNA durch H₂O ersetzt wurde, um eine eventuelle Kontamination der verwendeten Lösungen auszuschließen. Die zur Genotypisierung verwendeten Primer-Sequenzen sind Tab. 9 dargestellt. Die Sequenzen wurden von den jeweiligen Arbeitsgruppen, aus denen die betreffenden Mausstämme stammen, zur Verfügung gestellt. Die Primer wurden von Eurofins Genomics bezogen.

Tab. 9: Primersequenzen zur Genotypisierung der Mäuse.

Gen		Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge
Cldn10flox	floxed	GGCTTCGTAAGGTGGTGAGAG	443 bp
	WT	CCCTGTAAACACAGGCTGCTG	254 bp
PR-Cre	Cre1	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG	598 bp
	Cre2	TATACCGATCTCCCTGGACG	
	WT	CCCAAAGAGACACCAGGAAG	287 bp

Zur Amplifizierung der DNA-Fragmente wurde der Thermocycler T3000 (Biometra) und folgendes Programm verwendet:

Tab. 10: PCR-Programm zur Genotypisierung.

	Temperatur [°C]	Dauer	
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	} 35 x
Annealing	60 °C	45 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	∞	

Für die anschließende Gelelektrophorese wurden 2 %ige Agarose-Gele (2 g Agarose pro 100 ml TBE-Puffer) unter Zusatz von GelRed® (Biotium, 5 µl/100 ml) zur Anfärbung der DNA-Fragmente verwendet. Als DNA-Standard wurde der GeneRuler 100bp Plus (Thermo Scientific) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in TBE-Puffer durchgeführt und die Gele anschließend mit dem ChemiDoc Imaging System (BioRad) analysiert.

3.2.3.2 Transkriptomanalyse

RNA-Isolation

Für die phenolfreie RNA-Isolation aus Dezidugewebe wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen®) verwendet. Die Dezidugewebe wurden zunächst aufgetaut und anschließend das Gewebe von jeweils drei Implantationsstellen pro Maus gepoolt und in 600 µl RLT-Puffer homogenisiert (IKA^R T10 basic, Ultra Turrax Homogenizer). Anschließend erfolgte die RNA-Isolation nach Herstellerprotokoll mit integriertem DNase-Verdau. Dieser verhindert eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA, die zu einer Verfälschung des Expressionslevels eines Transkripts bei der Transkriptomanalyse führen würde. Die RNA wurde zum Schluss in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und deren Konzentration photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

RNA-Microarray

Zur Transkriptomanalyse wurde der Affymetrix Clariom™ S Assay mouse (Applied Biosystems™) verwendet. Die Durchführung erfolgte an der Genomics & Transcriptomics Facility (GTF) am Universitätsklinikum Essen (Leitung Dr. rer. nat René Scholtysik, Institut für Zellbiologie). Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Transcriptome analysis software 4.0 (Applied Biosystems™).

3.2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde nach einem Test auf Normalverteilung der Daten der Students t-Test angewendet, wobei der Signifikanzwert (p-Wert) auf 5 % festgelegt wurde. Bei einem berechneten p-Wert $\leq 0,05$ wurde der Unterschied der Messdaten somit als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Lokalisation des Cldn3-Proteins im zyklischen Endometrium und bei der Plazentabildung in der WT-Maus

4.1.1 Lokalisation von Cldn3 im zyklischen Endometrium

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Cldn3 im luminalen und glandulären Epithel des Endometriums im Östrus des murinen Zyklus, also im nicht schwangeren Uterus, exprimiert ist (Schumann, 2015). Da sich das Endometrium im Laufe des Östruszyklus bedingt durch die hormonellen Schwankungen morphologisch und funktionell einer möglichen Befruchtung und Schwangerschaft anpassen muss, wurde in dieser Arbeit zunächst die Verteilung des Cldn3 in allen Phasen des Östruszyklus analysiert. Dazu wurde durch einen Vaginalabstrich die Zyklusphase der Mäuse bestimmt, die Uteri entnommen und Fluoreszenzfärbungen von Cldn3 angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass Cldn3 in allen Phasen des Östruszyklus im endometrialen luminalen und glandulären Epithel exprimiert ist, in keiner Phase jedoch in den endometrialen Stromazellen. Im Metöstrus, Diöstrus und Proöstrus ist eine apikale und basale Konzentration von Cldn3 sowohl im luminalen als auch glandulären Epithel zu erkennen. Im Östrus hingegen ist diese Konzentration im luminalen Epithel aufgehoben und das Protein ist im Gewebe eher diffus verteilt. Im Gegensatz dazu zeigt Cldn3 im glandulären Epithel im Östrus eine starke apikale Konzentration, eine basale Expression ist nicht zu erkennen (Abb. 4).

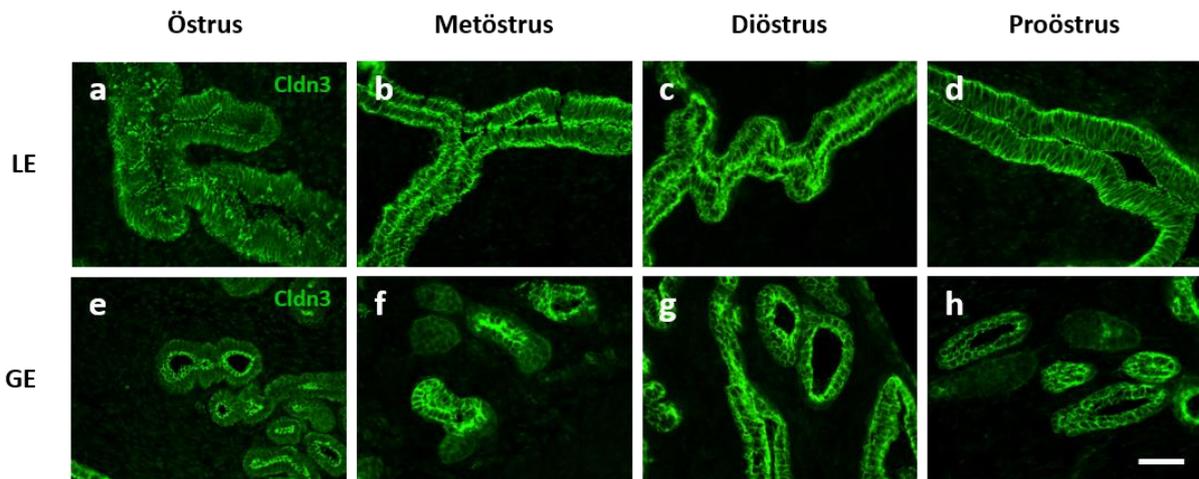


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Endometriumgewebe von WT-Mäusen in unterschiedlichen Phasen des Östruszyklus. Die Zyklusphasen wurden mittels Vaginalabstrich bestimmt. Dargestellt sind jeweils Anschnitte des luminalen (LE, a-d) und des glandulären (GE, e-h) Epithel des Uterus. Cldn3 ist in allen Phasen des Östruszyklus im luminalen sowie glandulären Epithel mit einer zyklusabhängigen Konzentration am apikalen und/oder basalen Pol der Epithelzellen exprimiert, nicht aber in den Stromazellen. Maßstab 50 µm.

4.1.2 Lokalisation von Cldn3 in der Dezidua und in der Plazenta der frühen Schwangerschaft

Wie zuvor von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, wird Cldn3 kurz vor der Implantation an Tag 4,5 pc im luminalen Epithel der Implantationsstelle im Endometrium exprimiert. Zudem wird Cldn3 spezifisch ab Tag 5,5 pc in den dezidualisierten Stromazellen induziert. Die Expression von Cldn3 weitete sich im Verlauf der Schwangerschaft in der Dezidua aus und zeigte sich an Tag 8,5 pc in den Zellen der sekundären Dezidua sowie in der antimesometrialen Dezidua (Schumann et al., 2015). Um nun weiterführend zu untersuchen, ob die deziduale Expression von Cldn3 während der Bildung der Plazenta bestehen bleibt und Cldn3 auch im embryonalen Anteil der Plazenta zu finden ist, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Implantationsstellen an Tag 10,5 pc angefertigt. Zu diesem Zeitpunkt differenziert sich die Plazenta in Spongiotrophoblast und Labyrinth, welches Villi ausbildet, um den Nährstoffaustausch zwischen maternalem und embryonalem Gewebe zu gewährleisten.

In Abb. 5a ist eine Übersicht einer Implantationskammer an Tag 10,5 pc gezeigt. Cldn3 war zu diesem Stadium in dem verbleibenden luminalen Endometriumepithel, das sich auf antimesometrialer Seite über dem Embryo befindet und an die Trophoblastriesenzellen grenzt, exprimiert (Abb. 5 b,c). Ebenfalls fand sich eine Cldn3-Immunreaktivität in den noch persistierenden lateralen Teilen der Dezidua (Abb. 5 d,e)

und in dem mesometrialen Teil der Dezidua, der an den Spongiotrophoblasten der sich bildenden Plazenta grenzt (Abb. 5 f,g). Cldn3 wies in den unterschiedlichen Zelltypen eine differenzierte zelluläre Lokalisation auf: Während Cldn3 in den polaren endometrialen Epithelzellen eine apikale Konzentration mit einer etwas geringeren Verteilung an der basolateralen und basalen Seite der Zellen zeigte, wies die Cldn3-Färbung in den Deziduazellen eine gleichmäßige Verteilung über die Zellmembran auf. Die Plazenta selbst wies keine positive Immunreaktivität für Cldn3 auf (Abb. 5 h,i), ebenso zeigten der Embryo und der diesen umgebende Dottersack kein Cldn3-Protein (Abb. 5 b,c).

4.1.3 Lokalisation von Cldn3 in der Dezidua der reifen Plazenta der späten Schwangerschaft

Um zu einem späteren Zeitpunkt eine mögliche Expression von Cldn3 in der reifen Plazenta zu untersuchen, wurden Plazenten an Tag 17,5 pc entnommen und hieran ebenfalls Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. In Abb. 6a ist eine Übersicht einer Plazenta an Tag 17,5 pc in einer HE-Färbung zu sehen. Die murine Plazenta besteht aus drei Schichten, dem Labyrinth, in dem fetales und maternales Blut in fetalen Blutgefäßen und maternalen Vaskularräumen zirkuliert, dem Spongiotrophoblast, der eine junctional zone zwischen dem embryonalen und maternalen Teil der Plazenta darstellt und neben Spongiotrophoblastzellen auch Glykogenzellen und verschiedene TGCs enthält (Rai und Cross, 2014), sowie dem maternalen Anteil, der aus der *Dezidua basalis* gebildet wird. Cldn3 war in diesem Stadium ausschließlich in der maternalen Dezidua exprimiert (Abb. 6 b-c). Die Färbung war, ähnlich der Färbung der Dezidua zum Zeitpunkt 10,5 dpc, gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt, eine polare Verteilung des Proteins in den Zellen ist nicht erkennbar. Labyrinth und Spongiotrophoblast weisen keine positive Immunreaktivität gegen den Cldn3-Antikörper auf.

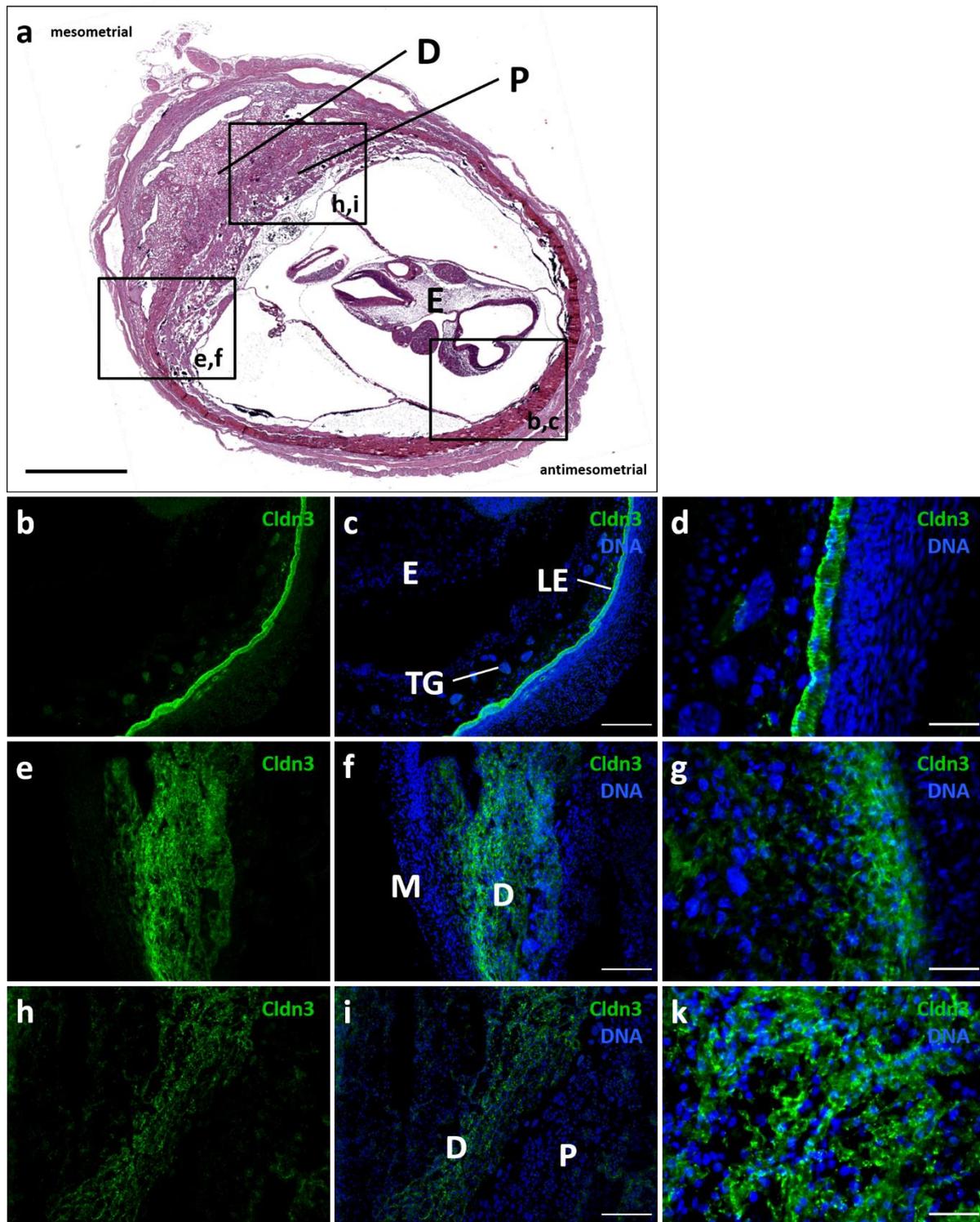


Abb. 5: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Implantationskammern von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 10,5 dpc. Zur Übersicht ist eine HE-Färbung einer Implantationskammer an Tag 10,5 pc mit einer Kennzeichnung der gezeigten Ausschnitte der Fluoreszenzfärbungen gezeigt (a). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung gegen Cldn3 (grün b, e, h) und eine Überlagerung mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau, c-d, f-g, i-k). Cldn3 ist im verbleibenden luminalen Epithel auf antimesometrialer Seite der Implantationskammer (b, c) exprimiert, sowie in den persistierenden Teilen der lateralen (e, f) und in der antimesometrialen Dezidua (h, i). (d, g, k) zeigen jeweils größere Vergrößerungen der drei Bereiche. E = Embryo, D = Dezidua, P = Plazenta, TG = Trophoblastriesenzellen, LE = luminales Epithel, M = Mesometrium. Maßstab (a) 1000 μ m, (b-c, e-f, h-i) 200 μ m, (d, g, k) 50 μ m.

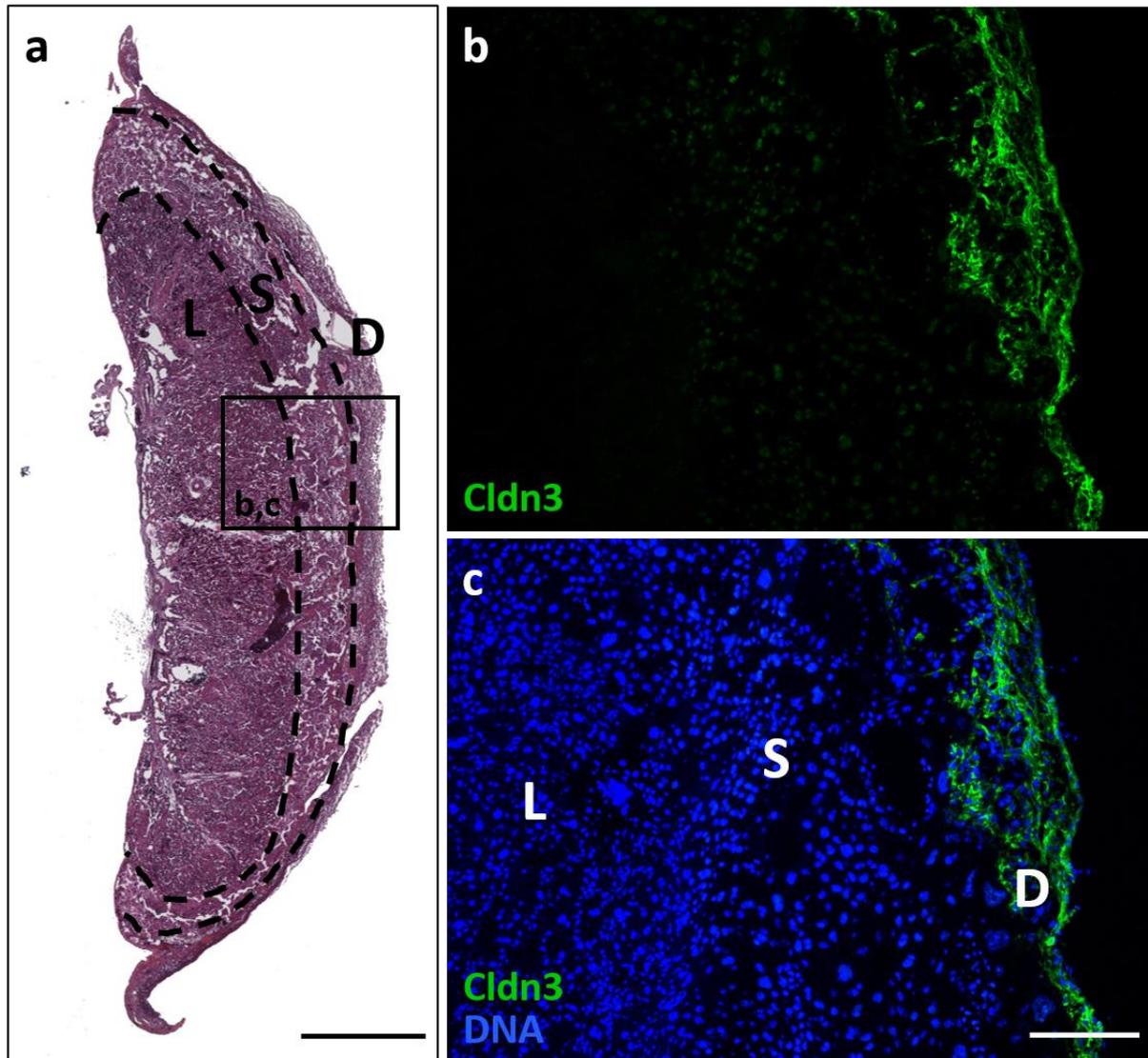


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Plazentagewebe von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 17,5 dpc. Zur Übersicht ist eine HE-Färbung einer Plazenta Tag 17,5 pc mit einer Kennzeichnung der gezeigten Ausschnitte der Fluoreszenzfärbungen gezeigt (a). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung gegen Cldn3 (grün, b) und eine Überlagerung mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau, c). Cldn3 ist zu diesem Zeitpunkt nur in dem dezidualen Teil der Plazenta exprimiert. L = Labyrinth, S = Spongiotrophoblast, D = Dezidua. Maßstab (a) 1500 μ m, (b und c) 200 μ m.

4.2 Untersuchungen zur Rolle von endometrialem Cldn3 in einem Cldn3KO-Mausmodell

Wie zuvor gezeigt werden konnte, wird Cldn3 in der frühen Schwangerschaft spezifisch in den Deziduazellen der Implantationskammer induziert (Schumann et al., 2015) und bleibt, wie im vorigen Kapitel beschrieben, auch in der reifen Plazenta in den maternalen Deziduazellen erhalten. Um genauere Einsichten in die Funktion dieses in der Schwangerschaft in den endometrialen Stromazellen hochregulierten Proteins zu gewinnen, wurden Untersuchungen an Cldn3-defizienten Mäusen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Müller, Klinik für Pädiatrie m. S. Nephrologie, Charité Berlin) durchgeführt. Diese wurden zunächst hinsichtlich ihrer Reproduktionsfähigkeit analysiert.

4.2.1 Nachweis des endometrialen Cldn3-Knockouts mittels Immunfluoreszenzfärbungen

Neben dem Nachweis des Knockouts von Cldn3 im Endometrium der Cldn3-defizienten Mäuse mittels Genotypisierungs-PCR, der in einer separaten Arbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (Xin Xin Wu, unveröffentlichte Daten), sollte der Knockout speziell im Endometrium hier auch auf Proteinebene mithilfe der etablierten Immunfluoreszenzfärbung gegen Cldn3 bestätigt werden. Dazu wurden die Uteri nicht schwangerer Cldn3KO-Mäuse entnommen und parallel zu Uteri aus WT-Mäusen gefärbt (Abb. 7). Im Endometrium der WT-Mäuse zeigte sich das typische Färbemuster der Cldn3-Verteilung. Das luminale sowie das glanduläre Endometriumepithel zeigten eine positive Immunreaktivität gegen den Cldn3-Antikörper (Abb. 7 a,b). In dem Uterusgewebe der Cldn3-defizienten Mäuse fehlte hingegen jegliche Immunreaktivität (Abb. 7 c,d). Somit konnte hier ein Fehlen des Cldn3-Proteins im Endometrium der Cldn3KO-Mäuse nachgewiesen werden.

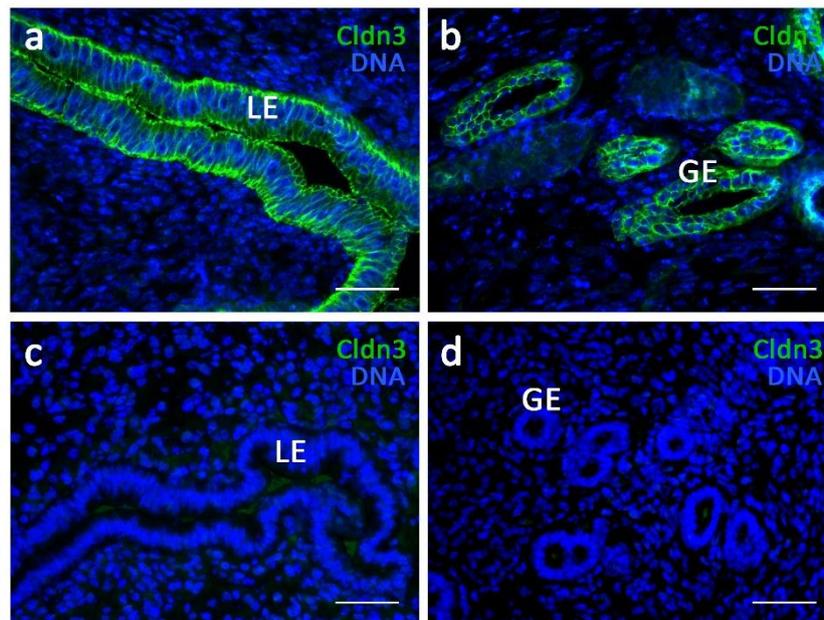


Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 an Endometriumgewebe von WT-Mäusen (a-b) und Cldn3KO-Mäusen (c-d). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung gegen Cldn3 (grün) und eine Überlagerung mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau). Im Endometrium der WT-Maus zeigten sich Fluoreszenzsignale in den Zellen des luminalen Epithels (a, LE) und glandulären Epithels (b, GE), während im Endometrium der Cldn3KO-Maus keinerlei Immunreaktion gegen Cldn3 im luminalen (c, LE) und glandulären (d, GE) Epithel detektiert werden konnte. Maßstab 50 μm .

4.2.2 Auswirkung der Cldn3-Deletion auf die Fertilität

Cldn3-defiziente Mäuse sind grundsätzlich fertil (Kooij et al., 2014), allerdings wurde zuvor gezeigt, dass bei der Verpaarung heterozygoter Cldn3-defizienter Mäuse weniger Mäuse mit einem homozygoten Genotypen geboren werden, als es gemäß der Mendel'schen Regeln zu erwarten wäre (Schröder, 2013). Bei Verpaarungen homozygoter Tiere untereinander konnte zudem eine reduzierte Reproduktionseffizienz beobachtet werden (Müller, pers. Mitteilung). Da die Reproduktionseffizienz der Cldn3-defizienten Mäuse bisher allerdings noch nicht systematisch und quantitativ erfasst wurde, wurden hier zum einen die weiblichen Cldn3KO-Mäuse auf eine korrekte zyklische Aktivität des Endometriums hin überprüft, zum anderen wurden diese Tiere hinsichtlich der Wurfgröße, der Geschlechterverteilung der Nachkommen und der postnatalen Gewichtsentwicklung der Jungtiere untersucht.

Zur Bestimmung des Ablaufs des Östruszyklus wurde täglich per Vaginalabstrich die Zyklusphase der weiblichen Tiere der jeweiligen Mauslinie bestimmt und der zeitliche Abstand erfasst, in dem die Tiere einen kompletten Zyklus durchlaufen hatten (Östrus bis Östrus). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der

Zykluslänge zwischen den Cldn3KO-Mäusen und den WT-Kontrollen. Die durchschnittliche Zykluslänge der WT-Weibchen betrug $5,06 \pm 0,68$ Tage und der Cldn3KO-Weibchen $4,92 \pm 0,51$ Tage (Abb. 8 a).

Die Wurfgröße der Cldn3KO-Mäuse, gemessen in Jungtieren pro Wurf, wies zwar einen tendenziellen, aber keinen signifikanten Unterschied zu der Wurfgröße der WT-Kontrolltiere auf (Abb. 8 b). Dabei betrug die Wurfgröße der WT-Mäuse $6,10 \pm 2,90$ und der Cldn3KO-Mäuse $5,40 \pm 2,19$ Tiere pro Wurf. Auch das Geschlechterverhältnis der Jungtiere beider Mausstämme zeigte keinen signifikanten Unterschied. Bei den Cldn3KO-Tieren überwogen tendenziell die männlichen Tiere gegenüber den weiblichen im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren, wo es umgekehrt war, doch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 8 c,d).

Die postnatale Entwicklung der Jungtiere aus Verpaarungen der homozygoten Cldn3KO-Mäuse untereinander im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren ist in Abb. 9 a zu sehen. Die Jungtiere wurden ab dem Zeitpunkt P1, welcher dem Tag der Geburt entspricht, täglich zur gleichen Zeit gewogen. Die Jungtiere der WT-Kontrollmäuse und der Cldn3KO-Mäuse wiesen zum Zeitpunkt der Geburt in etwa das gleiche Gewicht auf, welches bis zum Zeitpunkt P15 gleichermaßen anstieg. Bei beiden Stämmen stagnierte das Wachstum der Jungtiere ab P15 für etwa 5 Tage. In dieser Plateauphase waren die Cldn3-defizienten Jungtiere tendenziell etwas leichter, was jedoch statistisch nicht signifikant war. Ab P20 stieg das Gewicht der Jungtiere beider Stämme wieder an, wobei hier das Gewicht der Cldn3-defizienten Mäuse etwas stärker anstieg, was jedoch ebenfalls statistisch nicht signifikant war.

Zusätzlich zur Gewichtsentwicklung der Jungtiere wurde das Gewicht adulter Tiere erfasst. Dafür wurden Tiere, männliche wie weibliche, beider Stämme aus dem Bestand gewogen und das Gewicht korrelierend zu ihrem Alter in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 9 b,c). Hier ist zu erkennen, dass sowohl die weiblichen (Abb. 9 b) als auch die männlichen (Abb. 9 c) adulten Tiere beider Stämme keine Gewichtsunterschiede aufwiesen.

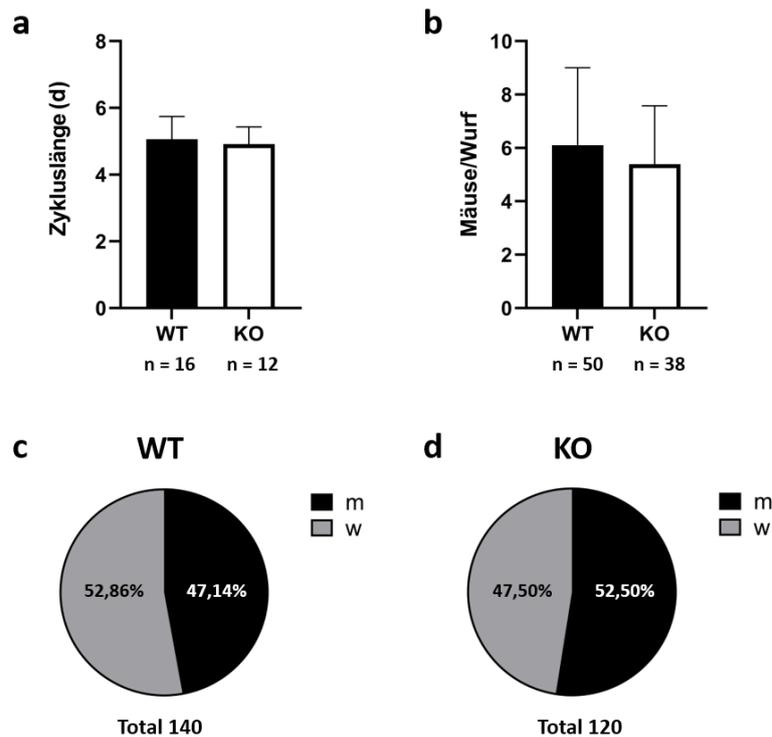


Abb. 8: Darstellung der Fertilitätsparameter von Cldn3KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen. (a) Zykluslängen von WT- und Cldn3KO-Mäusen gemessen in Tagen. Die Zyklusphase wurde mittels Vaginalabstrich bestimmt. Gemessen wurde jeweils der Zeitraum, in dem alle Zyklusphasen einmal durchlaufen worden sind. Dabei wurden mindestens 3 Zyklen von 4 Mäusen gemessen. (b) Wurfgröße von WT- und Cldn3KO-Mäusen gemessen in Mäuse pro Wurf. (c) Geschlechterverhältnis der WT- und (d) Cldn3KO-Mäuse. MW \pm SD.

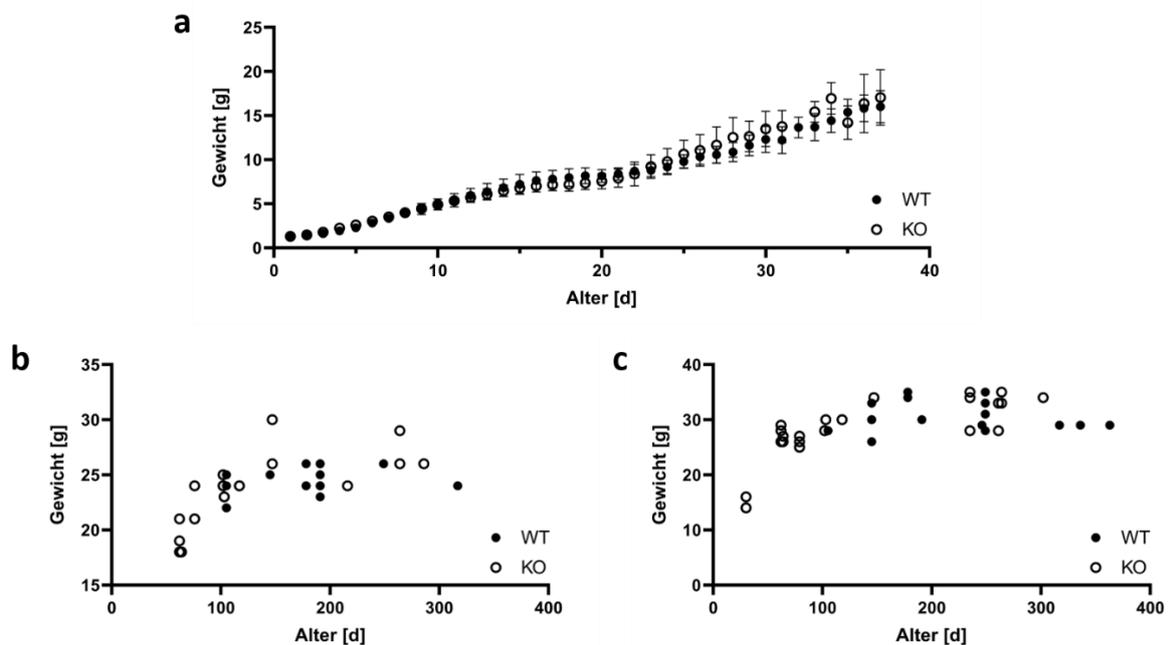


Abb. 9: Postnatale Gewichtsentwicklung (a) und Gewichte adulter Tiere (b) von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen. (a) Dargestellt ist das Gewicht der neugeborenen Cldn3KO- und WT-Mäuse in Abhängigkeit vom Alter. Die neugeborenen Tiere wurden innerhalb von 24h nach der Geburt zum ersten Mal und anschließend täglich zur gleichen Uhrzeit gewogen. Es wurden die Nachkommen aus drei verschiedenen Würfen von unterschiedlichen Muttertieren gewogen, dabei wurde nicht nach Geschlecht unterschieden. MW \pm SD. (b,c) Gewichte adulter WT- und Cldn3KO-Mäuse. Dabei wurden adulte Tiere einmalig gewogen und das Gewicht in Abhängigkeit vom Alter dargestellt. (b) Gewicht weiblicher Mäuse, (c) Gewicht männlicher Mäuse, wobei das Gewicht der WT-Mäuse durch schwarze und das der KO-Mäuse durch die weißen Punkte repräsentiert wird.

4.2.3 Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Implantation, Dezidualisierung und Embryoentwicklung

4.2.3.1 Die Cldn3-Deletion beeinträchtigt Dezidualisierung und Trophoblastinvasion

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Deletion von Cldn3 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Tiere und deren postnataler Entwicklung hat. Da das Cldn3-Protein jedoch spezifisch zum Zeitpunkt der Implantation in den sich zu Deziduazellen differenzierenden Stromazellen induziert wird, obwohl es im nicht-graviden Zustand nicht in endometrialen Stromazellen exprimiert wird, kann ein Einfluss während der frühen Schwangerschaft nicht ausgeschlossen werden. Um daher diesen potenziellen Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Prozesse während der Embryoimplantation zu untersuchen, wurden Implantationsstellen zu verschiedenen Zeitpunkten der frühen Schwangerschaft morphologisch untersucht. Dazu wurden Tiere der Cldn3KO-Mauslinie und WT-Kontrolltiere terminiert verpaart, die Implantationskammern entnommen und vereinzelt. Als Präparationsbeispiel sind in Abb. 10 a Implantationskammern von WT- und Cldn3KO-Mäusen zum Zeitpunkt 8,5 dpc gezeigt. Die Implantationskammern der beiden Mausstämme sahen makroskopisch ähnlich aus, und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Implantationsstellen pro gravidem Muttertier, wobei die Anzahl der Implantationsstellen der Cldn3KO-Tiere eine größere Varianz aufwiesen ($8,56 \pm 1,81$ in WT- und $6,06 \pm 3,30$ IPK/Tier in Cldn3KO-Mäusen) (Abb. 10 b).

Um die Entwicklung der Implantationskammern zu beurteilen, wurden zunächst jeweils homogene Verpaarungen der Mäuse (WT x WT und KO x KO) durchgeführt, und die Implantationskammern zum Zeitpunkt 6,5 dpc und 8,5 dpc entnommen, vereinzelt und gewogen. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl zum Zeitpunkt 6,5 dpc als auch zum Zeitpunkt 8,5 dpc die Implantationskammern der Cldn3KO-Tiere signifikant leichter waren als die der KO-Tiere. Um auszuschließen, dass diese Gewichtsreduktion durch eine retardierte Embryoentwicklung zustande kommt, und zu überprüfen, dass hier ein maternaler Effekt vorliegt, wurden heterologe Verpaarungen durchgeführt, bei der KO-Weibchen mit WT-Männchen verpaart wurden (KO x WT), so dass aus dieser Verpaarung ausschließlich heterozygote Embryonen resultierten. Auch bei dieser Verpaarung zeigte sich eine signifikante Gewichtsminderung der Implantationsstellen der Cldn3KO-Tiere. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen maternalen Effekt handelt und die Gewichtsminderung der

Implantationsstelle durch eine sich fehlerhaft entwickelnde Dezidua verursacht wird, da die Masse der Implantationsstelle zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft durch die Proliferation der Deziduazellen gebildet wird und nicht durch die Zellmasse des Embryos.

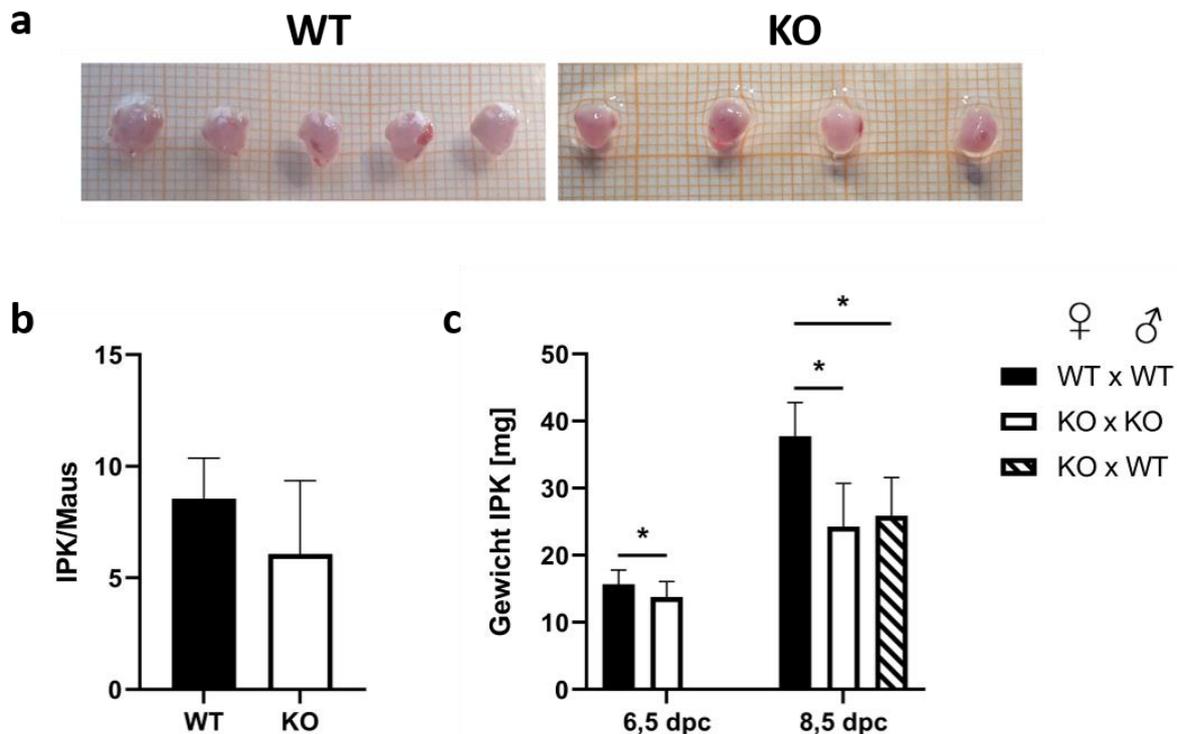


Abb. 10: Anzahl und Gewichte der Implantationskammern von Cldn3KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 6,5 pc und 8,5 pc. (a) Darstellung von vereinzelt Implantationskammern von WT- und Cldn3KO-Mäusen. (b) Anzahl der Implantationskammern pro Tier von WT- (n=9) und Cldn3KO-Mäusen (n=16) insgesamt an 6,5 dpc und 8,5 dpc zusammengefasst. (c) Gewichte der vereinzelt Implantationskammer zu den Zeitpunkten 6,5 dpc und 8,5 dpc. Durchgeführt wurden drei verschiedene Verpaarungstypen: WT x WT, KO x KO und eine Verpaarung, bei der das Weibchen eine Cldn3KO-Maus war, das Männchen eine WT-Maus (KO x WT). An beiden Zeitpunkten der Schwangerschaft wiesen die Implantationsstellen der Cldn3KO-Mäuse ein signifikant reduziertes Gewicht gegenüber denen der WT-Mäuse auf. MW ± SD, * $p \leq 0,05$.

Zur histomorphologischen Untersuchung wurden die Implantationskammern resultierend aus den WT x WT und den KO x WT Verpaarungen zum Zeitpunkt 8,5 dpc, an dem der größte Gewichtsunterschied vorlag, in Serie geschnitten und HE gefärbt (Abb. 11).

Die Implantationskammern beider Mausstämme zeigten eine unauffällige primäre Dezidua (PDZ), und auch die sekundäre Dezidua (SDZ) auf der antimesometrialen Seite und die *Dezidua basalis* auf der mesometrialen Seite wiesen keine Auffälligkeiten auf. Die Fruchthöhle des Embryos der Cldn3KO-Mäuse erschien tendenziell etwas kleiner als die der WT-Kontrolltiere. Zu diesem Zeitpunkt bildet der Ektoplazentarkonus

(EC) den invasiven Teil des Trophoblasten. Der EC war in den Implantationskammern beider Mäuse ausgebildet, was auf eine fortlaufende Implantation hindeutet. Allerdings zeigte der EC in den Cln3KO-Mäusen eine weniger ausgeprägte Abgrenzung zu den umliegenden Deziduazellen, und die Zellkomposition innerhalb des EC erschien lockerer. Um einen möglichen Effekt der Cldn3-Deletion auf die Invasivität des EC zu quantifizieren, wurde die Länge des EC gemessen, wie in Abb. 11 c und d gezeigt. Es war eine tendenziell verminderte Länge des EC in den Implantationskammern der Cldn3KO-Mäuse zu beobachten (WT: $452,48 \pm 89,53 \mu\text{m}$, Cldn3KO: $365,31 \pm 121,44 \mu\text{m}$, $p=0,087$). Ein unterentwickelter EC weist hiermit auf eine reduzierte oder verzögerte Embryoimplantation und eine verminderte Invasivität des Trophoblasten hin.

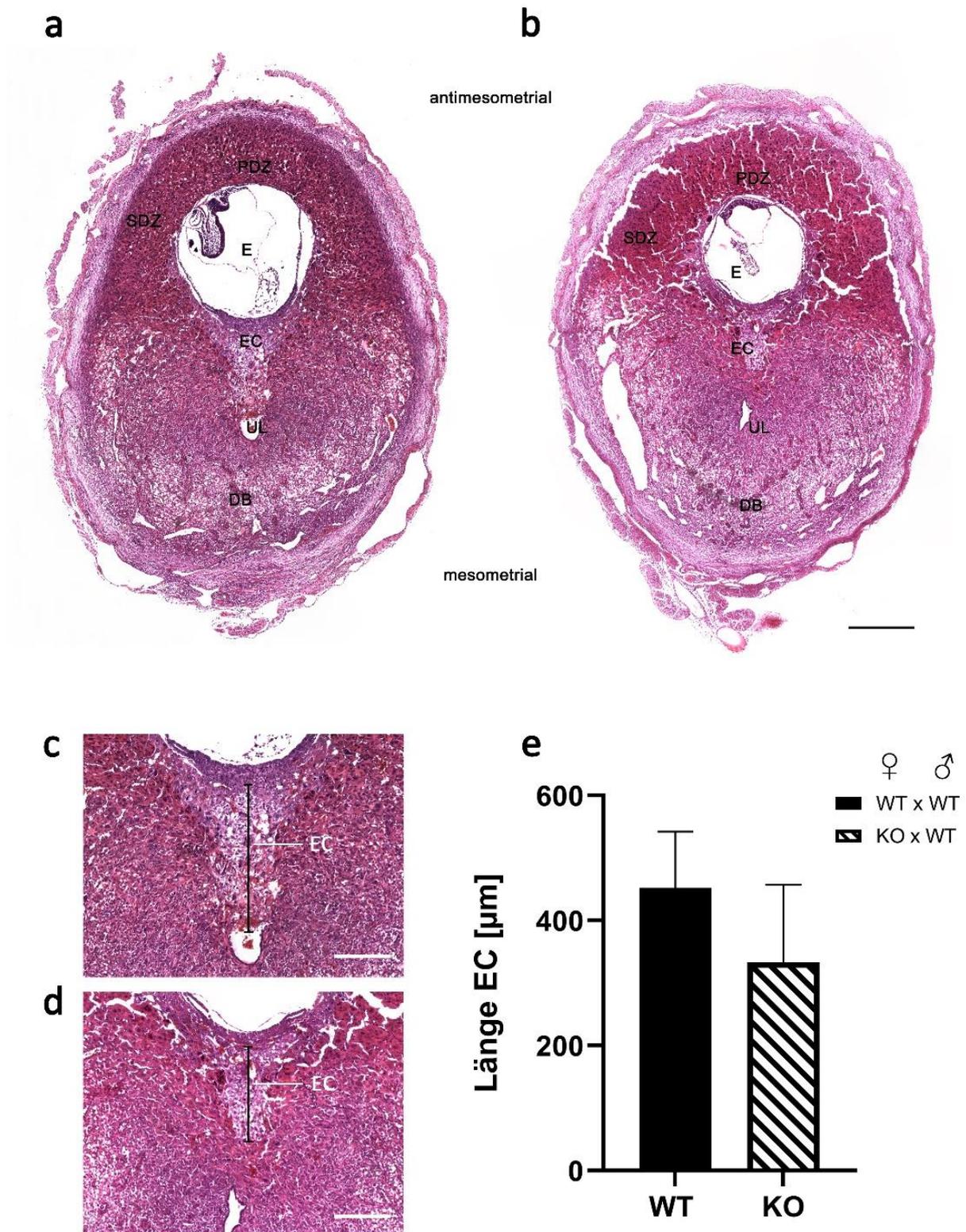


Abb. 11: Histologische Untersuchung der Implantationskammern von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 8,5 pc. Dargestellt sind HE-Färbungen an Paraffinschnitten von Implantationskammern zum Zeitpunkt 8,5 dpc von (a) WT- und (b) Cldn3KO-Mäusen. (c-e) Messung der Länge des Ekto-plazentarkonus (EC, senkrechter Strich) von WT- (c) und Cldn3KO-Mäusen (d). (e) Diagramm zur Darstellung der Länge des EC in μm . Gemessen wurde der EC in Implantationskammern resultierend aus Verpaarungen von WT x WT und KO x WT, $n = 6$. Die Länge des EC der KO-Tiere war im Vergleich zu den WT-Tieren tendenziell reduziert. MW \pm SD. PDZ = primäre Dezidua, SDZ = sekundäre Dezidua, DB = Dezidua basalis, E = Embryo, EC = Ekto-plazentarkonus, UL = uterines Lumen. Maßstab (a,b) 1000 μm und (c,d) Maßstab 50 μm .

4.2.3.2 Beeinträchtigung der frühen Plazentation durch Cldn3-Deletion

Um einen möglichen Effekt der Cldn3-Deletion auf die frühe Plazentation zu untersuchen, wurden histologische Präparate der Implantationsstellen von Cldn3KO- und WT-Mäusen zum Zeitpunkt 10,5 dpc angefertigt (Abb. 12). Auch hier wurden homogene Verpaarungen der WT-Tiere (WT x WT) und heterogene Verpaarungen der KO-Tiere (KO x WT) durchgeführt, um einen Effekt durch eine embryonale Cldn3-Deletion auszuschließen. In beiden Mauslinien zeigte sich eine regelgerechte Embryoentwicklung, wobei auch hier die Fruchthöhle der Embryonen der Cldn3KO-Mäuse kleiner erschien. Zum Zeitpunkt 10,5 dpc formt sich das Labyrinth der Plazenta aus Zellen des Chorion und der Allantois, während die Zellen des EC die Zellen der junctional zone, also des Spongiotrophoblasten, stellen (Rai und Cross, 2014). Die Entwicklung des Labyrinths und des Spongiotrophoblasten in den frühen Plazenten der Cldn3KO-Maus schien verzögert (Abb. 12 b,d), und das Gewebe des Labyrinths erschien weniger dicht im Vergleich zu dem der Kontrollmäuse (Abb. 12 a,c). Der Spongiotrophoblast war bei den Cldn3KO-Tieren noch deutlich von dem umliegenden Deziduagewebe abgegrenzt, was in den Kontrolltieren zu dem Zeitpunkt der Schwangerschaft nicht mehr der Fall war, und ähnelte noch mehr dem invasivem EC als dem Spongiotrophoblasten, da hier immernoch eine polare Struktur und Invasionsrichtung des Gewebes zu erkennen war und die Zellen des Spongiotrophoblasten eine flächigere Struktur aufwiesen.

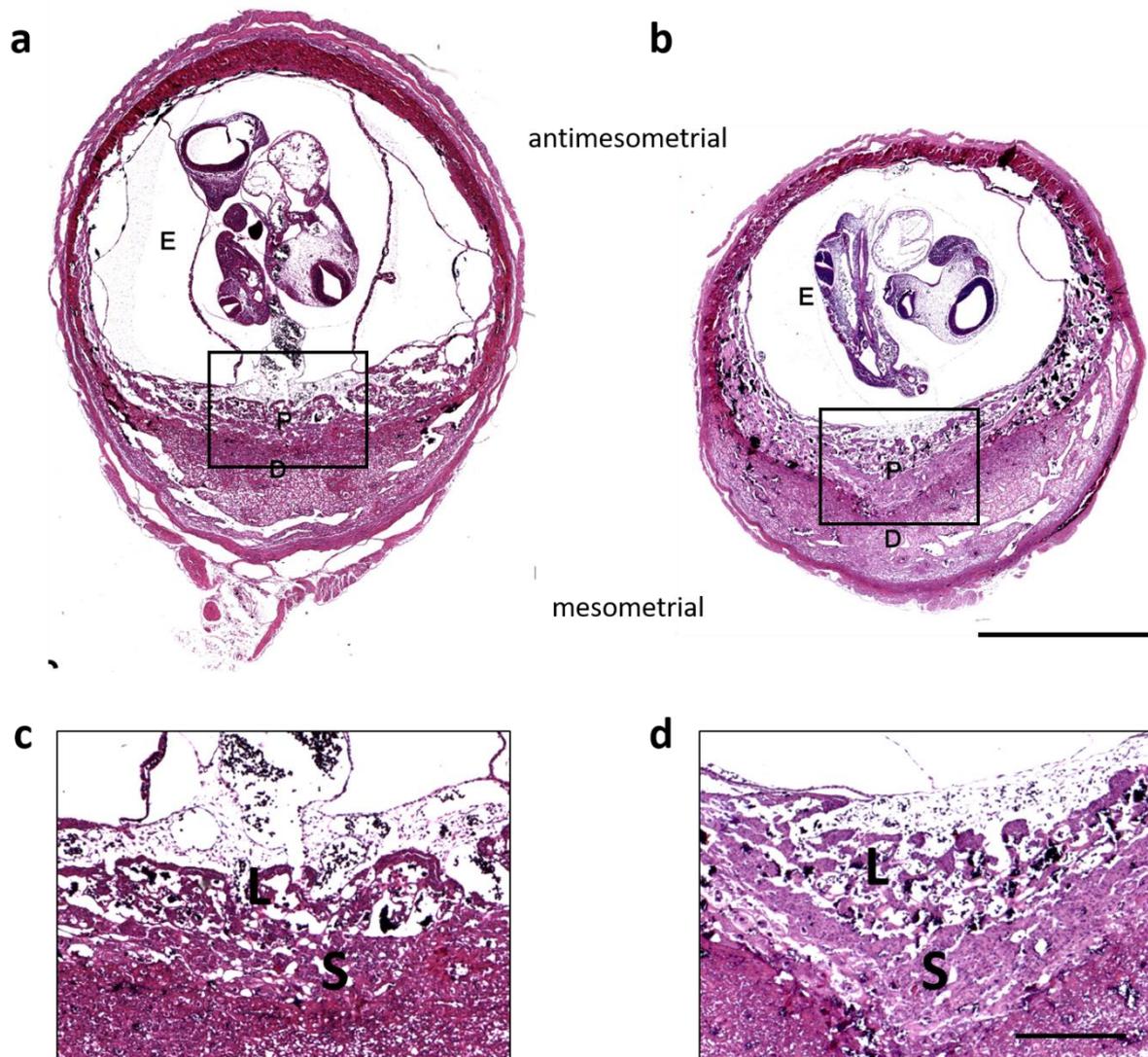


Abb. 12: Histologische Untersuchung der Implantationskammern von Cldn3KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 10,5 pc. Dargestellt sind HE-Färbungen an Paraffinschnitten von Implantationskammern zum Zeitpunkt 10,5 dpc von (a) WT- und (b) Cldn3KO-Mäusen mit gekennzeichnete Fläche des gezeigten korrespondierenden Ausschnitts in (c) und (d). E = Embryo, P = Plazenta, D = Dezidua, L = Labyrinth, S = Spongiotrophoblast. Maßstab (a, b) 2000 μ m, Maßstab (c, d) 500 μ m.

4.2.3.3 Die Cldn3-Deletion beeinträchtigt das Embryowachstum, nicht jedoch die reife Plazenta

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des endometrialen Cldn3 eine Reduktion des Gewichts der Implantationsstellen zum Zeitpunkt der Implantation und eine reduzierte Invasionstiefe des Trophoblasten zur Folge hat. Auch die frühe Entwicklung der Plazenta scheint beeinträchtigt zu sein. Um dies in den folgenden Entwicklungsstadien zu untersuchen, wurden die Plazenten beider Versuchsgruppen an Tag 14,5 pc und an 17,5 pc entnommen und histomorphologisch untersucht (Abb. 13). Auch hierfür wurden wieder homogene Verpaarungen der WT-Tiere (WT x WT) und heterogene Verpaarungen der KO-Tiere (KO x WT) durchgeführt. An Tag 14,5 pc

ist die Plazenta voll ausgebildet und weist den typischen schichtartigen Aufbau von Labyrinth, Spongiotrophoblast und der maternalen Dezidua auf. Zu diesem Zeitpunkt war kein morphologischer Unterschied zwischen den Plazenten der *Cldn3*-defizienten Tiere zu den Plazenten der WT-Kontrollen festzustellen. Alle drei Schichten der Plazenta sind vollständig ausgebildet und zeigen keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Gewebsstruktur (Abb. 13 a,b). Auch an Tag 17,5 pc waren die Plazenten der KO-Tiere in ihrer Morphologie unauffällig (Abb. 13 c,d).

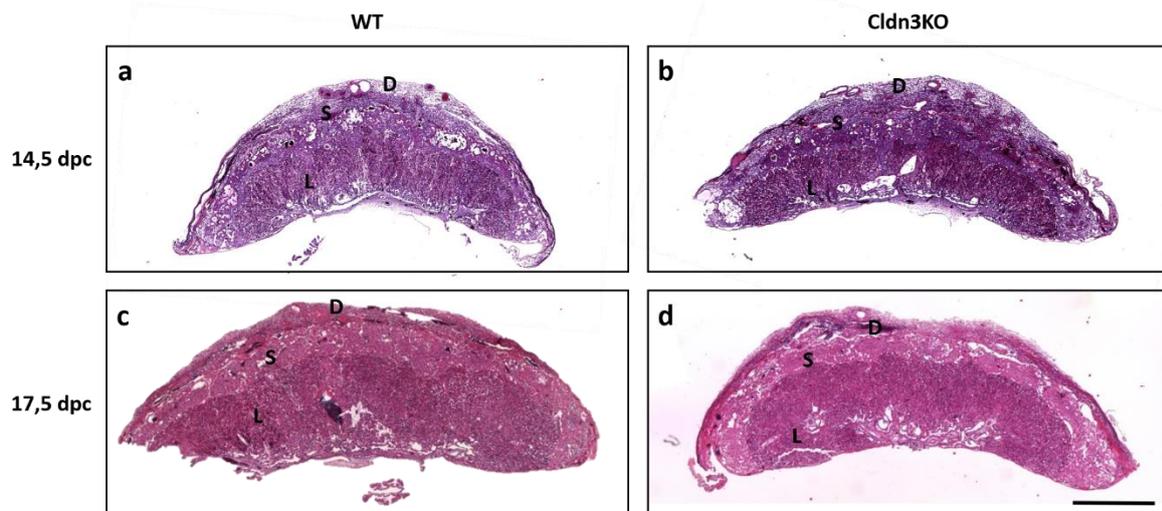


Abb. 13: Histologische Untersuchung der Plazenten von *Cldn3*KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 14,5 pc (a, b) und 17,5 pc (c, d). Dargestellt sind HE-Färbungen an Paraffinschnitten der Plazenten von (a, c) WT- und (b, d) *Cldn3*KO-Mäusen. L = Labyrinth, S = Spongiotrophoblast, D = Dezidua. Maßstab 1500 μ m.

An Tag 17,5 pc wurden die Plazenten und die dazugehörigen Embryonen zusätzlich gewogen. Hier wurden sowohl homogene WT- und KO-Verpaarungen (WT x WT; KO x KO) als auch heterogene KO-Verpaarungen durchgeführt (KO-Weibchen x WT-Männchen), um einen eventuellen Effekt einer embryonalen *Cldn3*-Deletion ausschließen zu können. Die Embryonen aus beiden KO-Verpaarungen wiesen ein signifikant reduziertes Gewicht gegenüber den WT-Kontrollembryonen auf (WT x WT: $0,923 \pm 0,10$ g, KO x KO: $0,821 \pm 0,08$ g, KO x WT: $0,892 \pm 0,06$ g), das Gewicht der Plazenten aus allen drei Verpaarungstypen zeigte jedoch keine Gewichtsunterschiede (WT x WT: $0,127 \pm 0,05$ g. KO x KO: $0,112 \pm 0,02$, KO x WT: $0,117 \pm 0,01$ g) (Abb. 14). Obwohl die reifen Plazenten der *Cldn3*-KO-Tiere also morphologisch unauffällig waren, konnte hier eine Wachstumretardierung der Embryonen in den *Cldn3*KO-Müttern gezeigt werden. Die *Cldn3*-Deletion beeinträchtigte also das Embryowachstum, vermutlich durch eine reduzierte Dezidualisierung und

Trophoblastinvasion in der frühen Schwangerschaft, was jedoch dennoch in überlebenschfähigen Nachkommen resultierte.

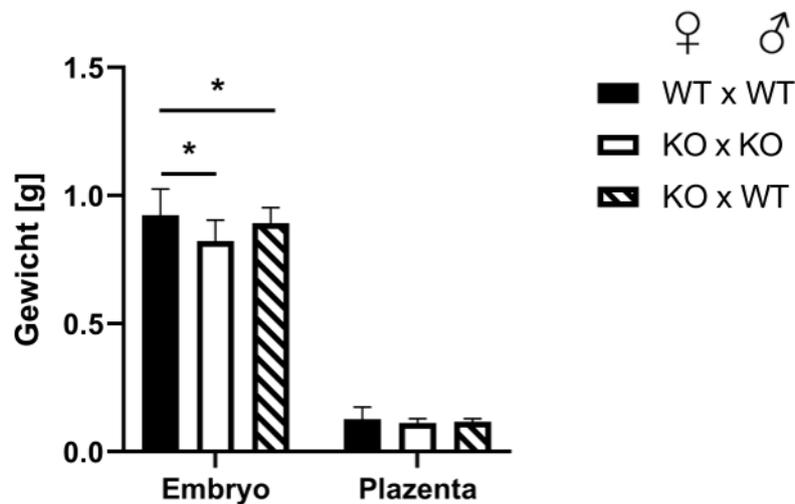


Abb. 14: Gewichte der Embryonen und korrespondierenden Plazenten von *Cldn3*KO- im Vergleich zu WT-Mäusen an Tag 17,5 pc. Dargestellt sind die Gewichte von Embryonen und Plazenten aus den Verpaarungstypen WT x WT (n=22), KO x KO (n=20) und KO-Weibchen x WT-Männchen (KO x WT, n=13). Das Gewicht der Embryonen aus beiden KO-Verpaarungen war signifikant reduziert, die Plazenten aller Versuchsgruppen wiesen keinen signifikanten Gewichtsunterschied auf. MW \pm SD, * p \leq 0,05.

In diesem Kapitel konnte somit gezeigt werden, dass die frühen Beeinträchtigungen der Dezidualisierung eine intrauterine Wachstumsretardierung der Embryonen zur Folge hatte, aber die Morphologie der reifen Plazenten nicht beeinflusste.

4.2.3.4 Untersuchung des Schwangerschaftsverlauf der *Cldn3*KO-Tiere mittels Ultraschall

Um die Entwicklung der Implantationskammern morphologisch *in vivo* beurteilen zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft Ultraschalluntersuchungen an *Cldn3*KO-Mäusen durchgeführt und diese mit den WT-Kontrollen verglichen (Abb. 15). Zum Zeitpunkt 8,5 dpc waren die Implantationsstellen mit stark echoarmer Fruchthöhle in den WT-Kontrollen in der Ultraschallaufnahme bereits deutlich zu sehen (Abb. 15 a, Pfeil). Die Implantationsstellen der *Cldn3*KO-Mäuse erschienen deutlich echoärmer und auch die Fruchthöhle war im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht so deutlich ausgeprägt (Abb. 15 b, Pfeil). Am Tag 10,5 pc war in den WT-Kontrollen der Embryo deutlich zu erkennen, in Ansätzen ebenfalls die *Arteria umbilicalis* (Abb. 15 c, Pfeil). Die sich bildende Plazenta, die zu diesem

Zeitpunkt aus dem Labyrinth und dem Spongiotrophoblasten besteht, grenzte sich bereits von der darunter liegenden Dezidua ab (Abb. 15 c, Stern). In den *Cldn3*KO-Mäusen war ebenfalls ein sich entwickelnder Embryo zu erkennen, die Plazenta zeichnete sich allerdings noch nicht so deutlich ab (Abb. 15 d). Ab dem Zeitpunkt 14,5 dpc waren die Plazenten vollständig entwickelt. Zudem waren in beiden Mausstämmen gleichermaßen deutlich die Embryonen zu erkennen (Abb. 15 e,f)

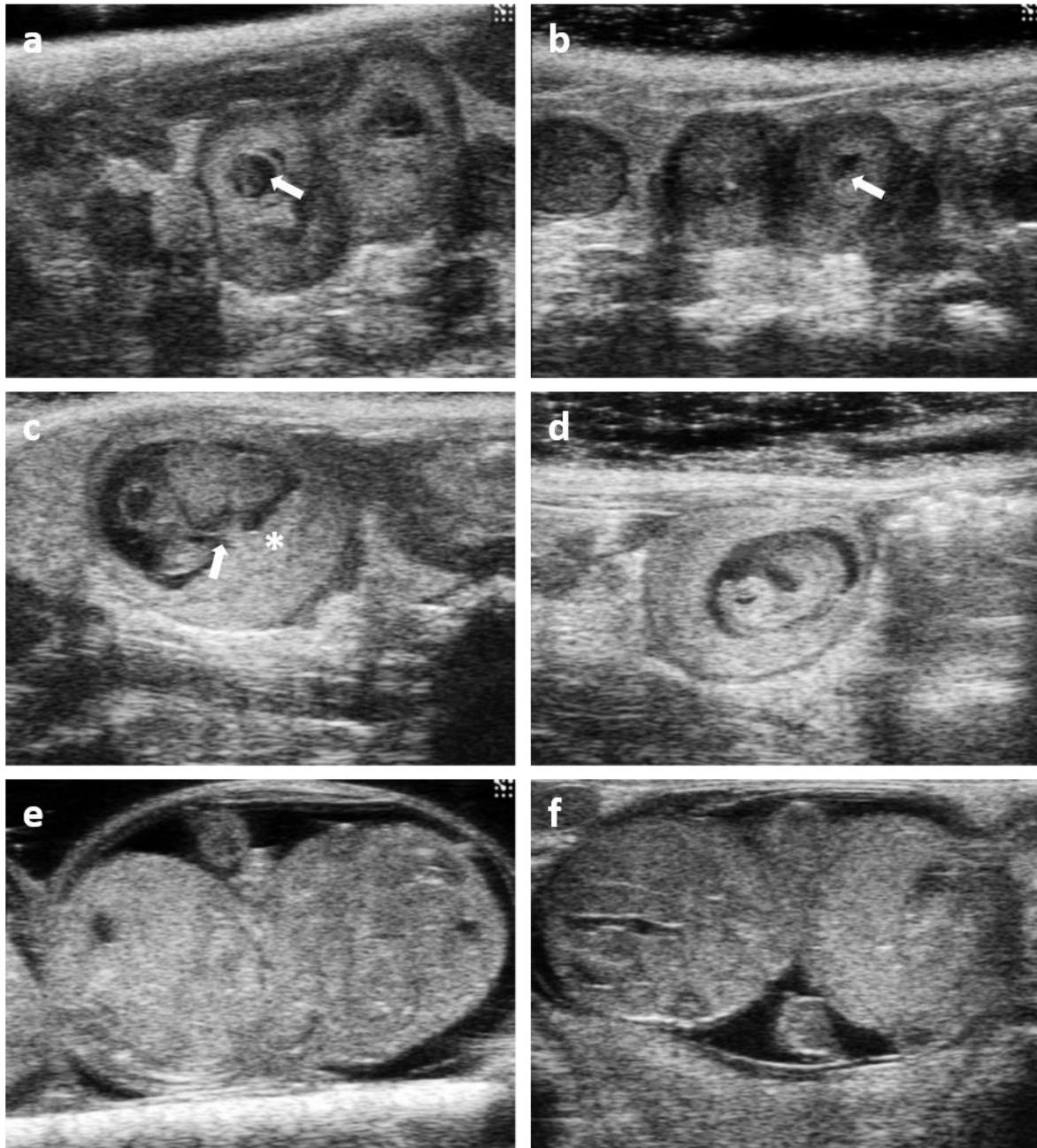


Abb. 15: Ultraschalluntersuchungen von Implantationskammern zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft von *Cldn3*KO- im Vergleich zu WT-Mäusen. Dargestellt sind Implantationskammern von WT- (a, c, e) und *Cldn3*KO-Mäusen (b, d, f) an 8,5 dpc (a, b), 10,5 dpc (c, d) und 14,5 dpc (e, f). Der Pfeil in a und b deutet auf den Embryo, das Sternchen in (c) auf die Plazenta und der Pfeil in (c) auf die Arteria umbilicalis.

4.2.3.5 Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Vaskularisierung der Dezidua

Ein wesentlicher Faktor für die Blutversorgung der sich entwickelnden Plazenta und damit für die ausreichende Versorgung des Embryos ist die Bereitstellung einer adäquaten Gefäßversorgung in der mütterlichen Dezidua. Hierzu ist eine umfangreiche Gefäßneubildung in der Dezidua in der frühen Schwangerschaft notwendig. Um einen möglichen Einfluss des Fehlens des Cldn3 auf diese Gefäßentwicklung näher zu untersuchen, wurde die Neovaskularisierung der Dezidua mittels einer Immunfluoreszenzfärbung gegen den Endothelmarker CD31 analysiert.

Lokalisation von CD31-positiven Gefäßen und Zellen im Verlauf der Schwangerschaft in der WT-Maus

In früheren Studien konnte in einer Fluoreszenzfärbung mittels Doppelinkubation von CD31- und Cldn3-Antikörpern bereits gezeigt werden, dass in der Intermediärzone der Implantationsstelle an Tag 6,5 pc die Endothelzellen auch eine Cldn3-Expression aufwiesen, in der antimesometrialen Dezidua allerdings nur die Deziduazellen Cldn3-positiv waren, die Endothelzellen jedoch nicht. An Tag 8,5 pc konnte hingegen kein Cldn3 in den Endothelzellen mehr nachgewiesen werden (Schumann, 2015). Da die Ko-Lokalisation von Cldn3 und CD31 in den späteren Schwangerschaftsstadien im WT jedoch noch nicht untersucht wurde, wurde in der vorliegenden Studie zunächst eine Doppel-Fluoreszenzfärbung mit den entsprechenden Antikörpern an Implantationsstellen von WT-Mäusen an Tag 10,5 pc durchgeführt (Abb. 16). Insgesamt konnten in der Implantationsstelle an Tag 10,5 pc keine Cldn3-positiven Endothelzellen, also keine Ko-Lokalisation der Cldn3- und CD31-positiven Zellen, gefunden werden. Allerdings wiesen die Zellen der antimesometrialen Dezidua, die sich nur noch schmal über den Embryo legt, CD31-positive Zellen auf, die nicht das typische Netzgeflecht des vaskulären Systems der Dezidua aufwiesen (Abb. 16 b-d). In der mesometrialen *Dezidua basalis*, die später den maternalen Teil der Plazenta bildet, konnten CD31-positive Zellen nachgewiesen werden, die die morphologischen Merkmale des Gefäßnetzes der Dezidua aufwiesen (Abb. 16 e-g).

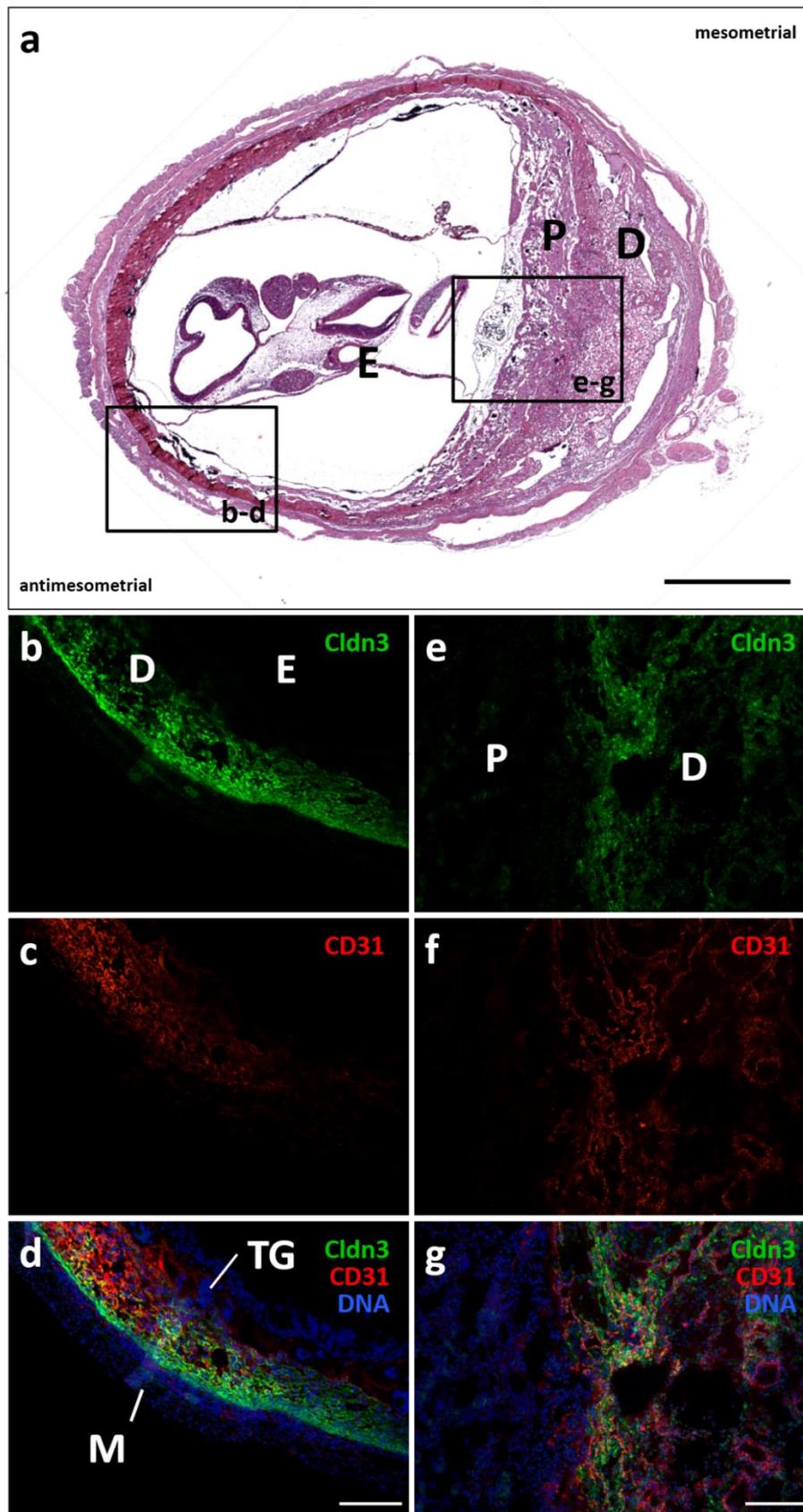


Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 und CD31 an Implantationskammern von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 10,5 dpc. Zur Übersicht ist eine HE-Färbung einer Implantationskammer an Tag 10,5 pc mit einer Kennzeichnung der gezeigten Ausschnitte der Fluoreszenzfärbungen gezeigt (a). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung gegen Cldn3 (grün, b, e), CD31 (rot, c, f) und eine Überlagerung mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau, d, g). E = Embryo, D = Dezidua, P = Plazenta, TG = Trophoblastriesenzellen, M = Mesometrium. Maßstab (a) 1000µm, (b-g) 200 µm.

In der reifen Plazenta sind die fetalen Blutgefäße des Labyrinths Ort des Austausches der Nährstoffe zwischen Mutter und Embryo. Wie bereits gezeigt, ist Cldn3 in der reifen Plazenta nur in dem maternalen Teil, der Dezidua, exprimiert. Um zu überprüfen, ob die Cldn3-positiven Zellen CD31-positiv sind, wurde eine Doppelfluoreszenzfärbung an Plazentagewebe im Stadium 17,5 dpc angefertigt (Abb. 17). Wie bereits beschrieben, befanden sich Cldn3-positive Zellen ausschließlich in dem dezidualen Teil der Plazenta. Zahlreiche kleinere CD31-positive Blutgefäße fanden sich überwiegend im Labyrinth (Abb. 17 k-m), die Dezidua (Abb. 17 e-g) und der Spongiotrophoblast (Abb. 17 h-j) waren nur vereinzelt durchzogen von größeren Gefäßen.

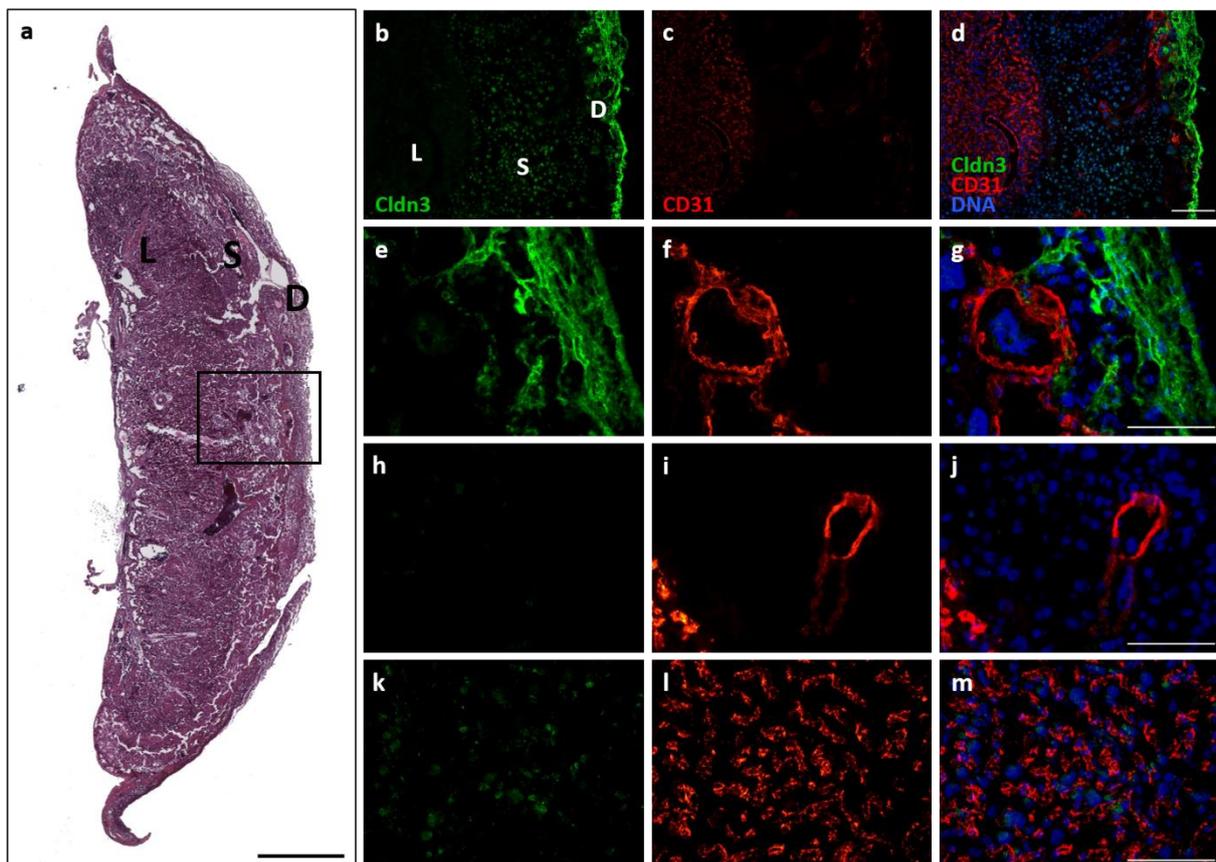


Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn3 und CD31 an Plazentagewebe von WT-Mäusen zum Zeitpunkt 17,5 dpc. Zur Übersicht ist eine HE-Färbung einer Plazenta an Tag 17,5 pc mit einer Kennzeichnung der gezeigten Ausschnitte der Fluoreszenzfärbungen gezeigt (a). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung gegen Cldn3 (grün, b, e, h, k), CD31 (rot, c, f, i, l) und eine Überlagerung beider Färbungen mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau, d, g, j, m). (b-d) Übersicht über die Verteilung von Cldn3 und CD31 in den Schichten der Plazenta. Cldn3 ist ausschließlich in der Dezidua exprimiert. CD31 positive Blutgefäße finden sich in allen drei Schichten der Plazenta. Detailaufnahmen der Dezidua (e-f) des Spongiotrophoblasten (h-j) und des Labyrinths (k-m). L = Labyrinth, S = Spongiotrophoblast, D = Dezidua. Maßstab (a) 1500 µm, (b-d) 100 µm, (e-m) 200 µm.

Die Cldn3-Deletion beeinflusst nicht die Vaskularisierung der Dezidua während der frühen Implantation

Da die Gefäßneubildung in der frühen Dezidua einen wesentlichen Grundstein für die spätere Embryoentwicklung darstellt, sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Vaskularisierung der Dezidua untersucht werden. Dazu wurden Implantationsstellen Cldn3-defizienter Mäuse und WT-Mäuse zum Zeitpunkt 8,5 dpc mit dem Endothelmarker CD31 gefärbt (Abb. 18). Sowohl in den Implantationsstellen der Cldn3-defizienten Mäusen als auch in denen der WT-Kontrollen waren die Zellen der antimesometrialen Dezidua CD31-positiv (Abb. 18 b,f). Lateral war bei beiden Mauslinien eine Intermediärzone mit geringer Gefäßdichte zu finden (Abb. 18 c,g) und ein gut ausgebildetes Netzwerk aus Gefäßen in der mesometrialen Dezidua (Abb. 18 d,h). Es zeigte sich kein Unterschied in Verteilung und Ausprägung der Blutgefäße beim Vergleich der beiden Mausstämme. Somit konnte kein Unterschied in der Vaskularisierung der mesometrialen Dezidua der Cldn3KO-Maus im Vergleich zu der WT-Maus festgestellt werden.

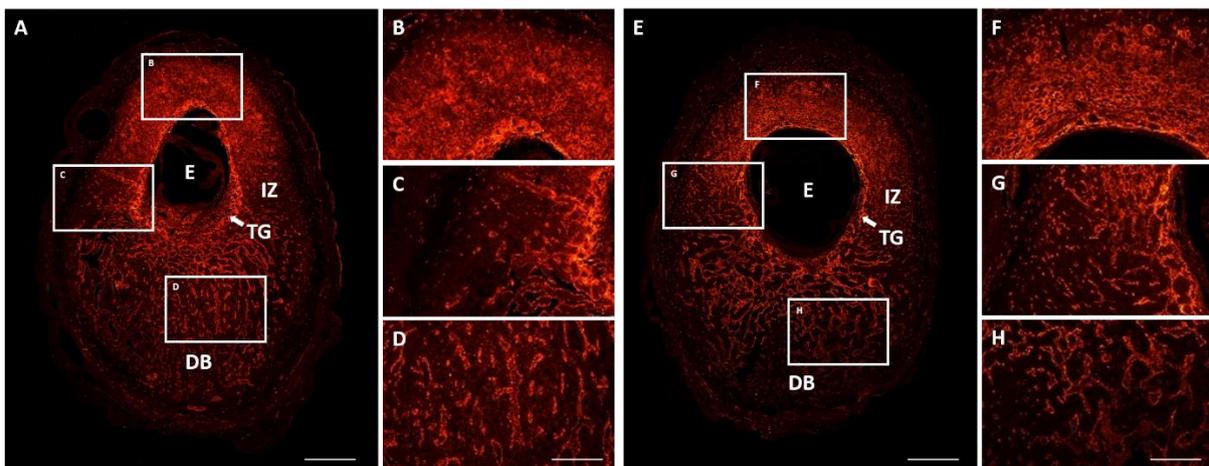


Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbungen für CD31 an Implantationskammern von WT- und Cldn3KO-Mäusen zum Zeitpunkt 8,5 dpc. Dargestellt sind jeweils eine Übersicht (a, e) und Detailausschnitte (b-d; f-h) der Implantationskammern von WT- (a-d) und Cldn3KO-Mäusen (e-h). Die Ausschnitte zeigen CD31 positive Blutgefäße in der antimesometrialen Dezidua (b,f), der Intermediärzone (c,g) und der basalen Dezidua (d,h). E = Embryo; IZ = Intermediärzone; TG = Trophoblastriesezellen (Pfeil); DB = *Dezidua basalis*. Maßstab (a, e) 1000 μ m, (b-d) und (f-h) 200 μ m.

4.2.4 Cldn4 als mögliches kompensatorisches Protein in Cldn3KO-Mäusen

Innerhalb der Proteinfamilie der Claudine gibt es Überschneidungen der verschiedenen Isoformen in der Proteinstruktur und damit einhergehend auch in der postulierten Funktion der Claudine (Lal-Nag und Morin, 2009; Van Itallie und Anderson, 2006). Da der Effekt der Deletion von Cldn3 trotz einer spezifischen

Induktion dieses Proteins in der Dezidua der frühen Schwangerschaft in WT-Mäusen recht mild ausfällt und die Cldn3KO-Mäuse trotzdem fertil sind, könnte ein anderes Claudin als kompensatorisches Protein fungieren und in den Implantationskammern der Cldn3KO-Mäuse hochreguliert sein. In unserer Arbeitsgruppe konnte mittels qRT-PCR bereits gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Implantation an 6,5 und 8,5 dpc die Transkripte für Cldn4 und Cldn10 in den Implantationskammern signifikant hochreguliert sind (Xin Xin Wu, unveröffentlichte Daten). Cldn4 ist in dieser Studie von besonderem Interesse, da das Protein eine ähnliche Aminosäuresequenz wie das Cldn3 besitzt. Deswegen wurde in dieser Studie die Expression und Lokalisation von Cldn4 im zyklischen Endometrium sowie zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft von WT-Mäusen untersucht und mit der Expression des Proteins in den Implantationskammern der Cldn3KO-Mäuse verglichen. Dazu wurden Paraffinschnitte der verschiedenen Gewebe angefertigt und mit einem Antikörper gegen Cldn4 fluoreszenzgefärbt.

4.2.4.1 Cldn4 im zyklischen Endometrium von Cldn3KO- und WT-Mäusen

Zunächst wurde die Expression von Cldn4 im zyklischen Endometrium der WT- und Cldn3KO-Mäuse untersucht. In der Immunfluoreszenzfärbung von Endometriumgewebe mit dem Antikörper gegen Cldn4 konnte das Protein im luminalen und glandulären Epithel in allen Phasen des Östruszyklus von WT-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 19 a-h). Ähnlich der Verteilung von Cldn3 war auch Cldn4 in einer apikalen und etwas schwächeren basalen Konzentration in den Zellen des luminalen Epithels vom Metöstrus bis zum Proöstrus zu finden, im Östrus war die Verteilung von Cldn4 eher diffus (Abb. 19 a-d). Im glandulären Epithel war Cldn4 in keiner polaren Konzentration exprimiert, sondern gleichmäßig über die Zellmembran verteilt (Abb. 19 e-h). In den Cldn3KO-Mäusen zeigten sich bis auf ein schwächeres Fluoreszenzsignal im glandulären Epithel im Di- und Proöstrus keine bedeutenden Unterschiede im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Abb. 19 i-p).

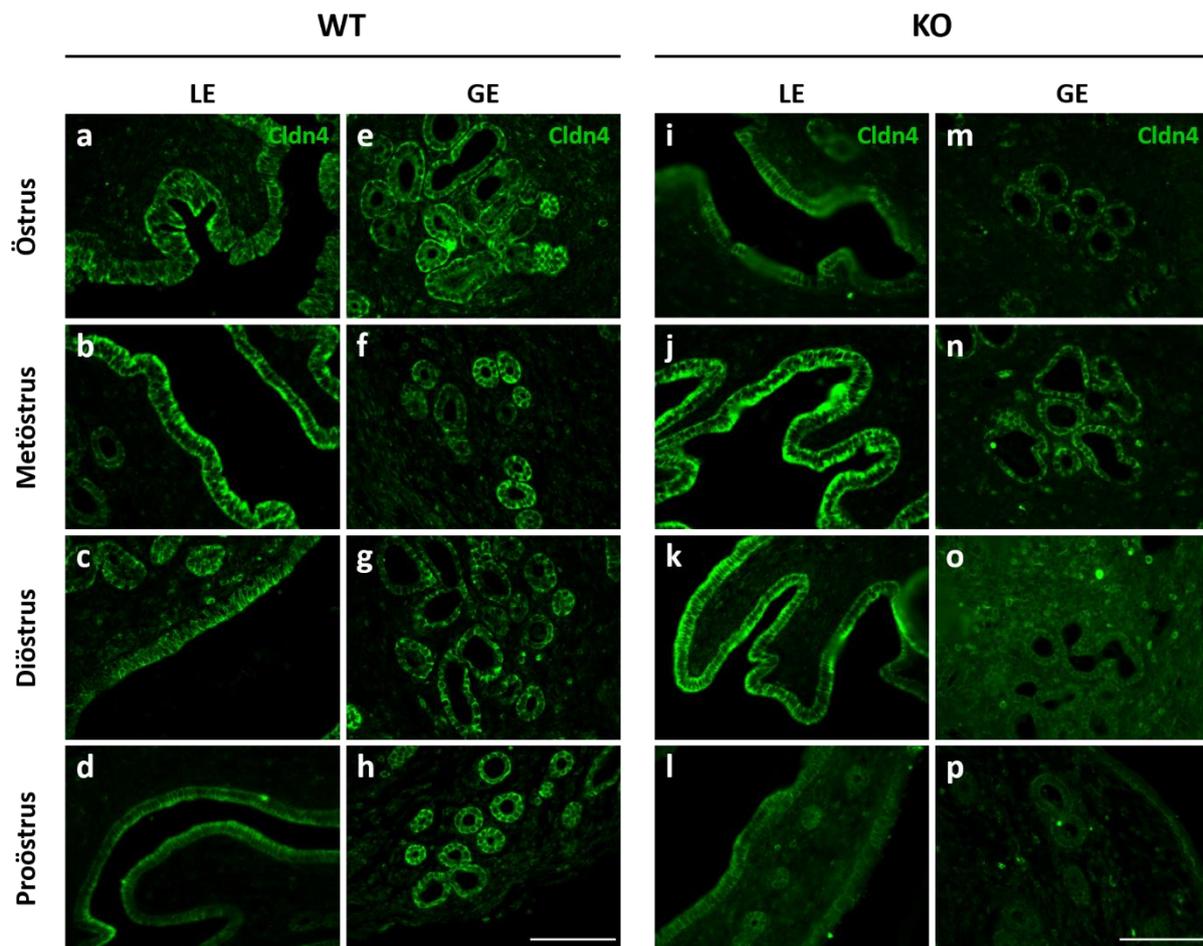


Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Endometriummewebe von WT- (a-h) und Cldn3KO-Mäusen (i-p) in unterschiedlichen Phasen des Östruszyklus. Die Zyklusphasen wurden mittels Vaginalabstrich bestimmt. Dargestellt sind jeweils Anschnitte des luminalen (LE, a-d und i-l) und des glandulären (GE, e-h und m-p) Epithels des Uterus. Cldn4 ist in der WT- und der Cldn3KO-Maus gleichermaßen im gesamten Zyklus im luminalen und glandulären Epithel exprimiert. Maßstab 100 μ m.

4.2.4.2 Cldn4-Expression während der Implantation und Plazentabildung in Cldn3KO- und WT-Mäusen

In der frühen Schwangerschaft der Maus wird das Cldn3-Protein spezifisch in den Deziduazellen der Implantationskammern induziert (Schumann et al., 2015). Um zu untersuchen, ob das Fehlen des Cldn3 eine Expressionsänderung des Cldn4-Proteins zur Folge hat, wurden Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Implantationsstellen von Cldn3-defizienten Mäusen an Tag 8,5 und 10,5 pc der Schwangerschaft (Abb. 20 a-d) angefertigt und mit WT-Kontrollen (Abb. 20 e-h) verglichen. Hierbei wurden homogene Verpaarungen der WT-Mäuse vorgenommen (WT x WT) und heterogene Verpaarungen der KO-Mäuse (KO x WT), um embryonale Effekte auszuschließen. An Tag 8,5 pc zeigten die Zellen der sekundären Dezidua der Implantationsstellen von WT-Mäusen eine starke Fluoreszenzfärbung gegen Cldn4 (Abb. 20 b). Der

Ektoplazentarkonus (Abb. 20 c) und die mesometriale Dezidua (Abb. 20 d) wiesen ebenfalls Cldn4-positive Zellen auf, jedoch war hier das Fluoreszenzsignal deutlich schwächer. In den Cldn3-defizienten Mäusen ähnelt die Verteilung von Cldn4 somit der Verteilung in dem WT-Gewebe. Als einzig deutlicher Unterschied war hier eine stärkere Immunreaktivität im Ektoplazentarkonus zu erkennen (Abb. 20 g). Im Gegensatz zu Cldn3 ist Cldn4 jedoch auch deutlich in den Strukturen des Embryos exprimiert.

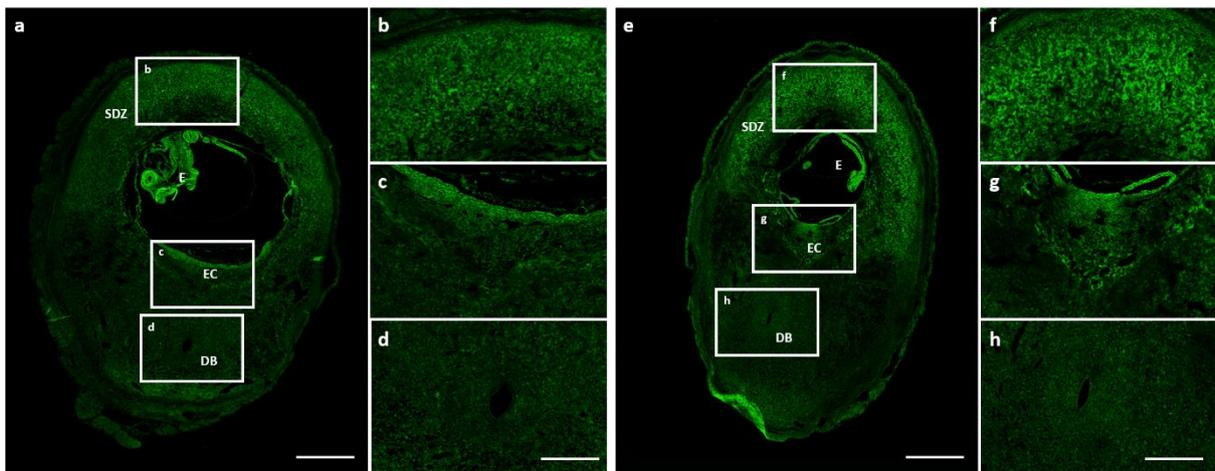


Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Implantationskammern von WT- und Cldn3KO-Mäusen an 8,5 dpc. Dargestellt sind jeweils eine Übersicht (a, e) und Detailausschnitte (b-d; f-h) der Implantationskammern von WT- (a-d) und Cldn3KO-Mäusen (e-h). Die Ausschnitte zeigen CD31-positive Zellen in der antimesometrialen Dezidua (b,f), der Intermediärzone (c,g) und der basalen Dezidua (d,h). Maßstab (a, e) 1000 μm , (b-d; f-h) 200 μm . E = Embryo, EC = Ektoplazentarkonus, DB = *Dezidua basalis*, SDZ = sekundäre Dezidua. Maßstab (a, e) 1000 μm , (b-d) und (f-h) 200 μm . Fluoreszenzfärbung gegen Cldn4 fand sich nur im Embryo, sowie im Labyrinth und Spongiotrophoblast der sich bildenden Plazenta (Abb. 21 c,d).

An Tag 10,5 pc wies das mütterliche Gewebe der WT-Mäuse sowie der Cldn3KO-Mäuse keine positive Immunreaktivität gegen Cldn4 mehr auf (Abb. 21). Eine Fluoreszenzfärbung gegen Cldn4 fand sich nur im Embryo, sowie im Labyrinth und Spongiotrophoblast der sich bildenden Plazenta (Abb. 21 c,d)

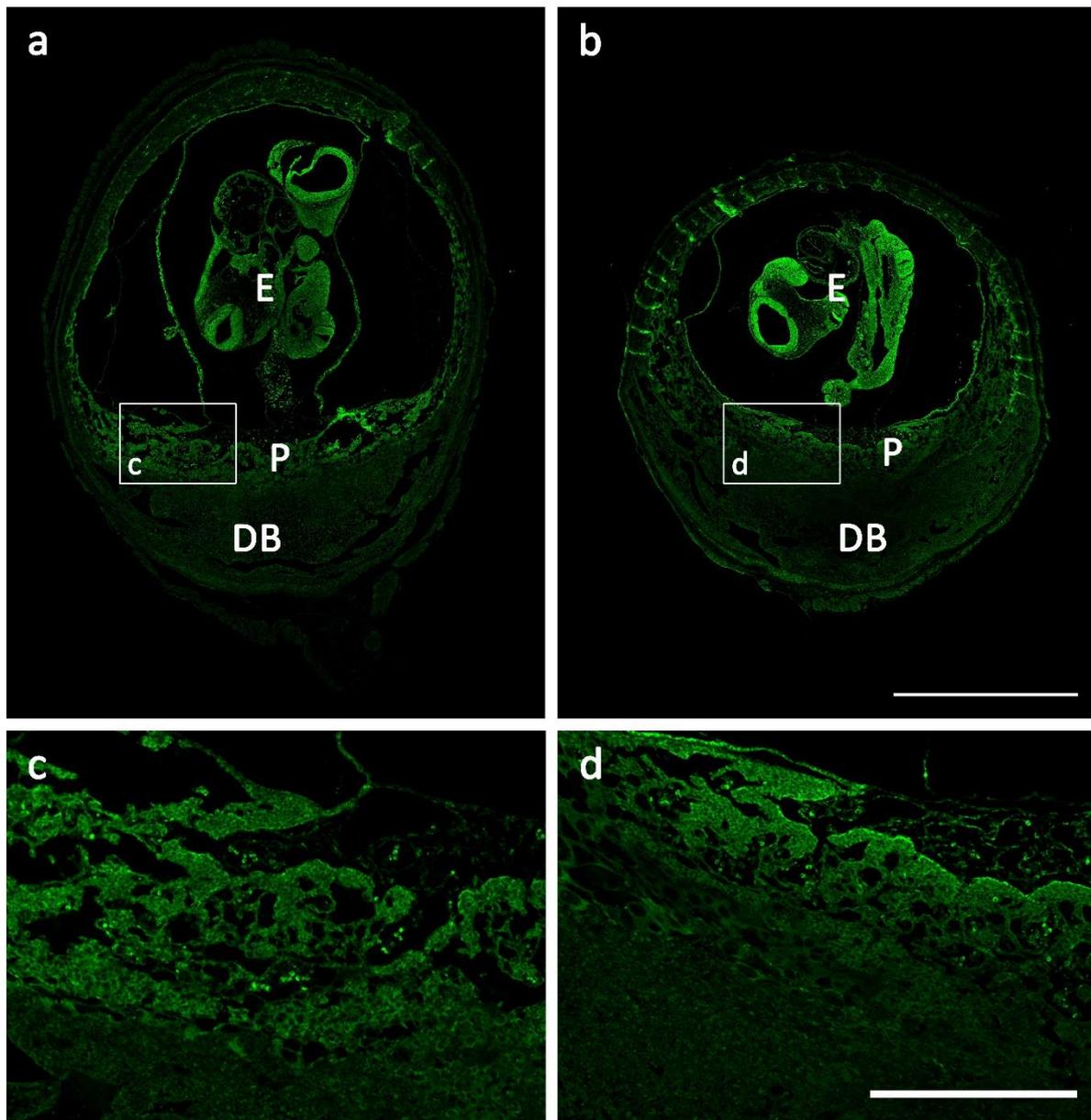


Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 an Implantationskammern von WT-(a,c) und Cldn3KO-(b,d) Mäusen an 10,5 dpc. Gezeigt sind Übersichtsdarstellungen der Implantationskammern (a,b) und Detailausschnitte der Plazenten (c,d). Cldn4 ist an diesem Stadium in den Strukturen des Embryos exprimiert, sowie in den embryonalen Teilen der Plazenta, dem Spongiotrophoblasten und dem Labyrinth. E = Embryo, P = Plazenta, DB = *Dezidua basalis*. Maßstab (a,b) 2000 μ m, (c,d) 500 μ m.

Da die beiden embryonalen Kompartimente der frühen Plazenta (Labyrinth und Spongiotrophoblast) zum Zeitpunkt 10,5 dpc eine positive Immunreaktivität gegen Cldn4 aufwiesen, wurden in gleicher Weise reife Plazenten an 17,5 dpc der Cldn3KO- und WT-Mäuse für Cldn4 gefärbt (Abb. 22). Während sich hier eine sehr schwache Expression im Dezidugewebe zeigte, war eine deutliche Cldn4 Färbung sowohl im Spongiotrophoblasten als auch im Labyrinth in den WT- (Abb. 22 a) wie auch in den Cldn3KO-Plazenten (Abb. 22 b) nachweisbar. Dabei erschien die intrazelluläre

Lokalisation des Proteins zytoplasmatisch mit einer Aussparung der Zellkerne. Ein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien konnte nicht beobachtet werden.

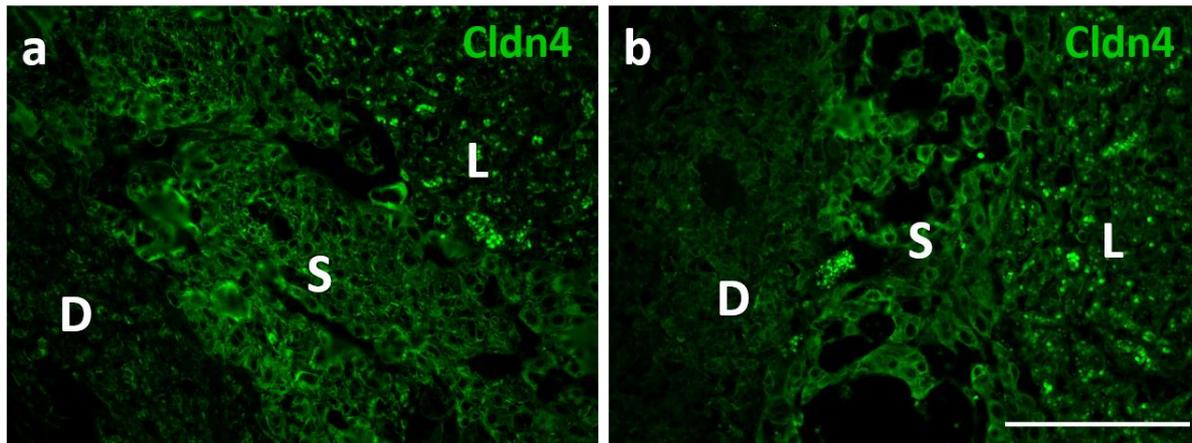


Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn4 in Plazentagewebe von WT- (a) und Cldn3KO-Mäusen (b) an 17,5 dpc. Dargestellt sind alle drei Schichten der Plazenta. Ein positives Fluoreszenzsignal ist in den embryonalen Teilen der Plazenta, dem Spongiotrophoblasten und dem Labyrinth gleichermaßen in beiden Mausstämmen zu finden. D = Dezidua, S = Spongiotrophoblast, L = Labyrinth. Maßstab 200 μm .

Cldn4 zeigt somit zusammengefasst einige Überschneidungen in der Expression mit Cldn3, jedoch auch einige distinktive Lokalisationen, z.B. in den embryonalen Strukturen an Tag 8,5 und 10,5 pc, sowie in den embryonalen Anteilen der Plazenta, dem Spongiotrophoblasten und dem Labyrinth, in denen Cldn3 nicht exprimiert ist.

4.2.5 Differentielle Genregulierung in der Dezidua der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zur WT-Maus

Um zu überprüfen, ob die Deletion von Cldn3 einen Einfluss auf die Genregulierung in der Implantationsstelle hat, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Dafür wurde RNA aus isolierten Deziduen an Tag 8,5 pc isoliert und mit dem Affymetrix Clariom™ S Assay mouse (Applied Biosystems™) analysiert, welcher über 20.000 annotierte Gene umfasst.

Abb. 23a stellt die Gesamtzahl der regulierten Gene dar. Dabei wurde nach zwei Parametern gefiltert: $p \leq 0,05$ und fold change ≥ 2 bzw. ≤ -2 . Das bedeutet, dass nur Gene als reguliert angesehen wurden, deren Expression mindestens um den Faktor 2 erhöht bzw. erniedrigt war, und dieser Unterschied auch statistisch signifikant war. Insgesamt waren in der Cldn3KO-Maus 36 Transkripte hoch und 202 Transkripte herunterreguliert. Von den hochregulierten Transkripten waren 38,89 %, von den herunterregulierten 57,43 % kodierende Gene. Zur anschaulichen Darstellung wurden

die untersuchten Gene in einem Volcano-Plot dargestellt, bei dem der fold change (X-Achse) gegen den negativen Logarithmus des p-Werts aufgetragen ist (Abb. 23b). Die gesetzten Parameter ($p \leq 0,05$ und fold change ≥ 2 bzw. ≤ -2) sind als Grenzen mit schwarzen Linien eingezeichnet. Im linken oberen Quadranten sind die herunterregulierten Gene in grün und im rechten oberen Quadranten die hochregulierten Gene in rot dargestellt.

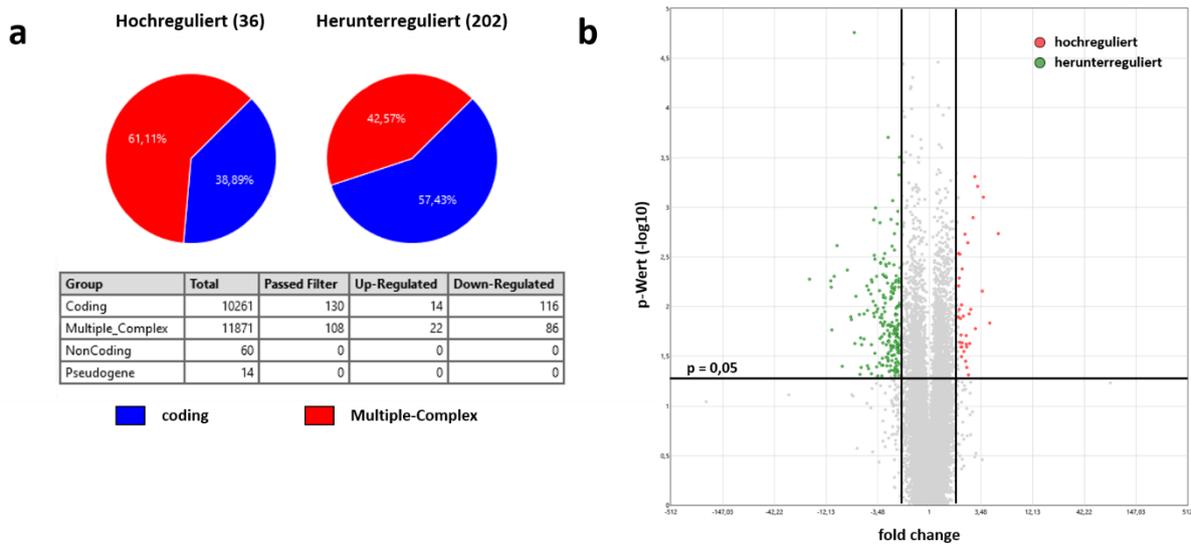


Abb. 23: Gesamtzahl regulierter Gene und Darstellung der in der Cldn3KO-Maus regulierten Gene als Volcano Plot. a) Dargestellt sind die Gesamtzahlen an regulierten Genen sowie ihr prozentualer und absoluter Anteil an kodierenden Genen. Dabei beschreibt Multiple_Complex den Umstand, dass für das Gen mehrere Gruppen beschrieben wurden. b) Volcano Plot der regulierten Gene. Die eingezeichneten Grenzen beziehen sich auf $p \leq 0,05$ und fold change ≥ 2 bzw. ≤ -2 . Hochregulierte Gene sind in rot, herunterregulierte Gene in grün dargestellt. Die Abbildungen wurde mithilfe der TAC-Software erstellt. n=3

Tab. 11 zeigt eine Auflistung der am stärksten regulierten Gene in der Dezidua der Cldn3KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus. Als Maß für die Regulation wurden die Gene in dieser Tabelle nach dem fold change sortiert. Alle diese Gene liegen innerhalb des Signifikanzwertes von $p \leq 0,05$. Das am stärksten herunterregulierte Gen stellt ein Vertreter der Prolaktin-Familie (Prl7b1) mit einem fold change von -18,12 dar, das am stärksten hochregulierte Gen die disintegrin-like and metallopeptidase (Adams18) mit einem fold change von 4,26. Eine Gesamtauflistung aller regulierten Gene findet sich in Kapitel 9 (Anhang), Tab. 14.

Tab. 11: Darstellung der jeweils 20 stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene in der Cldn3KO-Maus im Vergleich zu WT-Maus. Die Transkripte wurden nach fold change sortiert.

ID	Gen	Beschreibung	fold change	p-Wert
Herunterreguliert				
TC1300001694.mm.2	Prl7b1	prolactin family 7, subfamily b, member 1	-18,12	0,005
TC0700000233.mm.2	Ceacam9	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 9	-10,89	0,006
TC1300001698.mm.2	Prl7d1	prolactin family 7, subfamily d, member 1	-10,73	0,006
TC0700003914.mm.2	Hbb-y	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	-10,61	0,017
TC0300002561.mm.2	Hsd3b6	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 6	-9,97	0,005
TC0400000386.mm.2	4933409K07Rik	predicted gene 3893; RIKEN cDNA 4933409K07 gene	-9,28	0,002
TC0400000718.mm.2	Orm1	orosomucoid 1	-8,21	0,040
TC0300000821.mm.2	Sprr2a2; Sprr2a1	small proline-rich protein 2A2; small proline-rich protein 2A1	-7,27	0,004
TC0500003431.mm.2	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	-6,66	0,013
TC0600000573.mm.2	1600015110Rik	RIKEN cDNA 1600015110 gene	-6,62	0,014
TC0700000774.mm.2	Klk9	kallikrein related-peptidase 9	-6,13	0,000
TC1900001612.mm.2	Cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	-6,08	0,024
TC0700000776.mm.2	Klk7	kallikrein related-peptidase 7	-5,87	0,008
TC0300002559.mm.2	Hsd3b3	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 3	-5,41	0,012
TC0300000826.mm.2	Sprr2f	small proline-rich protein 2F	-5,36	0,048
TC0800000331.mm.2	Star	steroidogenic acute regulatory protein	-5,28	0,021
TC0300000825.mm.2	Sprr2e	small proline-rich protein 2E	-5,17	0,041
TC1900000161.mm.2	Lrrn4cl	LRRN4 C-terminal like	-4,84	0,012
TC1100000039.mm.2	Gatsl3	GATS protein-like 3	-4,51	0,006
TC1300000367.mm.2	Serpib9d	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9d	-4,48	0,011
Hochreguliert				
TC0800002972.mm.2	Adamts18	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type)	5,28	0,002
TC1100002608.mm.2	Dppa1	developmental pluripotency associated 1	4,26	0,015
TC1700000060.mm.2	Dynlt1b	dynein light chain Tctex-type 1B	3,66	0,001
TC1400000453.mm.2	Gm8113	predicted gene 8113	3,6	0,007
TC1700001381.mm.2	Dynlt1a	dynein light chain Tctex-type 1A	3,21	0,001
TC0300000043.mm.2	Stmn2	stathmin-like 2	3,02	0,017
TC1700000061.mm.2	Dynlt1c/1f	dynein light chain Tctex-type 1C/1f	3	0,001
TC1700001388.mm.2	Dynlt1f	dynein light chain Tctex-type 1F	2,87	0,001
TC0700003714.mm.2	Prss23	protease, serine 23	2,7	0,011
TC0500001976.mm.2	4930572O03Rik	spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein pg	2,64	0,024
TC0900002397.mm.2	Rec114	REC114 meiotic recombination protein	2,61	0,012
TC0300000979.mm.2	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	2,58	0,049
TC0300001846.mm.2	Qrfpr	pyroglutamylated RFamide peptide receptor	2,53	0,002
TC1000002639.mm.2	Parpbp	PARP1 binding protein	2,47	0,041
TC1100002170.mm.2	H2afv	H2A histone family, member V	2,45	0,025
TC1300001006.mm.2	Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	2,42	0,020
TC0500001572.mm.2	Abhd11	abhydrolase domain containing 11	2,42	0,024
TC0500000110.mm.2	Speer4d	spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 4D	2,39	0,035
TC0100002381.mm.2	Clk1	CDC-like kinase 1	2,35	0,002
TC1100001395.mm.2	Tmem100	transmembrane protein 100	2,29	0,028

Eine Auflistung zusätzlicher und für die Reproduktion relevanter regulierter Transkripte in der Dezidua der Cldn3KO-Maus findet sich in Tab. 12. Ein hier aufgeführter Vertreter der Prolaktin-Familie wurde auch bereits in Tab. 11 als am stärksten herunterreguliertes Gen gezeigt. Insgesamt waren in der Dezidua der Cldn3KO-Maus 14 Prolaktin-Subtypen signifikant herunterreguliert. Eine weitere Gruppe von Proteinen, die eine Regulation in der Cldn3KO-Maus zeigten, sind die Schwangerschaft-spezifischen Glykoproteine (pregnancy specific glycoproteins). Insgesamt zeigten sich vier Vertreter dieser Proteinfamilie herunterreguliert. Auch zeigte sich eine Regulation von diversen plazentalen Faktoren, Reproductive Homeobox-Genen und Adhäsionsmolekülen.

Tab. 12: Auflistung einer Auswahl an regulierten Genen in der Dezidua der Cldn3KO-Maus.

ID	Gen	Beschreibung	fold change	p-Wert
Prolaktin				
TC130000304.mm.2	Prl2a1	prolactin family 2, subfamily a, member 1	-4,05	0,024
TC130000305.mm.2	Prl2c1	prolactin family 2, subfamily c, member 1	-2,26	0,044
TC1300001453.mm.2	Prl2c2	prolactin family 2, subfamily c, member 2	-2,47	0,035
TC1300001452.mm.2	Prl2c3/4	prolactin family 2, subfamily c, member 3/4	-2,25	0,043
TC1300000082.mm.2	Prl2c5	prolactin family 2, subfamily c, member 5	-3,76	0,029
TC1300000294.mm.2	Prl3d2	prolactin family 3, subfamily d, member 1	-3,33	0,036
TC1300000293.mm.2	Prl3d1	prolactin family 3, subfamily d, member 1	-2,52	0,026
TC1300000295.mm.2	Prl3d3	prolactin family 3, subfamily d, member 3	-3,11	0,033
TC1300000309.mm.2	Prl5a1	prolactin family 5, subfamily a, member 1	-3,26	0,003
TC1300000301.mm.2	Prl6a1	prolactin family 6, subfamily a, member 1	-2,87	0,003
TC1300001694.mm.2	Prl7b1	prolactin family 7, subfamily b, member 1	-18,12	0,005
TC1300001699.mm.2	Prl7c1	prolactin family 7, subfamily c, member 1	-3,33	0,006
TC1300001698.mm.2	Prl7d1	prolactin family 7, subfamily d, member 1	-10,73	0,006
TC1300001693.mm.2	Prl8a1	prolactin family 8, subfamily a, member 1	-3,18	0,038
Pregnancy specific glycoprotein				
TC0700002449.mm.2	Psg18	pregnancy specific glycoprotein 18	-2,05	0,049
TC0700002460.mm.2	Psg19	pregnancy specific glycoprotein 19	-2,42	0,005
TC0700000270.mm.2	Psg22	pregnancy-specific glycoprotein 22	-3,85	0,011
TC0700000252.mm.2	Psg29	pregnancy-specific glycoprotein 29	-3,57	0,011
Plazentale Faktoren				
TC0900000598.mm.2	Plet1	placenta expressed transcript 1	-2,7	0,030
TC1200002089.mm.2	Pgf	placental growth factor	-3,57	0,004
TC0X00002235.mm.2	Plac1	placental specific protein 1	-3,18	0,012
Reproductive homeobox				
TC0X00000354.mm.2	Rhox5	reproductive homeobox 5	-2,25	0,033
TC0X00000355.mm.2	Rhox6	reproductive homeobox 6	-3,87	0,008
TC0X00002075.mm.2	Rhox9	reproductive homeobox 9	-2,18	0,043
Adhäsionsmoleküle				
TC1300000442.mm.2	Dsp	desmoplakin	-2,93	0,008
TC0800001253.mm.2	Cdh3	cadherin 3	-2,07	0,009
TC0400003567.mm.2	Gjb4	gap junction protein, beta 4	-2,14	0,015
TC0700000233.mm.2	Ceacam9	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 9	-10,89	0,005
TC0700002435.mm.2	Ceacam15	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 15	-3,02	0,007

Da in dieser Arbeit auch Claudine, die möglicherweise kompensatorisch für den Verlust des Cldn3 wirken, untersucht wurden, wurden die in dem Array analysierten Claudine mit ihrem jeweiligen fold change und p-Wert separat in Tab. 13 aufgelistet. Die meisten Claudine zeigten einen fold change, der nahe an 1 liegt, was eine geringe Regulation bedeutet, die ohne Signifikanz zu vernachlässigen ist, und erfüllten somit nicht die oben festgelegten Parameter. Eine Ausnahme bildet das Cldn3, das eine mehr als 30-fache Herunterregulierung des Transkripts zeigt, was den Knockout des Cldn3 bestätigt. In unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor mittels qPCR eine signifikante Hochregulation von Cldn4 und Cld10 in der Dezidua an Tag 6,5 und 8,5 pc gezeigt werden (Xin Xin Wu, unveröffentlichte Daten). In dieser Transkriptomanalyse konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden.

Tab. 13: Auflistung der in dem Transkriptom-Assay enthaltenen und untersuchten Claudine.

ID	Gen	Beschreibung	fold change	p-Wert
TC1600001419.mm.2	Cldn1	claudin 1	1,00	0,376
TC0X00001374.mm.2	Cldn2	claudin 2	-1,2	0,127
TC0500001570.mm.2	Cldn3	claudin 3	-30,05	0,076
TC0500003384.mm.2	Cldn4	claudin 4	-1,90	0,119
TC1600000249.mm.2	Cldn5	claudin 5	1,02	0,971
TC1700000316.mm.2	Cldn6	claudin 6	-1,08	0,830
TC1100000932.mm.2	Cldn7	claudin 7	-1,10	0,808
TC1600002005.mm.2	Cldn8	claudin 8	1,12	0,071
TC1700001599.mm.2	Cldn9	claudin 9	1,13	0,316
TC1400001288.mm.2	Cldn10	claudin 10	-1,87	0,178
TC0300000211.mm.2	Cldn11	claudin 11	-1,02	0,815
TC0500001909.mm.2	Cldn12	claudin 12	-1,07	0,128
TC0500003382.mm.2	Cldn13	claudin 13	1,22	0,219
TC1600002110.mm.2	Cldn14	claudin 14	-1,02	0,696
TC0500001614.mm.2	Cldn15	claudin 15	-1,05	0,526
TC1600000374.mm.2	Cldn16	claudin 16	-1,04	0,947
TC1600002004.mm.2	Cldn17	claudin 17	-1,01	0,923
TC0900002923.mm.2	Cldn18	claudin 18	-1,14	0,143
TC0400001330.mm.2	Cldn19	claudin 19	-1,06	0,598
TC1700000014.mm.2	Cldn20	claudin 20	-1,06	0,701
TC0800000561.mm.2	Cldn22	claudin 22	-1,18	0,270
TC0800002056.mm.2	Cldn23	claudin 23	1,05	0,772
TC0800000560.mm.2	Cldn24	claudin 24	-1,04	0,528

4.3 Untersuchungen zur Rolle von Cldn10 in einem Endometrium-spezifischen KO-Mausmodell

Es konnte zuvor bereits gezeigt werden, dass neben dem bisher untersuchten Cldn3 auch das Cldn10-Protein zum Zeitpunkt der beginnenden Implantation bereits ab Tag 4,5 pc spezifisch in den murinen Deziduaellen induziert wird. Im weiteren Verlauf der frühen Schwangerschaft bis hin zu Tag 8,5 pc dehnt sich diese Expression in der Dezidua aus (Schumann et al., 2015). Diese Befunde lassen vermuten, dass Cldn10 ein wichtiger Faktor der Zellkommunikation und Barrierebildung im Endometrium und ein wichtiger Teil der Zusammensetzung der Tight junctions ist, die zur Etablierung einer erfolgreichen Schwangerschaft nötig sind.

4.3.1 Expression von Cldn10 im zyklischen Endometrium

Als Basis für die folgenden Untersuchungen wurde im ersten Schritt die Verteilung von Cldn10 im zyklischen Endometrium von WT-Mäusen untersucht (Abb. 24). Interessanterweise zeigten die Zellen des luminalen Epithels des Endometriums nur im Diöstrus eine positive Immunreaktivität gegen Cldn10, die in einer starken apikalen Konzentration zu beobachten war (Abb. 24 c). In allen anderen Phasen des Zyklus war Cldn10 im luminalen Epithel nicht exprimiert (Abb. 24 a,b,d). Im glandulären Epithel konnte Cldn10 in der Fluoreszenzfärbung in allen Östrusphasen detektiert werden. Dabei war dieses Protein in den Drüsenepithelzellen apikal deutlich stärker konzentriert als in der basolateralen Lokalisation (Abb. 24 e-h).

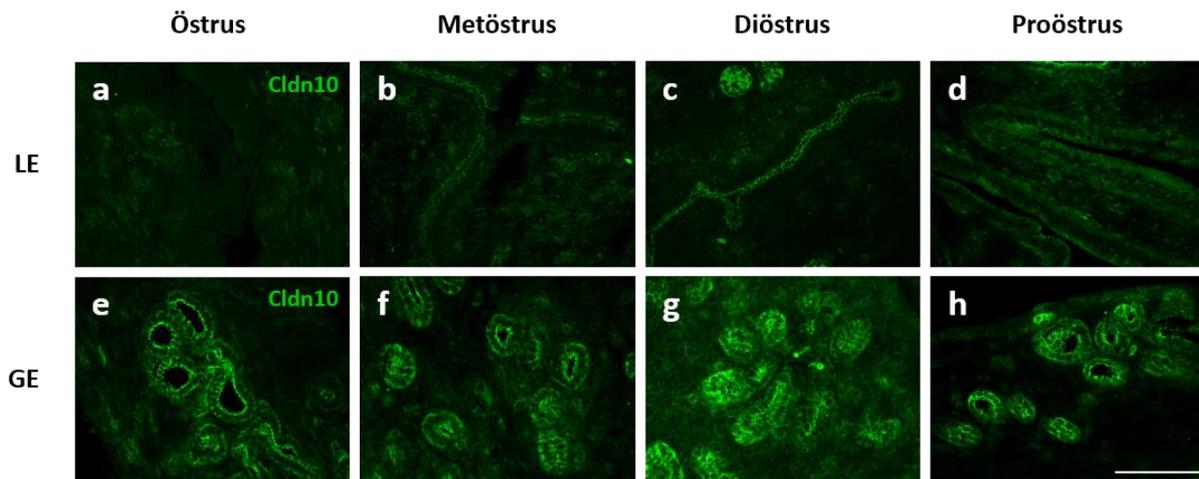


Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn10 an Endometriumgewebe von Wildtyp Mäusen in unterschiedlichen Phasen des Östruszyklus. Die Zyklusphasen wurden mittels Vaginalabstrich bestimmt. Dargestellt sind jeweils Anschnitte des luminalen (LE, a-d) und des glandulären (GE, e-h) Epithels des Uterus. Cldn10 ist im glandulären Epithel in allen Östrusphasen exprimiert, im luminalen Epithel ist lediglich im Diöstrus eine schwaches Fluoreszenzsignal mit Konzentration am apikalen Zellpol zu erkennen. Maßstab 100 µm.

4.3.2 Erzeugung des Knockouts durch Einkreuzung des Cre-Gens in die gefloxt Cldn10-Mauslinie

Eine generelle Cldn10KO-Maus, bei der das Protein im gesamten Organismus ausgeknockt ist, steht für Untersuchungen nicht zur Verfügung, da die Tiere kurz nach der Geburt versterben (Seker et al., 2019). Um daher die Rolle dieses Claudins während der Schwangerschaft näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Cre-lox-Systems ein Mausmodell mit einem konditionalen Endometrium-spezifischen Knockout des Cldn10 hergestellt. Dabei wurden „gefloxt“ Mäuse (Cldn10flox-Maus, Cldn10^{fl/fl}), bei denen das Cldn10-Gen von loxP-sites flankiert wird (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Müller, Klinik für Pädiatrie m. S. Nephrologie, Charité Berlin) mit einer Mauslinie gekreuzt, bei der das Gen für die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Progesteronrezeptor-Promotors (PR-Cre Maus, PR^{Cre/+}) steht (zur Verfügung gestellt von Prof. DeMayo, Department Molecular and Cellular Biology, Michigan State University). Der PR wird im Endometrium neben den Epithelzellen auch in den endometrialen Stromazellen exprimiert (Mote et al., 2006), die später zu den Deziduazellen ausdifferenzieren. Somit sollte während der Bildung der Dezidua die Cre-Rekombinase aktiviert werden, die das Gen für das Cldn10-Protein folgend an den loxP-sites ausschneidet, so dass dieses nicht exprimiert wird. Zunächst wurde eine PCR zur Genotypisierung der gefloxt und der Cre-Mäuse etabliert. Dafür wurde die genomische DNA der Tiere aus Ohrstanzen gewonnen, isoliert und mittels PCR vervielfältigt.

In Abb. 25 ist beispielhaft eine Genotypisierung der Tiere gezeigt. Bei den verwendeten Primern ist für den geflochten Genotypen in der Gelelektrophorese eine Bande in der Größe von 443 bp zu erwarten, für die wildtypische Allelvariante eine Bande in der Größe von 254 bp. Bei der PCR zur Detektion des Cre-Gens ist für das Cre-Allel eine Bande bei 598 bp und hier für die WT-Variante eine Bande in Höhe von 287 bp. Alle detektierten Banden entsprachen der erwarteten Größe. Hierbei war zu sehen, dass alle möglichen Genotypen, die bei der Verpaarung der Mäuse entstehen können, mittels dieser PCR zu erkennen waren.

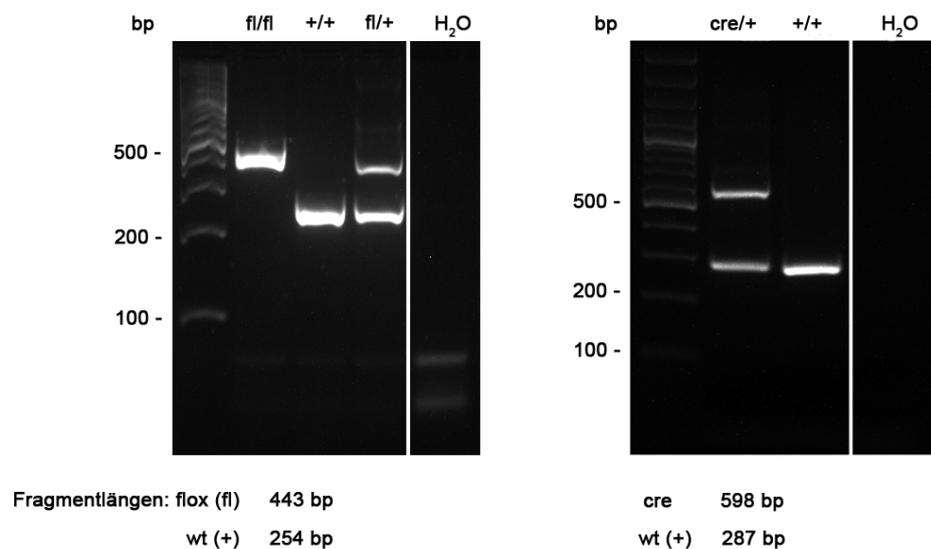


Abb. 25: Etablierung der Genotypisierung hinsichtlich des „flox“- und Cre-Gens. Dargestellt ist die Gelelektrophorese der Etablierungs-PCR zur Feststellung der Genotypen der Mäuse. Die genomische DNA wurde aus Gewebe aus Ohrstanzen isoliert und mittels spezifischer Primer amplifiziert. Gezeigt sind die Banden bei Ausprägung der verschiedenen möglichen Genotypen. Dabei repräsentiert fl das geflochte Allel, cre das Allel für die Cre-Rekombinase und + das wildtypische Allel.

Die Genotypen der Tiere, die zur Etablierung dieses Modells verwendet wurden, und die möglichen Genotypen der Nachkommen sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Ziel der Zucht war es, Mäuse zu generieren, die homozygot das Allel für die loxP-site aufwiesen (fl/fl) und heterozygot das Gen für die Cre-Rekombinase (cre/+). Die weiblichen Tiere dieses Genotyps sollten dann den gewünschten endometrialen Knockout des Cldn10 aufweisen ($Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$). Als Ausgangstiere der F₁-Generation wurden männliche geflochte Mäuse ($Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$) und weibliche Cre-Mäuse ($Cldn10^{+/+}PR^{Cre/+}$) verwendet. Somit waren alle Mäuse der F₂-Generation heterozygot geflocht und wiesen mit einer theoretischen Wahrscheinlichkeit von 50 % das Cre-Gen auf ($Cldn10^{fl/+}PR^{Cre/+}$). Diese Mäuse wurden dann zur Weiterzucht der F₃-Generation verwendet. Aus dieser Generation wurden anschließend männliche

Mäuse mit dem Genotypen $Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$ und weibliche Mäuse mit dem Genotypen $Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$ verpaart, wobei deren weibliche Nachkommen den Endometrium-spezifischen Knockout von $Cldn10$ aufweisen konnten ($Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$). Ein entsprechendes Kreuzungsschema ist in Abb. 26 dargestellt.

Zuchttiere			
	♂		♀
F_1	$Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$	X	$Cldn10^{+/+}PR^{Cre/+}$
F_2	$Cldn10^{fl/+}PR^{Cre/+}$	X	$Cldn10^{fl/+}PR^{Cre/+}$
F_3	$Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$	X	$Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$

➔ mögliche Genotypen der F_3 -Generation
 $Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$ oder $Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$

Abb. 26: Kreuzungsschema zur Generierung einer Endometrium-spezifischen $Cldn10$ KO-Maus ($Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$). Angegeben sind jeweils die Ausgangsgenotypen der Generationen, die zur Weiterzucht genutzt wurden. Bei der Verpaarung der Mäuse aus der F_3 -Generation mit den angegebenen Genotypen entstehen weibliche Mäuse, die einen Knockout von $Cldn10$ im Endometrium aufweisen (rotes Kästchen).

Bei der Kreuzung der F_3 -Generation, die zur Erzeugung der $Cldn10$ KO-Tiere führt, können die Tiere zwei verschiedene Genotypen aufweisen, $Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$ oder $Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$, d.h. dass sie homozygot gefloxt sind und entweder das Cre-Gen besitzen oder nicht (s. Abb. 26). Im Folgenden soll die Genotypverteilung innerhalb der beiden Geschlechter dieser Mäuse genauer untersucht werden.

Abb. 27 zeigt die Verteilung der beiden in der F_3 -Generation resultierenden Genotypen unabhängig des Geschlechts der Nachkommen (Abb. 27 a) und nach Geschlecht getrennt (Abb. 27 b, c). Den klassischen Regeln der Genetik zufolge sollten sich die Genotypen gleich durchsetzen, also ein Verhältnis von 50:50 für den $Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$ und den $Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$ Genotypen ergeben. Berücksichtigt man das Geschlecht der Tiere nicht, zeigte sich eine Verteilung, die dem in etwa entspricht. 46,43 % der Tiere weisen den $Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}$ Genotypen auf, wohingegen 53,57 % der Tiere das Allel für die Cre-Rekombinase nicht besaßen ($Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}$) (Abb. 27 a). Betrachtet man die Verteilung der Genotypen allerdings innerhalb eines Geschlechts, so war bei den männlichen Tieren eine Verteilung zu beobachten, die zugunsten des Cre-Allels ausfiel (Abb. 27 c), während bei den weiblichen Tieren das Allel für die Cre-Rekombinase weniger häufig auftrat. Hier wiesen nur 36,67 % der Tiere das Cre-Gen auf, 63,33 % der Tiere hingegen nicht (Abb. 27 b). Das Geschlechterverhältnis der Tiere dieser

Generation betrug 53,67 % weiblicher Tiere zu 46,43 % männlicher Tiere und liegt somit insgesamt im Rahmen der zu erwartenden biologischen Verteilung (Abb. 27 d).

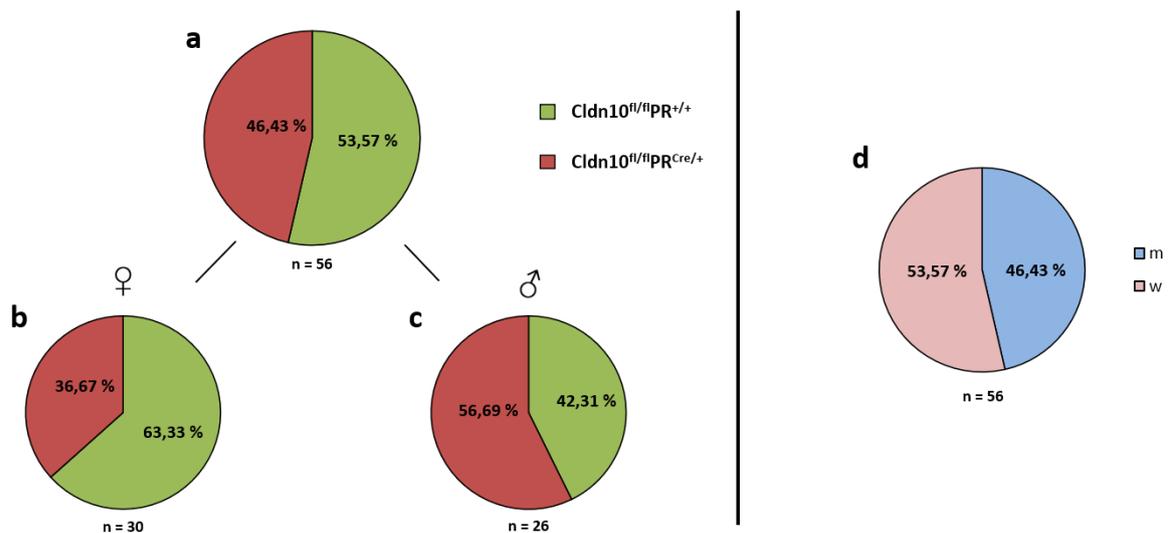


Abb. 27: Verteilung der Genotypen bei der Zucht der Cldn10KO-Mäuse und Geschlechterverteilung in der F₃-Generation. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der beiden möglichen Genotypen ungeachtet des Geschlechts des Tieres (a) und nach Geschlecht getrennt (b, c). (d) Generelle Verteilung des Geschlechts ungeachtet beider möglicher Genotypen. Die Tiere gingen aus Verpaarungen der F₃-Generation nach dem Schema in Abb. 26 hervor.

4.3.3 Nachweis des Endometrium-spezifischen Knockouts

Um den Knockout des Proteins im Endometrium zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei wurde gleichermaßen Uterusgewebe von WT- und KO-Mäusen für Cldn10 gefärbt. In den Uteri der WT-Mäuse zeigte sich die typische, zyklusabhängig hier etwas schwache Färbung des luminalen Epithels (Abb. 28 a) und eine deutlichere Färbung des glandulären Epithels (Abb. 28 b). Hier ist deutlich das apikale Schlussleistennetz zu erkennen, in dem das Cldn10 in den Epithelzellen lokalisiert ist. Im Gewebe der Cldn10KO-Mäuse war hingegen weder im luminalen (Abb. 28 c) noch im glandulären Epithel (Abb. 28 b) eine positive Immunreaktion gegen Cldn10 zu erkennen.

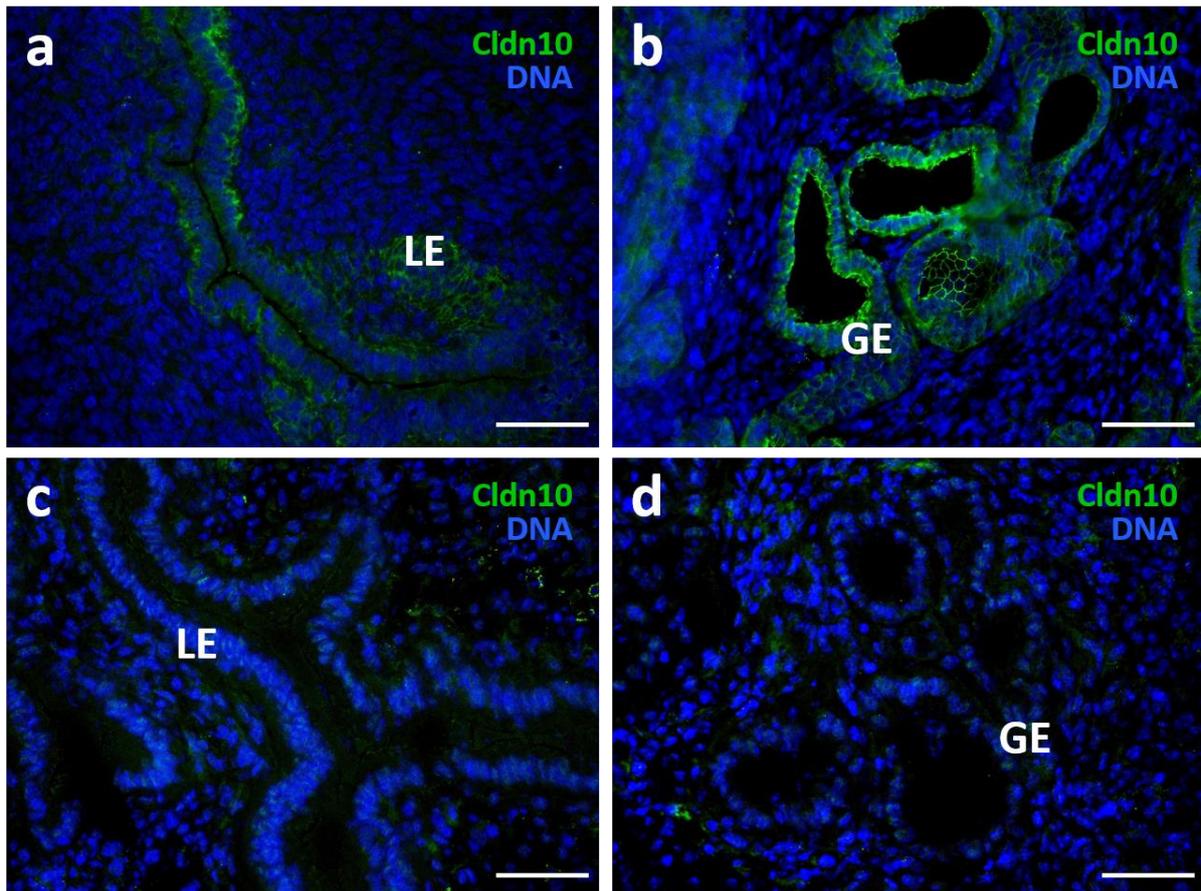


Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn10 an Endometriumgewebe von WT-Mäusen (a-b) und Cldn10KO-Mäusen (c-d). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung für Cldn10 (grün) und eine Überlagerung mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau). Im Endometrium der WT-Maus zeigen sich Fluoreszenzsignale in den Zellen des luminalen (a, LE) und glandulären Epithels (b, GE), während im Endometrium der Cldn10KO-Maus keinerlei Immunreaktion gegen Cldn10 im luminalen (c, LE) und glandulären (d, GE) Epithel detektiert werden kann. Maßstab 50 μ m

Cldn10 wird, wie bereits gezeigt und erwähnt, im nicht graviden Uterus ausschließlich in den Epithelzellen des luminalen und glandulären Epithels exprimiert und beim Prozess der Dezidualisierung in den Deziduazellen induziert (Schumann et al., 2015). Um zu prüfen, ob das Protein tatsächlich auch in der sich entwickelnden Dezidua der Cldn10KO-Mäuse fehlte, wurde hier eine Immunfluoreszenzfärbung für Cldn10 an Gewebe von Implantationsstellen an Tag 6,5 pc von WT- und Cldn10KO-Tieren angefertigt. In Abb. 29 a und c ist das zu erwartende Fluoreszenzsignal von Cldn10 in der sekundären Dezidua auf der antimesometrialen Seite der Implantationsstelle zu erkennen. Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität der Epithelzellen der peripheren Drüsen in der WT-Maus. In dem Gewebe der Implantationsstelle der Cldn10KO-Maus war keine Färbung und Lokalisation von Cldn10 in der sekundären Dezidua und im glandulären Epithel zu erkennen (Abb. 29 b, d). Somit konnte der Knockout von Cldn10 in der Dezidua der Cldn10KO-Mäuse nachgewiesen werden.

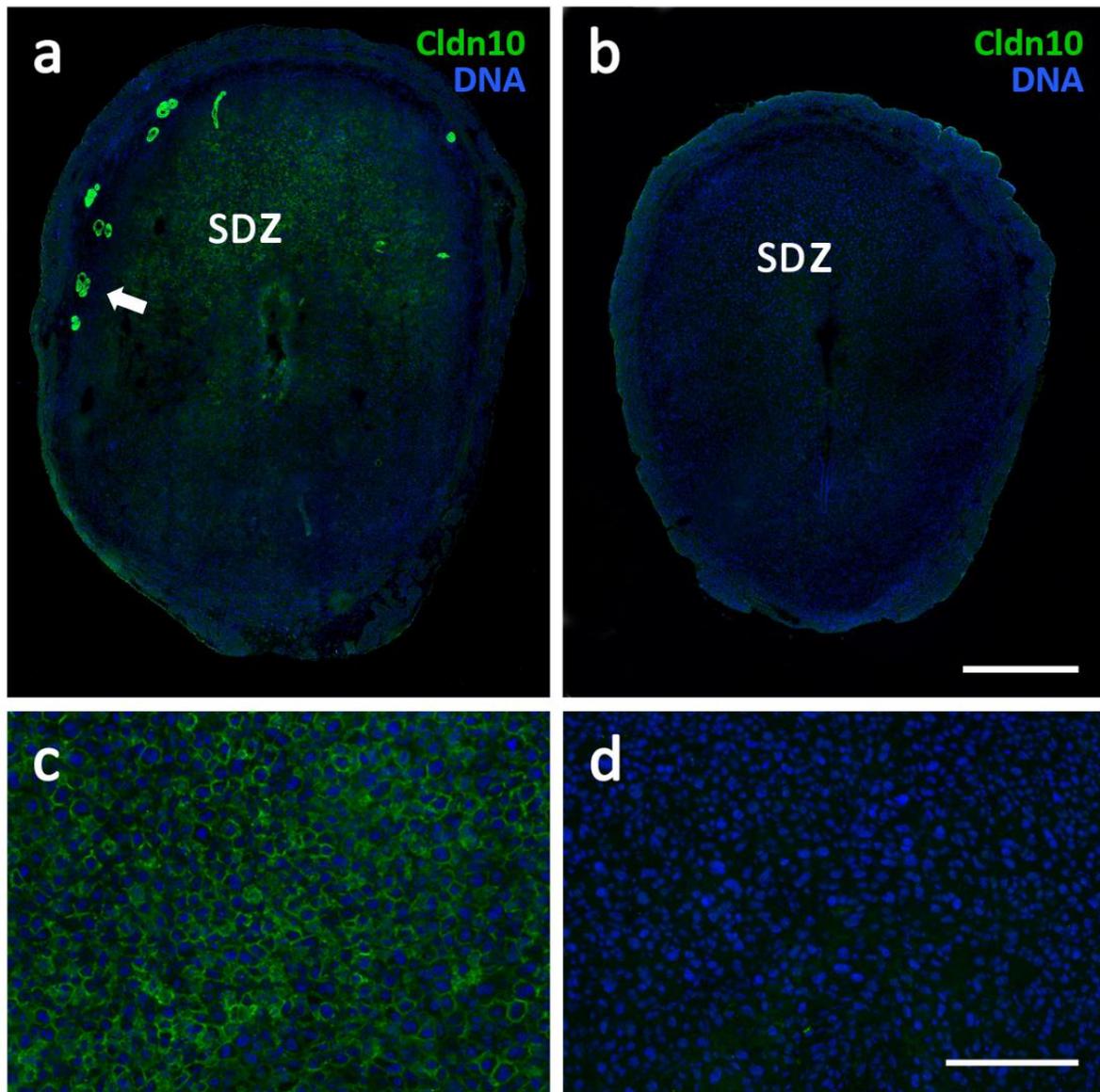


Abb. 29: Immunfluoreszenzfärbung für Cldn10 an Gewebe von Implantationsstellen an Tag 6,5 pc von WT- (a, c) und Cldn10KO-Mäusen (b, d). Dargestellt sind jeweils eine Übersicht der ganzen Implantationsstelle (a, b) und ein Vergrößerungsausschnitt der sekundären Dezidua (SDZ, c, d) mit einer Fluoreszenzfärbung für Cldn10 (grün) und einer Kernfärbung (DAPI, blau). In der Implantationsstelle der WT-Maus ist ein deutliches Fluoreszenzsignal für Cldn10 in der sekundären Dezidua und im glandulären Epithel (Pfeil) zu erkennen (a, c). In der Implantationsstelle der Cldn10KO-Maus fehlt jegliches Fluoreszenzsignal für Cldn10 (b, d). Maßstab (a, b) 500 μm und (c, d) 200 μm .

Zur Kontrolle der Spezifität des Knockouts und dessen Limitierung auf das Endometrium wurde ebenfalls Kolongewebe von WT- und KO-Mäusen gegen Cldn10 gefärbt. Cldn10 bildet ebenfalls ein Schlussleistennetz in den Epithelzellen des Kolons, was bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Holmes et al., 2006; Schumann, 2015). Daher diente das Kolongewebe auch in dieser Arbeit als Positiv-Kontrolle zur Überprüfung der Spezifität des Knockouts von Cldn10.

In den Enterozyten beider Mausstämmen war eine deutliche positive Immunreaktivität gegen Cldn10 im Schlussleistennetz zu erkennen (Abb. 30). Somit konnte gezeigt werden, dass sich der Knockout von Cldn10 in dem Cldn10KO-Mausstamm auf das Endometrium, bzw. Gewebe und Zellen beschränkt, in der Progesteronrezeptor und Cldn10 ko-lokalisiert waren.

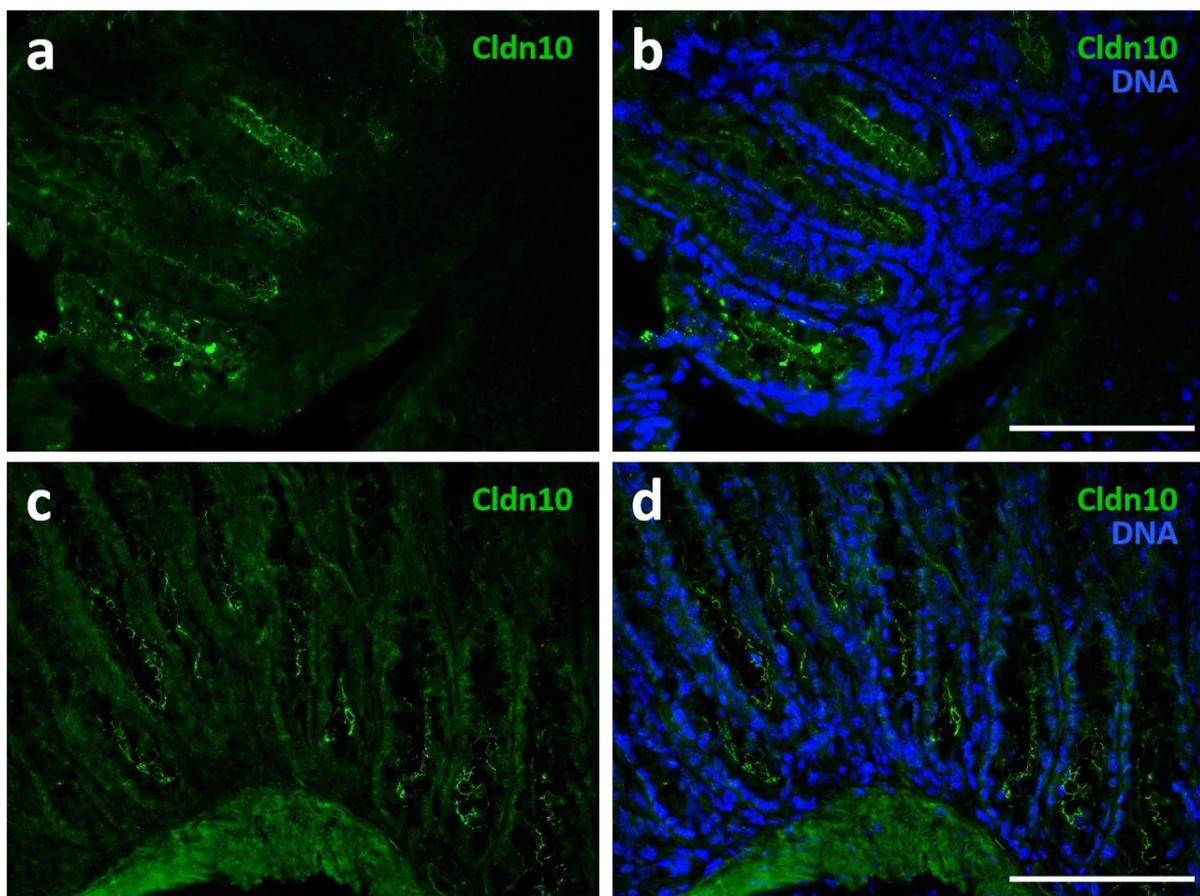


Abb. 30: Immunfluoreszenzfärbungen für Cldn10 an Kolongewebe von WT-Mäusen (a-b) und Cldn10KO-Mäusen (c-d). Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung für Cldn10 (grün, a und c) und eine Überlagerung mit einer DNA-Färbung (DAPI, blau, b). Es zeigten sich sowohl im Kolongewebe der WT-Maus (a, b), als auch der Cldn10KO-Maus (c, d) ein deutliches Fluoreszenzsignal von Cldn10 in den Enterozyten des Darmepithels. Maßstab 100 µm.

4.3.4 Reproduktionseffizienz der Cldn10KO-Mäuse

Um einen Einblick in die reproduktive Effizienz der Cldn10KO-Weibchen zu erhalten, wurden diese zunächst verpaart und überprüft, ob diese Weibchen lebende Nachkommen hervorbrachten. Dabei wurden die Tiere mit homozygot geflochten Männchen (Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}), die das Cre-Allel nicht besaßen, terminiert verpaart. Abb. 31 zeigt die Wurfgrößen der Würfe, die aus dieser Verpaarung resultieren. Gleichzeitig sind mehrere Kontrollen aufgeführt: Zum einen reine WT-Kontrollen (Cldn10^{+/+}PR^{+/+}), zum anderen reine flox-Kontrollen, bei denen die männlichen und weiblichen Tiere homozygot geflocht waren, aber nicht das Cre-Allel besaßen (Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+}). Die Wurfgröße der WT-Tiere betrug $6,10 \pm 2,90$ und die der flox-Mäuse $4,68 \pm 2,56$ Tiere pro Wurf. Ebenfalls sind die Wurfgrößen resultierend aus den Verpaarungen zur Zucht der Cldn10KO-Mäuse aufgeführt (s Abb. 26). In diesen Verpaarungen wurden, wie bereits beschrieben, Tiere verwendet, bei denen das Männchen den Genotypen Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+} und das Weibchen den Genotypen Cldn10^{fl/fl}PR^{+/+} (im Folgenden flox/PR-Cre genannt) aufwies. Die Wurfgröße dieser Tiere betrug $3,81 \pm 2,43$ Mäuse pro Wurf. Von den Weibchen, die den konditionalen Knockout von Cldn10 aufwiesen (Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}, von hier an vereinfacht nur noch Cldn10KO-Mäuse genannt), brachte kein Tier lebende Nachkommen hervor. Dabei wurden 17 terminierte Verpaarungen durchgeführt und täglich das Befinden der Tiere kontrolliert sowie ab Tag 18,5 pc eine Wurfkontrolle durchgeführt. Dies diente dazu sicherzustellen, dass die Muttertiere tatsächlich keine Nachkommen gebarten, und diese nicht potenziell auffraßen oder die Nachkommen totgeboren wurden.

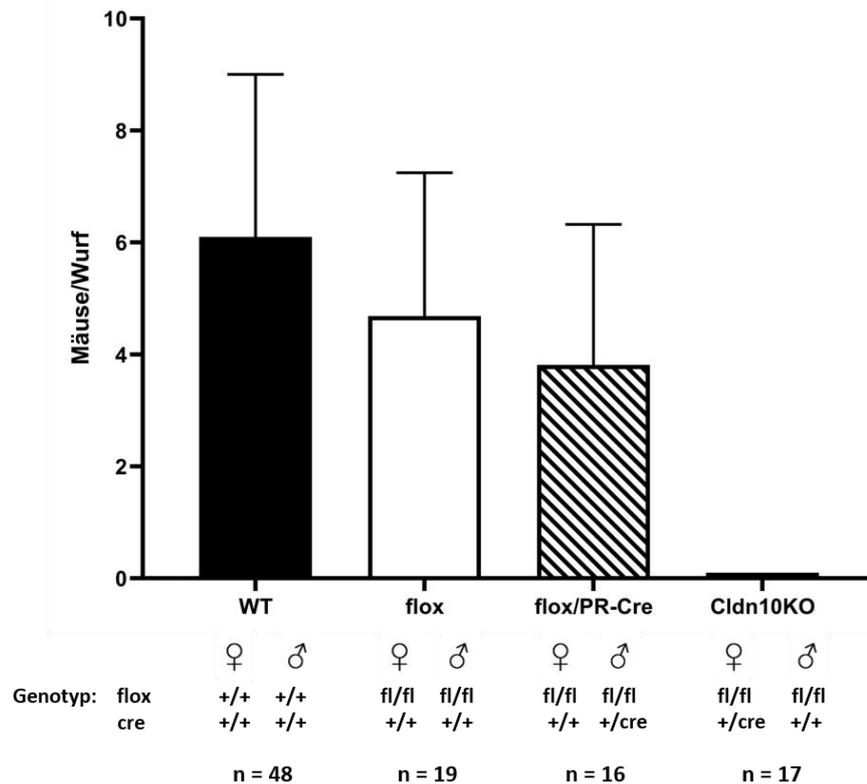


Abb. 31: Wurfgrößen der Cldn10KO-Mäuse und entsprechender Kontrollen. Dargestellt sind die Wurfgrößen in Mäuse pro Wurf der Cldn10KO-Tiere und WT-, flox- und flox/PR-Cre-Kontrollen. Angegeben sind die Genotypen der Eltern-Tiere, deren Würfe für die Berechnungen verwendet wurden. Während die Würfe der Kontrolltiere und der Zuchttiere zur Erzeugung der Cldn3KO-Mäuse keinen signifikanten Unterschied aufwiesen, gingen aus Verpaarungen der Cldn10KO-Weibchen keine lebenden Nachkommen hervor. WT, flox, flox/PR-Cre: n = beobachtete Würfe; Cldn10KO: n = Verpaarungen nach positivem Plugcheck.

Da die Cldn10KO-Weibchen keine lebenden Nachkommen hervorbrachten, wurde nun in einem nächsten Schritt systematisch überprüft, ob es zu einer Bildung und Implantation der Blastozyste kommt und mögliche Embryonen intrauterin absterben. Hierzu wurden die Cldn10KO-Weibchen terminiert mit flox-Männchen verpaart, zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft getötet und die Uteri entnommen. In der folgenden Abbildung (Abb. 32) sind die Uteri der Cldn10KO-Weibchen und als Referenz die Uteri von WT-Weibchen zu den Zeitpunkten 5,5 dpc bis 8,5 dpc abgebildet. Zum Zeitpunkt 5,5 dpc waren in WT-Mäusen bereits die Implantationsstellen als Verdickungen des Uterus deutlich zu sehen. Auch in den Uteri der Cldn10KO-Mäuse waren bereits Verdickungen zu sehen, allerdings waren diese nicht so ausgeprägt und weniger dick als die der WT-Mäuse. Auch an Tag 6,5 pc waren die Implantationsstellen der Cldn10KO-Mäuse nicht so deutlich ausgeprägt wie die der Kontrolltiere. An Tag 7,5 pc zeigte sich unter den Cldn10KO-Mäusen eine deutliche Divergenz in der Ausprägung der Implantationsstellen. Es wurden ausgeprägte Implantationsstellen beobachtet, die in der Größe den Implantationsstellen der WT-

Mäuse ähnelten, aber auch nur sehr kleine, die in ihrer Entwicklung zurückgeblieben schienen. An Tag 8,5 pc waren die Implantationsstellen in den WT-Mäusen deutlich voneinander abgegrenzt und auch die Durchblutung war gut zu erkennen. Hingegen waren die Implantationskammern der Cldn10KO-Mäuse auch zu diesem Zeitpunkt kleiner, auch die Durchblutung wirkte schwächer. Auch waren leichte Verdickungen in den Uteri neben den besser entwickelten Implantationsstellen zu sehen, die auf degenerierte Embryonen hindeuteten.

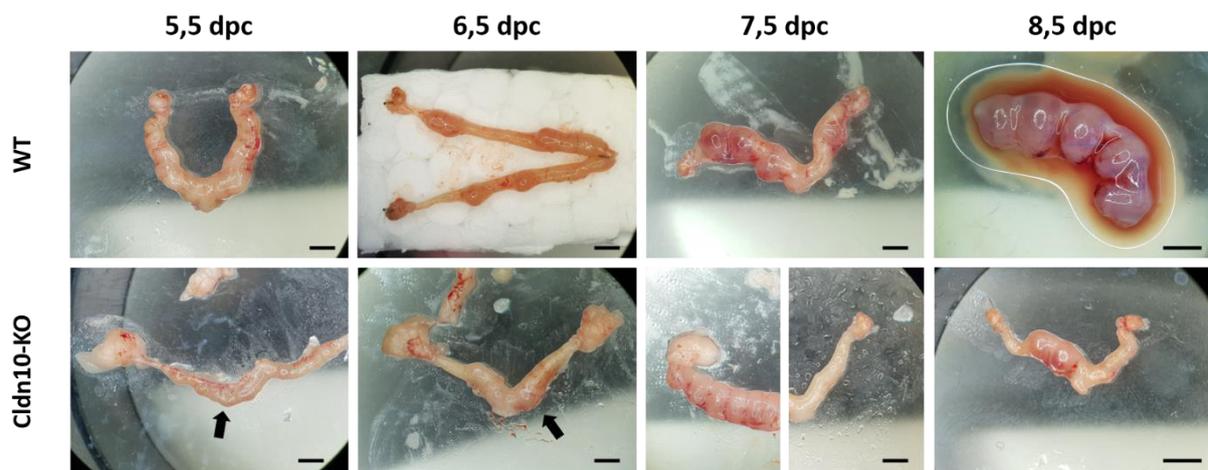


Abb. 32: Uteri der Cldn10KO-Mäuse und WT-Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten der frühen Schwangerschaft von 5,5 dpc bis 8,5 dpc. Die Tiere wurden terminiert verpaart und die Uteri zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommen. Pfeile markieren die Implantationsstellen. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen, bei denen an Tag 5,5 pc die Implantationsstellen als Verdickungen im Uterus zu erkennen sind und sich bis Tag 8,5 pc deutliche, perlenschnurartige gut durchblutete Implantationskammern entwickeln, sind die Implantationsstellen bei den Cldn10KO-Tieren an Tag 5,5 und 6,5 pc nur als minimale Verdickungen im Uterus zu erkennen, an Tag 7,5 und 8,5 pc sind deutlichere Verdickungen zu sehen, die aber makroskopisch deutlich kleiner und weniger durchblutet sind als die der WT-Kontrollen. Pro Stadium wurden mindestens n=3 Tiere untersucht. Maßstab 5 mm.

Sichtbare Implantationsstellen wiesen somit auf das Vorhandensein einer Schwangerschaft hin. Im Vergleich der Anzahl schwangerer Mäuse nach terminierter Verpaarung bei beiden Mausstämmen zeigte sich bei den Cldn10KO-Mäusen eine vergleichbare Schwangerschaftsrate wie bei den WT-Kontrolltieren (Abb. 33). Von den WT-Mäusen waren etwa 70 % der Tiere schwanger, von den Cldn10KO-Tieren etwa 77 %. Somit konnte hier gezeigt werden, dass das Fehlen von Würfen (s. Abb. 31) bei den Cldn10KO-Mäusen nicht auf eine fehlende Befruchtung oder Implantation zurückzuführen war, sondern dass es nach der Implantation zu einem Absterben der Embryonen kam.

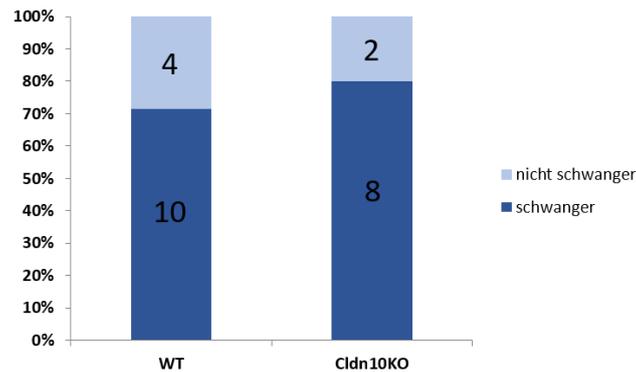


Abb. 33: Schwangerschaftsraten der Cldn10KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Dargestellt sind die Anzahlen der schwangeren bzw. nicht schwangeren Tiere nach positiven Vaginalplug. Die Schwangerschaft wurde durch Präparation der Uteri zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft zwischen 5,5 dpc und 8,5 dpc festgestellt. Waren Implantationsstellen zu sehen, wurde das Tier als schwanger gezählt.

Die bisher beschriebenen Befunde deuten darauf hin, dass die Cldn10KO-Weibchen zwar in gleichem Maße eine Schwangerschaft etablieren wie die Kontrolltiere, die Embryonen allerdings in der frühen Schwangerschaft während oder nach der Implantation intrauterin absterben. Um diesen Vorgang näher zu untersuchen, wurden histologische Präparate der Implantationsstellen der Cldn10KO-Tiere angefertigt und mit den WT-Kontrollen verglichen (Abb. 34). In den Implantationsstellen der WT-Tiere war an Tag 5,5 pc die sich implantierende Blastozyste und die sich bildende primäre Dezidua zu erkennen, die den Embryo umgibt. In den Cldn10KO-Tieren sind ebenfalls die Implantationsstellen und die Deziduareaktion in den den Embryo umgebenden Zellen zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft zeigten die Implantationsstellen der Cldn10KO-Tiere jedoch deutliche Defizite in der Entwicklung sowohl des Embryos als auch der Dezidua. Bereits an Tag 6,5 pc erschien die Dezidua nicht so ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt proliferieren die Deziduazellen stark und bilden ein dichtes Zellgeflecht besonders auf der antimesometrialen Seite, was in den Cldn10KO-Tieren nicht deutlich erkennbar war. Auch der Embryo war deutlich weniger ausgebildet. Die Fruchthöhle war im Vergleich zu den WT-Kontrollen kaum ausgebildet. An Tag 8,5 pc war deutlich zu erkennen, dass sich keine Fruchthöhle ausgebildet hatte und auch kein Embryo mehr vorhanden war. Die Cldn10KO-Mäuse zeigen somit eine beginnende Implantation und Dezidualisierung, die allerdings nicht aufrechterhalten werden konnte. Aufgrund der spezifischen Induktion der Cldn10-Expression in den Deziduazellen zum Zeitpunkt der Embryoimplantation lässt sich vermuten, dass hier eine gestörte Dezidualisierung vorliegt, die möglicherweise eine erfolgreiche Invasion der Trophoblastzellen und Versorgung des Embryos verhindert.

Die genauen Ursachen für diesen Vorgang müssen jedoch in weiterführenden Analysen noch untersucht werden.

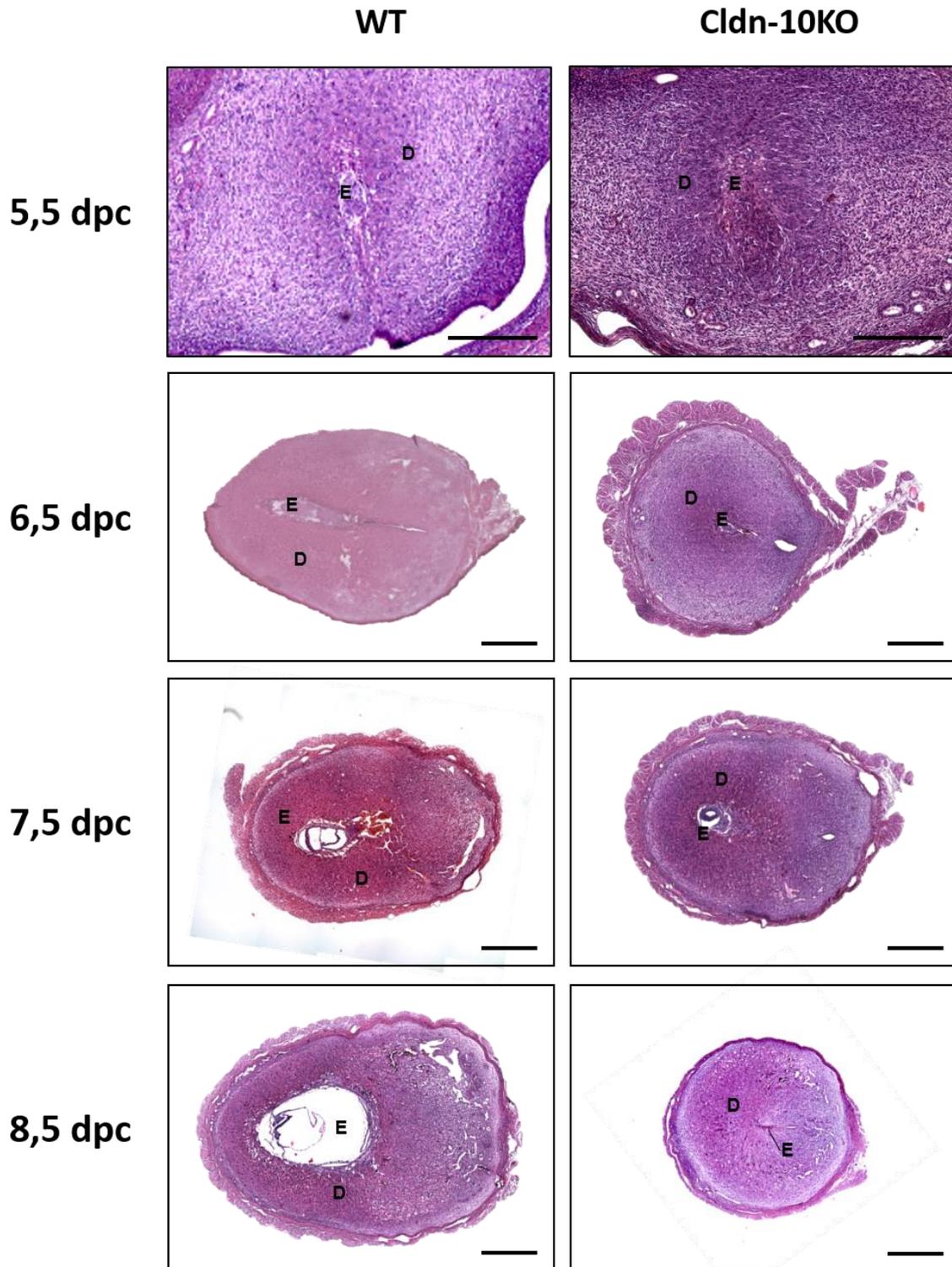


Abb. 34: Histologische Untersuchung der Implantationskammern von Tag 5,5 pc bis 8,5 pc von Cldn10KO- im Vergleich zu WT-Mäusen. Dargestellt sind HE-Färbungen an Paraffinschnitten von Implantationskammern zum Zeitpunkt 5,5-8,5 dpc von WT- (obere Zeile) und Cldn10KO-Mäusen (untere Zeile). In den WT-Mäusen ist die regelgerechte Dezidualisierung der Zellen zu erkennen. Pro Stadium wurden mindestens n=3 Implantationskammern aus verschiedenen Tieren untersucht. E = Embryo, D = Dezidua. Maßstab (5,5dpc) 300 µm, (6,5 bis 8,5 dpc) 1000 µm

5. Diskussion

Die Schwangerschaft stellt eine physiologische Ausnahmesituation dar, die besondere Anforderungen an die beteiligten Gewebe stellt. Zur Etablierung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft ist eine zeitlich präzise regulierte Umstrukturierung des Endometriums notwendig, die es dem Embryo ermöglicht, in das maternale Gewebe einzudringen und seine Versorgung sicherzustellen. Das Endometrium weist im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben und Organen eine hohe Plastizität auf, um diesen Anforderungen gerecht zu werden. Nicht nur vor einer potenziellen Schwangerschaft zeigt es hormonell regulierte zyklische Veränderungen, die seine Rezeptivität bedingen, sondern auch besonders während des Prozesses der Implantation ist die Bildung der Dezidua, die die Trophoblastinvasion reguliert und die Ernährung des frühen Embryos gewährleistet, ein essenzieller Schritt bei der erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft (Gellersen und Brosens, 2014). In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, dass die Bildung von Zellkontakten bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Grund und Grümmner, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde anhand zwei verschiedener Knockout-Mausmodelle die Funktion von zwei Vertretern der Proteinfamilie der Claudine, Cldn3 und Cldn10, die zum TJ-Komplex gehören, während der Implantation und Schwangerschaft untersucht.

5.1 Mausmodelle

Die Maus ist als Modellorganismus zur Untersuchung vielfältiger physiologischer Prozesse und Krankheiten des Menschen in der Wissenschaft nicht wegzudenken. Wie bereits in Kapitel 1.2.4 beschrieben, gibt es eine Reihe von Knockout-Mausmodellen zur Untersuchung der Funktionen von Claudinen und deren jeweiligen Rollen in den Organen. Diese Mauslinien dienen nicht nur zur Aufklärung grundlegender Funktionen der Claudine, sondern werden ebenfalls dazu genutzt, Claudin-assoziierte Krankheiten und Symptome beim Menschen zu modellieren und zu untersuchen (Seker et al., 2019). So sind beispielsweise Claudin-Mutationen für das Neonatale Ichthyose-Sklerosierende-Cholangitis (NISCH)-Syndrom (Hadj-Rabia et al., 2004), „nonsyndromic sensorineural hearing loss“ (K. Lee et al., 2012; Sineni et

al., 2019) und der familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) verantwortlich (Hou et al., 2009). Auch an der Suppression oder Promotion von Tumoren sind Claudine beteiligt (Kage et al., 2019). Mausmodelle helfen hier die genauen Auswirkungen solcher Mutationen oder Gendelektionen zu untersuchen. Dies ist insbesondere relevant für die Vorgänge bei der Implantation und frühen Schwangerschaft, da diese Stadien beim Menschen aus ethischen Gründen nicht untersucht werden können. Hier wurde der Effekt des Fehlens von Cldn3 und Cldn10 im Endometrium untersucht, da deren Präsenz im Endometrium und deren spezifische Induktion in der Dezidua zum Zeitpunkt der Implantation in der Maus in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnten (Schumann, 2015). Die Auswirkungen von Deletionen verschiedener Claudine können in den jeweiligen Knockout-Mausmodellen sehr unterschiedlich sein. Während einige Mausstämme mit ubiquitär ausgeknockten Claudinen, wie die Cldn3KO-Maus in dieser Arbeit, überlebensfähig sind bzw. nur sehr milde physiologische Auswirkungen zeigen, sind andere CldnKO-Mausstämme nicht lebensfähig. So zeigen Cldn5KO-Mäuse z. B. eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und versterben innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt (Nitta et al., 2003). Cldn1-defiziente Mäuse versterben ebenfalls innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt an einem vermutlich überhöhten trans-epithelialen Wasserverlust aufgrund defekter Hautbarrieren (Furuse et al., 2002). Mäuse, die ein ubiquitäres Cldn10-Defizit aufweisen, versterben innerhalb des ersten Tages nach der Geburt, vermutlich aufgrund eines Nierendefektes (Seker et al., 2019).

Aufgrund der unterschiedlichen Vitalität der Cldn3KO- und Cldn10KO-Mäuse wurde in dieser Arbeit auf unterschiedliche Arten von Knockout-Mausmodellen zurückgegriffen. Während an der lebensfähigen Cldn3KO-Maus die Auswirkung der Deletion des Proteins auf die frühe Schwangerschaft gut untersucht werden konnte, musste zur Untersuchung einer Cldn10-Deletion erst ein Mausstamm erzeugt werden, der einen Endometrium-spezifischen Knockout von Cldn10 aufwies.

Die Auswirkungen der Deletion der beiden in dieser Arbeit untersuchten Claudine, Cldn3 und Cldn10, auf die Fertilität der jeweiligen Knockout-Mäuse waren sehr unterschiedlich. Während die Cldn3KO-Maus fertil war, aber eine Einschränkung der Dezidualisierung aufwies, die eine intrauterine Wachstumsverzögerung der Embryonen zufolge hatte, waren die konditionalen Endometrium-spezifischen Cldn10KO-Mäuse infertil und brachten keinen lebenden Nachwuchs hervor. Im

Folgendes wird die Auswirkungen beider Claudin-Deletionen auf die frühe Schwangerschaft, die Dezidualisierung und das Embryowachstum detailliert diskutiert.

5.2 Auswirkungen der Cldn3-Deletion auf die Reproduktion

5.2.1 Cldn3-Expression im zyklischen Endometrium und in der Schwangerschaft bei WT-Mäusen

In dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil von Cldn3 im zyklischen Endometrium und während der späteren Schwangerschaft bzw. Plazentation untersucht.

Um eine erfolgreiche Schwangerschaftsetablierung zu ermöglichen, müssen die molekularen Bedingungen im Reproduktionstrakt optimal auf die Bedürfnisse der Blastozyste und die Voraussetzungen für eine Implantation abgestimmt sein. In den murinen Reproduktionsorganen konnte eine sehr differenzierte und individuelle Zusammensetzung der Follikel-, Ovar- und Uterusflüssigkeit beobachtet werden (Harris et al., 2005). Maßgeblich beteiligt an der Regulierung dieser Milieus sind TJ in den Epithelzellen, die wesentlich durch die Claudin-Proteine die Durchlässigkeit des parazellulären Transportwegs beeinflussen (Van Itallie und Anderson, 2006). Es konnten bereits einige Claudine im Endometrium der Maus beschrieben werden. So sind bekanntermaßen Cldn1, -3, -7 und -10 in den endometrialen Epithelien exprimiert (Liang et al., 2013; Schumann et al., 2015; X. Wang et al., 2004). In diesen Studien wurden allerdings nur östrische Mäuse untersucht und eine mögliche zyklusabhängige Änderung der zellulären Lokalisation der Proteine außer Acht gelassen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cldn3 in allen Phasen des Östruszyklus im luminalen sowie glandulären Epithel des murinen Endometriums exprimiert ist und eine apikale Konzentration innerhalb der Epithelzellen aufweist. Im Östrus war diese Konzentration im luminalen Epithel nur noch punktuell vorhanden. Dafür konzentrierte sich die Expression von Cldn3 während des Östrus im glandulären Epithel stark am apikalen Zellpol.

In dieser Arbeit konnte keine Auswirkung der Cldn3-Deletion auf die Länge des Östruszyklus beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass trotz der prominenten Expression von Cldn3 in den endometrialen Epithelien das Protein wenig Einfluss auf die zyklischen Umstrukturierungen des Gewebes hat, bzw. das Fehlen des Proteins kompensiert werden kann. Unter der hormonellen Kontrolle von Östrogen

und Progesteron bereitet sich das Endometrium auf eine potenzielle Implantation vor. Es findet ein zeitlich fein reguliertes Zusammenspiel aus luminaler, glandulärer und stromaler Proliferation und Apoptose statt (Wood et al., 2007). Auch die Zusammensetzung des Uterussekrets spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer Schwangerschaft. Sie ist einerseits maßgebend für die Spermienkapazitation (X. F. Wang et al., 2003), deren Motilität (Lapointe et al., 2000) und für chemotaktische Effekte (Isobe et al., 2002). Andererseits ist die Zusammensetzung des Uterussekrets auf die Bedürfnisse der befruchteten Eizelle abgestimmt und unterstützt den Embryo bei der Entwicklung bis zur Implantation in das Endometrium im Blastozystenstadium (Harris et al., 2005). Eine Umstrukturierung der Claudinzusammensetzung und -lokalisierung im luminalen und glandulären Epithel könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. In Ratten wurde bereits eine zyklisch regulierte Expression von Cldn1, -3, -5 und -7 nachgewiesen (Mendoza-Rodriguez et al., 2005). Und auch beim Menschen, bei dem die Umstrukturierung des Endometriums im Rahmen des Menstruationszyklus noch deutlicher ist, konnte eine zyklusabhängige und differenzierte Expression einer Reihe von Claudinen, wie Cldn1, -3, -4, und 5 und auch anderen Zellkontaktproteinen wie Desmoplakin1 und 2, Desmoglein2, E-Cadherin und Connexin26, -32 und -43 beschrieben werden (Grund und Grümmner, 2018). Diese Befunde legen nahe, dass die Zusammensetzung an Claudinen im Uterusepithel stark an der Regulierung der uterinen Flüssigkeiten und somit an der erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft beteiligt ist.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Cldn3 an Tag 4,5 der Schwangerschaft im apikalen Bereich der basalen Membran der luminalen Epithelzellen, die die adhäsive Blastozyste umgeben und so die Implantationskammer auskleiden, exprimiert ist. Ferner wird Cldn3 in den Zellen der sekundären Dezidua an Tag 5,5 pc induziert und ist auch an Tag 8,5 pc noch nachweisbar (Schumann et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde ergänzend dazu die Expression von Cldn3 an Tag 10,5 pc untersucht, an dem sich bereits Spongiotrophoblast und Labyrinth der frühen Plazenta differenziert haben. Cldn3 war zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft in der mesometrialen Dezidua exprimiert, die an die sich bildende Plazenta angrenzt und durch eine Reihe von Trophoblastriesenzellen vom Spongiotrophoblasten abgegrenzt wird. Im Embryo selbst sowie im gesamten embryonalen Teil der Plazenta, also dem Spongiotrophoblasten und dem Labyrinth,

war hingegen in allen untersuchten Schwangerschaftsstadien keine Expression von Cldn3 zu erkennen.

Für einige andere Claudine existieren Hinweise, an essenziellen morphogenetischen Prozessen der Embryoentwicklung beteiligt zu sein. So sollen Cldn5a und -15 die Lumenbildung im Neuroepithel von Zebrafischen beeinflussen (J. Zhang et al., 2010) und Cldn1 und -10 an der links/rechts Differenzierung des Embryos beteiligt sein (Collins et al., 2015; Simard et al., 2006). Eine solche Beteiligung an der Embryonalentwicklung scheint für Cldn3 nicht der Fall zu sein.

Bis zum Stadium der reifen Plazenta an Tag 17,5 pc war Cldn3 nur in der Dezidua, also in dem maternalen Teil der Plazenta exprimiert. Dieser Teil enthält maternale Immunzellen wie uNK-Zellen, invadierende Trophoblastzellen und die maternalen Gefäße in der Form von Spiralarterien und venösen Sinusoiden (Simmons, 2014). Über die Funktion und Expression von Claudinen und ihre Funktion für parazelluläre Transportwege in der Plazenta ist generell nicht viel bekannt. Die Expression einiger Claudine in der murinen Plazenta zu unterschiedlichen Schwangerschaftsstadien wurde von Ahn et al. (2015) untersucht. Dabei wurde die Expression von Cldn1 bis -24 auf transkriptioneller Ebene mittels RealTime-PCR untersucht und eine geringe Expression von Cldn3 an Tag 12, 16 und 20 pc gefunden. Die Lokalisation von Cldn3 wurde nicht weiter bestimmt. Allerdings konnte eine vergleichsweise hohe Expression von Cldn1, -2, -4 und -5 gezeigt werden. Diese Claudine wurden immunhistochemisch untersucht und für jedes dieser Claudine konnte ein spezifisches Expressionsmuster gefunden werden, dass sich bezüglich Schwangerschaftsstadium und Lokalisation innerhalb der Plazenta unterscheidet. Auch eine hormonelle Abhängigkeit der Expression dieser Claudine konnte gezeigt werden (Ahn et al., 2015). Generell wird die Expression von Claudinen also nicht nur im zyklischen Endometrium und in der Dezidua den Anforderungen entsprechend reguliert, sondern auch in der Plazenta.

5.2.2 Auswirkungen der Cldn3-Deletion auf die Fertilität

Es war bekannt, dass Cldn3KO-Mäuse grundsätzlich fertil sind (Kooij et al., 2014). Die neonatalen Tiere zeigten zudem keine Auffälligkeiten bezüglich ihrer Entwicklung, und auch die adulten Tiere zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Es wurden zuvor bereits Parameter der Nieren- und Leberfunktion und die Barrierefunktion des Kolonepithels untersucht und dabei lediglich ein erhöhter pH-Wert des Urins der Cldn3KO-Mäuse gefunden. Einschränkungen der Barrierefunktionen und der Permeabilität der

Epithelien für Moleküle verschiedener Größen in den genannten Organen konnten nicht gefunden werden (Schröder, 2013). Auch in der Arbeitsgruppe um Kooji et al. konnten keine Einschränkung in der Vitalität der Cldn3KO-Mäuse gefunden werden (Kooij et al., 2014). Lediglich eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke wurde postuliert.

Die Beobachtung, dass die Tiere sehr wenig physiologische Einschränkungen aufzeigen und uneingeschränkt vital sind, hilft bei der Untersuchung der Auswirkungen der Cldn3-Deletion auf die Schwangerschaft und speziell die Dezidualisierung, da so andere physiologische Effekte, die die Fertilität beeinflussen können, weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Die Cldn3KO-Mäuse zeigten jedoch eine tendenziell verringerte Anzahl an Implantationsstellen und in Folge auch eine gering reduzierte Wurfgröße im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Auch wenn dieser Effekt nicht statistisch signifikant war, weist diese Tendenz darauf hin, dass Cldn3 eine Rolle für die Rezeptivität des Uterusepithels bzw. für die Interaktion zwischen dem Epithel und der Blastozyste spielen könnte. Hierfür spricht, dass Cldn3 im luminalen Epithel der Implantationskammer zum Zeitpunkt der Adhäsion der Blastozyste an Tag 4,5 pc exprimiert ist (Schumann et al., 2015), und eine Änderung der räumlichen Verteilung dieses Proteins im Laufe des Östruszyklus beobachtet werden konnte.

Bislang konnte keine Expression von Cldn3 in der Blastozyste oder in den frühen Embryonalstadien bis hin zum implantierten Embryo nachgewiesen werden. Trotzdem ist eine Interaktion anderer in der murinen Blastozyste exprimierten Claudine wie z.B. Cldn4, -6 und -7 (Moriwaki et al., 2007) mit dem Cldn3 des luminalen Epithels nicht auszuschließen.

5.2.3 Auswirkung der Cldn3-Deletion auf die Dezidualisierung und Trophoblastinvasion

Wie in einer vorherigen (Schumann, 2015) und in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird Cldn3 im Verlauf der Schwangerschaft in der Dezidua zeitlich und räumlich präzise reguliert exprimiert und induziert. Aufgrund dieser Befunde war zu vermuten, dass das Fehlen des Cldn3 Folgen für die Dezidualisierung und möglicherweise auch für die Embryoentwicklung haben könnte. Daher wurden in dieser Arbeit die Implantationsstellen der Cldn3KO-Maus zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um

eine eventuelle Auswirkung der Deletion auf die Dezidualisierung, Embryoentwicklung und Plazentation zu analysieren.

Interessanterweise konnte in der frühen Schwangerschaft an 6,5 und 8,5 dpc ein signifikant verringertes Gewicht der Implantationsstellen der Cldn3KO-Mäuse gegenüber den WT-Kontrollen beobachtet werden. Durch die Erzeugung von heterozygoten Embryonen durch die Verpaarung von Cldn3KO-Weibchen mit WT-Männchen konnte bestätigt werden, dass es sich bei dieser Wachstumsretardierung um einen maternalen Effekt handelte.

Zu diesen Zeitpunkten wird das Gewicht der Implantationskammern durch die stark anwachsende Dezidua bestimmt. Die Dezidualisierung ist gekennzeichnet durch starke Zellproliferation, Differenzierung und Polyploidisierung der endometrialen Stromazellen (Gellersen und Brosens, 2014; Mori et al., 2016). Nach der Adhäsion der Blastozyste an 4,5 dpc beginnt die Bildung der avaskulären und epitheloiden PDZ (Enders und Schlafke, 1969; Paria et al., 1999). An Tag 6 pc proliferieren die Stromazellen, die die primäre Dezidua (PDZ) umgeben weiterhin und bilden die sekundäre Dezidua (SDZ), während die Zellen der PDZ in die Apoptose übergehen. Nach Tag 8 pc ist die PDZ stark zurückgebildet und plazentare Strukturen beginnen, die SDZ zu ersetzen (Das, 2010). Zahlreiche Signalmoleküle wurden bereits identifiziert, die diese Prozesse maßgebend regulieren sollen, darunter Hoxa10, ein Transkriptionsfaktor der Hox-Familie, Cyclin D3, ein Regulator der CDK-Kinasen, oder auch Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (H. J. Lim und Wang, 2010; H. Wang und Dey, 2006). Neuere Studien zeigten neben den genannten Faktoren auch TJ-Proteine als Mediatoren der Zellproliferation (Diaz-Coranguez et al., 2019). Es wird postuliert, dass die ZO-Proteine, die die Transmembranproteine der TJ mit dem Zytoskelett verbinden, abhängig von der Zelldichte über den Y-box Transkriptionsfaktor ZONAB (ZO-1 associated nucleic acid binding protein) Gene der Zellproliferation steuern (Balda et al., 2003).

Auch kann ZO-3 über Interaktionen der PDZ-Domäne mit Cyclin D1 die Zellproliferation regulieren (Capaldo et al., 2011). Auch für die Beteiligung der Transmembranproteine der TJ, wie Occludin, JAM-A und Proteine der MARVEL Familie, aber vor allem auch der Claudine gibt es zahlreiche Hinweise (Diaz-Coranguez et al., 2019). Vor allem für Claudine scheint es einen Zusammenhang zwischen einer Proteinüberexpression bzw. der Umstrukturierung der Claudin-

Zusammensetzung von Geweben und der Tumorprogression zu geben. So wurde beispielsweise eine Überexpression von Cldn6, -7 und -9 mit einer erhöhten Zellproliferation der humanen Magen-Adenokarzinomzelllinie AGS in Verbindung gebracht (Zavala-Zendejas et al., 2011). Während zum einen postuliert wird, dass die Änderung der Zusammensetzung der TJ homöostatische Veränderungen der Mikroumgebung der Krebszellen zur Folge hat, die eine Metastasierung begünstigen, gibt es auch Hinweise darauf, dass Claudine direkt auf die molekularen Mechanismen der Zellproliferation einwirken. So wurde beispielsweise eine Interaktion von Cldn11 mit dem outer surface protein-associated protein 1 (OAP1) und β 1-Integrin postuliert (Tiwari-Woodruff et al., 2001) und eine Korrelation zwischen der Überexpression von Cldn18 und der Verringerung der nukleären Lokalisation des Yes-associated protein (YAP), das ähnlich dem ZO/ZONAB-Mechanismus die Zellproliferation beeinflussen soll (B. Zhou et al., 2018). Während für das Cldn3 noch keine genaueren Mechanismen bekannt sind, könnte der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt einer verringerten oder verlangsamten Deziduabildung in den Cldn3KO-Mäusen entweder auf veränderte homöostatische Bedingungen in der Dezidua oder auch auf einen durch das Cldn3-Defizit bedingten negativen Effekt durch noch unbekannte Mechanismen auf die Proliferation der Deziduaellen beruhen.

Parallel zum verringerten Deziduagewebe wurde in dieser Arbeit eine tendenziell verminderte Invasionstiefe des Ektoplazentarkonus in den Implantationskammern der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren an Tag 8,5 pc gefunden. Der Ektoplazentarkonus ist der invasive Teil des Trophoblasten. Nach der Penetration des Uterusepithels beginnt der Trophoblast zu proliferieren und bildet so das extraembryonale Ektoderm. Durch das weitere proliferative Wachstum des extraembryonalen Ektoderms bildet sich auf der mesometrialen Seite der Ektoplazentarkonus aus, der aus einer inneren und einer äußeren Schicht von Zellen besteht. Die innere Zellschicht bleibt proliferativ und undifferenziert, bildet Adherens junctions und Desmosomen aus und ist für die spätere Bildung des Spongiotrophoblasten verantwortlich (Bevilacqua et al., 2014). Die äußere Schicht wird von Trophoblastriesenzellen (TGCs) gebildet, die terminal differenziert und polyploid sind. Diese Zellen sind für die Invasion in das mütterliche Gewebe, die Aufnahme von Molekülen zur Ernährung des Embryos, regulierende Hormonsekretion, Immunregulation und Angiogenese zuständig. Die peripheren TGCs, die mit der Dezidua in Kontakt stehen, formen Zellkontakte mit dem mütterlichen Endothel, welche

essenziell für den Austausch von angiogenetischen und vasoaktiven Substanzen sind. Ein kontrolliertes Einwachsen der Zellen des Ektoplazentarkonus in die Dezidua und die Kommunikation der beiden Gewebe miteinander sind somit wesentlich für eine erfolgreiche Implantation (Ain et al., 2003).

Die Ausbildung von Tight junctions in der Dezidua kann zum einen eine physische Barriere bilden, die die Invasion des Ektoplazentarkonus in das mütterliche Gewebe reguliert und ihr eine Richtung gibt. Zum anderen kontrollieren Tight junctions auch hier das Milieu und den parazellulären Austausch von Molekülen in den Geweben. Das Fehlen von Cldn3 in der Dezidua führte in dieser Arbeit zu einer tendenziell verminderten Invasivität des Ektoplazentarkonus. Die Präsenz von Claudinen und deren veränderte Zusammenstellung wird häufig mit der Invasivität von Tumoren assoziiert, wobei der Verlust von TJ-Strukturen in epithelialen Tumoren die Invasivität und Proliferation durch einen erleichterten Zugang zu Nährstoffen fördert (Takehara et al., 2009). Änderungen der Claudinexpression wurde häufig in Kolon-, Brust-, Pankreas-, Prostata, Uterus- und Ovarkarzinomen gefunden (Hewitt et al., 2006), wobei sie zum einen die Barrierefunktion, zum anderen durch Signalkaskaden oder Wechselwirkungen der Claudine mit den Tumorzellen deren Invasivität und Migration beeinflussen können (Oku et al., 2006).

Eine Überexpression von Cldn3, oft korrelierend mit einer Überexpression von Cldn4, konnte in diversen Tumoren, wie dem Prostatakarzinom (Sheehan et al., 2007), kolorektalen Karzinom (de Oliveira et al., 2005) und Mammakarzinom (Kominsky et al., 2004), was vermuten lässt, dass die Expression von Cldn3 positiv auf die Tumorprogression wirkt. Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von Cldn3 und -4 und der fortschreitenden Progression von malignen Gewebeveränderungen des Endometrium und des Ovars gezeigt werden (Pan et al., 2007).

Cldn3 und -4 wurden zunächst als Rezeptoren für das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) identifiziert (Katahira et al., 1997), wobei das CPE an die zweite extrazelluläre Schleife des Cldn3 binden kann (Fujita et al., 2000) und vermutlich mit den Claudinen und Occludin eine zytotoxische Pore bildet, durch die es zum Kalziumeinstrom in die Zelle und zu deren Tod kommt. Bindung des CPE führt in dem Cldn3-Protein zu Konformationsänderungen, die die *trans*- und *cis*-Interaktionen des Proteins beeinträchtigen (Van Itallie et al., 2008). In neueren Studien wird der Einsatz von CPE in der Krebstherapie diskutiert, bei der man sich den Zusammenhang

zwischen der Rezeptoraktivität des Cldn3 und -4 für CPE und deren Überexpression in Tumorgewebe zunutze macht (Black et al., 2015). Auf der anderen Seite wurde ein Verlust der Cldn3-Expression im humanen Glioblastom beobachtet, was vermuten lässt, dass die Cldn3-Expression in verschiedenen Geweben unter malignen Bedingungen differenziert reguliert wird (Wolburg et al., 2003).

Durch eine solche differenzierte Regulation könnte auch die hier gefundene verminderte Invasivität des Ektoplazentarkonus in den Cldn3KO-Mäusen bedingt sein. Möglicherweise hat das Cldn3-Defizit in der Dezidua einen hemmenden Einfluss auf die Invasion der Trophoblastzellen, was jedoch aufgrund der Funktion des Cldn3 nicht sehr wahrscheinlich ist. Die zum Mess-Zeitpunkt verminderte Invasionstiefe kann aber auch dadurch bedingt sein, dass es durch das Fehlen des Cldn3 im Uterusepithel zu einer generell verzögerten Implantation und damit auch zu einer Entwicklungsverzögerung des Ektoplazentarkonus beim Vergleich gleicher Schwangerschaftszeitpunkte in der WT- und KO-Maus kommt.

Auch an Tag 10,5 pc, an dem sich bereits deutlich das Labyrinth und der Spongiotrophoblast differenzieren, konnte in dieser Arbeit eine Beeinträchtigung der Bildung dieser Strukturen in den Cldn3KO-Mäusen gefunden werden. Der Spongiotrophoblast, der sich aus Zellen des inneren Ektoplazentarkonus differenziert, wies noch eine deutliche Polarität in Richtung der mesometrialen Seite der Implantationsstelle auf, während in der WT-Maus der Spongiotrophoblast diese Polarität nicht mehr zeigte. Diese Beobachtung kann auf die verzögerte oder beeinträchtigte Entwicklung des Ektoplazentarkonus zurückzuführen sein, da sich sowohl die Zellen des Spongiotrophoblasten als auch die Zellen des Labyrinths aus den verschiedenen Schichten des Ektoplazentarkonus entwickeln. Eine genauere Identifizierung mit speziellen Markern für die einzelnen Typen von Trophoblastzellen könnte hier genauer darüber Aufschluss geben, inwieweit die Cldn3-Deletion die Differenzierung der einzelnen Zelltypen beeinträchtigt.

Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Cldn3-Deletion zu einem veränderten Flüssigkeitsgehalt des Dezidugewebes oder durch eine verzögerte Implantation zu einer kleineren Ektoplazentar- bzw. Amnionhöhle führt. Da die Messung der Länge des Ektoplazentarkonus an HE-gefärbten Paraffinschnitten erfolgte, könnte die Entwässerung im Prozess der Einbettung der Gewebe dazu beigetragen haben, dass flüssigkeitsgefüllte Räume in unterschiedlichem Maße geschrumpft sind und so zu unzuverlässigen Daten beim Ausmessen geführt haben.

Einen entscheidenden Hinweis auf einen veränderten Flüssigkeitsgehalt des Gewebes wird in der Ultraschalluntersuchung der Implantationsstellen deutlich, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Hier wurde eine verringerte Echogenität des Deziduagewebes in den Implantationsstellen der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen an Tag 8,5 pc gefunden, was auf einen höheren Flüssigkeitsgehalt hinweist. Dies könnte auf einem veränderten parazellulären Transport in der Dezidua beruhen, der den Prozess der Implantation beeinflussen könnte.

5.2.4 Auswirkung der Cldn3-Deletion auf das embryonale Wachstum und die Plazentation

Um zu prüfen, ob die beschriebenen Einschränkungen in der Implantation und Dezidualisierung einen Einfluss auf das weitere Wachstum des Embryos und die Plazentafunktion haben, wurden Embryonen an Tag 17,5 pc, somit etwa zwei Tage vor der Geburt, entnommen und gewogen. Es zeigte sich ein signifikant verringertes Gewicht der Embryonen der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen, wohingegen die Plazenten zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft keinen Gewichtsunterschied aufwiesen. Auch zeigten die Plazenten beider Mauslinien zum Zeitpunkt 14,5 und 17,5 dpc keine morphologischen Unterschiede. Alle drei Schichten der Plazenta waren regulär entwickelt. In dieser Arbeit konnte Cldn3 in der reifen Plazenta nur in dem maternalen Teil, der Dezidua gefunden werden. Andere Studien konnten zeigen, dass eine Reihe von Claudinen in der murinen Plazenta exprimiert sind. So konnten mittels RealTime-PCR Analysen Cldn1, -2, -4, -5, -6, -7, und in geringem Maße -10b, -11 und -12 in unterschiedlichen Mengen zu verschiedenen Schwangerschaftszeitpunkten in der murinen Plazenta gefunden werden (Ahn et al., 2015). Die korrekte Ausbildung verschiedenster Adhäsionsmoleküle, inkl. Claudinen in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Plazenta ist von essenzieller Bedeutung für die Regulation des Nährstoffaustausches zwischen der maternalen und embryonalen Zirkulation, und eine Fehlregulation dieser Expression kann zu diversen Schwangerschafts-Komplikationen wie Präeklampsie, Fehlgeburten oder Plazenta accreta führen. Einige Claudine sind auch im Zytotrophoblasten und im extravillösen Trophoblasten der menschlichen Plazenta exprimiert und eine Fehlregulation der Claudine scheint in der menschlichen Plazenta zur Ausbildung solcher Symptome zu führen (Adu-Gyamfi et al., 2021). So sind beispielsweise Cldn1, -3 und -5 während einer Präeklampsie herunterreguliert (Lievano et al., 2006). Eine andere Studie fand

das Cldn4 herunterreguliert, während Cldn8 hochreguliert war (Y. Zhang et al., 2019). In der murinen Plazenta scheint eine Cldn3-Deletion in der Dezidua der reifen Plazenta keinen signifikanten Einfluss auf deren Morphologie und Funktion auszuüben bzw. dieser durch einen kompensatorischen Mechanismus aufgefangen zu werden. Trotzdem zeigen die Embryonen am Ende der Schwangerschaft ein reduziertes Gewicht. Dies ist vermutlich weniger auf eine Fehlfunktion der Plazenta zurückzuführen, sondern eher eine Folge der verzögerten Deziduabildung und Invasion in den frühen Schwangerschaftsstadien bei den Cldn3KO-Mäusen. Diese Gewichtsretardierung wird jedoch schnell aufgeholt und ist in den neugeborenen Tieren ab P1 (Stadium postnatal Tag 1) bereits nicht mehr sichtbar.

5.2.5 Cldn3-Deletion hat keinen Einfluss auf die Vaskularisierung der Dezidua

Ein essentieller Faktor für die ausreichende Ernährung und damit die adäquate Gewichtsentwicklung der Embryonen ist eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, die durch die maternale Dezidua sichergestellt werden muss. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Vaskularisierung der mesometrialen Dezidua an Tag 8,5 pc mittels Immunfluoreszenzfärbung für CD31, einem Endothelzellmarker, untersucht. Das vorherrschende Claudin in Endothelien ist Cldn5 (Morita et al., 1999), allerdings ist Cldn3 an der Bildung der Blut-Hirn- (Wolburg et al., 2003) und Blut-Liquor-Schranke (Kooij et al., 2014) beteiligt, so dass auch das Cldn3 bei der Angiogenese in der Dezidua eine Rolle spielen könnte. In früheren Studien konnte in unserer Arbeitsgruppe Cldn3 in Embryo-nahen Endothelzellen in der Intermediärzone der sekundären Dezidua an Tag 6,5 pc, nicht aber an Tag 8,5 pc nachgewiesen werden (Schumann, 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Ko-Lokalisation des Fluoreszenzsignals für Cldn3 und CD31 in den Implantationsstellen an Tag 10,5 pc oder in der Plazenta an 17,5 pc nachgewiesen werden. Es konnte kein Unterschied in der Vaskularisierung der mesometrialen Dezidua der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen an Tag 8,5 pc gefunden werden. Dieses Ergebnis passt zu dem Befund der regelgerecht ausgebildeten Plazenta in den Cldn3KO-Mäusen, da Störungen der Vaskularisierung wie bereits beschrieben zu dramatischen Fehlbildungen der Plazenta führen können, die in diesem Mausmodell nicht beobachtet werden konnten.

Allerdings können kleinere Unterschiede in der Gefäßdichte und -ausprägung zwischen WT- und KO-Mäusen mittels einer immunhistochemischen Färbung an

einzelnen Schnitten nicht hinreichend quantifiziert werden. Hier wären in weiterführenden Versuchen Methoden wie die Light-Sheet-Mikroskopie anwendbar, mit der der Gefäßverlauf genauer untersucht werden kann, um mögliche kleinere Beeinträchtigungen der Angiogenese durch die Cldn3-Deletion zu finden.

5.2.6 Cldn4 als mögliches kompensatorisches Protein in Cldn3KO-Mäusen

Cldn3 ist ein TJ-Protein, das nicht nur in der murinen Dezidua stark exprimiert wird, sondern auch in einer Vielzahl von anderen Geweben der Maus. Obwohl das Protein in dem hier verwendeten Mausmodell global ausgeknockt wurde, zeigten sich insgesamt wenig Beeinträchtigungen der physiologischen Funktionen verschiedener Organe, in denen das Protein normalerweise exprimiert ist (Schröder, 2013). Die Deletion von Cldn3 in der Dezidua führte zwar zu den hier beschriebenen Beeinträchtigungen bei der Implantation und dem Embryonalwachstum, diese fallen jedoch vor dem Hintergrund der spezifischen Induktion und starken Expression dieses Proteins in der Dezidua unerwartet mild aus. Grund dafür könnte die Expression bzw. Hochregulation anderer, kompensatorisch wirkender Claudine sein. Ein möglicher Kandidat hierfür war das Cldn4, dessen Hochregulation an 6,5 und 8,5 dpc in den Implantationskammern der Cldn3KO-Mäuse bereits durch RealTime-PCR in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte (Xin Xin Wu, unveröffentlichte Daten). Eine solche Hochregulation von Cldn4 konnte in der Cldn3KO-Maus auch in der Lunge nachgewiesen werden (Schröder, 2013). Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit das Vorkommen des Cldn4-Proteins im zyklischen Endometrium sowie in der Dezidua und auch der Plazenta zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Cldn4 war in jeder Phase des Östruszyklus gleichermaßen in WT- und Cldn3KO-Mäusen im luminalen sowie glandulären Epithel exprimiert. An Tag 8,5 pc zeigte sich ein positives Fluoreszenzsignal für Cldn4 in der antimesometrialen sekundären Dezidua in beiden Mausstämmen, wohingegen es auf der mesometrialen Seite nur ein sehr schwaches Signal gab. Dieses Vorkommen von Cldn4 ähnelt der Verteilung von Cldn3 in den WT-Mäusen. Im Gegensatz zu Cldn3 ist Cldn4 allerdings auch im Embryo exprimiert. Hier zeigte sich eine Expression in den peripheren und polaren Trophoblastzellen des Ektoplazentarkonus, und ab Tag 10,5 pc auch in weiteren embryonalen Strukturen der Plazenta. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Verteilung des Cldn4-Proteins zwischen WT- und Cldn3KO-Mäusen. Auch in der reifen Plazenta an Tag 17,5 pc konnte Cldn4 in den embryonalen

Anteilen der Plazenta, also dem Labyrinth und Spongiotrophoblasten, gefunden werden. Die Cldn3-Deletion zeigte in dieser Arbeit somit keinen Einfluss auf die Expression von Cldn4 in den maternalen Gewebeanteilen der Implantationskammer, die ein überlappendes Expressionsmuster mit Cldn3 in der Dezidua zeigte.

Cldn3 und Cldn4 sind die am nächsten verwandten Claudine in Säugetieren, mit einer Homologie der Aminosäuresequenzen von 94 % in der ersten extrazellulären Schleife und 64 % in der zweiten (Mitchell et al., 2011). Die extrazellulären Domänen sind typischerweise für die Ionenspezifität und Interaktion mit anderen Claudinen zuständig, wobei gezeigt wurde, dass Claudine untereinander eine unterschiedliche Affinität zueinander haben. So bindet Cldn3 beispielsweise an Cldn1, -2 und -5, wohingegen Cldn4 nur mit sich selbst bindet (Coyne et al., 2003; Daugherty et al., 2007). Allerdings können gezielt ausgelöste Mutationen einzelner Aminosäuren der extrazellulären Domänen zu anderen Bindungsverhalten der Claudine führen (Van Itallie et al., 2001). In anderen Geweben konnte bereits ein differenziertes Zusammenspiel von Cldn3 und -4 gezeigt werden. So ist beispielsweise Cldn3 in der Lunge in Typ-II Pneumozyten exprimiert, und Cldn4 sowohl in Typ-I als auch Typ-II Pneumozyten wo es spezifisch als Reaktion auf Verletzung des Lungenepithels hochreguliert wird (F. Wang et al., 2003). In der Lunge konnte eine Verringerung der epithelialen Barrierefunktion bei Überexpression von Cldn3 und eine Erhöhung bei Überexpression von Cldn4 gefunden werden (Mitchell et al., 2011). Wie bereits erwähnt konnte eine erhöhte Expression von Cldn3 und -4 in gynäkologischen Tumoren wie dem Endometriuskarzinom gefunden werden (Pan et al., 2007). Hier wurde die erhöhte Expression der beiden Claudine mit Tumorwachstum und Invasivität assoziiert.

In der Dezidua stellt Cldn4 einen potenziellen Kandidaten dar, um das Cldn3-Defizit zu kompensieren, allerdings ist es wahrscheinlich, dass das feine Zusammenspiel mehrerer Claudine insgesamt zu einem kompensatorischen Effekt beiträgt. Zum einen gibt es Hinweise, dass die Expression eines bestimmten Claudins abhängig von der Expression anderer Claudine in der Zelle sowohl dramatische als auch keine Effekte auf die Ionenpermeabilität haben kann (Van Itallie et al., 2003), zum anderen konnte in anderen Mausmodellen gezeigt werden, dass die Überexpression eines bestimmten Claudins die Fehlfunktion eines anderen kompensieren kann (Breiderhoff et al., 2018). Es ist also möglich, dass selbst eine leichte Expressionsänderung bzw. -erhöhung von Cldn4 und/oder anderen Claudinen in der Dezidua eine differenzierte Kontaktausbildung zwischen den einzelnen Zellen verändert und so den Verlust von

Cldn3 kompensieren kann. Dies ist vermutlich ein komplexes Zusammenspiel von Cldn3 und -4 und möglicherweise weiteren Claudinen, dessen Bedeutung in der Dezidua in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden sollte. So könnte der Anteil von Cldn4 an diesem Kompensationsmechanismus beispielsweise an einer Cldn3/Cldn4-Doppelknockout-Maus untersucht werden.

5.2.7 Differentielle Genregulierung in der Dezidua der Cldn3KO-Mäuse im Vergleich zur WT-Maus

Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, welchen Einfluss eine Cldn3-Deletion auf die Genexpression in der Dezidua hat, wurde in dieser Arbeit eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Diese Analyse bietet Einsichten in die Genregulationen, die durch das Fehlen von Cldn3 in der Knockout-Maus verändert sind. Der hierfür verwendete Affymetrix Clariom™ S Assay mouse (Applied Biosystems™) bietet eine Auswahl an über 20.000 Genen, für die eine differenzielle Expression gemessen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit und dieses Versuchs sollte eine erste Übersicht über die Gene gewonnen werden, die bei einer Cldn3-Deletion eine veränderte Regulation im Endometrium aufweisen.

Die RNA für die Transkriptomanalyse wurde aus Gewebe von isolierten Deziduen an Tag 8,5 pc gewonnen. Es wurde sich für diesen Zeitpunkt entschieden, weil hier die Wachstumsretardierung der Implantationsstelle am größten war. Das Dezidugewebe wurde vom Myometrium getrennt, sodass eine differenzielle Genexpression im Myometrium keinen Einfluss auf die Daten hatte. Allerdings ist es an Tag 8,5 pc nicht möglich, den Embryo zu isolieren. Deswegen wurden für diesen Versuch heterogene Verpaarungen (KO x WT) angesetzt, um einen heterozygoten Embryo bzgl. der Cldn3-Deletion zu generieren und ihn somit so wildtypisch wie möglich zu halten.

In Auswertung der Transkriptomanalyse wurden zwei Parameter festgelegt mithilfe derer bestimmt wurde, ob ein Gen als reguliert angesehen wurde. Zum einen musste der fold change ≥ 2 bzw. ≤ -2 betragen. Damit dieses Gen aber als tatsächlich reguliert definiert wurde, musste der p-Wert $\leq 0,05$ betragen. Unter diesen Kriterien wurden insgesamt in der Dezidua der Cldn3KO-Maus 36 hochregulierte und 202 herunterregulierte Gene gefunden. Das Fehlen von Cldn3 scheint also eher eine negative Auswirkung auf die Genregulation zu haben. Eine sehr prominente Gruppe differenziell regulierter Gene stellen die Prolaktine (PRL) dar (Tab. 12). Prolaktin wird als Marker für die Dezidualisierung angesehen (Gellersen und Brosens, 2014; Irwin et

al., 1989) und sowohl von murinen Deziduazellen als auch von humanen Deziduazellen *in vitro* und *in vivo* produziert (Daly et al., 1983; Kimura et al., 2001; Maslar und Riddick, 1979). In der Maus, sowie in der Ratte und in der Kuh, wurde eine Genfamilie charakterisiert, die als expanded PRL gene family bezeichnet wird und durch Genduplikationen entstanden ist. Beim Menschen hingegen enthält der Genlocus nur ein einziges PRL-Gen (Soares et al., 2007). Die expanded PRL gene family umfasst eine Vielzahl an homologen und paralogen Proteinen, deren Nomenklatur nicht eindeutig geregelt ist und die sich in ihrer Funktion sowie ihrer zeitlichen und räumlichen Expression sehr unterscheiden können. Einige Vertreter der expanded PRL gene family werden von Deziduazellen synthetisiert, wobei in der frühen Schwangerschaft eine bestimmte Subgruppe von granulierten Deziduazellen die Quelle des Prolaktin zu sein scheint (Candeloro und Zorn, 2007). Die Expression von Prolaktin in der frühen Schwangerschaft ist essenziell für eine Vielzahl von Prozessen und die Funktionen von Prolaktin umfassen die Regulation des zellulären Wachstums des Trophoblasten, die Angiogenese, Immunregulation und die homöostatische Stressantwort (Jabbour und Critchley, 2001). Eine verfrühte Expression von Prolaktin wird mit der recurrent implantation failure (RIF) in Verbindung gebracht (Berkhout et al., 2020). In der Cldn3KO-Maus konnte eine signifikante Herunterregulierung von 14 Subtypen der expanded PRL gene family gefunden werden, wobei das Prl7b1 (prolactin family 7, subfamily b, member 1) das am stärksten regulierte Gen darstellt. Prl7b1 (auch PRL-like protein N, PLP-N genannt) konnte in invasiven Zelltypen des Ektoplazentarkonus ab Tag 8,5 pc nachgewiesen werden, welche eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der hämochorialen Plazenta spielen (Bu et al., 2016). In Prl7b1-Knockout-Mäusen konnte unter normalen Haltungsbedingungen keine Einschränkung der Plazentation und Schwangerschaft der Tiere gefunden werden, allerdings zeigten die Tiere eine veränderte Adaption der Plazenta an hypoxischen Stress, was zu der Vermutung führte, dass das Protein Teil des regulatorischen Systems der Plazenta auf physiologischen Stress ist (Bu et al., 2016). Eine Herunterregulation dieses und anderer Vertreter der expanded PRL gene family könnte in der Cldn3KO-Maus einen Marker für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete beeinträchtigte Dezidualisierung sein. Die Fertilität der Cldn3KO-Mäuse wurde hier unter normalen Haltungsbedingungen untersucht. Die Erkenntnisse über das Prl7b1 könnten allerdings vermuten lassen, dass die starke Herunterregulation des Prl7b1 in den Cldn3KO-Mäusen bei Einwirkung von physiologischem Stress zu

einer veränderten Antwort des Gewebes führen könnte. Interessanterweise wurde in einer Studie, bei der eine Prl8a2KO-Maus erzeugt wurde, auch eine Herunterregulation von Klk7 (Kallikrein related peptidase 7) an Tag 7,4 pc in der Implantationsstelle gefunden (Alam et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine signifikante Herunterregulation von Klk7 und Klk9 gefunden. Kallikrein konnte im Östruszyklus und in der Implantationsstelle der Ratte (G. Valdes et al., 1998) und auch im zyklischen humanen Endometrium (G. Valdes et al., 2001) gefunden werden und es wird vermutet, dass das Kallikrein-Kinin-System u.a. eine vasodilatierende Wirkung auf uterine Blutgefäße hat und somit den Blutfluss aufrechterhält.

Allerdings muss bei der Evaluation dieser Ergebnisse der Transkriptomanalyse auch bedacht werden, dass die Deletion von Cldn3 einen möglichen negativen Effekt auf die Zellproliferation der Dezidua haben kann (s. Kapitel 5.2.3). Eine Herunterregulation der Prolaktine kann also auch ein Artefakt der niedrigeren Anzahl an Deziduazellen sein.

Neben den Prolaktinen sind auch einige Vertreter der Schwangerschaft-spezifischen Glykoproteine (pregnancy-specific-glycoproteins, Psg), einige plazentale Faktoren und einige Rhox(reproductive homeobox)-Gene in der Dezidua der Cldn3KO-Maus reguliert.

Die Schwangerschaft-spezifischen Glykoproteine, die den CEACAM-Proteinen verwandt sind und ebenfalls zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie gehören, werden in Trophoblastriesenzellen und Zellen des Spongiotrophoblasten exprimiert und sind die am meisten gefundenen Trophoblastproteine im maternalen Serum während der Schwangerschaft. Ihnen wird eine immunregulatorische, pro-angiogenetische und plättchenaggregationshemmende Wirkung zugesprochen. Ebenfalls wird ein Zusammenhang zwischen einem niedrigen Psg-Serumlevel und fetalen Wachstumsretardierungen und Präeklampsie postuliert (Moore und Dveksler, 2014). Zu den regulierten plazentalen Faktoren gehören Plet1 (placenta expressed transcript 1), Plac1 (placenta specific protein 1) und Pgf (placental growth factor). Allen drei Faktoren wird eine Rolle bei der Trophoblastdifferenzierung und Plazentation, sowie bei der Angiogenese zugesprochen, und eine veränderte Expression dieser Faktoren wird ebenfalls mit einer Präeklampsie korreliert (Chau et al., 2017; Gu et al., 2017; Murray et al., 2016; Wan et al., 2019).

Rhox(reproductive homeobox)-Gene werden im männlichen und weiblichen Reproduktionsstrakt, z.B. im Ovar und in der Plazenta exprimiert, aber auch in embryonalen Strukturen und sind essenziell u.a. für die Gametogenese (S. E. Lee et al., 2013).

Während die Herunterregulation von Prolaktin auf einen direkten Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Dezidua hinweist, lassen diese herunterregulierten Gene in der Cldn3KO-Maus eher einen indirekten Einfluss einer fehlerhaften Dezidualisierung auf die Entwicklung des Trophoblasten vermuten, da es sich hier hauptsächlich um Gene handelt, die in den verschiedenen Zellen des Trophoblasten exprimiert werden. Die Assoziation einer Herunterregulierung dieser Gene mit einer embryonalen Wachstumsretardierung kann auch in diesem Mausmodell wiedergespielt werden, da die Embryonen der Cldn3KO-Maus an Tag 17,5 pc ein geringeres Gewicht aufwiesen (Abb. 14). Über den Zusammenhang zwischen Cldn3 und einer Regulation dieser Faktoren ist allerdings bisher nichts bekannt und es bedarf hier weiterer Studien, um die Funktion von Cldn3 und den hier gezeigten regulierten Genen weiter zu untersuchen.

Interessanterweise führte die Cldn3-Deletion zu einer Regulierung der Expression diverser Adhäsionsmoleküle (Tab. 12), jedoch nicht zu einer Über- oder Unterexpression von anderen Claudinen (Tab. 13). Mit Hilfe von RealTime-PCR Analysen konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits eine signifikante Hochregulation von Cldn4 und -10 an Tag 6,5 und 8,5 pc in der Implantationskammer gefunden werden (Xin Xin Wu, unveröffentlichte Daten). Dieses Ergebnis konnte mit dieser Transkriptomanalyse jedoch nicht bestätigt werden. Obwohl hier keine signifikante Regulation anderer Claudine in der Implantationsstelle der Cldn3KO-Maus gefunden werden konnte, bleibt die Möglichkeit eines kompensatorischen Effekts anderer Claudine bestehen. Zum einen, da eine Hochregulation von Cldn4 und -10, wie erwähnt mittels der im Vergleich zum Array sensitiveren Methode der RealTime-PCR gefunden werden konnte, zum anderen da auch kleinere Regulationen anderer oder auch mehrerer Claudine zusammengenommen einen signifikanten kompensatorischen Effekt aufweisen können, ohne eine im einzelnen sichtbare Überexpression aufzuweisen.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse der Transkriptomanalyse die Hypothese, dass die Deletion von *Cldn3* in der Dezidua einen negativen Einfluss auf die Dezidualisierung und Embryoimplantation hat.

5.3 Auswirkungen einer endometrialen *Cldn10*-Deletion auf die Reproduktion

In Vorstudien unserer Arbeitsgruppe konnte neben der Induktion von *Cldn3* auch eine spezifische Induktion von *Cldn10* in der Dezidua der murinen Implantationskammer zum Zeitpunkt der Implantation bereits an Tag 4,5 pc beobachtet werden, die bis Tag 8,5 pc beschrieben wurde (Schumann, 2015). Über die genaue Funktion von *Cldn10* in der Dezidua ist allerdings noch nichts bekannt. Da globale *Cldn10*KO-Mäuse nicht überlebensfähig sind, konnte bisher keine Aussage über die Bedeutung von *Cldn10* bei der Schwangerschaft getroffen werden. Deshalb bietet das in dieser Arbeit erzeugte konditionale *Cldn10*KO-Mausmodell erstmalig die Möglichkeit, die Funktion von *Cldn10* in der Schwangerschaft zu untersuchen.

5.3.1 Erzeugung eines Endometrium-spezifischen *Cldn10*-Knockouts mittels des Cre-lox-Systems

*Cldn10*KO-Mäuse sind nicht überlebensfähig, die neugeborenen Tiere sterben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (Seker et al., 2019). Deshalb wurde hier zur Untersuchung der Rolle von *Cldn10* in der Schwangerschaft ein konditionales Knockout-Mausmodell etabliert, das den Knockout von *Cldn10* spezifisch im Endometrium aufweist. Zur Erzeugung einer solchen Mauslinie wurde in dieser Arbeit das Cre-lox-System verwendet. Hierzu wurden „gefloxt“ Mäuse, bei denen das Target-Gen durch eine lox-P-Site flankiert wird (*Cldn10^{fl/fl}*), mit einer Cre-Linie gekreuzt, die das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors des Progesteronrezeptors (PR) besitzt (*PR^{Cre/+}*). Diese Cre-Linie wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits verwendet, um einen Endometrium-spezifischen Knockout des Gap-Junction Proteins *Cx26* herzustellen (Bienek, 2011). Der PR wird im Endometrium sowohl im Epithel als auch im Stroma exprimiert (Mote et al., 2006), und stellt somit einen geeigneten Promoter für die Cre-Rekombinase dar, um *Cldn10*, das sowohl im

luminalen und glandulären Epithel des zyklischen Endometriums als auch in der Dezidua, die aus Stromazellen gebildet wird, exprimiert wird, auszuschalten.

In dieser Arbeit konnte ein solches Mausmodell erfolgreich etabliert werden. Es konnte mithilfe von immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass das Cldn10-Protein in den Cldn10KO-Mäusen (Cldn10^{fl/fl}PR^{Cre/+}) sowohl in den Epithelien des zyklischen Endometriums als auch in der Dezidua der frühen Schwangerschaft nicht mehr vorhanden war. Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität des Knockouts wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Kolongewebe, in dem Cldn10 nachgewiesenermaßen exprimiert ist (Holmes et al., 2006), von WT- und Cldn10KO-Mäusen durchgeführt, bei denen sich zeigte, dass das Protein im Kolon beider Mauslinien vorhanden war. Die konditionalen Cldn10KO-Mäuse beider Geschlechter zeigten keinen gesundheitsbeeinträchtigenden Phänotypen.

5.3.2 Einfluss der Cldn10-Deletion im Endometrium auf die Fertilität

In dieser Arbeit brachte keine der weiblichen Endometrium-spezifischen Cldn10KO-Mäuse Nachkommen zur Welt. Um sicherzustellen, dass die Nachkommen nicht innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt verstarben und durch die Elterntiere gefressen wurden, wurden die Verpaarungen stets terminiert durchgeführt und die Muttertiere während der ganzen Schwangerschaft regelmäßig beobachtet. Um den Zeitpunkt der potenziellen Geburt herum wurden regelmäßig Wurfkontrollen durchgeführt. Zu keinem Zeitpunkt wurden Schwangerschaftsanzeichen bei den Muttertieren oder neugeborene Tiere im Haltungskäfig beobachtet. Deshalb wurde geschlussfolgert, dass diese Cldn10KO-Tiere infertil sind.

Aufgrund dieser Beobachtungen entwickelte sich die Fragestellung, in welchem Stadium die Schwangerschaft scheiterte. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass durch die Cldn10-Deletion im Endometrium die Zusammensetzung des Uterussekrets in einem Maße verändert war, dass bereits vor der Implantation die Befruchtung der Eizelle und deren Entwicklung zur Blastozyste fehlerhaft war. Zum anderen könnte eine veränderte Rezeptivität des Uterus eine Adhäsion und Implantation der Blastozyste verhindern, sodass die Cldn10KO-Mäuse erst gar nicht schwanger wurden. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass nachfolgende Prozesse der Embryoimplantation und Dezidualisierung gestört waren, sodass sich die Embryonen nicht bis zu einem Stadium entwickeln konnten, um äußere

Schwangerschaftsanzeichen an den Cldn10KO-Mäusen zu zeigen. Um dies genauer zu untersuchen wurden terminierte Verpaarungen durchgeführt, und die Uteri ab Tag 5,5 pc, an dem eine Implantation der Blastozyste auch makroskopisch sichtbar ist, entnommen. In diesem Schwangerschaftsstadium konnten in den Cldn10KO-Mäusen makroskopisch und histologisch Implantationsstellen identifiziert werden, es kam also zuvor zu einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle und deren Entwicklung zur Blastozyste. Allerdings wiesen die in dieser Arbeit untersuchten Implantationsstellen der Cldn10KO-Mäuse deutliche Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrollmäusen auf.

Makroskopisch konnten ab Tag 5,5 pc Implantationsstellen in den präparierten Uteri erkannt werden, diese waren jedoch oft kleiner und nicht sehr deutlich voneinander abgrenzbar im Vergleich zu den Implantationsstellen der WT-Mäuse und wirkten aufgrund ihrer blässeren Färbung weniger gut durchblutet. Bisherige histologische Analysen der Implantationskammern zeigten, dass während an Tag 5,5 pc noch eine einsetzende Bildung der primären Dezidua um die Blastozyste zu beobachten war, ab Tag 6,5 pc deutliche Entwicklungsbeeinträchtigungen des Embryos sichtbar waren, bis dieser an Tag 8,5 pc weitgehend resorbiert war. Die Ausbildung der Dezidua war in reduzierter Form allerdings noch zu beobachten. Somit hatten Implantationen stattgefunden. Cldn10 ist auch im glandulären Epithel in allen Phasen des Östruszyklus und im Diöstrus auch im luminalen Epithel des Endometriums von WT-Mäusen exprimiert. Aufgrund dieser speziellen Regulation des Cldn10 im luminalen Epithel ließe sich eine Beteiligung des Proteins an der zyklischen Umstrukturierung des Endometriums zur Erlangung eines rezeptiven Zustandes und an Zusammensetzung der uterinen Flüssigkeiten vermuten (Harris et al., 2005). Allerdings scheint das Cldn10-Defizit der Endometrium-spezifischen Cldn10KO-Mäuse keinen offensichtlichen Einfluss auf die Befruchtung der Eizelle, deren Entwicklung zur Blastozyste und die Adhäsion und Penetration des Uterusepithels zu haben. Ob es durch die Cldn10-Deletion zu einer vermehrten Zahl früher Resorptionen der Embryonen vor Tag 5,5 pc kam, müsste durch die Auswertung von Serienschnitten von Uteri an diesen Schwangerschaftsstadien evaluiert werden, da nur so zuverlässig die Anzahl der Implantationsstellen bestimmt werden kann.

Offensichtlich ist jedoch die weitere Embryonalentwicklung gestört, was in einer Beeinträchtigung der Dezidua-differenzierung begründet sein könnte. Die Mechanismen, die dieser Störung der Progression der Schwangerschaft zugrunde

liegen, könnten z. B. die Proliferation der Dezidua, die Angiogenese, oder auch die intrauterine Immunmodulation betreffen und müssten in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Cldn10 existiert wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben in zwei Splice-Varianten, Cldn10a und Cldn10b. Während die Expression von Cldn10a auf die Niere beschränkt ist, konnte Cldn10b in mehreren Geweben wie den Schweißdrüsen, Niere, Gehirn, Lunge und Pankreas nachgewiesen werden (Breiderhoff et al., 2012; Günzel et al., 2009; Inai et al., 2005; Van Itallie et al., 2006). In diesen Studien wurde gezeigt, dass Cldn10a den parazellulären Anionentransport reguliert, und Cldn10b für den parazellulären Kationentransport verantwortlich ist. Über das Vorkommen der Splice-Varianten von Cldn10 im Endometrium ist bisher nichts bekannt. Es existieren keine spezifischen Antikörper, sodass eine Unterscheidung der Splice-Varianten mit Methoden wie der Immunhistochemie oder dem Westernblot nicht möglich ist. In der murinen Plazenta wurde bereits ausschließlich Cldn10b mittels RealTime PCR nachgewiesen (Ahn et al., 2015). Entsprechende Untersuchungen für das Endometrium bzw. die Dezidua stehen noch aus.

Diverse Cldn10-Mutationen wurden in Verbindung mit Pathologien gebracht. So konnte eine gestörte Funktion von Cldn10 bei Symptomen wie Hypohidrose, Mundtrockenheit, Alacrima, Polyurie, dem HELIX-Syndrom, Hypokalziurie und Hypokaliämie beobachtet werden (Hadj-Rabia et al., 2018). Die Cldn10-Mutationen hatten dabei Auswirkungen auf die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle, TJ-Strangformation und die Ionenkanalfunktion des Proteins und führten schlussendlich zu einer verringerten NA^+ -Permeabilität der Zellen (Milatz, 2019).

Wie auch Cldn3, lässt sich die Expression von Cldn10 in Verbindung bringen mit der Progression verschiedener Tumore. So konnte eine Förderung des malignen Typs des Osteosarkoms via des JAK1/Stat1-Signalwegs durch Cldn10 gezeigt werden (X. Zhang et al., 2019), eine Assoziation der Cldn10-Expression und der Tumorprogression und Metastasierung von papillärem Schilddrüsenkrebs und Lymphknotentumoren (Xiang et al., 2020; Y. Zhou et al., 2018), oder Cldn10 als Biomarker für das Klarzellkarzinom der Niere postuliert werden (Yang et al., 2021).

Viele dieser Pathologien liegt ein gestörter Ionenhaushalt zugrunde. Da die Dezidua in der frühen Schwangerschaft die Nährstoffversorgung des Embryos kontrolliert und auch die Interaktion des Embryos mit dem maternalen Immunsystem bestimmt, ist hier

zu vermuten, dass die Cldn10-Deletion eine beträchtliche Störung des Ionenhaushalts hervorruft, die die Funktionen der Dezidua maßgeblich einschränken und letztendlich zu einer gestörten Embryoimplantation in den Cldn10KO-Mäusen führen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zur Fertilität der Endometrium-spezifischen Cldn10KO-Mäuse stellen eine erste Analyse der Rolle von Cldn10 während der Schwangerschaft dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Cldn10KO-Mäuse infertil sind und dass diese Infertilität mit großer Wahrscheinlichkeit durch gestörte Prozesse bei der Implantation des Embryos in die Dezidua verursacht wird.

5.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die Funktion von Cldn3 und Cldn10, deren Expression im zyklischen Endometrium und deren zeitlich und räumlich spezifische Induktion in der Dezidua zuvor bereits nachgewiesen wurde (Schumann et al., 2015), anhand zwei verschiedener Knockout-Mausmodelle untersucht. Cldn3KO-Mäuse erwiesen sich als fertil. Sie zeigten lediglich eine leichte Reduktion der Wurfgröße und ein reduziertes Gewicht der pränatalen Embryonen. Da bekannt ist, dass globale Cldn10KO-Mäuse nicht überlebensfähig sind, wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell erzeugt, das einen konditionalen Knockout des Cldn10 im Endometrium aufweist. Diese Mäuse wiesen selbst keine Einschränkungen in ihrer Vitalität auf, konnten jedoch keine lebenden Nachkommen erzeugen. Nach bisherigen Erkenntnissen sind die generellen Funktionen von Cldn3 und -10 sehr unterschiedlich. Während für Cldn3 postuliert wird, die Barrierefunktion von Epithelien zu verstärken und diese zu „versiegeln“ (Milatz et al., 2010), scheint Cldn10 wesentlich am parazellulären Kationen- und Anionentransport beteiligt zu sein (Breiderhoff et al., 2012; Günzel et al., 2009). Eine veränderte Cldn3-Expression trägt vor allen in malignen Geweben, einschließlich Tumoren des Reproduktionstrakts, zur Pathogenese bei (Pan et al., 2007), wohingegen eine gestörte Funktion von Cldn10 mit diversen Krankheitsbildern, die mit gestörten Ionentransportprozessen assoziiert werden, in Verbindung gebracht wurde (Milatz, 2019). Sollte Cldn3 eine wesentliche Rolle bei der Implantation und Etablierung der Schwangerschaft spielen, kann der Effekt der Cldn3-Deletion auf die Fertilität der Tiere offensichtlich durch andere Claudine bzw. andere Kompensationsmechanismen aufgefangen werden. Dies scheint bei einer

endometrialen Cldn10-Deletion nicht möglich zu sein, da diese Deletion eine Infertilität der Tiere zufolge hat. Das hier erzeugte konditionale Cldn10KO-Mausmodell bietet eine gute Möglichkeit, um die Relevanz von Cldn10 für Krankheitsbilder, die in einer Infertilität resultieren, zu untersuchen. Ob das Cldn10 auch bei Pathologien des weiblichen Reproduktionstrakts des Menschen, wie Präeklampsie, Endometriose oder diversen Karzinomen eine Rolle spielen könnte, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

Diese Arbeit trägt dazu bei, das Bild über das feine Zusammenspiel zwischen mehreren Claudinen während der Schwangerschaft und deren distinktive Expression und Funktion während der Schwangerschaft zu vervollständigen. Besonders die Infertilität der Cldn10KO-Mäuse verdeutlicht, dass die Ausbildung von TJ und Zellkontakten in der Dezidua von essenzieller Bedeutung ist, um eine maternal-fetale Kommunikation und eine erfolgreiche Implantation und Etablierung einer Schwangerschaft zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Das Endometrium stellt eines der plastischsten Gewebe des Organismus dar. In Vorbereitung auf eine Schwangerschaft sowie bei deren Etablierung und Aufrechterhaltung unterliegt es drastischen hormonell regulierten Umstrukturierungen. Einen Teil dieser Umstrukturierungen betrifft die Ausbildung von Zell-Zellkontakten. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung einer Deletion der Tight junction Proteine Cldn3 bzw. Cldn10, die im Epithel des zyklischen Endometriums exprimiert sind und in der frühen Dezidua spezifisch induziert werden, auf die Implantation, Dezidualisierung und Embryoentwicklung anhand zweier Knockout-Mausmodelle zu untersuchen. Die Cldn3KO-Mäuse zeigten nur eine gering eingeschränkte Fertilität und hatten vitale Nachkommen. Bei der Untersuchung der Implantationsstellen zu unterschiedlichen Schwangerschaftszeitpunkten wurde jedoch festgestellt, dass die Implantationskammern der Cldn3KO-Mäuse an 6,5 und 8,5 dpc ein signifikant verringertes Gewicht im Vergleich zu den WT-Kontrollen aufwiesen. Hierbei handelte es sich um einen maternalen Effekt. Histologische Analysen zeigten eine verminderte Invasionstiefe des Trophoblasten an Tag 8,5 pc. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte kein Einfluss der Cldn3-Deletion auf die Vaskularisierung der Dezidua gefunden werden. Eine Transkriptomanalyse zeigte eine Reihe von differenziell regulierten Genen in der Dezidua der Cldn3KO- im Vergleich zur WT-Maus, von denen bekannt ist, eine Rolle bei der Implantation und Dezidualisierung zu spielen. Die hier beobachtete fehlerhafte Dezidualisierung führte zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung der Embryonen in den Cldn3KO-Müttern an Tag 17,5 pc. Da Cldn10KO-Mäuse nicht überlebensfähig sind, wurde in dieser Arbeit erfolgreich mittels des Cre-lox-Systems eine Endometrium-spezifische Cldn10KO-Maus erzeugt. Es konnte beobachtet werden, dass diese Mäuse infertil sind. In histologischen Analysen früher Schwangerschaftsstadien zeigte sich, dass in diesen Mäusen eine fehlerhafte Implantation vorliegt, die zu einer Resorption der Embryonen bis 8,5 dpc resultiert. In dieser Arbeit wurden somit unterschiedlich stark ausgeprägte Auswirkungen der beiden Claudindeletionen auf die Schwangerschaft gefunden, die Anhaltspunkte für eine sehr differenzierte Funktion der verschiedenen Claudine im Endometrium liefern.

7. Summary

The endometrium constitutes one of the most plastic tissues in the organism. It undergoes drastic hormonally regulated changes during preparation, establishment and maintenance of pregnancy. A part of these changes comprises the regulation of cell-cell contacts. The aim of this study was to analyse the effect of the deletion of the tight junction proteins *cldn3* and *cldn10*, which are both expressed in the epithelium of the murine cyclic endometrium and are specifically induced in the decidua, with regard to the processes of implantation, decidualization and embryo development by the use of two knockout mouse models. *cldn3*KO mice showed only a slightly impaired fertility and delivered healthy offspring. Analysis of implantation sites at different stages of pregnancy revealed a significantly reduced weight at 6.5 and 8.5 dpc in *cldn3*KO mice compared to wt mice. This was shown to be a maternal effect. Histological analyses showed a decreased invasion depth of the invasive trophoblast at 8.5 dpc. By means of immunofluorescence staining no impairment of the vascularization in the decidua of *cldn3*KO mice compared to wt mice was observed. Transcriptome analysis of decidual tissue at 8.5 dpc revealed a differential regulation of a set of genes involved in decidualization and implantation in *cldn3*KO mice compared to wt mice. The impaired decidualization found in *cldn3*KO mice resulted in a decreased intrauterine weight of the embryos at 17.5 dpc compared to the wt mice.

Since *cldn10*KO mice are not viable, a mouse strain which displays a conditional knockout of *cldn10* in the endometrium was successfully generated in this study. These mice turned out to be infertile. Histological analyses of early stages of pregnancy showed an impaired implantation process resulting in a resorption of the embryos until 8.5 dpc.

In this study the endometrial deletion of the two different claudins showed very diverse consequences on the process of pregnancy, pointing to differential functions of different claudins in the endometrium.

8. Literaturverzeichnis

- Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, *12*(6), 731-746.
- Adu-Gyamfi, E. A., Czika, A., Gorleku, P. N., Ullah, A., Panhwar, Z., Ruan, L. L., Ding, Y. B., & Wang, Y. X. (2021). The Involvement of Cell Adhesion Molecules, Tight Junctions, and Gap Junctions in Human Placentation. *Reprod Sci*, *28*(2), 305-320.
- Ahn, C., Yang, H., Lee, D., An, B. S., & Jeung, E. B. (2015). Placental claudin expression and its regulation by endogenous sex steroid hormones. *Steroids*, *100*, 44-51.
- Ain, R., Canham, L. N., & Soares, M. J. (2003). Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol*, *260*(1), 176-190.
- Alam, S. M., Konno, T., & Soares, M. J. (2015). Identification of target genes for a prolactin family paralog in mouse decidua. *Reproduction*, *149*(6), 625-632.
- Amasheh, S., Fromm, M., & Gunzel, D. (2011). Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)*, *201*(1), 133-140.
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2008). Tight junctions. *Curr Biol*, *18*(20), R941-943.
- Aplin, J. D., & Ruane, P. T. (2017). Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci*, *130*(1), 15-22.
- Asano, A., Asano, K., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium. *Curr Biol*, *13*(12), 1042-1046.
- Balda, M. S., Garrett, M. D., & Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*, *160*(3), 423-432.
- Ben-Yosef, T., Belyantseva, I. A., Saunders, T. L., Hughes, E. D., Kawamoto, K., Van Itallie, C. M., Beyer, L. A., Halsey, K., Gardner, D. J., Wilcox, E. R., Rasmussen, J., Anderson, J. M., Dolan, D. F., Forge, A., Raphael, Y., Camper, S. A., & Friedman, T. B. (2003). Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*, *12*(16), 2049-2061.
- Berkhout, R. P., Lambalk, C. B., Repping, S., Hamer, G., & Mastenbroek, S. (2020). Premature expression of the decidualization marker prolactin is associated with repeated implantation failure. *Gynecol Endocrinol*, *36*(4), 360-364.
- Bevilacqua, E., Lorenzon, A. R., Bandeira, C. L., & Hoshida, M. S. (2014). 10 - Biology of the Ectoplacental Cone. In B. A. Croy, A. T. Yamada, F. J. DeMayo, & S. L. Adamson (Eds.), *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (pp. 113-124). Academic Press.
- Bienek, M. (2011). *Effekt einer Endometrium-spezifischen Connexin 26 Deletion auf die Implantation des Embryos* [Universitätsklinikum Essen].
- Black, J. D., Lopez, S., Cocco, E., Schwab, C. L., English, D. P., & Santin, A. D. (2015). Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) and CPE-binding domain (c-CPE) for the detection and treatment of gynecologic cancers. *Toxins (Basel)*, *7*(4), 1116-1125.
- Breiderhoff, T., Himmerkus, N., Stuiver, M., Mutig, K., Will, C., Meij, I. C., Bachmann, S., Bleich, M., Willnow, T. E., & Muller, D. (2012). Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(35), 14241-14246.

- Breiderhoff, T., Himmerkus, N., Drewell, H., Plain, A., Gunzel, D., Mutig, K., Willnow, T. E., Muller, D., & Bleich, M. (2018). Deletion of claudin-10 rescues claudin-16-deficient mice from hypomagnesemia and hypercalciuria. *Kidney Int*, *93*(3), 580-588.
- Bu, P., Alam, S. M., Dhakal, P., Vivian, J. L., & Soares, M. J. (2016). A Prolactin Family Paralog Regulates Placental Adaptations to a Physiological Stressor. *Biol Reprod*, *94*(5), 107.
- Buck, V. U., Windoffer, R., Leube, R. E., & Classen-Linke, I. (2012). Redistribution of adhering junctions in human endometrial epithelial cells during the implantation window of the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol*, *137*(6), 777-790.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*, *7*(4), e35538.
- Candeloro, L., & Zorn, T. M. (2007). Granulated and non-granulated decidual prolactin-related protein-positive decidual cells in the pregnant mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol*, *57*(2), 122-132.
- Capaldo, C. T., Koch, S., Kwon, M., Laur, O., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2011). Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell*, *22*(10), 1677-1685.
- Cha, J., & Dey, S. K. (2014). Cadence of procreation: orchestrating embryo-uterine interactions. *Semin Cell Dev Biol*, *34*, 56-64.
- Chau, K., Hennessy, A., & Makris, A. (2017). Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens*, *31*(12), 782-786.
- Claude, P., & Goodenough, D. A. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol*, *58*(2), 390-400.
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol*, *39*(2-3), 219-232.
- Colegio, O. R., Van Itallie, C. M., McCrea, H. J., Rahner, C., & Anderson, J. M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *283*(1), C142-147.
- Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C., & Anderson, J. M. (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol*, *284*(6), C1346-1354.
- Collins, M. M., Baumholtz, A. I., Simard, A., Gregory, M., Cyr, D. G., & Ryan, A. K. (2015). Claudin-10 is required for relay of left-right patterning cues from Hensen's node to the lateral plate mesoderm. *Dev Biol*, *401*(2), 236-248.
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., & De Mayo, F. J. (2001). Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol*, *179*(1-2), 97-103.
- Couse, J. F., & Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, *20*(3), 358-417.
- Cowell, T. P. (1969). Implantation and development of mouse eggs transferred to the uteri of non-progestational mice. *J Reprod Fertil*, *19*(2), 239-245.
- Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L., & Johnson, L. G. (2003). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *285*(5), L1166-1178.
- D'Souza, T., Agarwal, R., & Morin, P. J. (2005). Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, *280*(28), 26233-26240.

- Daly, D. C., Maslar, I. A., & Riddick, D. H. (1983). Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *Am J Obstet Gynecol*, *145*(6), 672-678.
- Das, S. K. (2010). Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by Hoxa-10. *Mol Reprod Dev*, *77*(5), 387-396.
- Daugherty, B. L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J. D., & Koval, M. (2007). Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem*, *282*(41), 30005-30013.
- de Oliveira, S. S., de Oliveira, I. M., De Souza, W., & Morgado-Diaz, J. A. (2005). Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett*, *579*(27), 6179-6185.
- de Ziegler, D., Fanchin, R., de Moustier, B., & Bulletti, C. (1998). The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol*, *39*(1-2), 149-166.
- Diamond, J. M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*, *20*(1), 10-18.
- Diaz-Coranguéz, M., Liu, X., & Antonetti, D. A. (2019). Tight Junctions in Cell Proliferation. *Int J Mol Sci*, *20*(23).
- Dickson, A. D. (1963). Trophoblastic Giant Cell Transformation of Mouse Blastocysts. *J Reprod Fertil*, *6*, 465-466.
- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., Cao, J., & Chen, Y. H. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*, *142*(2), 305-315.
- Enders, A. C., & Schlafke, S. (1969). Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat*, *125*(1), 1-29.
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, *17*, 375-412.
- Fawcett, D. W., Wislocki, G. B., & Waldo, C. M. (1947). The development of mouse ova in the anterior chamber of the eye and in the abdominal cavity. *Am J Anat*, *81*(3), 413-443.
- Feldman, G. J., Mullin, J. M., & Ryan, M. P. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev*, *57*(6), 883-917.
- Fisher, S. J., & Damsky, C. H. (1993). Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol*, *4*(3), 183-188.
- Fujita, K., Katahira, J., Horiguchi, Y., Sonoda, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2000). Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett*, *476*(3), 258-261.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, *123*(6 Pt 2), 1777-1788.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, *127*(6 Pt 1), 1617-1626.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, *141*(7), 1539-1550.
- Furuse, M., Sasaki, H., & Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*, *147*(4), 891-903.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., & Tsukita, S. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*, *153*(2), 263-272.

- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., & Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, *156*(6), 1099-1111.
- Gaetje, R., Holtrich, U., Engels, K., Kissler, S., Rody, A., Karn, T., & Kaufmann, M. (2008). Differential expression of claudins in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Endocrinol*, *24*(8), 442-449.
- Garcia, M. A., Nelson, W. J., & Chavez, N. (2018). Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *10*(4).
- Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*, *35*(6), 851-905.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., & Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, *81*(1), 1-44.
- Gow, A., Southwood, C. M., Li, J. S., Pariali, M., Riordan, G. P., Brodie, S. E., Danias, J., Bronstein, J. M., Kachar, B., & Lazzarini, R. A. (1999). CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell*, *99*(6), 649-659.
- Gow, A., Davies, C., Southwood, C. M., Frolenkov, G., Chrustowski, M., Ng, L., Yamauchi, D., Marcus, D. C., & Kachar, B. (2004). Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci*, *24*(32), 7051-7062.
- Grund, S., & Grümmer, R. (2018). Direct Cell(-)Cell Interactions in the Endometrium and in Endometrial Pathophysiology. *Int J Mol Sci*, *19*(8).
- Gu, Y., Wan, J., Yao, L., Peng, N. N., & Chang, W. L. (2017). Plac1 Expression Pattern at the Mouse Fetomaternal Interface and Involvement in Trophoblast Differentiation. *Cell Physiol Biochem*, *43*(5), 2001-2009.
- Günzel, D., Stuiver, M., Kausalya, P. J., Haisch, L., Krug, S. M., Rosenthal, R., Meij, I. C., Hunziker, W., Fromm, M., & Muller, D. (2009). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*, *122*(Pt 10), 1507-1517.
- Günzel, D., & Fromm, M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*, *2*(3), 1819-1852.
- Gupta, I. R., & Ryan, A. K. (2010). Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet*, *77*(4), 314-325.
- Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M., & Smahi, A. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, *127*(5), 1386-1390.
- Hadj-Rabia, S., Brideau, G., Al-Sarraj, Y., Maroun, R. C., Figueres, M. L., Leclerc-Mercier, S., Olinger, E., Baron, S., Chaussain, C., Nochy, D., Taha, R. Z., Knebelmann, B., Joshi, V., Curmi, P. A., Kambouris, M., Vargas-Poussou, R., Bodemer, C., Devuyst, O., Houillier, P., & El-Shanti, H. (2018). Multiplex epithelium dysfunction due to CLDN10 mutation: the HELIX syndrome. *Genet Med*, *20*(2), 190-201.
- Harder, J. L., & Margolis, B. (2008). SnapShot: tight and adherens junction signaling. *Cell*, *133*(6), 1118, 1118 e1111-1112.
- Harris, S. E., Gopichandran, N., Picton, H. M., Leese, H. J., & Orsi, N. M. (2005). Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*, *64*(4), 992-1006.

- Hashimoto, K., Oshima, T., Tomita, T., Kim, Y., Matsumoto, T., Joh, T., & Miwa, H. (2008). Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(1), 154-157.
- Hewitt, K. J., Agarwal, R., & Morin, P. J. (2006). The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, 6, 186.
- Hirabayashi, S., Tajima, M., Yao, I., Nishimura, W., Mori, H., & Hata, Y. (2003). JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol*, 23(12), 4267-4282.
- Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E., & Anderson, J. M. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns*, 6(6), 581-588.
- Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A. S., Hou, M., Paul, D. L., Waldegger, S., & Goodenough, D. A. (2009). Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36), 15350-15355.
- Hsieh-Li, H. M., Witte, D. P., Weinstein, M., Branford, W., Li, H., Small, K., & Potter, S. S. (1995). Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development*, 121(5), 1373-1385.
- Hu, D., & Cross, J. C. (2010). Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int J Dev Biol*, 54(2-3), 341-354.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171(6), 939-945.
- Illera, M. J., Cullinan, E., Gui, Y., Yuan, L., Beyler, S. A., & Lessey, B. A. (2000). Blockade of the alpha(v)beta(3) integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol Reprod*, 62(5), 1285-1290.
- Inai, T., Sengoku, A., Guan, X., Hirose, E., Iida, H., & Shibata, Y. (2005). Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol*, 68(5), 349-360.
- Irwin, J. C., Kirk, D., King, R. J., Quigley, M. M., & Gwatkin, R. B. (1989). Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril*, 52(5), 761-768.
- Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N., & Toyoda, N. (2002). The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*, 17(6), 1441-1446.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999a). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 147(6), 1351-1363.
- Itoh, M., Morita, K., & Tsukita, S. (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*, 274(9), 5981-5986.
- Jabbour, H. N., & Critchley, H. O. (2001). Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction*, 121(2), 197-205.
- Joswig, A., Gabriel, H. D., Kibschull, M., & Winterhager, E. (2003). Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 44.

- Kage, H., Flodby, P., Zhou, B., & Borok, Z. (2019). Dichotomous roles of claudins as tumor promoters or suppressors: lessons from knockout mice. *Cell Mol Life Sci*, 76(23), 4663-4672.
- Kaneko, Y., Day, M. L., & Murphy, C. R. (2011). Integrin beta3 in rat blastocysts and epithelial cells is essential for implantation in vitro: studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection. *Hum Reprod*, 26(7), 1665-1674.
- Katahira, J., Sugiyama, H., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M., & Sugimoto, N. (1997). Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem*, 272(42), 26652-26658.
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N., & Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*, 378(6552), 85-88.
- Kim, J. J., Buzzio, O. L., Li, S., & Lu, Z. (2005). Role of FOXO1A in the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrial cells: interaction with progesterone receptor. *Biol Reprod*, 73(4), 833-839.
- Kimura, F., Takakura, K., Takebayashi, K., Ishikawa, H., Kasahara, K., Goto, S., & Noda, Y. (2001). Messenger ribonucleic acid for the mouse decidual prolactin is present and induced during in vitro decidualization of endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol*, 15(6), 426-432.
- Kirby, D. R. (1963). Development of the mouse blastocyst transplanted to the spleen. *J Reprod Fertil*, 5, 1-12.
- Klentzeris, L. D., Bulmer, J. N., Trejdosiewicz, L. K., Morrison, L., & Cooke, I. D. (1993). Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum Reprod*, 8(8), 1223-1230.
- Kollmar, R., Nakamura, S. K., Kappler, J. A., & Hudspeth, A. J. (2001). Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18), 10196-10201.
- Kominsky, S. L., Vali, M., Korz, D., Gabig, T. G., Weitzman, S. A., Argani, P., & Sukumar, S. (2004). Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*, 164(5), 1627-1633.
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakaloglu, S. A., Hediger, M. A., Gallati, S., Neuhauss, S. C., Nurnberg, P., & Weber, S. (2006). Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet*, 79(5), 949-957.
- Kooij, G., Kopplin, K., Blasig, R., Stuiver, M., Koning, N., Goverse, G., van der Pol, S. M., van Het Hof, B., Gollasch, M., Drexhage, J. A., Reijerkerk, A., Meij, I. C., Mebius, R., Willnow, T. E., Muller, D., Blasig, I. E., & de Vries, H. E. (2014). Disturbed function of the blood-cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation. *Acta Neuropathol*, 128(2), 267-277.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., & Blasig, I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), 631-645.
- Krug, S. M., Gunzel, D., Conrad, M. P., Lee, I. F., Amasheh, S., Fromm, M., & Yu, A. S. (2012). Charge-selective claudin channels. *Ann N Y Acad Sci*, 1257, 20-28.
- Kummer, D., & Ebnet, K. (2018). Junctional Adhesion Molecules (JAMs): The JAM-Integrin Connection. *Cells*, 7(4).
- Lal-Nag, M., & Morin, P. J. (2009). The claudins. *Genome Biol*, 10(8), 235.

- Lapointe, S., Bilodeau, J. F., Lemieux, D., Asselin, E., Fortier, M. A., & Sirard, M. A. (2000). Epithelial and stromal uterine cells cultured in vitro protect bovine sperm from hydrogen peroxide. *Theriogenology*, *54*(3), 355-369.
- Lee, K., Ansar, M., Andrade, P. B., Khan, B., Santos-Cortez, R. L., Ahmad, W., & Leal, S. M. (2012). Novel CLDN14 mutations in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*, *158A*(2), 315-321.
- Lee, K. Y., Jeong, J. W., Tsai, S. Y., Lydon, J. P., & DeMayo, F. J. (2007). Mouse models of implantation. *Trends Endocrinol Metab*, *18*(6), 234-239.
- Lee, S. E., Lee, S. Y., & Lee, K. A. (2013). Rhox in mammalian reproduction and development. *Clin Exp Reprod Med*, *40*(3), 107-114.
- Lessey, B. A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S. M., & Buck, C. A. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest*, *90*(1), 188-195.
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Buck, C. A., Lei, Y., Yowell, C. W., & Sun, J. (1994). Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril*, *62*(3), 497-506.
- Li, Y., Sun, X., & Dey, S. K. (2015). Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell Rep*, *11*(3), 358-365.
- Liang, X., Zhang, X. H., Han, B. C., Lei, W., Qi, Q. R., Wang, T. S., Gu, X. W., & Yang, Z. M. (2013). Progesterone and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor regulate the expression of tight junction protein Claudin-3 during early pregnancy. *Fertil Steril*, *100*(5), 1410-1418.
- Lievano, S., Alarcon, L., Chavez-Munguia, B., & Gonzalez-Mariscal, L. (2006). Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell Tissue Res*, *324*(3), 433-448.
- Lim, H. J., & Wang, H. (2010). Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest*, *120*(4), 1004-1015.
- Lim, T. S., Vedula, S. R., Hunziker, W., & Lim, C. T. (2008). Kinetics of adhesion mediated by extracellular loops of claudin-2 as revealed by single-molecule force spectroscopy. *J Mol Biol*, *381*(3), 681-691.
- Loh, Y. H., Christoffels, A., Brenner, S., Hunziker, W., & Venkatesh, B. (2004). Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*. *Genome Res*, *14*(7), 1248-1257.
- Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., & Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(23), 11162-11166.
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O. M., & O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, *9*(18), 2266-2278.
- Ma, W. G., Song, H., Das, S. K., Paria, B. C., & Dey, S. K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(5), 2963-2968.
- Maslar, I. A., & Riddick, D. H. (1979). Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, *135*(6), 751-754.
- Matter, K., & Balda, M. S. (1998). Biogenesis of tight junctions: the C-terminal domain of occludin mediates basolateral targeting. *J Cell Sci*, *111* (Pt 4), 511-519.

- Mendoza-Rodriguez, C. A., Gonzalez-Mariscal, L., & Cerbon, M. (2005). Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Cell Tissue Res*, *319*(2), 315-330.
- Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Gunzel, D., Muller, D., Schulzke, J. D., Amasheh, S., & Fromm, M. (2010). Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*, *1798*(11), 2048-2057.
- Milatz, S. (2019). A Novel Claudinopathy Based on Claudin-10 Mutations. *Int J Mol Sci*, *20*(21).
- Mitchell, L. A., Overgaard, C. E., Ward, C., Margulies, S. S., & Koval, M. (2011). Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *301*(1), L40-49.
- Miyamoto, T., Morita, K., Takemoto, D., Takeuchi, K., Kitano, Y., Miyakawa, T., Nakayama, K., Okamura, Y., Sasaki, H., Miyachi, Y., Furuse, M., & Tsukita, S. (2005). Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol*, *169*(3), 527-538.
- Mohamed, O. A., Jonnaert, M., Labelle-Dumais, C., Kuroda, K., Clarke, H. J., & Dufort, D. (2005). Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(24), 8579-8584.
- Moog-Lutz, C., Cave-Riant, F., Guibal, F. C., Breau, M. A., Di Gioia, Y., Couraud, P. O., Cayre, Y. E., Bourdoulous, S., & Lutz, P. G. (2003). JAML, a novel protein with characteristics of a junctional adhesion molecule, is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Blood*, *102*(9), 3371-3378.
- Moore, T., & Dveksler, G. S. (2014). Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *Int J Dev Biol*, *58*(2-4), 273-280.
- Mori, M., Bogdan, A., Balassa, T., Csabai, T., & Szekeres-Bartho, J. (2016). The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Semin Immunopathol*, *38*(6), 635-649.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol*, *147*(1), 185-194.
- Moriwaki, K., Tsukita, S., & Furuse, M. (2007). Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, *312*(2), 509-522.
- Mote, P. A., Arnett-Mansfield, R. L., Gava, N., deFazio, A., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O. M., & Clarke, C. L. (2006). Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. *Endocrinology*, *147*(12), 5503-5512.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., & Conneely, O. M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, *289*(5485), 1751-1754.
- Murray, A., Sienerth, A. R., & Hemberger, M. (2016). Plet1 is an epigenetically regulated cell surface protein that provides essential cues to direct trophoblast stem cell differentiation. *Sci Rep*, *6*, 25112.
- Nadano, D., Sugihara, K., Paria, B. C., Saburi, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Nakayama, J., & Fukuda, M. N. (2002). Significant differences between mouse and human trophinins are revealed by their expression patterns and targeted disruption of mouse trophinin gene. *Biol Reprod*, *66*(2), 313-321.
- Nakano, Y., Kim, S. H., Kim, H. M., Sanneman, J. D., Zhang, Y., Smith, R. J., Marcus, D. C., Wangemann, P., Nessler, R. A., & Banfi, B. (2009). A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet*, *5*(8), e1000610.

- Nicholson, M. D., Lindsay, L. A., & Murphy, C. R. (2010). Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy. *Acta Histochem*, 112(1), 42-52.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161(3), 653-660.
- Oku, N., Sasabe, E., Ueta, E., Yamamoto, T., & Osaki, T. (2006). Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res*, 66(10), 5251-5257.
- Orchard, M. D., & Murphy, C. R. (2002). Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Acta Histochem*, 104(2), 149-155.
- Ozturk, S., & Demir, R. (2010). Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. *Histol Histopathol*, 25(9), 1215-1228.
- Pan, X. Y., Wang, B., Che, Y. C., Weng, Z. P., Dai, H. Y., & Peng, W. (2007). Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer*, 17(1), 233-241.
- Pan, X. Y., Li, X., Weng, Z. P., & Wang, B. (2009). Altered expression of claudin-3 and claudin-4 in ectopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 91(5), 1692-1699.
- Paria, B. C., Zhao, X., Das, S. K., Dey, S. K., & Yoshinaga, K. (1999). Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol*, 208(2), 488-501.
- Parr, M. B., & Parr, E. L. (1989). The Implantation Reaction. In R. M. Wynn & W. P. Jollie (Eds.), *Biology of the Uterus* (pp. 233-277). Springer US.
- Plaisier, M. (2011). Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25(3), 259-271.
- Poon, C. E., Madawala, R. J., Day, M. L., & Murphy, C. R. (2013). Claudin 7 is reduced in uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Histochem Cell Biol*, 139(4), 583-593.
- Rai, A., & Cross, J. C. (2014). Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol*, 387(2), 131-141.
- Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., & Turner, J. R. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*, 21(7), 1200-1213.
- Ramathal, C. Y., Bagchi, I. C., Taylor, R. N., & Bagchi, M. K. (2010). Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*, 28(1), 17-26.
- Rock, J., & Bartlett, M. K. (1937). Biopsy studies of human endometrium: criteria of dating and information about amenorrhea, menorrhagia, and time of ovulation. *J Am Med Assoc*, 108(24), 2022-2028.
- Rodriguez, A., Tripurani, S. K., Burton, J. C., Clementi, C., Larina, I., & Pangas, S. A. (2016). SMAD Signaling Is Required for Structural Integrity of the Female Reproductive Tract and Uterine Function During Early Pregnancy in Mice. *Biol Reprod*, 95(2), 44.
- Rogers, P. A., Murphy, C. R., Rogers, A. W., & Gannon, B. J. (1983). Capillary patency and permeability in the endometrium surrounding the implanting rat blastocyst. *Int J Microcirc Clin Exp*, 2(3), 241-249.
- Satokata, I., Benson, G., & Maas, R. (1995). Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature*, 374(6521), 460-463.

- Schröder, K. (2013). *Generierung und Charakterisierung eines Claudin-3-defizienten Mausmodells* [Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin].
- Schumann, S. (2015). *Immunmorphologische Untersuchungen zur Verteilung unterschiedlicher Claudin-Proteine im Endometrium und im Trophoblasten während der Embryoimplantation* [Dissertation, Universitätsklinikum Essen].
- Schumann, S., Buck, V. U., Classen-Linke, I., Wennemuth, G., & Grummer, R. (2015). Claudin-3, claudin-7, and claudin-10 show different distribution patterns during decidualization and trophoblast invasion in mouse and human. *Histochem Cell Biol*, *144*(6), 571-585.
- Seker, M., Fernandez-Rodriguez, C., Martinez-Cruz, L. A., & Muller, D. (2019). Mouse Models of Human Claudin-Associated Disorders: Benefits and Limitations. *Int J Mol Sci*, *20*(21).
- Sheehan, G. M., Kallakury, B. V., Sheehan, C. E., Fisher, H. A., Kaufman, R. P., Jr., & Ross, J. S. (2007). Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol*, *38*(4), 564-569.
- Simard, A., Di Pietro, E., Young, C. R., Plaza, S., & Ryan, A. K. (2006). Alterations in heart looping induced by overexpression of the tight junction protein Claudin-1 are dependent on its C-terminal cytoplasmic tail. *Mech Dev*, *123*(3), 210-227.
- Simmons, D. G. (2014). 12 - Postimplantation Development of the Chorioallantoic Placenta. In B. A. Croy, A. T. Yamada, F. J. DeMayo, & S. L. Adamson (Eds.), *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (pp. 143-161). Academic Press.
- Sineni, C. J., Yildirim-Baylan, M., Guo, S., Camarena, V., Wang, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Bademci, G., & Tekin, M. (2019). A truncating CLDN9 variant is associated with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Genet*, *138*(10), 1071-1075.
- Soares, M. J., Konno, T., & Alam, S. M. (2007). The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends Endocrinol Metab*, *18*(3), 114-121.
- Sobel, G., Nemeth, J., Kiss, A., Lotz, G., Szabo, I., Udvarhelyi, N., Schaff, Z., & Paska, C. (2006). Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, *103*(2), 591-598.
- Soma, T., Chiba, H., Kato-Mori, Y., Wada, T., Yamashita, T., Kojima, T., & Sawada, N. (2004). Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res*, *300*(1), 202-212.
- Someya, M., Kojima, T., Ogawa, M., Ninomiya, T., Nomura, K., Takasawa, A., Murata, M., Tanaka, S., Saito, T., & Sawada, N. (2013). Regulation of tight junctions by sex hormones in normal human endometrial epithelial cells and uterus cancer cell line Sawano. *Cell Tissue Res*, *354*(2), 481-494.
- Song, H., Lim, H., Das, S. K., Paria, B. C., & Dey, S. K. (2000). Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol*, *14*(8), 1147-1161.
- Staehelin, L. A. (1974). Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol*, *39*, 191-283.
- Steed, E., Rodrigues, N. T., Balda, M. S., & Matter, K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*, *10*, 95.
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, *359*(6390), 76-79.

- Takehara, M., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T., & Mizushima, T. (2009). Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 32(5), 825-831.
- Tamura, N., Sugihara, K., Akama, T. O., & Fukuda, M. N. (2011). Trophinin-mediated cell adhesion induces apoptosis of human endometrial epithelial cells through PKC-delta. *Cell Cycle*, 10(1), 135-143.
- Tanaka, M., Kamata, R., & Sakai, R. (2005). EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J Biol Chem*, 280(51), 42375-42382.
- Tei, C., Maruyama, T., Kuji, N., Miyazaki, T., Mikami, M., & Yoshimura, Y. (2003). Reduced expression of alphavbeta3 integrin in the endometrium of unexplained infertility patients with recurrent IVF-ET failures: improvement by danazol treatment. *J Assist Reprod Genet*, 20(1), 13-20.
- Tiwari-Woodruff, S. K., Buznikov, A. G., Vu, T. Q., Micevych, P. E., Chen, K., Kornblum, H. I., & Bronstein, J. M. (2001). OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J Cell Biol*, 153(2), 295-305.
- Turco, M. Y., & Moffett, A. (2019). Development of the human placenta. *Development*, 146(22).
- Turksen, K., & Troy, T. C. (2004). Barriers built on claudins. *J Cell Sci*, 117(Pt 12), 2435-2447.
- Valdes, C. T., Schutt, A., & Simon, C. (2017). Implantation failure of endometrial origin: it is not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium. *Fertil Steril*, 108(1), 15-18.
- Valdes, G., Corthorn, J., & Figueroa, C. D. (1998). The kallikrein-kinin system along the different stages of gestation: experimental and clinical findings. *Biol Res*, 31(3), 235-241.
- Valdes, G., Germain, A. M., Corthorn, J., Chacon, C., Figueroa, C. D., & Muller-Esterl, W. (2001). Tissue kallikrein and bradykinin B2 receptor in human uterus in luteal phase and in early and late gestation. *Endocrine*, 16(3), 207-215.
- Van Itallie, C., Rahner, C., & Anderson, J. M. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107(10), 1319-1327.
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (2003). Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(6), F1078-1084.
- Van Itallie, C. M., Colegio, O. R., & Anderson, J. M. (2004). The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J Membr Biol*, 199(1), 29-38.
- Van Itallie, C. M., Gambling, T. M., Carson, J. L., & Anderson, J. M. (2005). Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci*, 118(Pt 7), 1427-1436.
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 68, 403-429.
- Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J., & Anderson, J. M. (2006). Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(6), F1288-1299.
- Van Itallie, C. M., Betts, L., Smedley, J. G., 3rd, McClane, B. A., & Anderson, J. M. (2008). Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Biol Chem*, 283(1), 268-274.

- Volpe, D. A. (2011). Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med Chem*, 3(16), 2063-2077.
- Wan, L., Sun, D., Xie, J., Du, M., Wang, P., Wang, M., Lei, Y., Wang, H., Wang, H., & Dong, M. (2019). Declined placental PLAC1 expression is involved in preeclampsia. *Medicine (Baltimore)*, 98(44), e17676.
- Wang, F., Daugherty, B., Keise, L. L., Wei, Z., Foley, J. P., Savani, R. C., & Koval, M. (2003). Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29(1), 62-70.
- Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 7(3), 185-199.
- Wang, J., & Armant, D. R. (2002). Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs*, 172(3), 190-201.
- Wang, X., Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S. K., & Paria, B. C. (2004). Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Sci*, 117(Pt 1), 53-62.
- Wang, X. F., Yu, M. K., Lam, S. Y., Leung, K. M., Jiang, J. L., Leung, P. S., Ko, W. H., Leung, P. Y., Chew, S. B., Liu, C. Q., Tse, C. M., & Chan, H. C. (2003). Expression, immunolocalization, and functional activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms in mouse endometrial epithelium. *Biol Reprod*, 68(1), 302-308.
- Watson, E. D., & Cross, J. C. (2005). Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)*, 20, 180-193.
- Welsh, A. O., & Enders, A. C. (1987). Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat Rec*, 217(2), 203-219.
- Welsh, A. O., & Enders, A. C. (1991a). Chorioallantoic placenta formation in the rat: I. Luminal epithelial cell death and extracellular matrix modifications in the mesometrial region of implantation chambers. *Am J Anat*, 192(3), 215-231.
- Welsh, A. O., & Enders, A. C. (1991b). Chorioallantoic placenta formation in the rat: II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *Am J Anat*, 192(4), 347-365.
- Westphal, J. K., Dorfel, M. J., Krug, S. M., Cording, J. D., Piontek, J., Blasig, I. E., Tauber, R., Fromm, M., & Huber, O. (2010). Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol Life Sci*, 67(12), 2057-2068.
- Wilcox, A. J., Baird, D. D., & Weinberg, C. R. (1999). Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 340(23), 1796-1799.
- Will, C., Breiderhoff, T., Thumfart, J., Stuiver, M., Kopplin, K., Sommer, K., Gunzel, D., Querfeld, U., Meij, I. C., Shan, Q., Bleich, M., Willnow, T. E., & Muller, D. (2010). Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(5), F1152-1161.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E. H., Risau, W., & Engelhardt, B. (2003). Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 105(6), 586-592.
- Wood, G. A., Fata, J. E., Watson, K. L., & Khokha, R. (2007). Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*, 133(5), 1035-1044.

- Wu, V. M., Schulte, J., Hirschi, A., Tepass, U., & Beitel, G. J. (2004). Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J Cell Biol*, 164(2), 313-323.
- Xiang, Z., Zhong, C., Chang, A., Ling, J., Zhao, H., Zhou, W., & Zhuo, X. (2020). Immune-related key gene CLDN10 correlates with lymph node metastasis but predicts favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Aging (Albany NY)*, 12(3), 2825-2839.
- Yamaguti, P. M., dos Santos, P. A., Leal, B. S., Santana, V. B., Mazzeu, J. F., Acevedo, A. C., & Neves Fde, A. (2015). Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: case report. *BMC Nephrol*, 16, 92.
- Yamauchi, K., Rai, T., Kobayashi, K., Sohara, E., Suzuki, T., Itoh, T., Suda, S., Hayama, A., Sasaki, S., & Uchida, S. (2004). Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13), 4690-4694.
- Yang, W., Li, L., Zhang, K., Ma, K., Gong, Y., Zhou, J., & Gong, K. (2021). CLDN10 associated with immune infiltration is a novel prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma. *Epigenomics*, 13(1), 31-45.
- Zavala-Zendejas, V. E., Torres-Martinez, A. C., Salas-Morales, B., Fortoul, T. I., Montano, L. F., & Rendon-Huerta, E. P. (2011). Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Invest*, 29(1), 1-11.
- Zhang, J., Piontek, J., Wolburg, H., Piehl, C., Liss, M., Otten, C., Christ, A., Willnow, T. E., Blasig, I. E., & Abdelilah-Seyfried, S. (2010). Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1425-1430.
- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*, 34(5), 939-980.
- Zhang, X., Wang, X., Wang, A., Li, Q., Zhou, M., & Li, T. (2019). CLDN10 promotes a malignant phenotype of osteosarcoma cells via JAK1/Stat1 signaling. *J Cell Commun Signal*, 13(3), 395-405.
- Zhang, X. H., Liang, X., Liang, X. H., Wang, T. S., Qi, Q. R., Deng, W. B., Sha, A. G., & Yang, Z. M. (2013). The mesenchymal-epithelial transition during in vitro decidualization. *Reprod Sci*, 20(4), 354-360.
- Zhang, Y., Zhao, H. J., Xia, X. R., Diao, F. Y., Ma, X., Wang, J., Gao, L., Liu, J., Gao, C., Cui, Y. G., & Liu, J. Y. (2019). Hypoxia-induced and HIF1alpha-VEGF-mediated tight junction dysfunction in choriocarcinoma cells: Implications for preeclampsia. *Clin Chim Acta*, 489, 203-211.
- Zhou, B., Flodby, P., Luo, J., Castillo, D. R., Liu, Y., Yu, F. X., McConnell, A., Varghese, B., Li, G., Ching, N. O., Sunohara, M., Koss, M. N., Elatre, W., Conti, P., Liebler, J. M., Yang, C., Marconett, C. N., Laird-Offringa, I. A., Minoo, P., Guan, K., Stripp, B. R., Crandall, E. D., & Borok, Z. (2018). Claudin-18-mediated YAP activity regulates lung stem and progenitor cell homeostasis and tumorigenesis. *J Clin Invest*, 128(3), 970-984.
- Zhou, Y., Xiang, J., Bhandari, A., Guan, Y., Xia, E., Zhou, X., Wang, Y., & Wang, O. (2018). CLDN10 is Associated with Papillary Thyroid Cancer Progression. *J Cancer*, 9(24), 4712-4717.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(9), 564-580.

9. Anhang

Tab. 14: Gesamtliste der differenziell regulierten Gene in der Dezidua der Cldn3KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus. Die Gene sind nach fold change sortiert und unter den Parametern fold change ≥ 2 bzw. ≤ -2 und p-Wert $\leq 0,05$ selektiert.

ID	Gen	Beschreibung	fold change	P-val
Herunterreguliert				
TC1300001694.mm.2	Prl7b1	prolactin family 7, subfamily b, member 1	-18,12	0,005
TC0700000233.mm.2	Ceacam9	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 9	-10,89	0,006
TC1300001698.mm.2	Prl7d1	prolactin family 7, subfamily d, member 1	-10,73	0,006
TC0700003914.mm.2	Hbb-y	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	-10,61	0,017
TC0300002561.mm.2	Hsd3b6	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 6	-9,97	0,005
TC0400000386.mm.2	4933409K07Rik	predicted gene 3893; RIKEN cDNA 4933409K07 gene	-9,28	0,002
TC0400000718.mm.2	Orm1	orosomuroid 1	-8,21	0,040
TC0300000821.mm.2	Sprr2a2; Sprr2a1	small proline-rich protein 2A2; small proline-rich protein 2A1	-7,27	0,004
TC0500003431.mm.2	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	-6,66	0,013
TC0600000573.mm.2	1600015I10Rik	RIKEN cDNA 1600015I10 gene	-6,62	0,014
TC0700000774.mm.2	Klk9	kallikrein related-peptidase 9	-6,13	0,000
TC1900001612.mm.2	Cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	-6,08	0,024
TC0700000776.mm.2	Klk7	kallikrein related-peptidase 7 (chymotryptic, stratum corneum)	-5,87	0,008
TC0300002559.mm.2	Hsd3b3	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 3	-5,41	0,012
TC0300000826.mm.2	Sprr2f	small proline-rich protein 2F	-5,36	0,048
TC0800000331.mm.2	Star	steroidogenic acute regulatory protein	-5,28	0,021
TC0300000825.mm.2	Sprr2e	small proline-rich protein 2E	-5,17	0,041
TC190000161.mm.2	Lrrn4cl	LRRN4 C-terminal like	-4,84	0,012
TC1100000039.mm.2	Gatsl3	GATS protein-like 3	-4,51	0,006
TC1300000367.mm.2	Serpib9d	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9d	-4,48	0,011
TC0600002975.mm.2	Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase	-4,44	0,039
TC1000000726.mm.2	Derl3	Der1-like domain family, member 3	-4,37	0,007
TC0100003866.mm.2	Serpib2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2	-4,37	0,042
TC0600000575.mm.2	Doxl2	diamine oxidase-like protein 2	-4,12	0,008
TC1400000301.mm.2	Chdh	choline dehydrogenase	-4,08	0,047
TC1300000304.mm.2	Prl2a1	prolactin family 2, subfamily a, member 1	-4,05	0,024
TC0700004346.mm.2	Prss8	protease, serine 8 (prostasin)	-4,03	0,005
TC0700002617.mm.2	Atp1a3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide	-4,02	0,006
TC0X00000355.mm.2	Rhox6	reproductive homeobox 6	-3,87	0,009
TC0700000270.mm.2	Psg22	pregnancy-specific glycoprotein 22	-3,85	0,012
TC0700000775.mm.2	Klk8	kallikrein related-peptidase 8	-3,81	0,001
TC0200000087.mm.2	Sfmbt2	Scm-like with four mbt domains 2	-3,8	0,013
TC1300002151.mm.2	Cts7	cathepsin 7	-3,79	0,003
TC1300000082.mm.2	Prl2c5	prolactin family 2, subfamily c, member 5	-3,76	0,030
TC0400000401.mm.2	Gm10600	predicted gene 10600 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3710628]	-3,74	0,003
TC0500001225.mm.2	Mvk	mevalonate kinase	-3,7	0,001
TC1200000069.mm.2	Sdc1	syndecan 1	-3,67	0,010
TC1200002089.mm.2	Pgf	placental growth factor	-3,57	0,005
TC0700000252.mm.2	Psg29	pregnancy-specific glycoprotein 29	-3,57	0,011
TC0300000829.mm.2	Sprr2i	small proline-rich protein 2I	-3,57	0,040
TC0400001340.mm.2	Guca2a	guanylate cyclase activator 2a (guanylin)	-3,5	0,050
TC1100002805.mm.2	Hand1	heart and neural crest derivatives expressed transcript 1	-3,49	0,011
TC1300000294.mm.2	Prl3d2	prolactin family 3, subfamily d, member 1	-3,33	0,037
TC1300001699.mm.2	Prl7c1	prolactin family 7, subfamily c, member 1	-3,33	0,007

TC1200001902.mm.2	Rtn1	reticulon 1	-3,3	0,001
TC1400001432.mm.2	Dnase1l3	deoxyribonuclease 1-like 3	-3,29	0,021
TC0700004569.mm.2	Mir675; H19	microRNA 675; H19, imprinted maternally expressed transcript	-3,29	0,013
TC1300000309.mm.2	Prl5a1	prolactin family 5, subfamily a, member 1	-3,26	0,004
TC0600000014.mm.2	Peg10	paternally expressed 10	-3,25	0,014
TC1300000370.mm.2	Gm11397	predicted gene 11397	-3,23	0,004
TC0X00002235.mm.2	Plac1	placental specific protein 1	-3,18	0,013
TC1300001693.mm.2	Prl8a1	prolactin family 8, subfamily a, member 1	-3,18	0,039
TC0300000822.mm.2	Sprr2a3; Sprr2a1	small proline-rich protein 2A3; small proline-rich protein 2A1	-3,18	0,013
TC0300000354.mm.2	Noct	nocturnin	-3,16	0,050
TC1800001397.mm.2	Smim3	small integral membrane protein 3	-3,15	0,020
TC1300002144.mm.2	Tpbpa	trophoblast specific protein alpha	-3,14	0,012
TC1300000295.mm.2	Prl3d3	prolactin family 3, subfamily d, member 3	-3,11	0,033
TC0700001519.mm.2	Trim6	tripartite motif-containing 6	-3,09	0,015
TC0X00003427.mm.2	Xlr5a	X-linked lymphocyte-regulated 5A	-3,09	0,039
TC0700004585.mm.2	Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	-3,08	0,016
TC1500001073.mm.2	Krt7	keratin 7	-3,07	0,023
TC0X00001362.mm.2	Nrk	Nik related kinase	-3,07	0,005
TC1100000802.mm.2	Trpv2	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	-3,04	0,015
TC0600003412.mm.2	Bcat1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	-3,03	0,010
TC0400001970.mm.2	Slc2a5	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5	-3,03	0,008
TC0700002435.mm.2	Ceacam15	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 15	-3,02	0,008
TC1900000252.mm.2	Olfir1442	olfactory receptor 1442	-3,02	0,003
TC0400003942.mm.2	Pramef12	PRAME family member 12	-2,98	0,019
TC1000000717.mm.2	Ggt1	gamma-glutamyltransferase 1	-2,95	0,003
TC0X00001955.mm.2	Klhl13	kelch-like 13	-2,95	0,014
TC0X00001368.mm.2	Trap1a	tumor rejection antigen P1A	-2,94	0,011
TC1300000442.mm.2	Dsp	desmoplakin	-2,93	0,008
TC0700002120.mm.2	AU018091	expressed sequence AU018091	-2,93	0,005
TC0300002558.mm.2	Hsd3b2	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	-2,92	0,009
TC1300000301.mm.2	Prl6a1	prolactin family 6, subfamily a, member 1	-2,87	0,004
TC1100000773.mm.2	Kcnj12	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	-2,85	0,005
TC1000000355.mm.2	Ddo	D-aspartate oxidase	-2,84	0,032
TC0X00002246.mm.2	Zfp36l3	zinc finger protein 36, C3H type-like 3	-2,83	0,005
TC0X00000567.mm.2	Ldoc1	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	-2,82	0,024
TC1300000369.mm.2	Serpinh9f	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9f	-2,81	0,004
TC4_GL456350_	Fam205a2; Gm10600	family with sequence similarity 205, member A2; predicted gene 10600	-2,8	0,039
TC1400000072.mm.2	Abhd6	abhydrolase domain containing 6	-2,76	0,006
TC1000001133.mm.2	Hal	histidine ammonia lyase	-2,74	0,015
TC1400002098.mm.2	Tgm1	transglutaminase 1, K polypeptide	-2,74	0,033
TC1500000801.mm.2	Fam118a	family with sequence similarity 118, member A	-2,73	0,017
TC1400002336.mm.2	Slc39a14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	-2,72	0,000
TC1200000760.mm.2	Ttc9	tetratricopeptide repeat domain 9	-2,72	0,034
TC0500003487.mm.2	Adap1	ArfGAP with dual PH domains 1	-2,7	0,022
TC0900000598.mm.2	Plet1	placenta expressed transcript 1	-2,7	0,030
TC0200004558.mm.2	Prom2	prominin 2	-2,7	0,035
TC0X00000689.mm.2	Dusp9	dual specificity phosphatase 9	-2,69	0,022
TC09000003314.mm.2	Ccr11l	chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1	-2,68	0,029
TC1100003604.mm.2	Igf2bp1; Mir3063	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1; microRNA 3063	-2,66	0,023
TC0900002770.mm.2	Fam46a	family with sequence similarity 46, member A	-2,65	0,045
TC0800002918.mm.2	Chst4	carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 4	-2,63	0,015
TC0700002047.mm.2	Eps8l2	EPS8-like 2	-2,63	0,020
TC0400001512.mm.2	Tmem54	transmembrane protein 54	-2,63	0,004
TC0900000048.mm.2	Mmp1a	matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)	-2,59	0,019
TC0X00003069.mm.2	Nup62cl	nucleoporin 62 C-terminal like	-2,59	0,020

TC1700000651.mm.2	Slc44a4	solute carrier family 44, member 4	-2,57	0,039
TC1100003556.mm.2	Wfikkn2	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 2	-2,57	0,025
TC1600000328.mm.2	Kng1	kininogen 1	-2,55	0,016
TC1300000371.mm.2	Serpnb9g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9g	-2,55	0,008
TC1900000645.mm.2	Scd3	stearoyl-coenzyme A desaturase 3	-2,54	0,001
TC1400001655.mm.2	Il17rb	interleukin 17 receptor B	-2,53	0,008
TC0900002322.mm.2	Acsbg1	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	-2,52	0,044
TC0X00003012.mm.2	Nxf7	nuclear RNA export factor 7	-2,52	0,028
TC1900001556.mm.2	Pkd2l1	polycystic kidney disease 2-like 1	-2,52	0,007
TC1300000293.mm.2	Prl3d1	prolactin family 3, subfamily d, member 1	-2,52	0,026
TC0200001915.mm.2	Adra2b	adrenergic receptor, alpha 2b	-2,51	0,008
TC1800001043.mm.2	Dsc2	desmocollin 2	-2,49	0,006
TC0X00002827.mm.2	Fnd3c2	fibronectin type III domain containing 3C2	-2,49	0,016
TC1300001453.mm.2	Prl2c2	prolactin family 2, subfamily c, member 2	-2,47	0,035
TC0400003707.mm.2	Sfn	stratifin	-2,46	0,007
TC0700001998.mm.2	Utf1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	-2,46	0,002
TC1900000067.mm.2	Fosl1	fos-like antigen 1	-2,45	0,031
TC0X00000675.mm.2	Xlr5b	X-linked lymphocyte-regulated 5B	-2,45	0,014
TC1300000368.mm.2	Serpnb9e	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9e	-2,44	0,007
TC1900000244.mm.2	Pfpl	pore forming protein-like	-2,43	0,031
TC1600001374.mm.2	Liph	lipase, member H	-2,42	0,001
TC0700002460.mm.2	Psg19	pregnancy specific glycoprotein 19	-2,42	0,006
TC1100001111.mm.2	Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	-2,41	0,007
TC0500001749.mm.2	Bhlha15	basic helix-loop-helix family, member a15	-2,4	0,019
TC0900000344.mm.2	Gm7257	predicted gene 7257	-2,4	0,025
TC0X00002269.mm.2	Arhgef6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	-2,4	0,026
TC0X00000582.mm.2	3830417A13Rik	RIKEN cDNA 3830417A13 gene	-2,36	0,017
TC1200000810.mm.2	Bbof1	basal body orientation factor 1	-2,35	0,044
TC1500002282.mm.2	Krt8	keratin 8	-2,35	0,031
TC0700004579.mm.2	Trpm5	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5	-2,35	0,004
TC0900000370.mm.2	Siae	sialic acid acetyltransferase	-2,34	0,002
TC1500001084.mm.2	Krt18	keratin 18	-2,33	0,016
TC0400003361.mm.2	Plk3	polo-like kinase 3	-2,33	0,003
TC0400002501.mm.2	Gm13298; Fam205a2	predicted gene 13298 (Gm13298), mRNA.; family with sequence similarity 205, member A2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3701946]; predicted gene 13298	-2,31	0,007
TC1100004039.mm.2	Cdc42ep4	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	-2,3	0,041
TC1700002078.mm.2	Olf117	olfactory receptor 117	-2,3	0,046
TC1100003564.mm.2	Epn3	epsin 3	-2,29	0,018
TC0X00002529.mm.2	Mageb16	melanoma antigen family B, 16	-2,29	0,006
TC1000002467.mm.2	Plpp2	phospholipid phosphatase 2	-2,29	0,016
TC0700002798.mm.2	Gm6513	PREDICTED: predicted gene 6513, transcript variant 1 (Gm6513), mRNA.	-2,29	0,023
TC0500001205.mm.2	Wscd2	WSC domain containing 2	-2,29	0,049
TC0700004571.mm.2	Igf2	insulin-like growth factor 2	-2,28	0,037
TC0400001712.mm.2	Rap1gap	Rap1 GTPase-activating protein	-2,28	0,022
TC0X00000961.mm.2	Gdpd2	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	-2,27	0,018
TC0200005136.mm.2	Pltp	phospholipid transfer protein	-2,26	0,012
TC1300000305.mm.2	Prl2c1	Prolactin family 2, subfamily c, member 1	-2,26	0,044
TC0600001974.mm.2	Impdh1	inosine 5-phosphate dehydrogenase 1	-2,25	0,010
TC1300001452.mm.2	Prl2c3; Prl2c4	prolactin family 2, subfamily c, member 3; prolactin family 2, subfamily c, member 4	-2,25	0,043
TC1500000791.mm.2	Prr5	proline rich 5 (renal)	-2,25	0,006
TC0X00000354.mm.2	Rhox5	reproductive homeobox 5	-2,25	0,034
TC0700004532.mm.2	Sct	secretin	-2,25	0,012
TC1900000684.mm.2	Elov13	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3	-2,24	0,005
TC0900001900.mm.2	Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	-2,23	0,020

TC0900001718.mm.2	Mmp1b	matrix metalloproteinase 1b (interstitial collagenase)	-2,23	0,005
TC0700004487.mm.2	Adam8	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	-2,22	0,019
TC0400003352.mm.2	Hpd1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like	-2,21	0,020
TC1500002186.mm.2	Fkbp11	FK506 binding protein 11	-2,21	0,014
TC0400003633.mm.2	Nkain1	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 1	-2,21	0,040
TC0800002674.mm.2	Tox3	TOX high mobility group box family member 3	-2,21	0,027
TC1000000548.mm.2	Vsir	V-set immunoregulatory receptor	-2,21	0,025
TC0500000378.mm.2	Sh3bp2	SH3-domain binding protein 2	-2,2	0,012
TC0500003576.mm.2	Baiap2l1	BAI1-associated protein 2-like 1	-2,18	0,002
TC0X00001973.mm.2	Gm1993	predicted gene 1993	-2,18	0,046
TC0X00002075.mm.2	Rhox9	reproductive homeobox 9	-2,18	0,043
TC1000000752.mm.2	Slc19a1	solute carrier family 19 (folate transporter), member 1	-2,18	0,017
TC0900003040.mm.2	Slc38a3	solute carrier family 38, member 3	-2,18	0,023
TC1200000260.mm.2	Fam110c	family with sequence similarity 110, member C	-2,17	0,016
TC0600001258.mm.2	Irak2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-2,17	0,010
TC0200002672.mm.2	Tfap2c	transcription factor AP-2, gamma	-2,17	0,019
TC1300002149.mm.2	Cts8	cathepsin 8	-2,15	0,028
TC0200001006.mm.2	Dhrs9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	-2,15	0,029
TC0700004201.mm.2	Cdr2	cerebellar degeneration-related 2	-2,14	0,010
TC0400003567.mm.2	Gjb4	gap junction protein, beta 4	-2,14	0,015
TC0900002972.mm.2	Tmem108	transmembrane protein 108	-2,14	0,025
TC1100003055.mm.2	Cd68	CD68 antigen	-2,13	0,001
TC0500000997.mm.2	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	-2,13	0,036
TC0400003957.mm.2	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	-2,13	0,045
TC0300000827.mm.2	Sprp2g	small proline-rich protein 2G	-2,12	0,027
TC1100001992.mm.2	Enpp7	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 7	-2,1	0,015
TC1100000343.mm.2	Stk10	serine/threonine kinase 10	-2,1	0,001
TC0100003796.mm.2	Vash2	vasohibin 2	-2,1	0,021
TC0100003318.mm.2	Axdnd1	axonemal dynein light chain domain containing 1	-2,09	0,015
TC1000003127.mm.2	Hsd17b6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	-2,09	0,025
TC0700004481.mm.2	Nkx6-2	NK6 homeobox 2	-2,09	0,006
TC1500000408.mm.2	Fam83a	family with sequence similarity 83, member A	-2,08	0,024
TC0700000781.mm.2	Klk15	kallikrein related-peptidase 15	-2,08	0,005
TC1100003758.mm.2	Krt19	keratin 19	-2,08	0,006
TC0800002313.mm.2	Msmo1	methylsterol monooxygenase 1	-2,08	0,010
TC0300000823.mm.2	Sprp2b	small proline-rich protein 2B	-2,08	0,006
TC0800001253.mm.2	Cdh3	cadherin 3	-2,07	0,009
TC0700000988.mm.2	Pcsk6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	-2,07	0,024
TC0900001299.mm.2	Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family	-2,07	0,038
TC0X00002671.mm.2	Las1l	LAS1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,05	0,010
TC0400000394.mm.2	Gm13304	predicted gene 13304	-2,05	0,000
TC0700002449.mm.2	Psg18	pregnancy specific glycoprotein 18	-2,05	0,050
TC0800002529.mm.2	Gab1	growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1	-2,03	0,028
TC0900002053.mm.2	Spa17	sperm autoantigenic protein 17	-2,03	0,024
TC0100001844.mm.2	Tmem206	transmembrane protein 206	-2,03	0,004
TC0X00000653.mm.2	Gpr50	G-protein-coupled receptor 50	-2,02	0,030
TC0400002509.mm.2	Fam205a1	family with sequence similarity 205, member A1	-2	0,022
Hochreguliert				
TC0800002972.mm.2	Adams18	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 18	5,28	0,002
TC1100002608.mm.2	Dppa1	developmental pluripotency associated 1	4,26	0,015
TC1700000060.mm.2	Dynl1b	dynein light chain Tctex-type 1B	3,66	0,001
TC1400000453.mm.2	Gm8113	predicted gene 8113 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3648791]	3,6	0,007
TC1700001381.mm.2	Dynl1a	dynein light chain Tctex-type 1A	3,21	0,001
TC0300000043.mm.2	Stmn2	stathmin-like 2	3,02	0,017
TC1700000061.mm.2	Dynl1c; Dynl1f	dynein light chain Tctex-type 1C; dynein light chain Tctex-type 1F	3	0,001

TC1700001388.mm.2	Dynlt1f	dynein light chain Tctex-type 1F	2,87	0,001
TC0700003714.mm.2	Prss23	protease, serine 23	2,7	0,011
TC0500001976.mm.2	4930572O03Rik	spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein pseudogene	2,64	0,024
TC0900002397.mm.2	Rec114	REC114 meiotic recombination protein	2,61	0,012
TC0300000979.mm.2	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	2,58	0,049
TC0300001846.mm.2	Qrfpr	pyroglutamylated RFamide peptide receptor	2,53	0,002
TC1000002639.mm.2	Parpbp	PARP1 binding protein	2,47	0,041
TC1100002170.mm.2	H2afv	H2A histone family, member V	2,45	0,025
TC0500001572.mm.2	Abhd11	abhydrolase domain containing 11	2,42	0,024
TC1300001006.mm.2	Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	2,42	0,020
TC0500000110.mm.2	Speer4d	spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 4D	2,39	0,035
TC0100002381.mm.2	Clk1	CDC-like kinase 1	2,35	0,002
TC1100001395.mm.2	Tmem100	transmembrane protein 100	2,29	0,028
TC1200000280.mm.2	Gdap10	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 10	2,27	0,012
TC0800001802.mm.2	Defb40	defensin beta 40	2,21	0,023
TC0200000657.mm.2	Olf338	olfactory receptor 338	2,2	0,004
TC0700003437.mm.2	Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	2,18	0,010
TC0900000742.mm.2	Hcn4	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 4	2,18	0,025
TC0100000338.mm.2	Gulp1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1	2,17	0,032
TC0500000080.mm.2	Sema3d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	2,15	0,019
TC1100003566.mm.2	Rsad1	radical S-adenosyl methionine domain containing 1	2,14	0,026
TC0600001189.mm.2	Lrrn1	leucine rich repeat protein 1, neuronal	2,12	0,013
TC1100001698.mm.2	Adam11	a disintegrin and metallopeptidase domain 11	2,09	0,023
TC0800000150.mm.2	Kbtbd11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	2,07	0,003
TC0700002646.mm.2	Cyp2s1	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	2,06	0,011
TC0900000854.mm.2	2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene	2,04	0,005
TC0500003483.mm.2	Prkar1b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I beta	2,03	0,006
TC0600000724.mm.2	Mmrn1	multimerin 1	2,02	0,003
TC1300002542.mm.2	Cenph	centromere protein H	2,01	0,013

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden folgendermaßen veröffentlicht:

Vortragsabstract

- Grund S., Wu X., Müller D., Breiderhoff T., Wennemuth G., Grümmer R. (2020). The role of endometrial claudin-3 for implantation, decidualization and embryo development. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2020; 17 (1): 21.

Sonstige Publikationen:

Übersichtsartikel

- Grund, S., & Grümmer, R. (2018). Direct Cell-Cell Interactions in the Endometrium and in Endometrial Pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 19(8).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Ruth Grümmer danken. Zum einen für die Überlassung des sehr interessanten Themas, aber noch viel mehr für die fachlich exzellente und menschlich überaus warmherzige Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihr für ihr offenes Ohr und die Unterstützung in allen fachlichen Fragen, den wissenschaftlichen Austausch und das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit. Außerdem möchte ich für die Möglichkeit und die darin inbegriffene Förderung danken, an einer großen Anzahl von Kongressen und Tagungen teilnehmen zu dürfen, dort interessante neue Einblicke gewinnen zu können und meine Ergebnisse präsentieren zu dürfen. Danke für jede hilfreiche, kreative und motivierende Idee, die zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Auch möchte ich Herrn Prof. Gunther Wennemuth für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an dem Institut für Anatomie anfertigen zu dürfen. Mein Dank gilt dem gesamten Team der Anatomie, mit dessen Unterstützung jedes Problem überwunden werden konnte. Danke für den wissenschaftlichen Austausch in den Seminaren und Retreats, die fachlichen Anregungen und die angenehme Atmosphäre. Hier geht mein besonderer Dank auch an alle meine Büro-Kolleg*innen während dieser Zeit, mit denen ich viele Gespräche, Freude und Lachen, Frustrationen und Erfolge teilen konnte und die mir eine sehr erinnerungswürdige Zeit beschert haben.

Den Mitarbeitern des Zentralen Tierlabors, darunter besonders Esra Köser, danke ich ganz herzlich für die Unterstützung in allen tierexperimentellen Fragen.

Zudem möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich auf vielfältigste Weise in den letzten Jahren unterstützt haben. Danke für alles, was ihr für mich getan habt. Für die Motivation, die Anerkennung, das Verständnis und unsere gemeinsamen Zeiten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zum Einfluss endometrialer Claudin3- und Claudin10-Defizienzen auf die Implantation und Embryoentwicklung anhand von Knockout-Mausmodellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Susanne Grund befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Name des Betreuers an der
Universität Duisburg-Essen

Unterschrift

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in