

Einfluss nicht-invasiven physikalischen Plasmas (NIPP) auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sarah Leonie Suttner, geb. Müller

aus Troisdorf

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachterin: Prof. Dr. Verena Tischler

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.02.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	11
1.1	Der Menstruationszyklus	11
1.2	Dezidualisierung	13
1.2.1	Regulation der Dezidualisierung	15
1.2.2	Klinische Bedeutung der Dezidualisierung	17
1.3	Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP)	20
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	22
2.	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2	Chemikalien und Lösungen	26
2.1.3	Primer	26
2.1.4	Zelllinie	27
2.1.5	Zellkultur: Medien und Zusätze	28
2.2	Zellbiologische Methoden	28
2.2.1	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	28
2.2.2	Kultivierung der Zellen	29
2.2.3	Aussaat der Zellen und Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.4	Hormonelle Stimulation der Zellen	30
2.2.5	Direkte NIPP Behandlung der Zellen	31
2.2.6	Indirekte NIPP Behandlung der Zellen	32
2.2.7	RNA-Isolierung	32
2.2.8	Reverse Transkription der mRNA in cDNA	33
2.2.9	mRNA-Nachweis mittels real time-PCR	34
2.2.10	Reverse Transkription der miR in STEM-LOOP-DNA	35
2.2.11	miR-Nachweis mittels real time-PCR	35
2.3	Statistische Auswertung	36

3.	Ergebnisse	37
3.1	Wachstumsanalyse endometrialer Stromazellen im 24-Well Maßstab	37
3.2	Hormonelle Stimulation von endometrialen Stromazellen	38
3.2.1	Morphologie und Wachstumsanalyse unter hormoneller Stimulation	38
3.2.2	mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 unter hormoneller Stimulation	39
3.2.3	miR-Expression von miR-30a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p unter hormoneller Stimulation	40
3.3	Direkte NIPP Behandlung von endometrialen Stromazellen	41
3.3.1	Morphologie und Wachstumsanalyse nach NIPP Behandlung	42
3.3.2	mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 nach NIPP Behandlung	43
3.3.3	miR-Expression von miR-30-a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p nach NIPP Behandlung	45
3.4	Indirekte NIPP Behandlung von endometrialen Stromazellen	47
3.4.1	Wachstumsanalyse nach indirekter NIPP Behandlung	48
3.4.2	mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 nach indirekter NIPP Behandlung	48
3.4.3	miR-Expression von miR-30a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p nach indirekter NIPP Behandlung	50
4.	Diskussion	52
4.1	Morphologische Differenzierung	52
4.2	Zellwachstum	53
4.3	mRNA-Expression von PRL und IGFBP1	56
4.4	miR Expression	58
4.4	Schlussfolgerungen und klinischer Ausblick	63
5.	Zusammenfassung	65
6.	Abbildungsverzeichnis	66
7.	Tabellenverzeichnis	67
8.	Literaturverzeichnis	68
9.	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

Ar	Argon
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
Br-cAMP	8-Bromoadenosine-3',5'-cyclic Monophosphate
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	Cold Atmospheric Plasma
CARM1	Coactivator assoziierte Arginin-Methyltransferase 1
cDNA	Complementary DNA
CKN1C	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DBD	Dielektrische Barriereentladung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
e ⁻	Elektron
E2	Estradiol
EZM	Extrazellulärmatrix

FBS	Fetal Bovine Serum
FOXO1a	Forkhead-Box-Protein O1a
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCG	Humanes Chorion-Gonadotropin
HESC	Humane endometriale Stromazellen
HOX	Homeobox
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IGFBP1	Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1
IL	Interleukin
ILK	Integrin Linked Kinase
IVF	In-Vitro-Fertilisationen
KLF	Krüppel-Like Factor
Ktr.	Kontrolle
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MPA	Medroxyprogesteronacetat
miR	microRNA

MMP	Matrix Metallopeptidase
mRNA	messenger-RNA
N ₂	Stickstoff
NO ₂ ⁻	Nitrit
NIPP	Nicht-invasives physikalisches Plasma
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anion
p	Signifikanz mit p<0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***)
P4	Progesteron
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor Type 1
PCO-Syndrom	Polyzyklisches Ovarialsyndrom
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PER3	Period-Circadian Clock 3
PTPN1	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1
RNA	Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
PITX1	Paired-Like Homeodomain 1
PKA	Proteinkinase A
PR	Progesteronrezeptor
PRL	Prolaktin

Rel.	Relativ
RONS	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
RPLP0	Large Ribosomal Protein
SMD	Surface Microdischarge bzw. Oberflächenmikrobarriereentladungen
StAbw.	Standardabweichung
Stim.	Stimulation
Tab.	Tabelle
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
TLL	Tolloid-like
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

Die amerikanische Gesellschaft für Reproduktionsmedizin definiert Infertilität als das Ausbleiben einer Schwangerschaft nach mindestens 12 Monaten ungeschütztem und regelmäßigem Geschlechtsverkehr (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2020). An dieser Definition orientiert sich auch das internationale Klassifikationssystem ICD-11, nachdem Sterilität und Infertilität im ICD-10 noch abweichend definiert wurden. Die mittlere 12-Monatsprävalenz für Infertilität liegt bei 9 %, über die Hälfte der betroffenen Paare suchen medizinische Hilfe auf (Boivin et al., 2007). In bis zur 40% der Fälle findet sich die Ursache der Kinderlosigkeit bei der Frau; geschätzt sind 72,4 Millionen Frauen weltweit unfruchtbar (Boivin et al., 2007; Strowitzki, 2013).

Habituelle Aborte (engl. recurrent miscarriage oder recurrent pregnancy loss) werden definiert als das aufeinanderfolgen von zwei oder mehr Fehlgeburten vor Eintritt der Lebensfähigkeit des Embryos (Farquharson et al., 2005). Dies betrifft 1 % der Paare mit Kinderwunsch und ist assoziiert mit einer erhöhten psychischen Morbidität. Eine von drei Frauen mit habituellen Aborten, die eine spezialisierte Kinderwunschklinik aufsucht, ist klinisch depressiv (Rai und Regan, 2006). Die Therapieoptionen bei sporadischen und habituellen Aborten sind begrenzt und haben größtenteils eine geringe Evidenz. Der Einsatz von Progesteron (P4) ist klinisch verbreitet und scheint die Rate an Fehlgeburten zu reduzieren, jedoch ausschließlich bei Frauen mit habituellem Abort (Haas et al., 2019). Auch Aspirin, Heparin und Immunglobuline zur Reduktion der Abortrate sind Gegenstand der Forschung, bisher konnte allerdings keine Substanz einen durchschlagenden Erfolg verzeichnen (Rai und Regan, 2006).

1.1 Der Menstruationszyklus

Grundlage der Fortpflanzungsfähigkeit einer Frau ist die zyklische Veränderung der Gebärmutter Schleimhaut und die Eizellreifung, gesteuert durch einen komplexen hormonellen Regelkreis verschiedener Organe. Die pulsatile Freisetzung von Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) durch den Hypothalamus beginnt mit dem Einsetzen der Pubertät

und stimuliert gonadotrope Zellen in der Hypophyse zur Ausschüttung des follikelstimulierenden und des luteinisierenden Hormons (FSH und LH). Die hypothalamische Aktivität wird durch Neurotransmitter, Neuropeptide und Steroidhormone reguliert, so hemmt beispielsweise P4 in der Lutealphase über einen negativen Feedbackmechanismus die pulsatile GnRH-Freisetzung (Felberbaum et al., 2007).

Zu Beginn des Menstruationszyklus steigt die FSH- und LH-Konzentration an und es kommt zur Rekrutierung und Reifung einiger Follikel in den Eierstöcken. Die Granulosazellen (Follikelepithelzellen) beginnen mit der Produktion und Sekretion von Östrogen. Bis zum 7. Zyklustag erfolgt die Selektion des dominanten Follikels, der über verschiedene Stadien bis zum sprungreifen Graaf-Follikel heranreift. Dabei kommt es zu einem exponentiellen Anstieg von Östrogen, wodurch die FSH- und LH-Konzentration absinkt (negative Rückkopplung). Parallel erfolgt in den ersten Zyklustagen die Abstoßung der Endometriumschleimhaut, induziert durch den Hormonentzug gegen Ende des vorangegangenen Zyklus. Anschließend beginnen im Endometrium Epithel-, Bindegewebs- und Drüsenzellen unter dem Einfluss von Östrogen zu proliferieren, es bildet sich das Stratum funktionale (Proliferationsphase) (Felberbaum et al., 2007).

Die Ovulation, ungefähr am 14. Zyklustag, markiert den Übergang der Follikelphase in die Lutealphase. Durch den starken Anstieg von Östrogen, ausgehend vom sprungreifen Follikel, kommt es zu einem LH-Peak (positive Rückkopplung), welcher den Eisprung auslöst. Die Granulosazellen der Follikelhöhle werden, durch LH gesteuert, in das P4 produzierende Corpus luteum umgewandelt. Durch den zunehmenden P4-Einfluss verändert sich die Endometriumschleimhaut, um die Einnistung einer befruchteten Eizelle zu ermöglichen (Sekretionsphase) (Felberbaum et al., 2007). Es beginnt die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen, wobei diese morphologisch differenzieren und Glykogen, Lipide und Proteine einlagern. Außerdem verändert sich die Sekretion uteriner Drüsen und es kommt zum Einwandern spezialisierter uteriner NK-Zellen (Okada et al., 2018).

Bei ausbleibender Befruchtung der Eizelle atrophiert das Corpus luteum gegen Ende des Menstruationszyklus, sodass die Konzentration von P4 und Östrogen abfällt. Die Spiralarterien im Endometrium verschließen sich, es kommt zu einer Gewebischämie und schließlich zur Menstruation (Felberbaum et al., 2007). Bei einer stattgehabten Befruch-

tung dagegen bleiben das Corpus luteum und die hochaufgebaute und differenzierte Endometriumschleimhaut erhalten, da der Trophoblast (äußere Zellschicht der Blastozyste) humanes Chorion-Gonadotropin (hCG) produziert (Eberle, 2015).

1.2 Dezidualisierung

Dezidualisierung bezeichnet die morphologische und sekretorische Differenzierung endometrialer Stromazellen, die für die Embryoimplantation und Plazentaentwicklung essentiell ist. Bei den meisten Säugetieren beginnt dieser Prozess erst in Anwesenheit einer Blastozyste, während er beim Menschen konzeptionsunabhängig nach der Ovulation durch den Anstieg von P4 induziert wird. Möglicherweise ist die maternal induzierte Dezidualisierung beim Menschen eine evolutionäre Anpassung auf chromosomal abnormale Embryonen. Das Endometrium besitzt die Fähigkeit, Embryonen durch fördernde oder inhibierende Signale zu selektieren (Gellersen und Brosens, 2014).

Die Dezidualisierung beginnt wenige Tage nach der Ovulation in der Nähe der Spiralarterien und breitet sich auf das gesamte Endometrium aus. Es kommt zu einer Zunahme des Zytoplasmas und der Größe des Zellkerns endometrialer Stromazellen, außerdem steigt die Menge an endoplasmatischen Retikula und Golgi-Apparaten (Mizuno et al., 1998; Noyes et al., 2019). Zusätzlich sind die dezidualen Stromazellen am Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt, wobei eine erhöhte phagozytäre Aktivität beobachtet werden konnte (Gellersen und Brosens, 2014). Die Umgestaltung der EZM durch die Produktion von beispielsweise Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ 4 ermöglicht die Implantation des Embryos. Im Vergleich zu nicht-dezidualisierten endometrialen Stromazellen sind die Deziduazellen resistenter gegenüber oxidativem Stress, definiert als Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (Okada et al., 2018). Außerdem wandern uterine NK-Zellen und Makrophagen in das Endometrium ein und induzieren die Umwandlung der Spiralarterien, sezernieren Zytokine und Chemokine und schützen die Plazenta vor Infektionen (Ng et al., 2020).

Die Hauptsekretionsprodukte dezidualer Stromazellen sind Prolaktin (PRL) und Insulin-like Growth Factor-binding Protein 1 (IGFBP1). PRL wird ab Beginn der Dezidualisierung bis zur Geburt sezerniert und vermittelt seine Effekte über Zytokinrezeptoren an den Zielzellen. Diese sind vorwiegend im Drüsenepithel lokalisiert und finden sich während einer Schwangerschaft in der Dezidua, im Zytotrophoblasten, im Amnionepithel und im Synzytiotrophoblasten (Jabbour und Critchley, 2001; Maaskant et al., 1996). Im Unterschied zu hypophysären Zellen nutzen deziduale Stromazellen einen alternativen Promotor im PRL-Gen, welcher in der untranslatierten 5'-Region liegt. Das deziduale PRL unterscheidet sich jedoch vom hypophysären PRL nicht in der Aminosäuresequenz (Gellersen et al., 1989; Takahashi et al., 1984). PRL hat vielfältige Funktionen, so reguliert es möglicherweise die sekretorische Funktion der endometrialen Drüsen, welche die Trophoblasteninvasion in das Endometrium beeinflussen. Außerdem scheint es zelldifferenzierende Eigenschaften zu besitzen, denn die histologischen Veränderungen der endometrialen Stromazellen korrelieren mit dem Beginn der PRL-Sekretion. Das Wachstum des Trophoblasten wird wahrscheinlich über spezifische wachstumsinhibierende Signale von PRL gesteuert, ebenso wie die Angiogenese während der Schwangerschaft. Auch eine proliferative Wirkung auf Immunzellen ist bekannt (Ben-Jonathan et al., 2008; Jabbour und Critchley, 2001).

IGFBP1, das IGF-1 und -2 bindet sowie inhibiert, ist lokalisiert in den dezidualen Stromazellen, der EZM und im Trophoblasten (Giudice und Irwin, 1999). IGF-1 wird gegen Ende der Proliferationsphase bis zum Anfang der Sekretionsphase exprimiert und vermittelt die mitotische Wirkung von Estradiol (E2). Dagegen scheint IGF-2, welches vor allem in der Sekretionsphase des Endometriums synthetisiert wird, ein Mediator von P4 zu sein (Frost et al., 1993; Giudice und Irwin, 1999). IGF-2 wird außerdem vom Trophoblasten exprimiert und erhöht die Motilität des Zytotrophoblasten (Irving und Lala, 1995). Für IGF-2 konnte eine verstärkte Expression während der Dezidualisierung nachgewiesen werden, während dies für IGF-1 nicht der Fall war (Ganef et al., 2009). Außerdem hat IGFBP1 eine IGF-unabhängige Wirkung über die Bindung an $\alpha 1\beta 5$ -Integrin in der Trophoblastenmembran, das ebenfalls die Motilität des Trophoblasten reguliert (Irwin et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von IGFBP1 durch Insulin zu einer verstärkten Trophoblasteninvasion führt, umgekehrt wird bei exogener Zugabe von IGFBP1 die Invasion gehemmt (Giudice und Irwin, 1999).

Der Anstieg von PRL und IGFBP1 während der Dezidualisierung wird, neben morphologischen Veränderungen, als etablierter Marker für in vitro Modelle der Dezidualisierung genutzt (Mizuno et al., 1998). Daneben wird die Sekretion vieler weiterer Faktoren, wie IL-11 und -15 (Interleukin 11 und 15), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor Type 1) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), während der Dezidualisierung gesteigert (Dimitriadis et al., 2005; Lockwood et al., 1997; Matsui et al., 2004). IL-11 ist ein antiinflammatorisches Zytokin und scheint für die Embryoimplantation wichtig zu sein; bei infertilen Frauen ist die Expression von IL-11 reduziert. IL-15 stimuliert die Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität von aktivierten NK-Zellen und liegt bei Frauen mit Aborten erhöht vor (Dimitriadis et al., 2005). VEGF induziert die Angiogenese und das endotheliale Zellwachstum, PAI-1 ist ein Inhibitor der Fibrinolyse (Lockwood et al., 1997; Matsui et al., 2004).

1.2.1 Regulation der Dezidualisierung

Die Dezidualisierung wird zyklusabhängig durch verschiedene Hormone gesteuert; die genauen Mechanismen der Wirkung von FSH und LH sind noch nicht bekannt. In Anwesenheit von P4, welches während der Lutealphase vom Corpus luteum sezerniert wird, steigt die Expression von PRL und IGFBP1 (Irwin et al., 1989). Der Progesteronrezeptor (PR) ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der regulatorisch an seine Zielgene bindet. Für IGFBP1 ist eine direkte Wirkung von P4 auf die Expression bekannt, vermittelt über HOX-Proteine (Homeobox-Proteine) (Gao et al., 2002). Hauptsächlich scheint die Wirkung von P4 auf die Zielzellen jedoch indirekt über cAMP-vermittelte Signalwege stattzufinden. Das Response-Element für P4 fehlt in vielen dezidualisierungsspezifischen Genen, einschließlich des Gens für PRL. Stattdessen scheint ein Signalweg über cAMP und die Proteinkinase A (PKA) die Zellen für die P4-Wirkung zu sensibilisieren (Brosens et al., 1999; Gellersen und Brosens, 2003). cAMP entsteht nach der Bindung extrazellulärer Liganden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch die Aktivierung der membrangebundenen Adenylatcyclase. Ein Hauptziel von cAMP ist die PKA, welche die Transkription spezifischer Gene reguliert (Gellersen und Brosens, 2014). Während der Sekretionsphase wurde eine erhöhte Aktivität der Adenylatzylase und eine erhöhte Menge an cAMP nachgewiesen (Bergamini et al., 1985). Bei in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass P4

sowohl zu einem Anstieg von PRL, als auch von cAMP führt, während der PRL-Anstieg bei Zugabe eines PKA-Inhibitors ausbleibt (Brar et al., 1997). Lokale Faktoren, wie Prostaglandin E2 (PGE2), Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Relaxin, kontrollieren möglicherweise über einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration die Induktion der Dezidualisierung (Gellersen und Brosens, 2014; Gravanis et al., 1999; Palejwala et al., 2002).

Während der Dezidualisierung wird die Expression von über 3.300 Genen verändert, unter anderem für die Zellzyklusregulation, die Angiogenese, die Abwehr von oxidativem Stress sowie den Wasser- und Ionentransport (Takano et al., 2007). Dies wird durch epigenetische Mechanismen kontrolliert, sodass gestörte epigenetische Modifikationen mit Implantationsstörungen und Aborten in Verbindung gebracht werden können (Munro et al., 2010). Es kommt zu zyklischen Veränderungen der DNA-Methylierung und Histon-Modifikation, auch die Menge an nichtkodierender RNA variiert während des Menstruationszyklus (Retis-Resendiz et al., 2021). Durch spezifische microRNAs (miRs), kurze nicht kodierende RNA-Sequenzen mit regulatorischen Funktionen, wird die Expression dezidualer Marker gesteuert, wobei die genauen Mechanismen noch überwiegend unbekannt sind (Liu et al., 2020).

Die Erkenntnisse zur Regulation der Dezidualisierung können für in vitro Modelle genutzt werden. Es konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass endometriale Stromazellen in Anwesenheit von P4 und cAMP bzw. deren stabilere Analoga MPA und Br-cAMP dezidualisieren (Irwin et al., 1989; Mizuno et al., 1998; Tseng et al., 1992). Eine Zusammenfassung der komplexen Prozesse während der Dezidualisierung ist in Abb. 1 dargestellt.

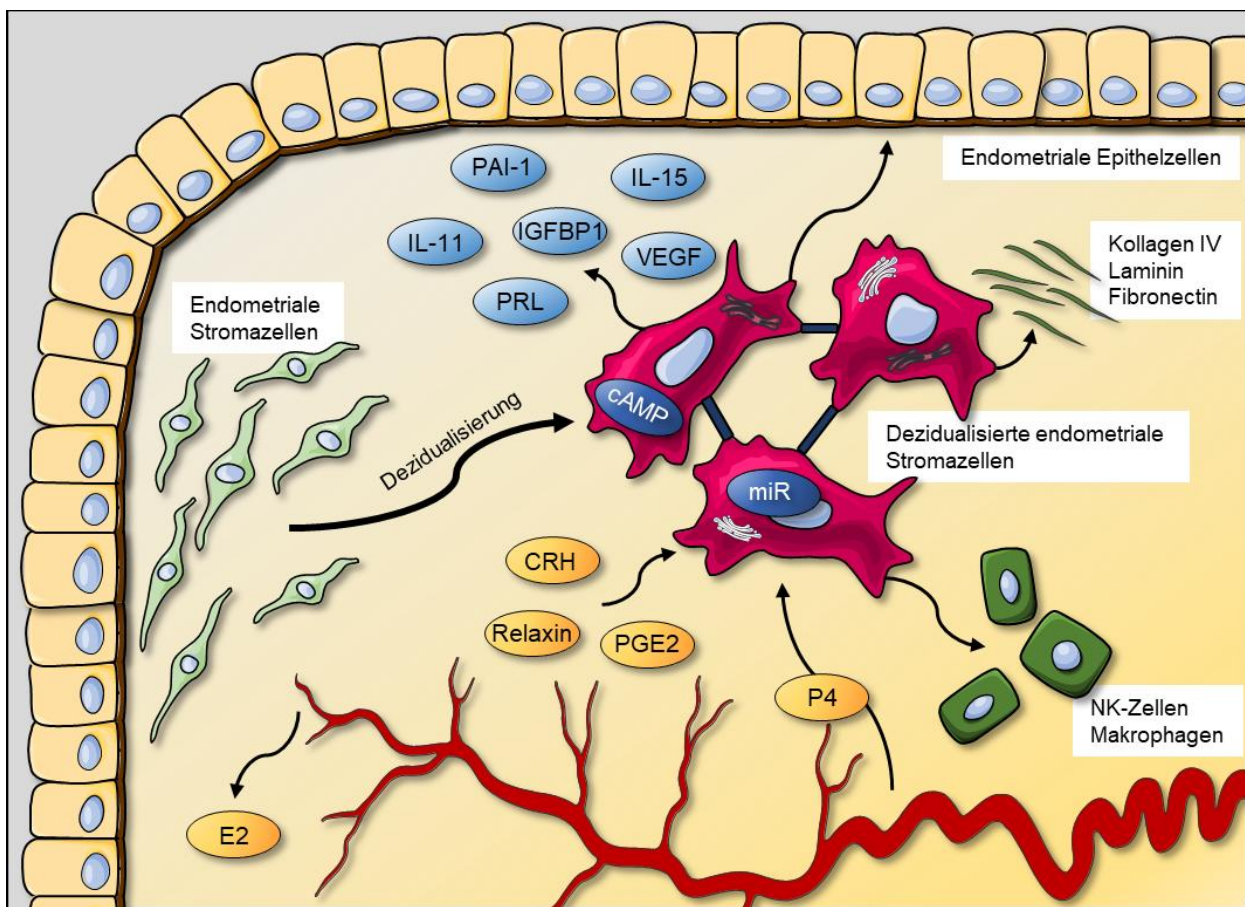


Abb. 1: Zusammenfassung der Prozesse während der Dezidualisierung. Endometriale Stromazellen differenzieren, gesteuert durch P4 und weitere Faktoren, morphologisch und sekretorisch. Dabei kommt es zu vielfältigen Veränderungen bezüglich der EZM, lokaler Immunfaktoren, der Genexpression und der Sekretion.

1.2.2 Klinische Bedeutung der Dezidualisierung

Die endometriale Rezeptivität, welche im Rahmen der Dezidualisierung entsteht, ist notwendig für eine erfolgreiche Implantation des Embryos (Beier-Hellwig et al., 1998). Es wird angenommen, dass eine Störung der endometrialen Rezeptivität eine Hauptursache für weibliche Infertilität ist (Gellersen und Brosens, 2014).

Die Bedeutung von Implantationsstörungen ist im Rahmen von in vitro Fertilisationen (IVF) beschrieben worden. Die Ursachen für wiederholtes Implantationsversagen nach Embryotransfer sind vielfältig, unter anderem scheint die lokale Immunabwehr eine Rolle zu spielen. Während der Trophoblasteninvasion ist der Crosstalk zwischen dem maternalen Immunsystem und den embryonalen Antigenen entscheidend, abhängig von hormonellen

Signalen kommt es während der Dezidualisierung zu einer Proliferation von uterinen NK-Zellen und Makrophagen (Garrido-Gomez et al., 2017; Gellersen und Brosens, 2014). Diese sind wichtig um eine Immuntoleranz während der Schwangerschaft zu vermitteln (Franasiak et al., 2021). Für die Adenomyose, bei der ektope Endometriumschleimhaut im Myometrium vorliegt, ist bekannt, dass eine sekundäre P4-Resistenz zu einer veränderten Immunregulation und zu einem Verlust der Schwangerschaft führen kann (Bourdon et al., 2021). Auch bei der Endometriose ist eine abweichende Reaktion auf Steroidhormone und eine proinflammatorische Immunantwort beschrieben worden (Franasiak et al., 2021). Das PCO-Syndrom ist ebenfalls mit einer gestörten uterinen Rezeptivität assoziiert. Vermittelt durch die Insulinresistenz und nachfolgende Hyperinsulinämie kommt es zur Herunterregulierung des dezidualisierungsspezifischen Markers IGFBP1 (Schulte et al., 2015). Außerdem können unter anderem chromosomale Anomalien, Blutgerinnungsstörungen, anatomische Veränderungen und endokrine Störungen Ursachen für wiederholtes Implantationsversagen sein (Franasiak et al., 2021).

Diagnostische Methoden zur Beurteilung der endometrialen Rezeptivität sind bisher nicht etabliert, diskutiert werden histologische, ultrastrukturelle, immunhistochemische, proteomische und genetische Analysen (Gellersen und Brosens, 2014). Als etablierte therapeutische Option für wiederholtes Implantationsversagen steht die operative Korrektur anatomischer Auffälligkeiten zur Verfügung, beispielsweise die Entfernung von Polypen, welche die Implantation erschweren (Toth et al., 2011). Therapiemöglichkeiten zur Beeinflussung der Dezidualisierung und endometrialen Rezeptivität sind dagegen nicht verbreitet, auch wenn bereits einige Ansätze vorhanden sind. Aspirin und Heparin sollen die Blutversorgung des Endometriums verbessern, Prednisolon wird genutzt um die Abstoßung des Embryos zu verhindern. Allerdings konnte keine erhöhte Implantationsrate durch diese Substanzen nachgewiesen werden (Boomsma et al., 2022; Groeneveld et al., 2011; Strowitzki et al., 2006). Der Leukemia Inhibitory Factor (LIF), der bei Mäusen für die Dezidualisierung und Implantation notwendig ist, führt sogar zu einer reduzierten Schwangerschaftsrate nach IVF (Brinsden et al., 2009). In einer Metaanalyse konnte nach IVF-Behandlungen eine erhöhte Schwangerschaftsrate beobachtet werden, wenn Seminalplasma intrazervikal appliziert wird (Ahmadi et al., 2022). Seminalplasma, Bestandteil des männlichen Ejakulats, bewirkt über eine Entzündungskaskade mit Anstieg von Zytokinen und Chemokinen einen Influx von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen

(Strowitzki et al., 2006). Diese lokale Immunreaktion fördert möglicherweise die Dezidualisierung und Implantation (Ng et al., 2020). Zur Optimierung der Immunregulation bei wiederholtem Implantationsversagen sind einige vielversprechende Ansätze bekannt, wie beispielsweise die Applikation von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor, thrombozytenreichem Plasma oder mononukleären Zellen (Turocy und Williams, 2021). Es konnte auch beobachtet werden, dass eine Verletzung des Endometriums vor der Embryoimplantation die Dezidualisierung induziert und die Schwangerschaftsrate steigert. Ein möglicher Wirkmechanismus ist die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Prostaglandinen durch eine lokale inflammatorische Reaktion, ähnlich wie bei einer Wundheilung (Bashiri et al., 2018; Strowitzki und Germeyer, 2016). Allerdings ist das Prozedere potentiell mit Schmerzen verbunden (Nastri et al., 2012).

Neben dem wiederholten Implantationsversagen ist die gestörte Dezidualisierung auch mit habituellen Aborten assoziiert, vermutlich durch eine gestörte Embryoselektion (Gellersen und Brosens, 2014; Salker et al., 2010). In Biopsien des Endometriums während der Sekretionsphase zeigt sich eine reduzierte Expression des dezidualen Markers PRL bei Frauen mit habituellen Aborten. Auch die Menge an uterinen NK-Zellen, deren Anzahl während der Dezidualisierung ansteigt, ist reduziert (Lucas et al., 2020; Salker et al., 2010). Außerdem ist bekannt, dass die hormonellen Stimulationsprotokolle im Rahmen einer IVF zu einer gestörten endometrialen Differenzierung und Asynchronität zwischen endometrialer und embryonaler Entwicklung führen können. Die Expression des PR ist in stimulierten Zyklen verändert und das Endometrium scheint vorzeitig sekretorisch zu differenzieren (Teh et al., 2016). Diese Asynchronität ist assoziiert mit habituellen Aborten und einer gestörten Plazentation, welche zu Präeklampsie, fetaler Wachstumsretardierung oder Frühgeburt führen kann (Coulam, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass endometriale Stromazellen von Frauen mit vorausgegangener Präeklampsie in vitro eine gestörte Dezidualisierung aufweisen. Morphologisch bleibt eine Zelldifferenzierung aus, ebenso werden spezifische, während der Dezidualisierung heraufregulierte Gene vermindert exprimiert. Außerdem ist die Sekretion von PRL und IGFBP1 reduziert, wobei für IGFBP1 auch eine gesteigerte Sekretion während einer schweren Präeklampsie beschrieben worden ist (Garrido-Gomez et al., 2017; Giudice et al., 1997). Möglicherweise könnte

die Entwicklung einer Therapie, welche die Dezidualisierung verbessert, eine schwere Präeklampsie verhindern (Garrido-Gomez et al., 2017).

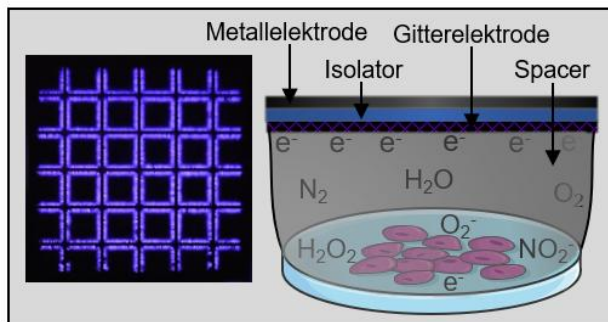
Obwohl der Dezidualisierung eine zunehmende Bedeutung für wiederholtes Implantationsversagen, habituelle Aborte und Präeklampsie zugeschrieben wird, stehen etablierte Therapieoptionen bislang nicht zur Verfügung. Jedoch scheint eine Stimulierung der Dezidualisierung durch lokale Immunreaktionen und Wundheilungsprozesse positive Auswirkungen auf die Schwangerschaftswahrscheinlichkeit zu haben (Ahmadi et al., 2022; Bashiri et al., 2018; Ng et al., 2020). Eine neue vielversprechende Therapiemethode zur Förderung der Wundheilung, Regulation immunologischer Prozesse und Geweberegeneration ist die Plasmamedizin, welche zunehmend klinisch eingesetzt wird (Heinlin et al., 2011).

1.3 Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP)

Plasma ist ein teilweise oder vollständig ionisiertes Gas, das durch eine weitere Energieaufnahme entsteht (Filipić et al., 2020; Rotering et al., 2020). Es kommt zur Bildung von biologisch aktiven Stoffen, wie Photonen (UV-Licht), Elektronen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) sowie elektromagnetischen Feldern. Für die biologischen Effekte von Plasma scheinen hauptsächlich RONS ursächlich zu sein, sie sind identisch zu reaktiven Spezies, die während dem physiologischen Zellmetabolismus entstehen. RONS wirken als second messengers und sind beteiligt bei Prozessen der Immunantwort, Zellaadhäsion, Migration, Apoptose und Wundheilung (Boeckmann et al., 2020). Plasma liegt natürlicherweise zum Beispiel in der Sonne, den Sternen oder Polarlichtern vor (Wende und Brandenburg, 2022). Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) oder Cold Atmospheric Plasma (CAP) entsteht, wenn einem Gas unter Normaldruck Energie zugeführt wird (Rotering et al., 2020). Dabei kommt es zu einer Erwärmung des Gases bis leicht oberhalb der Körpertemperatur, sodass keine thermischen Schäden entstehen (Heinlin et al., 2011). Für die medizinische Anwendung sind verschiedene Methoden zur Plasmagenerierung verfügbar, die wichtigsten sind dielektrische Barriereentladungen (DBDs) und Plasmajets (Wende und Brandenburg, 2022). In dieser Arbeit wurde als Repräsentant für

DBD-Devices das Gerät PlasmaCare verwendet, das Plasma durch Oberflächenmikrobarriereentladungen (SMD) erzeugt. Die Plasmaquelle besteht aus einer Hochspannungselektrode aus Kupfer, einem Isolator aus Keramik und einer geerdeten Edelstahlelektrode (Abb. 2A) (Zimmermann et al., 2022). Außerdem wurde das Gerät KinpenMed aus der Gruppe der Plasmajets verwendet, das Argon als Trägergas nutzt (Abb. 2B) (Sailer, 2022).

A



B

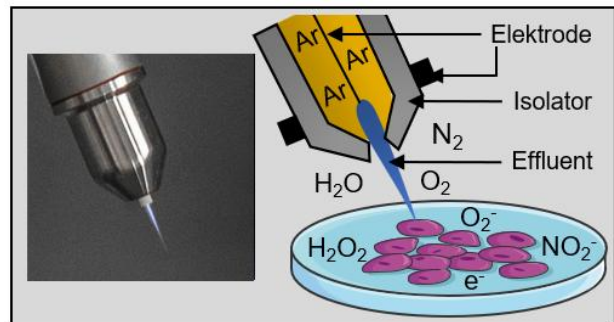


Abb. 2: Aufbau und Prinzip der Plasmaquellen. Der PlasmaCare besteht aus einer Metall- und einer Gitterelektrode, an welcher kurzlebige Spezies entstehen (A). Innerhalb des Spacers befindet sich Raumluft, welche durch NIPP aktiviert wird, sodass unter anderem RONS auf die Zellen treffen (Zimmermann et al., 2022). Der KinpenMed besteht aus einer innerliegenden und einer geerdeten Elektrode sowie einem Argonzufluss (B). Es entsteht ein Effluent, welcher auf die zu behandelnden Zellen gerichtet wird. (Sailer, 2022).

Die Effekte von NIPP sind dosisabhängig gewebsregenerierend bis antiproliferativ, im Extremfall kann der Zelltod induziert werden. Viele Studien zeigen die Wirkung von Plasma in vitro, für die Anwendung auf der Haut gibt es bereits einige klinische Studien. Die gegensätzlichen Eigenschaften von NIPP können über die Behandlungszeit und -intensität gut kontrolliert werden, da diese die Konzentration von RONS beeinflussen. Die Wundheilung wird durch NIPP über eine Modulation von Inflammation, Proliferation, Angiogenese, Migration und Reepithelialisierung beschleunigt, wobei physiologische Vorgänge über das Redoxsystem genutzt werden (Boeckmann et al., 2020). Es steigt die Produktion von Kollagen Typ 1 und die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche in die Wundheilungskaskade involviert sind (Arndt et al., 2013). Immunzellen können durch NIPP direkt beeinflusst und beispielsweise aktiviert werden (Semmler et al., 2020). Auch die Differenzierung verschiedener Zelltypen kann durch NIPP induziert werden, ohne dass es zu einer genetischen Schädigung kommt. Das könnte beispielsweise

für neurodegenerative Erkrankungen ein Therapieansatz sein (Braný et al., 2020; Kobayashi et al., 2022; Nie et al., 2022; Xiong, 2018). Daneben kann NIPP über verschiedene Mechanismen den Zelltod induzieren, proapoptotische Effekte scheinen jedoch hauptsächlich Tumorzellen zu betreffen, da diese sensibler gegenüber oxidativem Stress sind. Daher wird NIPP als vielversprechender Ansatz in der Therapie onkologischer Erkrankungen angesehen (Semmler et al., 2020). Es kann festgestellt werden, dass NIPP bei gesunden Zellen und adäquater Behandlungszeit keinen Zelltod induziert, sondern ausschließlich ein moderater Wachstumsarrest ohne genetische Schädigung zu erwarten ist (Choi et al., 2013). Bei Behandlungen von Tieren und Menschen mit NIPP, beispielsweise zur Förderung der Wundheilung, konnten bislang keine Nebenwirkungen festgestellt werden (Arndt et al., 2013).

Neben der direkten Behandlung von Zellen oder Geweben mit NIPP gibt es ein steigendes Interesse an einer indirekten Behandlung, bei dieser werden Zellkultur-, Spül- oder Injektionslösungen mit NIPP behandelt. Vorteil der Methode ist eine einfache klinische Anwendung, indem vorbehandelte Flüssigkeiten lokal angewendet oder in das Gewebe injiziert werden. Die Effekte einer indirekten Behandlung scheinen ähnlich zur direkten Anwendung zu sein, wobei von einer leicht reduzierten Wirksamkeit sowie geringeren Toxizität auszugehen ist (Gan et al., 2021; Khan et al., 2020; Saadati et al., 2018).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Dezidualisierung als Voraussetzung für die Implantation eines Embryos bzw. für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft erlangt zunehmend an Bedeutung. Störungen in diesem Prozess wird eine Beteiligung an habituellen Aborten, wiederholtem Implantationsversagen und Präeklampsie zugeschrieben. Dennoch gibt es bislang kaum Therapieansätze, die eine gestörte Dezidualisierung berücksichtigen.

NIPP gilt als vielversprechender neuer Therapieansatz für Wundheilungsstörungen, Haut- und Tumorerkrankungen. Die klinische Anwendung von NIPP auf der Haut ist bereits

etabliert und eine Förderung der Wundheilung ohne Nebenwirkungen nachgewiesen. Bislang unbekannt ist der Einfluss von NIPP auf endometriale Stromazellen, obwohl die zyklische Proliferation und Differenzierung des Endometriums mit der Wundheilung verglichen werden kann. Bei beiden Vorgängen kommt es zum Einstrom von Immunzellen, zur Revaskularisierung und zum Remodeling der EZM (Owusu-Akyaw et al., 2019). Bei anderen Zelltypen, wie verschiedenen Stammzellen und Neuronen, konnte eine verstärkte Zelldifferenzierung nach NIPP-Behandlungen beobachtet werden (Braný et al., 2020; Xiong, 2018). Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von NIPP auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen zu charakterisieren und mit den Effekten von P4 und cAMP zu vergleichen. Die Ergebnisse könnten genutzt werden, um einen nebenwirkungsarmen und einfach anwendbaren Therapieansatz bei wiederholtem Implantationsversagen und habituellem Abort zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte, einschließlich Herstellerangaben, sind in Tab. 1 gelistet, die Verbrauchsmaterialien in Tab. 2.

Tab. 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem LLG-uniVACUUSYS	Lab Logistics Group (Meckenheim)
CASY TT Cell counter and Analyzer	Omni Life Science (Bremen)
CFX96 Touch RealTime PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Eiswürfelbereiter	The Manitowoc Company (Manitowoc, USA)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Gusto High-Speed Minizentrifuge	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Inkubator Heracell 240	Heraeus (Hanau)
Inkubator MCO-170 AICD-PE	PHCbi (AZ Etten-Leur, Niederlande)
Laminar Flow	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbrühl)
MC-24 Touch Microcentrifuge	Benchmark Scientific (Sayreville, USA)
Microflow Klasse 2 Sicherheitswerkbank	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Mikroskop AE31E	Motic (Wetzlar)
Mini Zentrifuge C-1200	Corning (New York, USA)
Pipettensatz 0,5-1000µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
PlasmaCare®	Terraplasma (Garching bei München)
Plasmajet kINPen®MED	neoplas med (Greifswald)

PlateFuge Microzentrifuge	Benchmark Scientific (Sayreville, USA)
Spectrophotometer/Fluorometer DS-11 FX+	DeNovix (Wilmington, USA)
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Vortex Laborrührer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge 5402	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 Well PCR Platte farblos	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
CASYcup	Omni Life Science (Bremen)
Filterspitzen SafeSeal Tips professional	VWR international (Radnor, USA)
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Pasteurpipette	VWR international (Radnor, USA)
PCR Tubes 0,2 ml	Qiagen (Hilden)
Pipettenspitzen	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Reaktionsgefäß 0,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzenfilter 0,45 µm	Merck KGaA (Darmstadt)
Zellkulturplatte 6 und 24 Well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexiko)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind, einschließlich Herstellerangaben, in Tab. 3 gelistet.

Tab. 3: Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1-Bromo-3-Chlorpropan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2-Propanol ≥99,5%	Carl Roth (Karlsruhe)
5x First Strand Buffer	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
25 mM dNTP Mix	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
CASYblue	Omni Life Science (Bremen)
CASYclean	Omni Life Science (Bremen)
CASYton	Omni Life Science (Bremen)
Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8%	Carl Roth (Karlsruhe)
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl)	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
RNase away	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
SensiMix SYBR Hi-Rox Kit	Meridian Bioscience (Cincinnati, USA)
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
TRIzol® LS Reagent	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Wasser DEPC-behandelt	Carl Roth (Karlsruhe)

2.1.3 Primer

Alle für die PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA) bezogen. Die Sequenzen sind der Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Primer

Primer	Sequenz
Oligo dT 18	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
PRL Forward	5'-CACCCCCGAAGACAAGGAG-3'
PRL Reverse	5'-CCAGGATCGCAATATGCTGAC-3'
IGFBP1 Forward	5'-TACCTGCCAAACTGCAACAAGA-3'
IGFBP1 Reverse	5'-CCATGGATGTCTCACACTGTCTG-3'
RPLP0 Forward	5'-CAATGGCAGCATCTACAACC-3'
RPLP0 Reverse	5'-ACTCTTCCTTGGCTTCAACC-3
miR-30a 5p SLOOP	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGA TACGACCTTCCA-3'
miR-181 5p SLOOP	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGA TACGACACTCAC-3'
miR-181 3p SLOOP	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGA TACGACGGTACA-3'
U6 SLOOP	5'-GTCATCCTTGCGCAGG-3'
miR-30a 5p Forward	5'-GCCCCGCTGTAAACATCCTCGACTGG-3'
miR-181 5p Forward	5'-GCCCCGAACATTCAACGCTGTCGGT-3'
miR-181 3p Forward	5'-GCCCCGACCATCGACCGTTGATTGT-3'
Universal Reverse	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6 Forward	5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
U6 Reverse	5'-AGGGGCCATGCTAATCTTCT-3'

2.1.4 Zelllinie

Verwendet wurde die Zelllinie HESC (Humane endometriale Stromazellen) des Herstellers American Type Culture Collection (Manassas, USA).

2.1.5 Zellkultur: Medien und Zusätze

Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Zusätze sind, einschließlich Herstellerangaben, der Tab. 5 zu entnehmen. Die Herstellung der Kulturmedien wird unter 2.2 Zellbiologische Methoden erläutert.

Tab. 5: Kulturmedien und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller
8-Bromo-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate sodium salt	MedChemExpress (Monmouth Junction, USA)
17 β -Estradiol	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Aktivkohle	Carl Roth (Karlsruhe)
Dextran 70	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Nährstoffmischung F12 (1:1) ohne Phenolrot	PAN-Biotech (Aidenbach)
Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	PAN-Biotech (Aidenbach)
Fetal bovine serum (FBS) Good	PAN-Biotech (Aidenbach)
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	PAN-Biotech (Aidenbach)
Progesterone powder	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (10x)	PAN-Biotech (Aidenbach)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1x Trypsin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die nun vom Boden der Zellkulturflasche gelösten Zellen wurden in 4 ml Kulturmedium (DMEM/F12 ohne Phenolrot mit 10% FBS und 1% Pen/Strep) resuspendiert und bei 300 x g und Raumtemperatur für 3 min zentrifugiert. Hierbei entstand ein Zellsediment, das nach Absaugen des Überstandes in 3 ml

Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde auf zwei Kryovate aufgeteilt und in Behältern mit Isopropanol bei -80°C für maximal 24 h eingefroren. Anschließend erfolgte die Überführung der Zellen in den Stickstofftank zur dauerhaften Lagerung.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryovate für etwa 30 s in einem 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt. Danach wurden die Zellen durch Resuspension in 5 ml Medium weiter aufgetaut. Nachdem der Kryovatinhalt vollständig aufgetaut war, wurden die Zellen für 3 min bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in eine mit 10 ml Kulturmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Das Kulturmedium der Zellen wurde alle 3 Tage gewechselt. Bei lichtmikroskopischer Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Durch eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C in 2 ml 1x Trypsin wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Dies wurde lichtmikroskopisch überprüft. Durch die Hinzugabe von 4 ml Kulturmedium wurde die Reaktion von Trypsin beendet, die Zellsuspension wurde für 3 min bei 300 x g und Raumtemperatur in 15 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen im Verhältnis von 1:2 bis 1:4 in T75 Flaschen umgesetzt, in welche bereits 10 ml Kulturmedium vorgelegt worden waren.

2.2.3 Aussaat der Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Für die Wachstumskinetik der unbehandelten Zellen über 5 d wurden verschiedene initiale Zellzahlen im 24-Well-Maßstab ausgesät, die Ernte erfolgte alle 48 h. Die Zellen wurden wie oben beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und zentrifugiert, anschließend wurde das Zellsediment in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der

Zellzahl wurden 50 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton resuspendiert, danach wurde das CASYcup fünfmal invertiert. Das Gerät CASY TT Cell counter and Analyzer bestimmte die Anzahl vitaler Zellen pro ml. Zelltrümmer und tote Zellen wurden in der Messung nicht berücksichtigt, dafür war eine initiale Kalibrierung der Zelllinie notwendig. Mit der Angabe der Zellzahl pro ml konnte nun die benötigte Menge an Zellsuspension für die initialen Zellzahlen 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 und 5×10^4 pro Well berechnet werden. Dieses Volumen wurde in dem benötigten Kulturmedium resuspendiert und anschließend jeweils 1,5 ml pro Well gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

Nach jeweils 48 h erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels CASY TT Cell counter and Analyzer. Dafür wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C in 100 µl 1x Trypsin hatten sich die Zellen vom Boden gelöst und konnten in 900 µl Kulturmedium resuspendiert werden. Erneut wurden 50 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton resuspendiert und das CASYcup fünfmal invertiert. Anschließend erfolgte die Messung der Zellzahl.

2.2.4 Hormonelle Stimulation der Zellen

Die hormonelle Stimulation wurde aufgrund der langen Inkubationszeit über 12 d mit einer initialen Zellzahl von 3×10^4 im 6-Well-Maßstab durchgeführt. Die Messung des Zellwachstums erfolgten nach 4, 8 und 12 d wie oben beschrieben. Dafür wurden die Zellen in 3 ml DPBS gewaschen und mit 200 µl 1x Trypsin inkubiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in 800 µl Kulturmedium und die Messung der Zellzahl. Die mRNA- und miR-Expressionsanalyse wurde nach 12 d durchgeführt und ist in späteren Abschnitten beschrieben.

Für die hormonelle Stimulation wurde für das Kulturmedium depletiertes (steroidhormon-reduziertes) FBS verwendet. Hierfür wurden 5,0 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran 70 in 100 ml FBS gegeben, mehrmalig invertiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei $8.000 \times g$ für 20 min mit nachfolgender Abnahme des Überstandes, dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Der Überstand wurde abschließend zwei Mal durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Die Herstellung des Kulturmediums erfolgte mit 500 ml DMEM/F12 ohne Phenolrot, 50 ml depletiertem FBS und 5 ml Pen/Strep.

Für die Aussaat wurde, wie oben beschrieben, die Zellzahl einer Zellsuspension pro ml bestimmt. Dann wurde die benötigte Menge an Zellsuspension pro Well berechnet und auf die Wellplatte gegeben. Zu der Kontrollgruppe wurden jeweils 3 ml Kulturmedium hinzugefügt. Für die hormonelle Stimulation wurde der benötigten Menge Kulturmedium 1 μ M P4, 30 nM E2 und 0,5 mM Br-cAMP zugesetzt und jeweils 3 ml pro Well gegeben. Alle 3 d erfolgte bei beiden Gruppen ein Mediumwechsel, einschließlich Auffrischung der hormonellen Stimulation in der Interventionsgruppe.

2.2.5 Direkte NIPP Behandlung der Zellen

Die direkte NIPP Behandlung wurde mit einer initialen Zellzahl von 2×10^5 über 5 d im 6-Well-Maßstab durchgeführt. Die Messung des Zellwachstums erfolgte 24 h, 72 h und 120 h nach NIPP Behandlung; die mRNA- und miR-Expressionsanalyse erfolgte nach 24 h und 120 h.

Für die PlasmaCare Behandlung wurde die berechnete Menge der Zellsuspension in dem benötigten Kulturmedium resuspendiert und jeweils 5 ml pro Well verteilt. Die Behandlung erfolgte nach 24 h Inkubation an den adhären Zellen (Abb. 3A). Das Medium wurde hierfür bis auf 200 μ l abgenommen, die Behandlung für 30 s, 120 s oder 240 s durchgeführt und anschließend das Kulturmedium wieder auf den Zellen verteilt. Mit der Kontrollgruppe wurde ebenso verfahren, jedoch ohne NIPP Behandlung.

Für die Behandlung mittels KinpenMed wurde die berechnete Menge der Zellsuspension in dem benötigten Kulturmedium resuspendiert und jeweils 200 μ l pro Well verteilt. Es erfolgte die Behandlung der Zellsuspension in kreisenden Bewegungen für 6 s, 9 s oder 12 s (Abb. 3B). Anschließend wurden jeweils 4,8 ml Kulturmedium pro Well hinzugegeben, ebenso wurde mit der Kontrollgruppe verfahren.

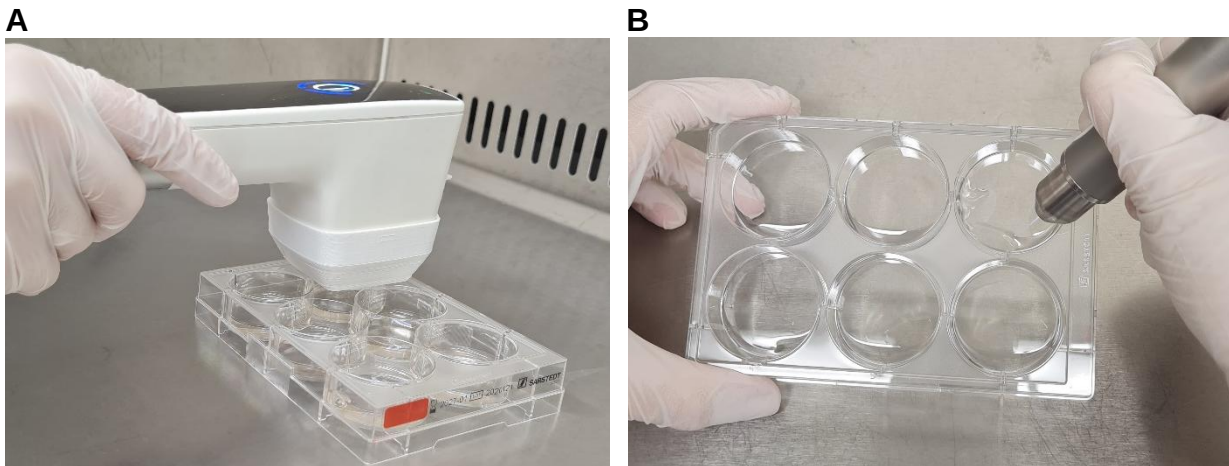


Abb. 3: NIPP Behandlung von HESC. Direkte Behandlung der Zellen mit dem PlasmaCare (A) bzw. KinpenMed (B)

2.2.6 Indirekte NIPP Behandlung der Zellen

Die indirekte NIPP Behandlung, bei der ausschließlich das Kulturmedium behandelt wurde, wurde mit einer initialen Zellzahl von 2×10^5 über 1 d im 6-Well-Maßstab durchgeführt. Für die PlasmaCare Behandlung wurde 24 h nach Aussaat der Zellen jeweils 3 ml Kulturmedium auf einer separaten 6-Wellplatte für 120 s behandelt. Nach Absaugen des Kulturmediums der ausgesäten Zellen wurde das behandelte Medium auf die Zellen gegeben. Für die Behandlung mittels KinpenMed wurde vor der Aussaat der Zellen jeweils 3 ml Kulturmedium in kreisenden Bewegungen auf einer 6-Wellplatte für 180 s behandelt. Anschließend wurde die berechnete Menge der Zellsuspension hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über 24 h und danach die Messung der Zellzahl sowie die mRNA- und miR-Expressionsanalyse.

2.2.7 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte für die hormonell stimulierten Zellen einschließlich Kontrollgruppe nach 12 d bei einer initialen Zellzahl von 3×10^4 . Bei den NIPP behandelten Zellen wurde die RNA-Isolierung nach 1 d und bei der direkten Behandlung zusätzlich nach 5 d durchgeführt, die initiale Zellzahl betrug 2×10^5 .

In beiden Fällen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml DPBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl Trizol und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur konnten die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Wellplatte gelöst werden, zusätzlich wurde das Lysat resuspendiert. Es erfolgte die Überführung in Reaktionsgefäße, bei Bedarf wurden diese bei -20 °C eingefroren und später bearbeitet.

Falls vor der RNA-Präparation die Messung der Zellzahl mithilfe des CASY TT Cell counter and Analyzer erfolgt war, wurde die verwendete Zellsuspension für 1 min bei 500 x *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Hinzufügen von 1 ml DPBS wurden die Zellen erneut bei 500 x *g* für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und die Zellen in 500 µl Trizol für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Resuspension erfolgte die Überführung des Lysats in Reaktionsgefäße und bei Bedarf die Lagerung bei -20 °C.

Nun wurden jeweils 50 µl 1-Bromo-3-Chloropropan in die Reaktionsgefäße gegeben und diese 15 s gevortext. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde das Lysat für 15 min bei 12.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, dies bewirkte eine Trennung in drei Phasen. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, die mittlere weiße Phase DNA und unten sammelten sich die Proteine. Von der obersten RNA-haltigen Phase wurden ca. 200 µl in Reaktionsgefäße überführt und 250 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach fünfmaligem invertieren erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über 10 min und anschließend die Zentrifugation bei 12.000 x *g* bei 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 500 µl 75% Ethanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 7.600 x *g* und 4 °C über 5 min wurde der Überstand verworfen. Für eine reinere RNA wurde dieser Waschschrift wiederholt. Nachdem das RNA-Pellet innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur getrocknet war, wurden 11 µl DEPC-H₂O hinzugefügt. Es erfolgte die Messung der RNA-Menge in ng/µl im Spectrophotometer, dafür wurde jeweils 1 µl je Probe aufgetragen. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.8 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Für die Transkription von mRNA in cDNA wurden 1.000 ng mRNA verwendet. Das benötigte Volumen an mRNA wurde berechnet und jeweils mit 1 µl Oligo dT 18 100 µM in ein

Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-H₂O auf 13,7 µl aufgefüllt und jede Probe kurz zentrifugiert. Es erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 65 °C im Thermal Cycler, währenddessen wurde der Mastermix nach Tab. 6 hergestellt. Anschließend wurde je 6,3 µl Mastermix zu jeder Probe hinzugegeben. Die Proben wurden im Thermal Cycler 60 min bei 42 °C und 10 min bei 72 °C inkubiert und danach bei 8°C gehalten. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80 °C.

Tab. 6: Herstellung Mastermix

Reagenz	Menge je Probe
5x First Strand Buffer	4,0 µl
10 mM dNTP-Mix	1,0 µl
SuperScript Reverse Transcriptase	0,8 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl

2.2.9 mRNA-Nachweis mittels real time-PCR

Für den mRNA-Nachweis wurde für jeden Primer (PRL, IGFBP1, RPLP0) eine Doppelbestimmung pro Probe angelegt, zusätzlich wurde eine Negativkontrolle pro Primer durchgeführt. Je 3 µl cDNA wurden nach kurzer Zentrifugation auf eine 96-Wellplatte vorgelegt, für den Primer RPLP0 wurde vorher 1 µl cDNA im Verhältnis 1:15 mit DEPC-H₂O verdünnt. Die Herstellung des Mastermix erfolgte nach Tab. 7 für jeden Primer getrennt, anschließend wurden 17 µl Mastermix je Probe auf die Wellplatte gegeben. Die Wellplatte wurde nun mit einer Folie abgeklebt und kurz zentrifugiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 95 °C im CFX96 Touch RealTime PCR Detection System erfolgte 45x der folgende Zyklus: 10 s 95 °C, 20 s 60 °C, 10 s 72 °C.

Tab. 7: Herstellung Mastermix

Reagenz	Menge je Probe
DEPC-H ₂ O	5 µl
10 µM Primer Forward	1 µl
10 µM Primer Reverse	1 µl
SensiMix SYBR Hi-Rox	10 µl

2.2.10 Reverse Transkription der miR in STEM-LOOP-DNA

Für die Transkription von miR in STEM-LOOP-DNA wurden 100 ng miR verwendet. Das benötigte Volumen wurde in sterile Reaktionsgefäße überführt und mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde jede Probe kurz zentrifugiert und der Mastermix nach Tab. 8 angesetzt. Je 4,0 µl RNA und 2,8 µl Mastermix wurden nun in sterile Reaktionsgefäße überführt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden im Thermal Cycler 30 min bei 16 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert und anschließend bei 10 °C gehalten. Danach wurde jede Probe mit DEPC-H₂O auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80 °C.

Tab. 8: Herstellung Mastermix

Reagenz	Menge je Probe
5x First Strand Buffer	1,5 µl
2 µM U6 SLOOP	0,2 µl
2 µM miR-30a 5p SLOOP	0,2 µl
2 µM miR-181 5p SLOOP	0,2 µl
2 µM miR-181 3p SLOOP	0,2 µl
1 mM dNTP-Mix	0,25 µl
SuperScript Reverse Transcriptase	0,2 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,05 µl

2.2.11 miR-Nachweis mittels real time-PCR

Für den miR-Nachweis wurde für jeden Primer (miR-30a 5p, miR-181 5p, miR-181 3p, U6) eine Doppelbestimmung pro Probe angelegt, zusätzlich wurde eine Negativkontrolle pro Primer durchgeführt. Je 2 µl STEM-LOOP-DNA wurden nach kurzer Zentrifugation auf eine 96-Wellplatte vorgelegt. Danach erfolgte die Herstellung des Mastermix nach Tab. 9 für jeden Primer getrennt. Für den reverse Primer wurde bei miR-30a 5p, miR-181 5p und miR-181 3p ein universaler Primer verwendet, für U6 dagegen wurde ein spezifischer reverse Primer benutzt. Nun wurden 14 µl Mastermix je Probe auf die Wellplatte

gegeben und diese mit einer Folie abgeklebt und kurz zentrifugiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 95 °C im CFX96 Touch RealTime PCR Detection System erfolgte 45x der folgende Zyklus: 10 s 95 °C, 20 s 60 °C, 10 s 72 °C.

Tab. 9: Herstellung Mastermix

Reagenz	Menge je Probe
DEPC-H ₂ O	5,2 µl
25 µM Primer Forward	0,4 µl
25 µM Primer Reverse	0,4 µl
SensiMix SYBR Hi-Rox	8,0 µl

2.3 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und Datenanalyse wurde Microsoft Excel 2019 verwendet. Die Erstellung der Diagramme erfolgte mittels GraphPad Prism 5, die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Servier Medical Art und Power Point 2016. Für die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung (StAbw.) und der Signifikanz mittels t-Test wurden mindestens 3 unabhängige Versuche je Experiment verwendet. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt, die Signifikanzen wurden folgendermaßen festgelegt: $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***). Die abgebildeten Darstellungen sind repräsentativ.

3. Ergebnisse

Um den Einfluss einer NIPP Behandlung auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten und die Morphologie der unbehandelten, hormonell stimulierten und mit NIPP behandelten Zellen betrachtet. Außerdem erfolgte eine mRNA-Expressionsanalyse dezidualisierungsspezifischer Marker, sowie die Untersuchung des Verhaltens der miRNA auf verschiedene Stimuli.

3.1 Wachstumsanalyse endometrialer Stromazellen im 24-Well Maßstab

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der unbehandelten Zellen untersucht, um initiale Zellzahlen für die weiteren Versuche festlegen zu können (Abb. 4). Das Wachstum zeigte sich nahezu linear und vergleichsweise gering. Bei niedriger initialer Zellzahl verdreifachte sich die Zellzahl nach 5 d (1×10^4 : $3,6 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^3$; 2×10^4 : $6,1 \times 10^4 \pm 9,0 \times 10^3$), während sich bei höherer initialer Zellzahl die Zahl der Zellen verdoppelte (3×10^4 : $7,7 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$; 5×10^4 : $9,6 \times 10^4 \pm 2,4 \times 10^4$). Die nachfolgenden Inkubationsversuche wurden im 6-Well Maßstab durchgeführt, da größere Mengen an Zellmaterial gebraucht wurden. Hierfür wurde eine initiale Zellzahl von 2×10^5 bei 5 d Inkubation und 3×10^4 bei 12 d Inkubation ausgewählt.

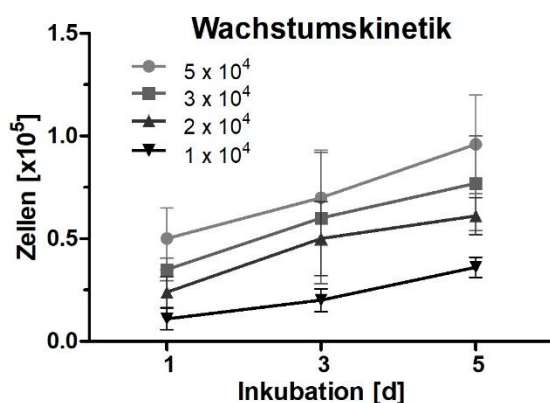


Abb. 4: Wachstumskinetik HESC mit unterschiedlicher initialer Zellzahl. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 5 d bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der absoluten Zellzahl dargestellt.

3.2 Hormonelle Stimulation von endometrialen Stromazellen

Um die Fähigkeit der endometrialen Stromazellen zur in vitro Dezidualisierung zu prüfen wurde ein etabliertes Protokoll zur hormonellen Stimulation angewendet. Die Zellen wurden über 12 d in Anwesenheit von 30 nM E2, 1 μ M P4 und 0,5 mM Br-cAMP inkubiert. Sowohl mikroskopisch, als auch auf mRNA- und miR-Ebene zeigten sich charakteristische dezidualisierungsspezifische Veränderungen der stimulierten Zellen.

3.2.1 Morphologie und Wachstumsanalyse unter hormoneller Stimulation

Morphologisch zeigten sich die nichtstimulierten Zellen spindelförmig und als dichter Zellrasen, unter hormoneller Stimulation dagegen vergrößert, polygonal und gruppiert (Abb. 5A). Ebenso konnte eine charakteristische Veränderung des Wachstumsverhaltens unter hormoneller Stimulation nachgewiesen werden, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde (Logan et al., 2012; Saleh et al., 2011) (Abb. 5B). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, die ein lineares Wachstum über 12 d zeigten (4 d: $1,1 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^3$; 8 d: $1,7 \times 10^5 \pm 8,5 \times 10^3$; 12 d: $2,2 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$), wurde durch die Hormonstimulation das Wachstum signifikant inhibiert (4 d: $5,6 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^3$, $p < 0,001$; 8 d: $4,8 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$, $p < 0,001$; 12 d: $4,3 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$, $p < 0,001$).

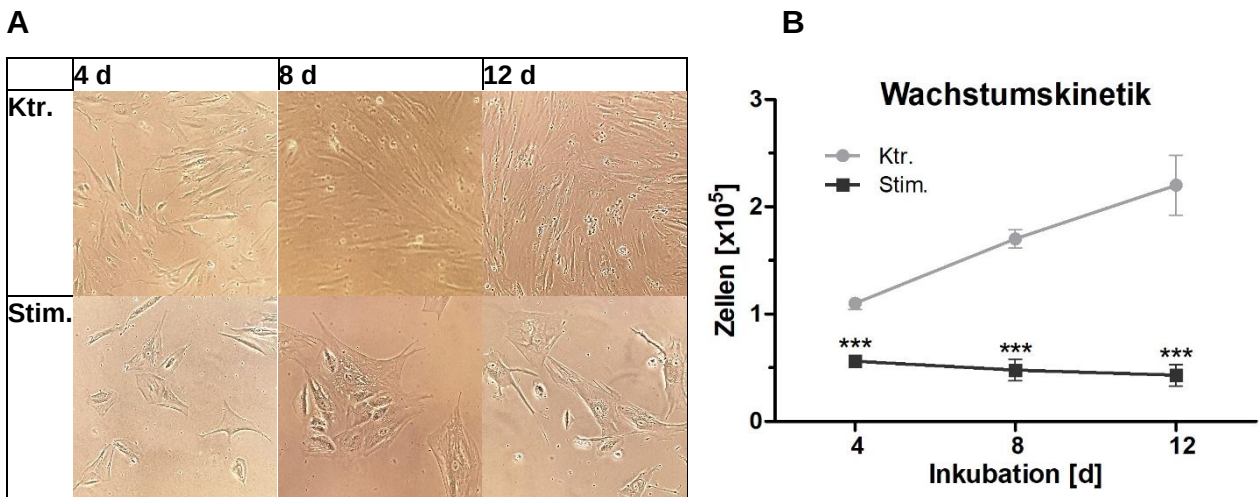


Abb. 5: Morphologie und Proliferation von HESC unter Hormonstimulation. Mikroskopie in 20facher Vergrößerung (A) und Wachstumskinetik im 6-Well Maßstab (B) von HESC unter Stimulation mit E2, P4 und Br-cAMP. Die initiale Zellzahl betrug 3×10^4 , als Kontrolle dienten nichtstimulierte Zellen. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 12 d bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,001$ (***).

Zur weiteren Untersuchung der in vitro Dezidualisierung erfolgte der Nachweis dezidualisierungsspezifischer Marker mittels mRNA- und miR-Expressionsanalyse 12 d nach Stimulation.

3.2.2 mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 unter hormoneller Stimulation

Um die Dezidualisierung der hormonell stimulierten Zellen nachzuweisen, wurde die mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 nach 12 d untersucht (Abb. 6). Da die Expression und Sekretion von PRL und IGFBP1 in endometrialen Stromazellen unter hormoneller Stimulation ansteigt, sind diese Faktoren als Marker der Dezidualisierung bei in vitro Modellen etabliert (Maruyama und Yoshimura, 2008; Saleh et al., 2011).

Es zeigte sich unter hormoneller Stimulation, im Vergleich zu den nichtstimulierten Zellen, ein hochsignifikanter Anstieg der relativen mRNA-Expression von PRL ($385,3 \pm 113,1$, $p < 0,001$), welches unter anderem die Angiogenese, Immunregulation und das Zellwachstum des Trophoblasten beeinflusst (Abb. 6A). Auch die relative mRNA-Expression von

IGFBP1, welches eine Rolle während der Trophoblasteninvasion spielt, stieg unter hormoneller Stimulation signifikant an ($32,3 \pm 24,8$, $p=0,023$), wenngleich der Anstieg deutlich weniger ausgeprägt war (Abb. 6B).

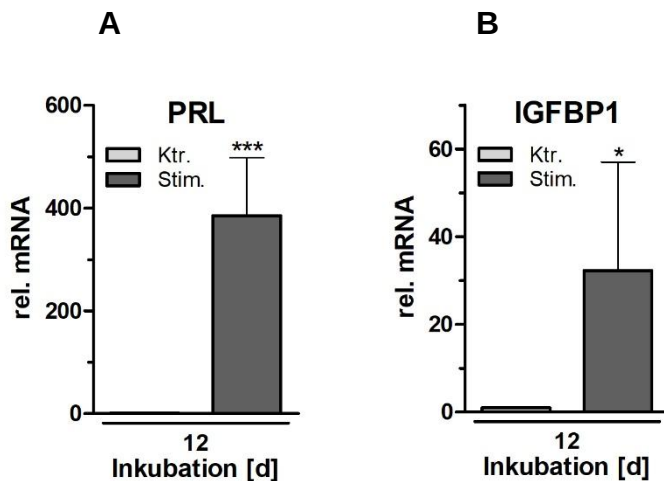


Abb. 6: mRNA-Expression in HESC unter Hormonstimulation. Relative mRNA-Expression von PRL (A) und IGFBP1 (B) unter Stimulation mit E2, P4 und Br-cAMP nach 12 d. Als Kontrolle dienten nichtstimulierte Zellen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der relativen mRNA-Expression dargestellt (normiert auf die Kontrolle). Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*) und $p \leq 0,001$ (***).

3.2.3 miR-Expression von miR-30a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p unter hormoneller Stimulation

Zur weitergehenden Beurteilung der Dezidualisierung wurde die relative Expression von miR-30a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p betrachtet. miRs bestehen aus kurzen nicht-kodierenden und einzelsträngigen RNA-Sequenzen und regulieren spezifisch die Translation (Bartel, 2004). Ein Anstieg von miR-30a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p wurde während der in vitro Dezidualisierung beobachtet (Aoyagi et al., 2017; Zhang et al., 2015), wobei zu miR-181a auch gegenteilige Effekte bekannt sind (Estella et al., 2012). miR-30a 5p ist möglicherweise beteiligt an Signalwegen, die den Expressionsanstieg von PRL und IGFBP1 indirekt kontrollieren (Aoyagi et al., 2017). Der Anstieg von miR-181a wird mit einer morphologischen Differenzierung von HESC und mit einer erhöhten Expression dezidualisierungsspezifischer Gene in Verbindung gebracht (Zhang et al., 2015).

miR-181a 5p und miR-181a 3p zeigten einen deutlichen Anstieg unter hormoneller Stimulation im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrollgruppe (miR-181a 5p: $3,05 \pm 0,95$, $p=0,0013$; miR-181a 3p: $2,67 \pm 0,72$, $p<0,001$) (Abb. 7B+C). Auch die Expression von miR-30a 5p stieg unter hormoneller Stimulation an, allerdings weniger stark ($1,40 \pm 0,20$, $p=0,002$) (Abb. 7A).

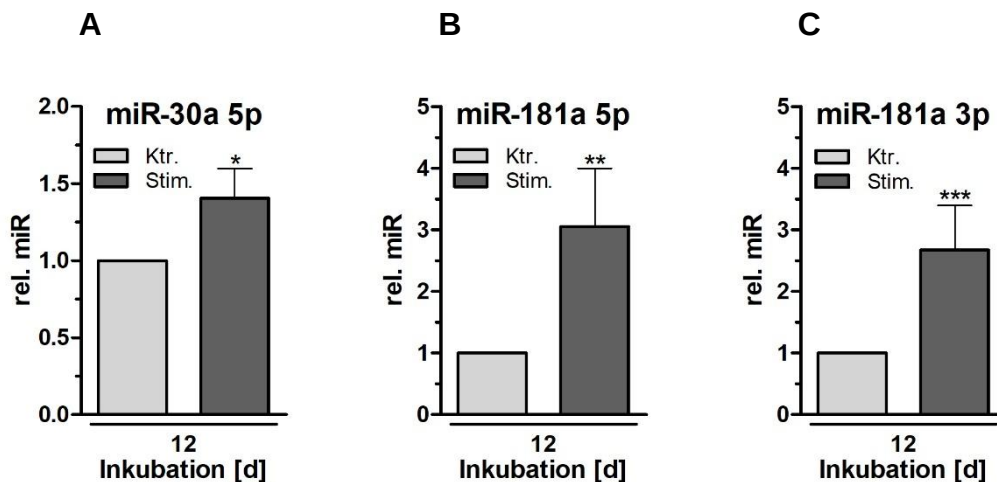


Abb. 7: miR-Expression in HESC unter Hormonstimulation. Relative Expression von miR-30a 5p (A), miR-181a 5p (B) und miR-181a 3p (C) unter Stimulation mit E2, P4 und Br-cAMP nach 12 d. Als Kontrolle dienten nichtstimulierte Zellen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der relativen mRNA-Expression dargestellt (normiert auf die Kontrolle). Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p<0,05$ (*), $p\leq 0,01$ (**) und $p\leq 0,001$ (***).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in vitro Dezidualisierung mittels hormoneller Stimulation sowohl mikroskopisch, als auch auf mRNA- und miR-Ebene nachgewiesen werden konnte. Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss von NIPP auf die endometrialen Stromazellen untersucht. Zum Nachweis einer in vitro Dezidualisierung wurden die gleichen Methoden genutzt, wie oben evaluiert.

3.3 Direkte NIPP Behandlung von endometrialen Stromazellen

Ziel der NIPP Behandlung war eine Induktion der Dezidualisierung ähnlich zur hormonellen Stimulation. Zur Behandlung der Zellen wurden zwei verschiedene Geräte (PlasmaCare und KinpenMed) verwendet, um spezifische Effekte vergleichen zu können (Abb.

8). Es wurden Wachstumsanalysen, morphologische Beurteilungen und mRNA- sowie miR-Expressionsanalysen durchgeführt.

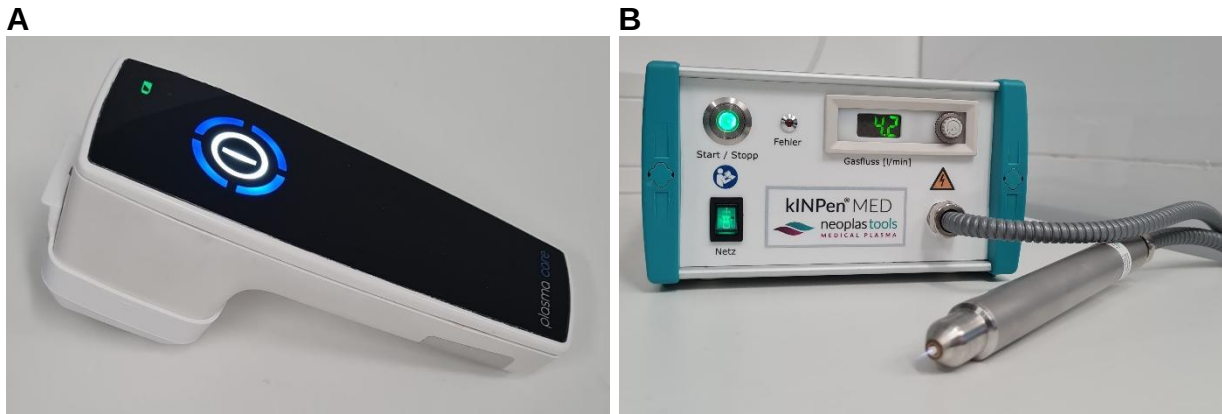


Abb. 8: Geräte für die NIPP Behandlung. PlasmaCare (A) ist ein DBD-Device und verwendet SMD, KinpenMed (B) ist ein Plasmajet.

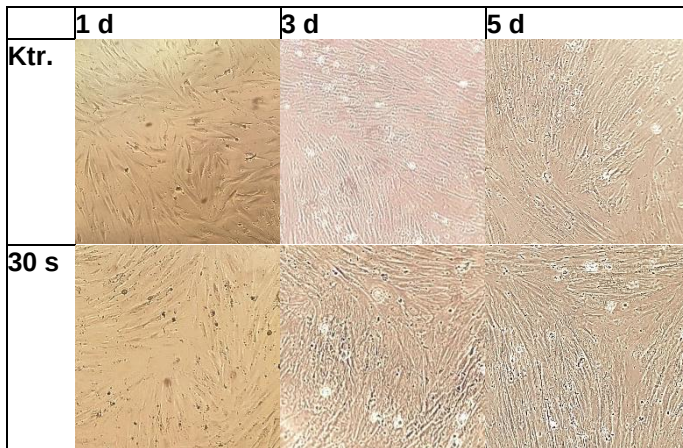
3.3.1 Morphologie und Wachstumsanalyse nach NIPP Behandlung

Die NIPP Behandlung der Zellen erfolgte mit verschiedenen Behandlungszeiten, da weder ein starker apoptotischer Effekt, noch ein zu geringer Effekt gewünscht war. Nach der einmaligen Behandlung wurden die Zellen über 5 d inkubiert. Morphologisch konnte bei einer Behandlung mittels PlasmaCare keine Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 9A). Die Zellen, welche mit dem KinpenMed behandelt wurden, wiesen allenfalls eine geringgradige polygonale Differenzierung auf (Abb. 9C).

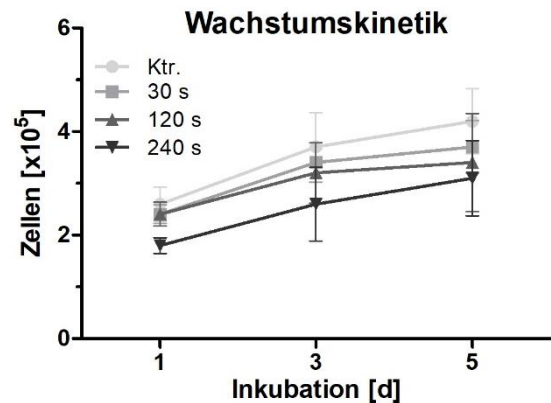
Das Zellwachstum wurde bei beiden Geräten abhängig von der Behandlungszeit inhibiert. Nach der Behandlung mit dem PlasmaCare zeigte sich bereits nach einem Tag ein deutlicher Effekt bei der längsten Behandlungsdauer ($1,8 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$), allerdings schienen sich die Zellen im Verlauf teilweise zu erholen (Abb. 9B). Nach 5 d hatte sich die Kontrolle verdoppelt ($4,2 \times 10^5 \pm 6,3 \times 10^4$), während das Zellwachstum nach der NIPP Behandlung abhängig von der Behandlungsdauer inhibiert wurde (30 s: $3,7 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^4$; 120 s: $3,4 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^4$; 240 s: $3,1 \times 10^5 \pm 7,3 \times 10^4$). Das Wachstum der Zellen, welche mit dem KinpenMed behandelt wurden, zeigte erst nach längerer Inkubation eine Inhibition (Abb. 9D). Dabei war auch hier der Effekt deutlich abhängig von der Behandlungsdauer,

insbesondere nach 5 d (Ktr.: $4,3 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$; 6 s: $3,8 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$; 9 s: $2,9 \times 10^5 \pm 9,4 \times 10^4$; 12 s: $2,4 \times 10^5 \pm 7,3 \times 10^4$).

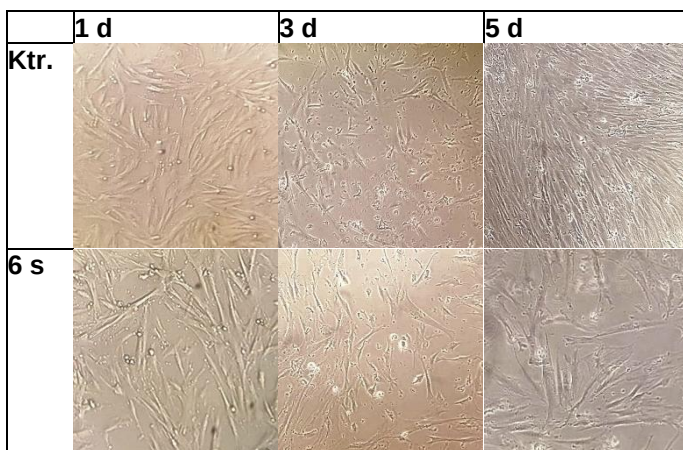
A



B



C



D

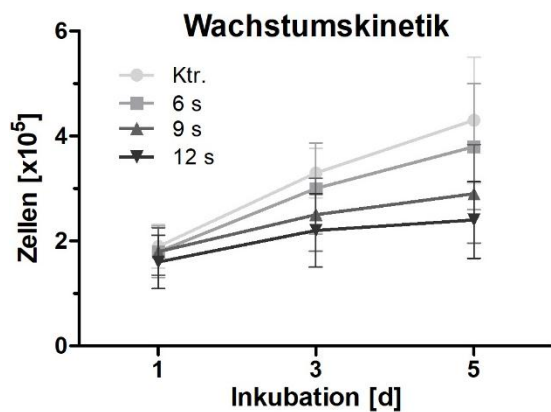


Abb. 9: Morphologie und Proliferation von HESC nach NIPP Behandlung. Mikroskopie in 10facher Vergrößerung (A+C) und Wachstumskinetik im 6-Well Maßstab (B+D) nach Behandlung mit PlasmaCare (A+B) und KinpenMed (C+D). Die initiale Zellzahl betrug 2×10^5 , als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 5 d bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der absoluten Zellzahl dargestellt.

3.3.2 mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 nach NIPP Behandlung

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Expression der dezidualisierungsspezifischen Marker PRL und IGFBP1 nach PlasmaCare und KinpenMed Behandlung untersucht. Dies

erfolgte sowohl nach ein-, wie auch nach fünftägiger Inkubation der Zellen nach der NIPP Behandlung.

Nach PlasmaCare Exposition zeigte sich ein Anstieg des Markers PRL nach 1 d, wobei hier eine große Variabilität zu hohen Standardabweichungen führte (30 s: $2,23 \pm 1,00$, $p=0,028$; 120 s: $2,21 \pm 1,66$, $p=0,104$; 240 s: $2,54 \pm 2,76$, $p=0,390$) (Abb. 10A). Nach 5 d konnte kein Effekt der NIPP Behandlung auf die mRNA-Expression mehr festgestellt werden, außer bei einer Behandlungszeit von 240 s (240 s: $2,08 \pm 0,09$, $p<0,001$). Interessanterweise zeigte sich bei dem Marker IGFBP1 ein Effekt tendenziell erst nach 5 d, der allerdings nicht signifikant war (30 s: $2,66 \pm 3,09$, $p=0,182$; 120 s: $2,14 \pm 2,06$, $p=0,168$; 240 s: $2,56 \pm 1,41$, $p=0,129$) (Abb. 10B).

Im Gegensatz dazu waren die Effekte nach einer Behandlung mittels KinpenMed deutlich ausgeprägter. Der Marker PRL stieg unabhängig von der Behandlungszeit bereits nach 1 d signifikant an (6 s: $1,95 \pm 0,23$, $p=0,0012$; 9 s: $2,41 \pm 0,91$, $p=0,02$; 12 s: $2,04 \pm 0,61$, $p=0,042$) (Abb. 10C). Nach 5 d war dieser Effekt nur noch bei einer Behandlungszeit von 6 s detektierbar (6 s: $2,91 \pm 0,62$, $p<0,001$). Ein ähnliches Muster war auch bei der Expression von IGFBP1 zu beobachten (Abb. 10D), nach 1 d zeigte sich ein signifikanter Anstieg unabhängig von der Behandlungszeit (6s: $2,63 \pm 0,67$, $p=0,003$; 9 s: $2,41 \pm 0,84$, $p=0,016$; 12 s: $3,18 \pm 1,32$, $p=0,016$).

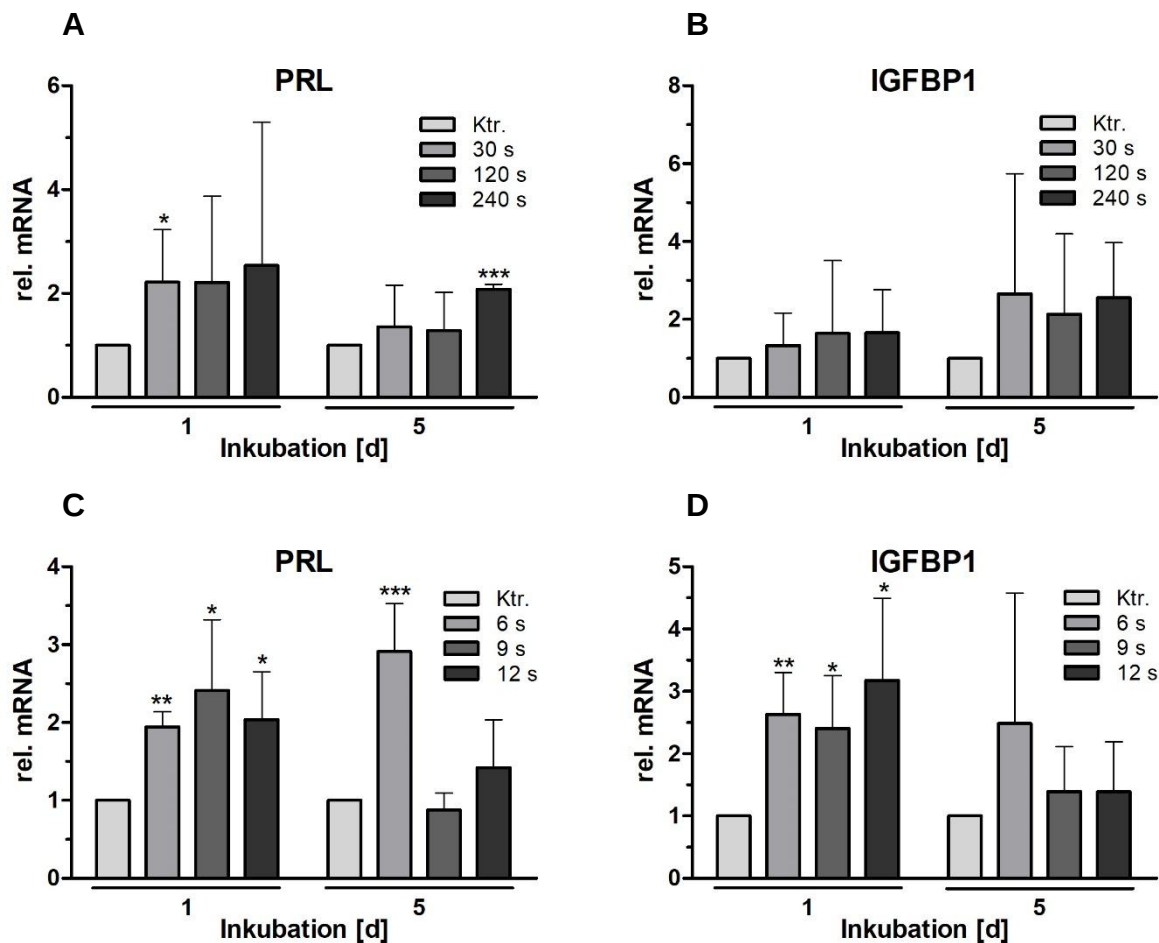


Abb. 10: mRNA-Expression in HESC nach NIPP Behandlung. Relative mRNA-Expression von PRL (A+C) und IGFBP1 (B+D) nach Behandlung mit PlasmaCare (A+B) und KinpenMed (C+D). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der relativen mRNA-Expression dargestellt (normiert auf die Kontrolle). Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

3.3.3 miR-Expression von miR-30-a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p nach NIPP Behandlung

Nachdem ein Effekt der NIPP Behandlung auf mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss auf miR-Ebene untersucht. Die miR-Expression wurde nach eintägiger Inkubation untersucht, da sich bei der mRNA-Expression tendenziell die stärksten Effekte nach einem Tag zeigten.

Die Expression aller miR stieg nach der Behandlung durch den PlasmaCare konstant und größtenteils signifikant an (Abb. 11A-C). Die kürzere Behandlungszeit von 30 s schien dabei stärkere Effekte zu verursachen (miR-30a 5p: $1,57 \pm 0,44$, $p=0,090$; miR-181a 5p: $3,08 \pm 0,56$, $p=0,003$; miR-181a 3p: $2,33 \pm 0,69$, $p=0,033$), daher wurde auf eine Behandlung mit 240 s verzichtet.

Im Gegensatz dazu waren die Effekte nach einer Behandlung mittels KinpenMed deutlich variabler. Bei der Expression von miR-30a 5p konnte kein signifikanter Anstieg beobachtet werden (6s: $1,63 \pm 1,28$, $p=0,301$; 9s: $1,67 \pm 1,59$, $p=0,371$; 12 s: $1,16 \pm 0,62$, $p=0,570$) (Abb. 11D). Die Expression von miR-181a 5p stieg signifikant an bei einer Behandlungsdauer von 12 s (6s: $1,90 \pm 0,95$, $p=0,108$; 9 s: $1,85 \pm 0,78$, $p=0,072$; 12 s: $1,46 \pm 0,37$, $p=0,049$) (Abb. 11E). Ebenso verhielt es sich auch bei dem Marker miR-181a 3p (6 s: $1,77 \pm 0,67$, $p=0,062$; 9 s: $1,51 \pm 0,50$, $p=0,084$; 12 s: $1,37 \pm 0,18$, $p=0,006$) (Abb. 11F).

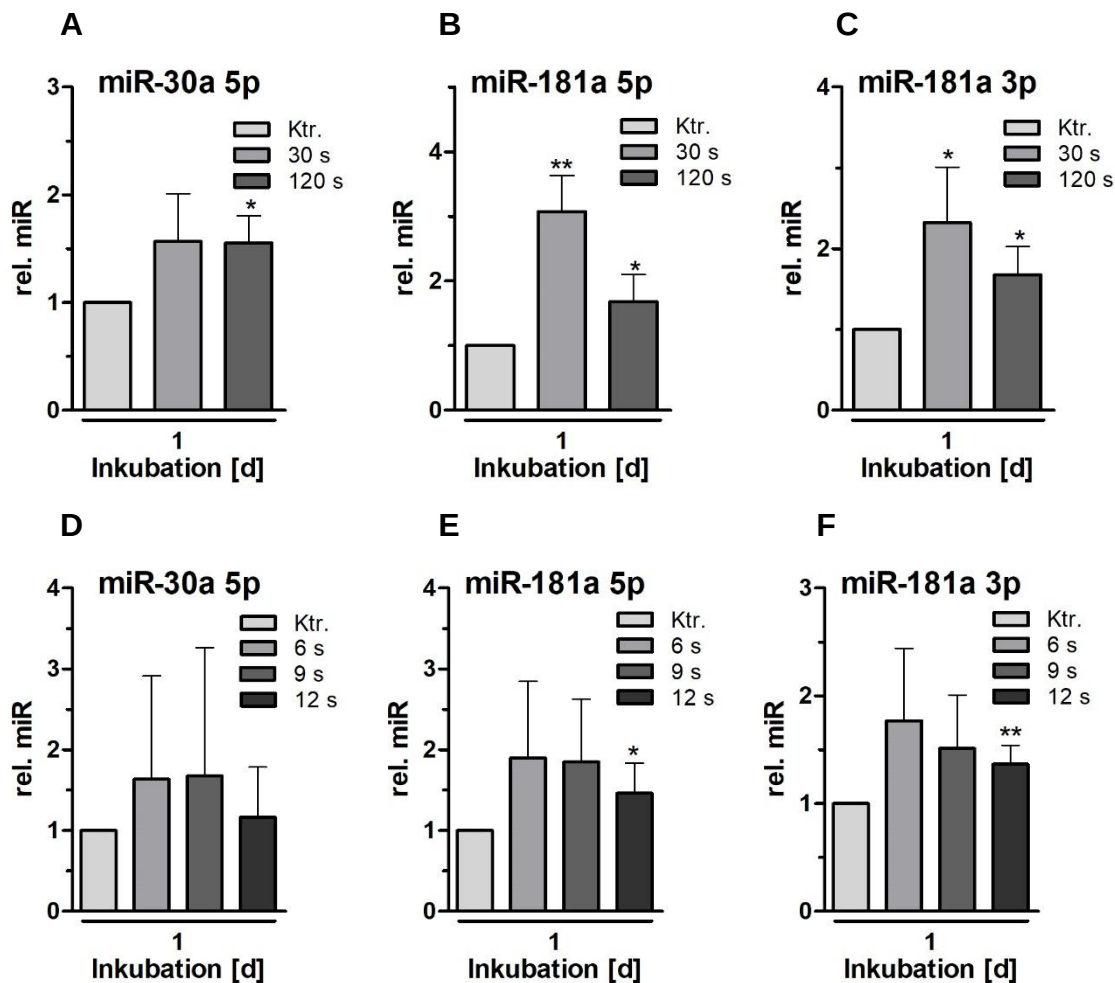


Abb. 11: miR-Expression in HESC nach NIPP Behandlung. Relative miR-Expression von miR-30a 5p (A+D), miR-181a 5p (B+E) und miR-181a 3p (C+F) nach Behandlung mit PlasmaCare (A-C) und KinpenMed (D-F). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der relativen mRNA-Expression dargestellt (normiert auf die Kontrolle). Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*) und $p \leq 0,01$ (**).

3.4 Indirekte NIPP Behandlung von endometrialen Stromazellen

Da die direkte NIPP Behandlung der Zellen einige interessante Effekte zeigte, wurde außerdem der Einfluss einer indirekten NIPP Behandlung untersucht. Dabei wurde Medium behandelt, welches den Zellen anschließend hinzugegeben wurde. Diese Methode ist besonders interessant, da hier eine klinische Anwendung mit geringem invasivem Vorgehen möglich erscheint. Als Behandlungszeit für die NIPP Behandlung mittels PlasmaCare wurde 120 s ausgewählt, weil die Durchführung ähnlich zu der direkten Behandlung war.

Im Gegensatz dazu musste die Behandlungszeit für den KinpenMed deutlich angepasst werden. In diesem Fall wurden die Zellen während der direkten Behandlung wesentlich punktueller behandelt, als dies bei der Mediumbehandlung aufgrund des erhöhten Volumens möglich war. Daher wurde die Behandlungsdauer auf 180 s erhöht.

3.4.1 Wachstumsanalyse nach indirekter NIPP Behandlung

Die indirekte NIPP Behandlung zeigte nur einen geringen Effekt auf das Zellwachstum. Die Behandlung mittels PlasmaCare hatte keine signifikante Inhibition des Zellwachstums zur Folge (Ktr.: $2,8 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$; 120 s: $2,6 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$, $p=0,298$) (Abb. 12A). Im Gegensatz dazu wurde das Zellwachstum durch die Behandlung mittels KinpenMed signifikant inhibiert (Ktr.: $2,5 \times 10^5 \pm 4,2 \times 10^3$; 180 s: $2,3 \times 10^5 \pm 6,8 \times 10^3$, $p=0,011$) (Abb. 12B).

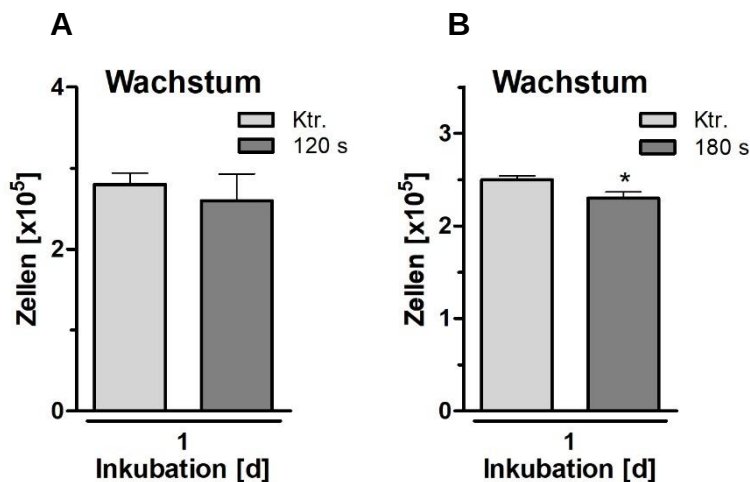


Abb. 12: Proliferation von HESC nach indirekter NIPP Behandlung. Wachstumskinetik im 6-Well Maßstab nach Behandlung des Zellmediums mit PlasmaCare (A) und KinpenMed (B). Die initiale Zellzahl betrug 2×10^5 , als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 1 d bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*).

3.4.2 mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 nach indirekter NIPP Behandlung

Ebenso wie nach der direkten NIPP Behandlung wurde auch nach der indirekten NIPP Behandlung eine mRNA-Expressionsanalyse durchgeführt. Nach einer Inkubation der

Zellen in mit PlasmaCare behandeltem Zellmedium konnte ein signifikanter Anstieg des Markers PRL festgestellt werden ($1,93 \pm 0,16$, $p < 0,001$) (Abb. 13A), wohingegen der Marker IGFBP1 nicht signifikant anstieg ($1,24 \pm 0,70$, $p = 0,587$) (Abb. 13B). Auch die Behandlung durch den KinpenMed führt zwar zu einem Anstieg der Marker PRL ($1,43 \pm 0,71$, $p = 0,351$) (Abb. 13C) und IGFBP1 ($2,59 \pm 2,41$, $p = 0,316$) (Abb. 13D), dieser war allerdings aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant.

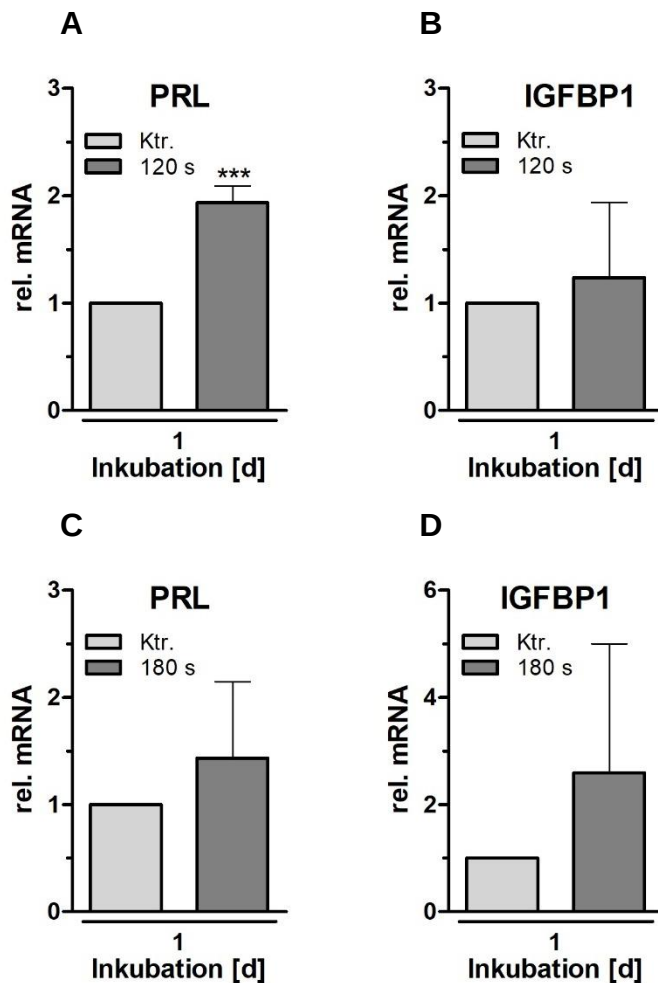


Abb. 13: mRNA-Expression in HESC nach indirekter NIPP Behandlung. Relative mRNA-Expression von PRL (A+C) und IGFBP1 (B+D) nach Behandlung des Zellmediums mit PlasmaCare (A+B) und KinpenMed (C+D). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der relativen mRNA-Expression dargestellt (normiert auf die Kontrolle). Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,001$ (***).

3.4.3 miR-Expression von miR-30a 5p, miR-181a 5p und miR-181a 3p nach indirekter NIPP Behandlung

Aufgrund der positiven Tendenz der PRL- und IGFBP1-Expression nach der indirekten NIPP Behandlung wurde auch der Einfluss auf die miR-Expression untersucht. Dabei zeigte die Behandlung mittels PlasmaCare einen Anstieg der Marker miR-30a 5p ($1,27 \pm 0,89$, $p=0,627$) (Abb. 14A), miR-181a 5p ($1,45 \pm 1,13$, $p=0,529$) (Abb. 14B) und miR-181a 3p ($1,40 \pm 0,31$, $p=0,875$) (Abb. 14C), dieser war jedoch sehr variabel und daher nicht signifikant. Die Behandlung mittels KinpenMed schien dagegen kaum einen Effekt auf die miR-Expression der Zellen zu haben (miR-30a 5p: $1,05 \pm 0,20$, $p=0,701$; miR-181a 5p: $1,11 \pm 0,26$, $p=0,496$; miR-181a 3p: $1,01 \pm 0,54$, $p=0,970$) (Abb. 14D-F).

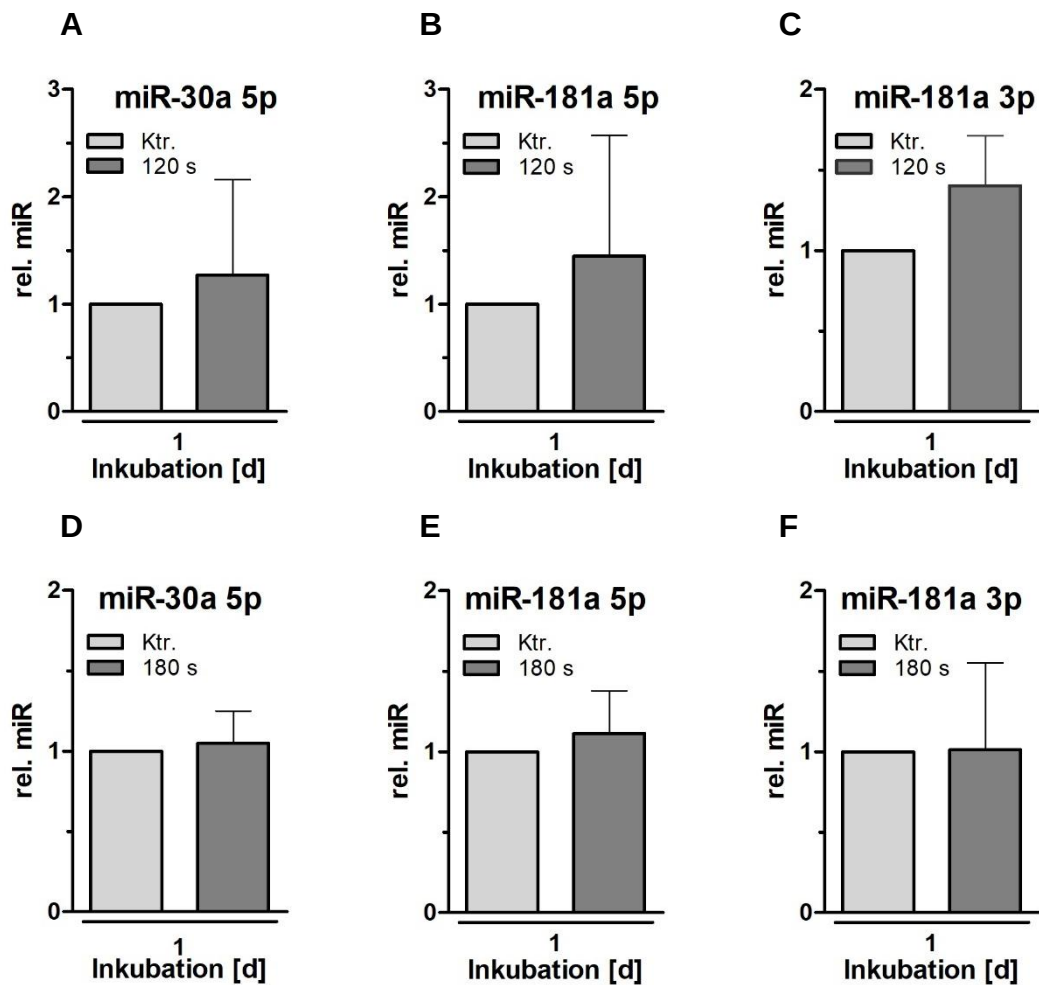


Abb. 14: miR-Expression in HESC nach indirekter NIPP Behandlung. Relative miR-Expression von miR-30a 5p (A+D), miR-181a 5p (B+E) und miR-181a 3p (C+F) nach Behandlung des Zellmediums mit PlasmaCare (A-C) und KinpenMed (D-F). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert $\pm$ StAbw. der relativen mRNA-Expression dargestellt (normiert auf die Kontrolle). Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet.

Die indirekte NIPP Behandlung zeigte zusammenfassend geringere Effekte bezüglich mRNA- und miR-Expression dezidualisierungsspezifischer Marker, im Vergleich zu der zuvor gezeigten direkten NIPP Behandlung von HESC.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer NIPP Behandlung auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen zu charakterisieren und mit den Effekten der hormonellen Stimulation zu vergleichen. Dies erfolgte sowohl auf zellulärer wie auch auf molekularer Ebene. Der Vorgang der Dezidualisierung ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft essentiell. Die morphologische und sekretorische Differenzierung der endometrialen Stromazellen ist notwendig für die Implantation und Ausbildung der Plazenta (Gellersen und Brosens, 2003). Zwar wurden bereits therapeutische Optionen zur Verbesserung der endometrialen Rezeptivität in vivo beschrieben, jedoch besteht hier weiterhin ein großer Forschungsbedarf (Strowitzki und Germeyer, 2016). Außerdem werden Störungen im Rahmen der Dezidualisierung in Verbindung gebracht mit habituellem Abort und Präeklampsie (Coulam, 2016; Garrido-Gomez et al., 2017; Giudice et al., 1997). Problematisch ist insbesondere die Übertragung der in vitro gewonnenen Daten auf eine klinische Nutzung in vivo.

Die Induktion der in vitro Dezidualisierung mithilfe von hormoneller Stimulation stellt ein etabliertes Verfahren dar, um Einflussfaktoren auf die Dezidualisierung zu untersuchen. Hierfür sind verschiedene Stimulationsmöglichkeiten und Kombinationen beschrieben. Die Kombination von E2 und P4 ist verbreitet, ebenso die Anwendung von cAMP, teilweise werden die stabileren Analoga MPA und Br-cAMP verwendet (Mizuno et al., 1998). Die Kombination der drei Stimuli scheint die stärksten Effekte hervorzurufen (Saleh et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die hormonelle Stimulation mithilfe von E2, P4 und Br-cAMP durchgeführt. Dabei konnten durchweg signifikante Effekte beobachtet werden, welche im Folgenden weitergehend diskutiert und mit den Effekten der NIPP Behandlung verglichen werden sollen.

4.1 Morphologische Differenzierung

Die morphologischen Veränderungen der endometrialen Stromazellen im Rahmen der Dezidualisierung sind vielfach beschrieben worden und werden zur Beurteilung der

erfolgten in vitro Dezidualisierung herangezogen. Die spindelförmigen, fibroblastenähnlichen Zellen differenzieren epithelartig, es kommt zu einer Größenzunahme durch Glykogen- und Lipideinlagerung. Der Zellkern vergrößert sich ebenfalls, die Anzahl an Nucleoli steigt. Außerdem erfolgt eine Zunahme des rauen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats. Innerhalb des Zellverbands erweitern sich die Gap Junctions und somit der Interzellularraum (Gellersen und Brosens, 2014; Kajihara et al., 2014; Mizuno et al., 1998; Okada et al., 2018).

Unter hormoneller Stimulation konnten in dieser Arbeit charakteristische morphologische Veränderungen bereits nach 4 d beobachtet werden. Nach 8 d zeigte sich eine deutliche Differenzierung der stimulierten Zellen im Vergleich zu den nichtstimulierten, spindelförmigen Zellen. Dagegen konnte nach NIPP Behandlung mittels PlasmaCare auch nach 5 d keine Veränderung des Phänotyps nachgewiesen werden. Bei der Durchführung der Behandlung mittels KinpenMed konnte eine geringgradige polygonale Differenzierung beobachtet werden. Obgleich auf molekularer Ebene dezidualisierungsspezifische Marker eindeutig nachgewiesen wurden, konnte die Transformation des Zellphänotyps von mesenchymal zu epithelial somit nach NIPP Exposition nicht beobachtet werden. Allerdings wäre es möglich, dass für eine sichtbare Differenzierung mehrmalige NIPP Behandlungen oder ein längerer Inkubationszeitraum notwendig sind. Außerdem ist nicht bekannt, welche Bedeutung die morphologische Zelldifferenzierung, unabhängig von den vielfältigen sekretorischen und regulatorischen Funktionen dezidualer Stromazellen, für die Embryoimplantation hat.

4.2 Zellwachstum

Neben den morphologischen Veränderungen wurde das Zellwachstum der unbehandelten, hormonell stimulierten und mit NIPP behandelten Zellen untersucht. Zum Wachstumsverhalten von HESC gibt es verhältnismäßig wenige Studien. Bereits beschrieben wurde, dass nicht-stimulierte Zellen logarithmisch proliferieren und sich innerhalb von 3-4 d verdoppeln. Innerhalb von 10 d kommt es mindestens zu einer Vervierfachung der Zellzahl (Logan et al., 2012; Saleh et al., 2011). Unter hormoneller Stimulation scheint die

Zellproliferation gehemmt zu sein. Das synthetische Gestagen MPA inhibiert in einer Studie von Logan et al. das Zellwachstum über 7 d, danach kommt es zu einer Proliferation der Zellen. Dabei korreliert die Inhibition des Zellwachstums mit den morphologischen Veränderungen der Zellen (Logan et al., 2012). Saleh et al. beschreiben dagegen unter der Kombination von E2 und P4 keine Beeinflussung des Zellwachstums und ebenso keine morphologischen Veränderungen. Allerdings führt in dieser Studie die Stimulation mit cAMP zu einem reduzierten Wachstum und zu einer morphologischen Differenzierung von HESC. Für die humanen dezidualen Stromazellen HDSC, gewonnen aufgrund von Schwangerschaftsabbrüchen im ersten Trimenon, ist sogar eine Reduktion der Zellzahl unter cAMP beschrieben (Saleh et al., 2011).

Ein möglicher Mechanismus der Zellwachstumsinhibition im Rahmen der Dezidualisierung ist folgender. Die in vitro Dezidualisierung mit E2, P4/MPA und cAMP scheint einen initialen Zellzyklusarrest zwischen der G0- und G1-Phase auszulösen, möglicherweise durch den Crosstalk zwischen cAMP und P4. cAMP wird von Logan et al. als Initiator der Dezidualisierung beschrieben, wodurch die endometrialen Stromazellen für P4 sensibilisiert werden. Dieser Zellzyklusarrest zwischen der G0- und G1-Phase wurde ebenfalls bei der in vitro Behandlung von Ovarialkarzinomen mit cAMP nachgewiesen. Im späteren Verlauf der Dezidualisierung kommt es zu einem Zellzyklusarrest zwischen der G2- und M-Phase, dieser kann durch eine Behandlung mit P4 induziert werden (Gellersen und Brosens, 2014; Logan et al., 2012).

Für die nichtstimulierten Zellen im 24-Well-Maßstab konnte in dieser Arbeit ein mit der Literatur vergleichbares Wachstumsverhalten über 5 d für verschiedene initiale Zellzahlen gezeigt werden. Um ein exponentielles Wachstum eindeutig nachzuweisen, wäre wahrscheinlich eine längere Inkubationszeit notwendig gewesen. Im Vergleich dazu zeigten die nichtstimulierten Zellen im 6-Well-Maßstab ein deutlich langsames Wachstum über 12 d. Die Ursache hierfür könnte zum Beispiel eine nicht optimal gewählte initiale Zellzahl sein. Ein ähnlich langsames Zellwachstum zeigen deziduale Stromazellen in der Studie von Saleh et al. (Saleh et al., 2011). Unter der Stimulation mit E2, P4 und Br-cAMP kam es in der vorliegenden Arbeit bereits nach 4 d zu einer signifikanten Reduktion der Zell-

zahl. Dies korrelierte mit den morphologischen Veränderungen der Zellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Zellwachstum der hormonell stimulierten Zellen inhibiert wurde. Um eine erfolgte Dezidualisierung festzustellen, sind jedoch weitere spezifische Marker notwendig.

Eine Inhibition des Wachstums zeigte sich auch nach direkter NIPP Behandlung, unabhängig von dem verwendeten Gerät. Die Stärke der Wachstumsinhibition war abhängig von der gewählten Behandlungsdauer. Es ist festzustellen, dass NIPP Behandlungen in vitro eine antiproliferative Wirkung zeigen können, insbesondere bei Tumorzellen (Semmler et al., 2020). Dieser Effekt wird über eine ansteigende Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt, es kommt zur Induktion von Apoptose und zu einer Membrandysfunktion (Partecke et al., 2012). Andererseits wird NIPP klinisch zur Wundheilung eingesetzt und scheint, neben vasodilatatorischen, antibakteriellen und immunregulatorischen Effekten, die Proliferation von Fibroblasten und Gefäßen zu stimulieren (Heinlin et al., 2011). Auch ein NIPP-induzierter Zellzyklusarrest in der G2-Phase ohne genetische Schädigungen bei Hautzellen ist bekannt (Choi et al., 2013).

Nach der indirekten NIPP Behandlung zeigte sich das Zellwachstum nach einem Tag nur gering inhibiert. Allerdings war auch in der direkten NIPP Behandlung der inhibitorische Effekt erst nach dreitägiger Inkubation zu beobachten. Grundsätzlich scheinen die Effekte der direkten und indirekten NIPP Behandlung ähnlich zu sein, auch wenn die direkte Behandlung eine stärkere Wirkung bei höherer Toxizität zeigt (Saadati et al., 2018). Jedoch gibt es zur indirekten NIPP Behandlung bislang wenige Studien, obwohl eine klinische Anwendung besonders praktikabel erscheint.

Zusammenfassend zeigten sich nach der NIPP Behandlung Veränderungen im Zellwachstum, die vergleichbar mit der Inhibition der Zellproliferation unter hormoneller Stimulation sind. Zur abschließenden Beurteilung, ob die Wachstumsinhibition von HESC im Rahmen der Dezidualisierung stattfindet, oder ob dies ein grundsätzlicher Effekt der NIPP Behandlung auf die Zellen ist, müssen weitere spezifische Parameter wie die mRNA-Expression mit einbezogen werden.

4.3 mRNA-Expression von PRL und IGFBP1

PRL und IGFBP1 sind die Hauptsekretionsprodukte von endometrialen Stromazellen während der Dezidualisierung und werden als Marker hierfür genutzt. Sie sind essentiell für die Differenzierung des Endometriums und kontrollieren die Trophoblasteninvasion (Fluhr et al., 2006; Okada et al., 2018). PRL stimuliert außerdem die Angiogenese, beeinflusst die Proliferation und Funktion von Immunzellen und reguliert die Sekretion der endometrialen Drüsen. Diese Effekte von PRL werden über single-pass Transmembranproteine, die zu den Typ-1-Zytokinrezeptoren gehören, an die Zielzellen vermittelt (Jabbour und Critchley, 2001). IGFBP1 bindet und reguliert, abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus, die Aktivität von IGF-1 und -2. Diese Proteine haben mitogene, metabolische und antiapoptotische Eigenschaften und beeinflussen so die endometriale Differenzierung (Giudice und Irwin, 1999). Über die IGF-unabhängige Bindung an trophoblastärem Integrin scheint IGFBP1 außerdem die Invasion des Trophoblasten direkt zu kontrollieren (Irwin und Giudice, 1998).

Veränderungen der mRNA-Expression der Marker PRL und IGFBP1 im Rahmen der in vitro Dezidualisierung wurden bereits mehrfach untersucht. Es sind eine Vielzahl von möglichen Stimulationsprotokollen bekannt, mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen. Die Stimulation mit P4 erweist sich in einigen Studien als nicht ausreichend, um einen Expressionsanstieg der Marker auszulösen (Cloke et al., 2008; Samalecos et al., 2009). Andere Studien konnten jedoch sehr wohl einen Anstieg von PRL und IGFBP1 unter P4 bzw. MPA zeigen, dieser scheint dosisabhängig zu sein (Irwin et al., 1989; Mizuno et al., 1998; Tseng et al., 1992). Auch für die Kombination von P4 mit E2 sind zum Teil signifikante Effekte beobachtet worden (Fluhr et al., 2006; Irwin et al., 1989; Saleh et al., 2011). Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich durch verschiedene Stimulationsprotokolle und Nachweismethoden innerhalb der Studien erklären. Br-cAMP scheint dagegen durchgehend einen starken Expressionsanstieg der Marker auszulösen, der allerdings nur kurzfristig anhält und nach 4-7 d abfällt (Cloke et al., 2008; Brosens et al., 1999; Samalecos et al., 2009). Die Kombination von P4/MPA mit Br-cAMP und ggf. E2 zeigt in diversen Studien den stärksten und anhaltendsten Effekt auf die Expression von PRL und IGFBP1 (Brosens et al., 1999; Cloke et al., 2008; Saleh et al., 2011; Samalecos et al., 2009). Auch

in der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der dezidualisierungsspezifischen Marker nach 12 d unter der Kombination von P4, E2 und Br-cAMP beobachtet werden. Somit ist anzunehmen, dass das verwendete Zellmodell die Fähigkeit zur in vitro Dezidualisierung besitzt.

Nach der direkten NIPP Exposition konnte ebenso ein Anstieg von PRL und IGFBP1 beobachtet werden, der aber schwächer ausgeprägt war, als bei der hormonellen Stimulation. Die PlasmaCare Behandlung hatte einen geringen Einfluss auf die IGFBP1-Expression, während die Expression von PRL zum Teil signifikant anstieg. Die Effekte unterschieden sich abhängig von der Behandlungsdauer, jedoch konnte mit den bisher durchgeführten Versuchen keine optimale Behandlungszeit festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigte die KinpenMed Behandlung einen deutlicheren Anstieg der dezidualisierungsspezifischen Marker. Eine Behandlungsdauer von 6 s zeigte anhaltende Effekte über 5 d, während längere Behandlungen nur zu einem kurzfristigen Anstieg von PRL und IGFBP1 nach 1 d führten. Auch die indirekte NIPP Behandlung zeigte einen schwachen Expressionsanstieg von PRL und IGFBP1, wobei hier lediglich PRL nach PlasmaCare Exposition signifikant anstieg. Grundsätzlich ist die gesteigerte Expression der dezidualisierungsspezifischen Marker als Nachweis der in vitro Dezidualisierung zu werten. Viele Regulationsmechanismen der Dezidualisierung werden über PRL und IGFBP1 vermittelt und ihre Bedeutung für eine erfolgreiche Implantation ist unbestritten. Allerdings scheint NIPP diese nur relativ schwach zu induzieren, was auch die ausbleibende morphologische Differenzierung erklären könnte. Hier wären weitere Untersuchungen zur optimalen Behandlungsdauer notwendig. Ebenso wurde der Einfluss von NIPP nur nach einer Inkubationszeit von 1 d und ggf. 5 d betrachtet. Es ist vorstellbar, dass eine längere Inkubationszeit und wiederholte NIPP Behandlungen, ähnlich wie bei der hormonellen Stimulation, für stärkere Effekte notwendig sind.

Die Wirkung von NIPP auf endometriale Stromazellen lässt sich über epigenetische Veränderungen erklären. Es ist bekannt, dass NIPP die Genexpression verschiedenster Zellen beeinflussen kann; beteiligte Mechanismen sind unter anderem Veränderungen der

DNA-Methylierung sowie der Histon-Methylierung, -Acetylierung und -Phosphorylierung (Braný et al., 2021). NIPP steigert beispielsweise die Expression bestimmter Gene in Hautzellen, welche im Zusammenhang mit Kollagen, Fibronectin und VEGF stehen (Choi et al., 2013). DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen spielen auch eine wichtige Rolle im Rahmen der Veränderungen der Genexpression während der Dezidualisierung. Bei der DNA-Methylierung werden Gene über das Hinzufügen von Methylgruppen an bestimmte Nukleotide durch DNA-Methyltransferasen inaktiviert. Die Menge dieser Enzyme ist in der präzeptiven Phase einer Schwangerschaft stark erhöht und führt zu spezifischen Veränderungen der Methylierung während der Implantation (Liu et al., 2020; Retis-Resendiz et al., 2021). Außerdem wurden in der proliferativen und sekretorischen Zyklusphase verschiedene Methylierungsmuster in Genen, die mit Zellproliferation und RNA-Metabolismus assoziiert sind, gefunden (Retis-Resendiz et al., 2021). Bei der Histon-Modifikation wird über Methylierung und Acetylierung die Chromatinstruktur und Genomorganisation entscheidend verändert und somit die Genexpression reguliert (Liu et al., 2020). Auch hier liegt eine zyklusabhängige Veränderung vor (Munro et al., 2010).

4.4 miR Expression

Neben epigenetischen Veränderungen kommt es während der Dezidualisierung auch zu Veränderungen der miR-Expression und -Funktionalität. miRs sind kurze, einzelsträngige und nichtkodierende RNA-Sequenzen mit regulatorischen Funktionen (He und Hannon, 2004). Sie beeinflussen die Genexpression posttranskriptional, indem sie an das untranslatierte 3'-Ende von mRNAs binden und die Translation direkt hemmen oder zu einem Abbau der mRNA führen (Bartel, 2009). Über eine Sekretion umhüllt von Exosomen können miRs extrazellulär als Signalmoleküle wirken (Kropp et al., 2014). Wahrscheinlich spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung, sowie bei metabolischen Prozessen, Mechanismen des Zelltods, Hämatopoese, Tumorgenese, DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikation (Chen et al., 2005; He und Hannon, 2004). Unter anderem regulieren miRs die Oogenese, Implantation, Plazentation und Embryoentwicklung in den weiblichen Reproduktionsorganen (Liang et al., 2017; Tesfaye et al.,

2016). Eine Dysregulation von miRs ist mit verschiedensten Krankheiten assoziiert, einschließlich Malignomen, Präeklampsie, Endometriose und dem PCO-Syndrom (Estella et al., 2012; Kropp et al., 2014; Tesfaye et al., 2016).

Die Bedeutung von miR-30a 5p während der Dezidualisierung wurde von Aoyagi et al. entdeckt. Es konnte festgestellt werden, dass die Expression von miR-30a 5p in endometrialen Stromazellen während der in vitro Dezidualisierung ansteigt. Dies korreliert mit einer gesteigerten mRNA-Expression von KLF9 (Krüppel-like Factor 9) und PER3 (Period-Circadian Clock 3), wohingegen die mRNA-Expression von TLL1 und 2 (Tolloid-like-1 und -2) sowie PITX1 (Paired-like Homeodomain 1) abnimmt. Die Autoren spekulieren, dass der Anstieg von miR-30a 5p über diese Mechanismen indirekt die Expression von PRL und IGFBP1 während der Dezidualisierung fördert (Abb. 15) (Aoyagi et al., 2017). Dies ist nachvollziehbar, da KLF9, welches von dezidualen Stromazellen vermehrt produziert wird, die Expression von IGFBP1 zyklusabhängig steigert (Pabona et al., 2010). Außerdem wird die Expression von PRL durch PITX1 sowie TLL1 und 2 inhibiert (Ge et al., 2007; Quentien et al., 2002). Allgemein scheint miR-30a antiproliferativ zu wirken, es inhibiert beispielsweise das Zellwachstum und die Progression kolorektaler Karzinomzellen (Liu et al., 2015). Andererseits fördert miR-30a die Fähigkeit von Gliomzellen zur Invasion und inhibiert die Autophagie von Zellen (Wang et al., 2015; Zheng et al., 2015).

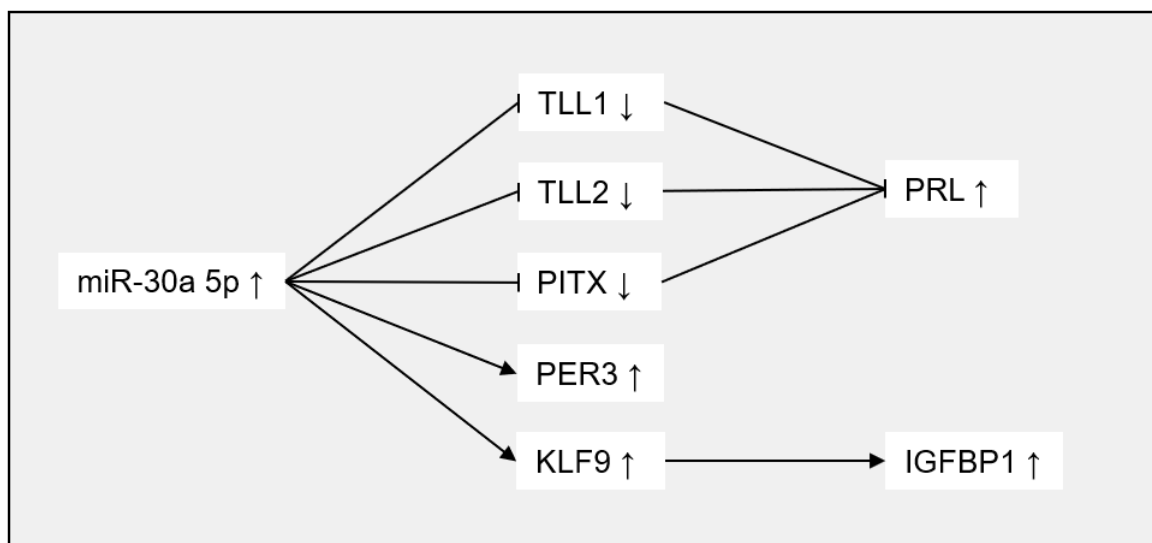


Abb. 15: Möglicher Signalweg von miR-30a 5p während der Dezidualisierung. In Anlehnung an Aoyagi et al., 2017.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass miR-30a 5p im Rahmen der hormonell induzierten in vitro Dezidualisierung signifikant ansteigt. Dieser Effekt wurde grundsätzlich auch nach der direkten NIPP Exposition beobachtet, wobei die PlasmaCare Behandlung deutlichere Ergebnisse zeigte. Nach der Behandlung mittels KinpenMed zeigte sich zwar auch ein Anstieg von miR-30a 5p, jedoch waren die Ergebnisse sehr variabel und nicht signifikant. Dennoch kann grundsätzlich der Effekt der direkten NIPP Behandlung auf die Expression von miR-30a 5p als durchaus vergleichbar zur hormonellen Stimulation gewertet werden, wenngleich eine Optimierung des Behandlungsablaufs, besonders bezüglich des KinpenMed, für aussagekräftigere Ergebnisse angestrebt werden sollte. Im Gegensatz dazu zeigte die indirekte NIPP Behandlung unabhängig vom verwendeten Gerät keinen Einfluss auf die miR-30a 5p Expression.

Eine mehrfach im Rahmen der Dezidualisierung untersuchte miR ist miR-181a. Während zum Teil eine Herunterregulierung der miR-181 Familie beschrieben ist (Estella et al., 2012; Wang et al., 2016), konnten andere Studien einen starken Anstieg von miR-181a während der in vitro Dezidualisierung nachweisen (Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2019). Die miR-181 Familie scheint Signalwege über TGF β (Transforming Growth Factor beta) zu regulieren, für dieses Protein konnte eine Beteiligung während der Dezidualisierung endometrialer Stromazellen gezeigt werden (Estella et al., 2012; Stoikos et al., 2008). Bei exogener Zufuhr von TGF β wird die in vitro Dezidualisierung verstärkt (Stoikos et al., 2008). Außerdem ist eine Beeinflussung der T-Zellrezeptoren durch miR-181 bekannt, diese vermitteln eine allogene Immuntoleranz und tragen daher zum Aufrechterhalten einer Schwangerschaft bei (Estella et al., 2012). Zhang et al. konnten nachweisen, dass miR-181a in endometrialen Epithelzellen in Anwesenheit von E2 konzentrationsabhängig reduziert wird, während in Anwesenheit von P4 erhöhte Mengen an miR-181a vorliegen (Zhang et al., 2019). Auch während der Stimulation endometrialer Stromazellen mit Br-cAMP und MPA wurde ein starker Anstieg der miR-181a Expression nachgewiesen, wodurch die morphologische Differenzierung und Expression dezidualisierungsspezifischer Gene gefördert wurde. Umgekehrt beeinträchtigte die Hemmung von miR-181a die in vitro Dezidualisierung (Zhang et al., 2015). Es ist bekannt, dass miR-181a die Transkription und Translation von KLF12 (Krüppel-like Factor 12) hemmt, der während der

Dezidualisierung signifikant reduziert ist (Zhang et al., 2015). KLF12 hat eine inhibierende Wirkung auf die Expression von PRL und IGFBP1, sowie auf die morphologische Differenzierung der Zellen (Shen et al., 2013). Während einer miR-181a Überexpression konnte außerdem eine gesteigerte FOXO1a (Forkhead-Box-Protein O1a) Expression nachgewiesen werden (Zhang et al., 2015). Sowohl in vitro als auch in vivo, kommt es zu einem Anstieg von FOXO1a während der Dezidualisierung. Dieses Protein reguliert vermutlich dezidualisierungsspezifische Gene wie PRL und IGFBP1 (Maruyama und Yoshimura, 2008).

In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass miR-181a während der Schwangerschaft erhöht vorliegt. miR-181a 5p scheint die Zelladhäsion zu regulieren, ist beteiligt an E2-vermittelten Signalwegen und reguliert CARM1 (Coactivator assoziierte Arginin-Methyltransferase 1) (Kamijo et al., 2022). Dieses Protein beeinflusst die Zellteilung und -differenzierung während der Oogenese und Präimplantation im Mausmodell (Sun et al., 2020). Auch in Rinderoozyten und -embryonen konnte miR-181a nachgewiesen werden, wobei bis zur Entstehung der Blastozyste eine gesteigerte Expression beobachtet wurde (Lingenfelter et al., 2011). Ähnliche Ergebnisse sind für das Endometrium von Schweinen vorhanden, wo miR-181a am 15. Gestationstag erhöht exprimiert wurde, während es am 26. Gestationstag reduziert vorlag (Su et al., 2014). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass miR-181a eine relevante Rolle während der Dezidualisierung spielt. Es stimuliert unter anderem dezidualisierungsspezifische Gene wie PRL und IGFBP1, fördert die morphologische Differenzierung der endometrialen Stromazellen und beeinflusst die T-Zell-Sensitivität und -Selektion (Zhang et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein starker Anstieg von miR-181a während der hormonell induzierten in vitro Dezidualisierung nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Studie von Zhang et al. zum Anstieg von miR-181a unter hormoneller Stimulation endometrialer Stromazellen (Zhang et al., 2015). Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch die direkte NIPP Behandlung. Nach PlasmaCare Exposition der Zellen stieg miR-181a signifikant an, wobei eine kürzere Behandlungsdauer etwas stärkere Effekte zeigte. Die Behandlung mit dem KinpenMed zeigte einen schwächeren Expressionsanstieg von miR-181a, dennoch konnte mit einer Behandlungsdauer von 12 s ein signifikantes Ergebnis erreicht werden.

Nach der indirekten KinpenMed Behandlung konnte kein Anstieg von miR-181a beobachtet werden. Die indirekte PlasmaCare Exposition führte zu einem schwachen, nicht signifikanten Anstieg. Insgesamt scheint sowohl die hormonelle Stimulation, wie auch die direkte NIPP Behandlung zu einem Expressionsanstieg von miR-181a zu führen, wobei für den KinpenMed eine weitere Optimierung angestrebt werden sollte. Dem gegenüber zeigt die indirekte NIPP Behandlung allenfalls schwache Effekte auf die miR-Expression.

Neben den exemplarisch dargestellten miRs sind noch viele weitere bekannt, welche im Rahmen der Dezidualisierung eine Rolle spielen könnten, wobei die genauen Regulationsmechanismen meist noch unbekannt sind (Tab. 10). Der Einfluss von NIPP auf die miR Expression verschiedener Zellen ist bereits mehrfach untersucht worden. In einer Studie von Guo et al. zur NIPP Behandlung von Leukämiezellen konnten Veränderungen von 28 miRs nachgewiesen werden, 17 miRs wurden verstärkt exprimiert, 11 miRs wurden inhibiert (Guo et al., 2021). Somit erscheint es möglich, dass NIPP in endometrialen Stromazellen die Expression spezifischer miRs verändert.

Tab. 10: Übersicht einiger miRs im Rahmen der Dezidualisierung

miR	Regulierung	Beteiligte Faktoren	Nachweis
miR-30a	Anstieg	KLF9, TLL1, TLL2, PER3, PITX1	Aoyagi et al., 2017
miR-96	Abfall	FOXO1, HOXA10	Estella et al., 2012
miR-135b	Abfall	FOXO1, HOXA10	Estella et al., 2012
miR-136	Abfall	BCL2, VEGF	Ji et al., 2017
miR-181a	Anstieg	KLF12, FOXO1a, T-Zellrezeptor	Zhang et al., 2015
miR-181b	Abfall	Osteopontin	Wang et al., 2018
miR-210	Anstieg	E2F3, PTPN1	Aoyagi et al., 2017
miR-222	Abfall	Zellzyklusarrest, CDKN1C/p57kip2	Qian et al., 2009
miR-542	Abfall	ILK, TGFβ1, SMAD2, VEGF, COX-2, MMP-9	Qu et al., 2021

4.4 Schlussfolgerungen und klinischer Ausblick

Die in vitro Dezidualisierung endometrialer Stromazellen konnte durch eine Stimulation mit E2, P4 und Br-cAMP auf zellulärer und molekularer Ebene gezeigt werden. Sowohl eindeutige morphologische Veränderungen, wie auch der Anstieg der dezidualisierungsspezifischen Marker PRL und IGFBP1 konnten beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse zeigen diverse Studien zur Etablierung der in vitro Dezidualisierung (Brosens et al., 1999; Cloke et al., 2008; Saleh et al., 2011; Samalecos et al., 2009). Darüber hinaus konnte der Anstieg von miR-30a und miR-181a unter hormoneller Stimulation beschrieben werden, wobei auch diese Ergebnisse durch vorhandene Untersuchungen bestätigt werden (Aoyagi et al., 2017; Zhang et al., 2015). Mit diesem etablierten Zellmodell wurde im nächsten Schritt der Einfluss von NIPP auf endometriale Stromazellen charakterisiert. Obgleich eine eindeutige morphologische Zelldifferenzierung ausblieb, kam es zu charakteristischen Veränderungen auf mRNA- und miR-Ebene. Der Anstieg der dezidualisierungsspezifischen Marker PRL und IGFBP1 legt nahe, dass auch nach direkter NIPP Behandlung eine Dezidualisierung stattfindet. Jedoch gab es deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Geräten und Behandlungszeiten, der KinpenMed scheint stärkere Effekte auszulösen als das Gerät PlasmaCare. Das könnte an den unterschiedlichen Mechanismen der Plasmagenerierung liegen, der KinpenMed erzeugt einen feinen und präzise zu kontrollierenden Plasmastrahl, während der PlasmaCare eine flächige Anwendung ermöglicht (Sailer, 2022; Zimmermann et al., 2022). Die indirekte NIPP Behandlung zeigte insgesamt ähnliche Effekte, jedoch waren diese deutlich schwächer ausgeprägt. Dabei scheint sich der KinpenMed für die indirekte Behandlung weniger gut zu eignen, da er vor allem für eine punktuelle Behandlung entwickelt wurde. Trotzdem wäre, im Hinblick auf eine einfache klinische Anwendung, eine weitere Evaluation der indirekten Behandlung interessant.

Wenige etablierte Therapiemöglichkeiten stehen bei habituellem Abort und wiederholtem Implantationsversagen nach Embryotransfer zur Verfügung. Die Mehrheit der Patientinnen mit habituellem Abort weist keine Assoziation mit anatomischen, endokrinen, immunologischen oder genetischen Veränderungen auf, welche die Aborte erklären und gezielt therapiert werden könnten (Gellersen und Brosens, 2014). So ist beispielweise die Anzahl

chromosomal unauffälliger Embryonen bei habituellen Aborten im Vergleich zu sporadischen Aborten signifikant höher (Coulam, 2016). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Ursache habitueller Aborte häufig auf zellulärer und molekularer Ebene, zum Beispiel im Rahmen der Dezidualisierung, zu finden ist. Der Bedarf für Therapiemöglichkeiten einer gestörten Dezidualisierung ist offensichtlich, aufgrund der herausragenden Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft. Habituelle Aborte sind assoziiert mit einer verminderten Expression von PRL und einer gestörten Reaktion auf hCG, das nach der Implantation durch den Embryo sezerniert wird und die Dezidualisierung fördert (Salker et al., 2010). Eine gestörte Dezidualisierung wird außerdem als mögliche Ursache für wiederholtes Implantationsversagen nach Embryotransfer beschrieben (Franasiak et al., 2021). Bereits einige Therapieansätze zur Steigerung der Schwangerschaftsrate und Vermeidung von Aborten sind untersucht worden, als einzige klinisch etablierte Option steht P4 zur Verfügung (Gellersen und Brosens, 2014). Aufgrund der risikoarmen Anwendung von NIPP Behandlungen und dem nachgewiesenen Einfluss auf endometriale Stromazellen wäre möglicherweise eine klinische Anwendung interessant. Die Sekretionsprodukte PRL und IGFBP1 vermitteln einen Großteil der Effekte der Dezidualisierung wie die Trophoblasteninvasion, die Angiogenese und die Immunregulation. Da auch durch NIPP ein Anstieg dieser Marker induziert werden kann, sind positive Effekte auf die Schwangerschaftsrate anzunehmen.

5. Zusammenfassung

Die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen, bei welcher es zu umfassenden sekretorischen und morphologischen Differenzierungen kommt, ist notwendig für die Embryoimplantation und Entwicklung der Plazenta. Über den Anstieg von Sekretionsprodukten wie PRL und IGFBP1 wird unter anderem Einfluss auf die Immunregulation, Gestaltung der EZM, Angiogenese und Trophoblasteninvasion genommen. Gesteuert wird dieser Prozess durch den zyklischen Anstieg von P4, das seine Wirkung vor allem über cAMP vermittelt. Außerdem sind viele weitere Einflussfaktoren und epigenetische Mechanismen bekannt, beispielsweise regulieren miR-30a 5p und miR-181a möglicherweise indirekt den Anstieg von PRL und IGFBP1. Eine gestörte Dezidualisierung wird mit Infertilität, habituellem Abort und Präeklampsie in Verbindung gebracht. Therapieoptionen zur Steigerung der endometrialen Rezeptivität sind jedoch bislang nicht etabliert.

Ein vielversprechender und nebenwirkungsarmer Therapieansatz für dermatologische, onkologische und neurologische Erkrankungen, sowie Wundheilungsstörungen ist physikalisches Plasma. Aufgrund der Zelldifferenzierenden, antiinflammatorischen und proliferativen Wirkung von NIPP auf verschiedene Zellen wurde der Einfluss auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen untersucht und mit der etablierten hormonellen Stimulation verglichen. Die direkte NIPP Behandlung der Zellen führte zu einem Anstieg der mRNA-Expression von PRL und IGFBP1 und einem Anstieg der miR-Expression von miR-30a 5p und miR-181a 5p und 3p, wenngleich dieser in Anwesenheit von E2, P4 und Br-cAMP ausgeprägter war. Auch wenn eine morphologische Differenzierung unter NIPP ausblieb, legt der Anstieg dieser Marker, welche eine Schlüsselrolle bei der Dezidualisierung spielen, einen potentiellen Effekt von NIPP auf die Dezidualisierung endometrialer Stromazellen nahe. Grundsätzlich ähnliche Effekte zeigte auch eine indirekte NIPP Behandlung der Zellen mit behandeltem Medium, allerdings in weniger stark ausgeprägter Form. Inwieweit die mögliche Induktion der Dezidualisierung durch NIPP klinisch bei Infertilität und Implantationsversagen angewendet werden könnte, ist noch nicht beurteilbar, hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zusammenfassung der Prozesse während der Dezidualisierung	17
Abb. 2: Aufbau und Prinzip der Plasmaquellen	21
Abb. 3: NIPP Behandlung von HESC	32
Abb. 4: Wachstumskinetik HESC mit unterschiedlicher initialer Zellzahl	37
Abb. 5: Morphologie und Proliferation von HESC unter Hormonstimulation	39
Abb. 6: mRNA-Expression in HESC unter Hormonstimulation	40
Abb. 7: miR-Expression in HESC unter Hormonstimulation	41
Abb. 8: Geräte für die NIPP Behandlung	42
Abb. 9: Morphologie und Proliferation von HESC nach NIPP Behandlung	43
Abb. 10: mRNA-Expression in HESC nach NIPP Behandlung	45
Abb. 11: miR-Expression in HESC nach NIPP Behandlung	47
Abb. 12: Proliferation von HESC nach indirekter NIPP Behandlung	48
Abb. 13: mRNA-Expression in HESC nach indirekter NIPP Behandlung	49
Abb. 14: miR-Expression in HESC nach indirekter NIPP Behandlung	51
Abb. 15: Möglicher Signalweg von miR-30a 5p während der Dezidualisierung	59

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte	24
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien	25
Tab. 3: Chemikalien und Lösungen	26
Tab. 4: Primer	27
Tab. 5: Kulturmedien und Zusätze	28
Tab. 6: Herstellung Mastermix	34
Tab. 7: Herstellung Mastermix	34
Tab. 8: Herstellung Mastermix	35
Tab. 9: Herstellung Mastermix	36
Tab. 10: Übersicht einiger miRs im Rahmen der Dezidualisierung	62

8. Literaturverzeichnis

Ahmadi H, Csabai T, Gorgey E, Rashidiani S, Parhizkar F, Aghebati-Maleki L. Composition and effects of seminal plasma in the female reproductive tracts on implantation of human embryos. *Biomed Pharmacother* 2022; 151: 113065

Aoyagi Y, Nasu K, Kai K, Hirakawa T, Okamoto M, Kawano Y, Abe W, Tsukamoto Y, Moriyama M, Narahara H. Decidualization Differentially Regulates microRNA Expression in Eutopic and Ectopic Endometrial Stromal Cells. *Reprod Sci* 2017; 24: 445–455

Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li Y-F, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff A-K, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PloS one* 2013; 8: e79325

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281–297

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215–233

Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16: 121

Beier-Hellwig K, Sterzik K, Beier HM. Molekulare und zellbiologische Aspekte der endometrialen Rezeptivität und ihre Diagnostik. *Gynäkologe* 1998; 31: 325–338

Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 2008; 29: 1–41

Bergamini CM, Pansini F, Bettocchi S, Segala V, Dallochio F, Bagni B, Mollica G. Hormonal sensitivity of adenylate cyclase from human endometrium: modulation by estradiol. *J Steroid Biochem* 1985; 22: 299–303

Boeckmann L, Schäfer M, Bernhardt T, Semmler ML, Jung O, Ojak G, Fischer T, Peters K, Nebe B, Müller-Hilke B, Seebauer C, Bekeschus S, Emmert S. Cold Atmospheric Pressure Plasma in Wound Healing and Cancer Treatment. *Appl Sc* 2020; 10: 6898

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506–1512

Boomsma CM, Kamath MS, Keay SD, Macklon NS. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2022; 6: CD005996

Bourdon M, Santulli P, Jeljeli M, Vannuccini S, Marcellin L, Doridot L, Petraglia F, Batteux F, Chapron C. Immunological changes associated with adenomyosis: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2021; 27: 108–129

Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 2932

Braný D, Dvorská D, Strnádel J, Matáková T, Halašová E, Škovierová H. Effect of Cold Atmospheric Plasma on Epigenetic Changes, DNA Damage, and Possibilities for Its Use in Synergistic Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 12252

Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* 1997; 6: 301–307

Brinsden PR, Alam V, Moustier B de, Engrand P. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure. *Fertil Steril* 2009; 91: 1445–1447

Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4809–4820

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahavakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e179

Choi J-H, Lee H-W, Lee J-K, Hong J, Kim G. Low-temperature atmospheric plasma increases the expression of anti-aging genes of skin cells without causing cellular damages. *Arch Dermatol Res* 2013; 305: 133–140

Cloke B, Huhtinen K, Fusi L, Kajihara T, Yliheikkilä M, Ho K-K, Teklenburg G, Lavery S, Jones MC, Trew G, Kim JJ, Lam EW-F, Cartwright JE, Poutanen M, Brosens JJ. The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium. *Endocrinology* 2008; 149: 4462–4474

Coulam C. What about superfertility, decidualization, and natural selection? *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 577–580

Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 613–630

Eberle C. Gynäkologische Endokrinologie. In: Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C, Muschel K, Kissler S, Siedentopf F, Weißenbacher T, Debus G, Schuhmacher I, Lato K, Sängler N, Hrsg. *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Thieme, 2015: 50–86

Estella C, Herrero I, Moreno-Moya JM, Quiñonero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C. miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization in vitro. *PLoS one* 2012; 7: e41080

Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod* 2005; 20: 3008–3011

Felberbaum R, Weiss JM, Lopens A. Hormonelle Regulation. In: Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schultze-Mosgau A, Schneider KTM, Weiss JM, Hrsg. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Heidelberg: Springer Medizin, 2007: 59–77

Filipić A, Gutierrez-Aguirre I, Primc G, Mozetič M, Dobnik D. Cold Plasma, a New Hope in the Field of Virus Inactivation. *Trends Biotechnol* 2020; 38: 1278–1291

Fluhr H, Krenzer S, Deperschmidt M, Zwirner M, Wallwiener D, Licht P. Human chorionic gonadotropin inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2006; 86: 236–238

Franasiak JM, Alecsandru D, Forman EJ, Gemmell LC, Goldberg JM, Llarena N, Margolis C, Laven J, Schoenmakers S, Seli E. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2021; 116: 1436–1448

Frost RA, Mazella J, Tseng L. Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits the mitogenic effect of insulin-like growth factors and progestins in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1993; 49: 104–111

Gan L, Jiang J, Duan JW, Wu XJZ, Zhang S, Duan XR, Song JQ, Chen HX. Cold atmospheric plasma applications in dermatology: A systematic review. *J Biophotonics* 2021; 14: e202000415

Ganeff C, Chatel G, Munaut C, Frankenne F, Foidart J-M, Winkler R. The IGF system in in-vitro human decidualization. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 27–38

Gao J, Mazella J, Tseng L. Hox proteins activate the IGFBP-1 promoter and suppress the function of hPR in human endometrial cells. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 819–825

Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, Ona K, Padilla-Iserte P, McMaster M, Genbacev O, Perales A, Fisher SJ, Simón C. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E8468-E8477

Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10010–10015

Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 2003; 178: 357–372

Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev* 2014; 35: 851–905

Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG. Prolactin (PRL) mRNA from human decidua differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 64: 127–130

Giudice LC, Irwin JC. Roles of the insulinlike growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 13–21

Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 751-7588

Gravanis A, Stournaras C, Margioris AN. Paracrinology of endometrial neuropeptides: corticotropin-releasing hormone and opioids. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 29–38

Groeneveld E, Broeze KA, Lambers MJ, Haapsamo M, Dirckx K, Schoot BC, Salle B, Duvan CI, Schats R, Mol BW, Hompes PGA. Is aspirin effective in women undergoing in vitro fertilization (IVF)? Results from an individual patient data meta-analysis (IPD MA). *Hum Reprod Update* 2011; 17: 501–509

Guo B, Li W, Liu Y, Xu D, Liu Z, Huang C. Aberrant Expressional Profiling of Small RNA by Cold Atmospheric Plasma Treatment in Human Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Front Genet* 2021; 12: 809658

Haas DM, Hathaway TJ, Ramsey PS. Progestogen for preventing miscarriage in women with recurrent miscarriage of unclear etiology. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 11: CD003511

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522–531

Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Nosenko T, Zimmermann JL, Karrer S. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 1–11

Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995; 217: 419–427

Irwin JC, Giudice LC. Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 21–31

Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril* 1989; 52: 761–768

Jabbour HN, Critchley HO. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 2001; 121: 197–205

Ji L, Zhang L, Li Y, Guo L, Cao N, Bai Z, Song Y, Xu Z, Zhang J, Liu C, Ma X. MiR-136 contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis and angiogenesis of mesenchymal stem cells. *Placenta* 2017; 50: 102–109

Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Sućurović S, Murakami K, Brosens JJ, Ishihara O. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci* 2014; 21: 372–380

Kamijo S, Hamatani T, Sasaki H, Suzuki H, Abe A, Inoue O, Iwai M, Ogawa S, Odawara K, Tanaka K, Mikashima M, Suzuki M, Miyado K, Matoba R, Odawara Y, Tanaka M. MicroRNAs secreted by human preimplantation embryos and IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol* 2022; 20: 130

Khan A, Malik S, Walia J, Fridman G, Fridman A, Friedman PC. Tolerability of Six Months Indirect Cold (Physical) Plasma Treatment of the Scalp for Hair Loss. *J Drugs Dermatol* 2020; 19: 1177–1180

Kobayashi M, Tomoda K, Morihara H, Asahi M, Shimizu T, Kumagai S. Non-thermal atmospheric-pressure plasma potentiates mesodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Heliyon* 2022; 8: e12009

Kropp J, Salih SM, Khatib H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Front Genet* 2014; 5: 91

Liang J, Wang S, Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2017; 15: 90

Lingenfelter BM, Tripurani SK, Tejomurtula J, Smith GW, Yao J. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 40

Liu H, Huang X, Mor G, Liao A. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 2091–2101

Liu M, Huang F, Zhang D, Ju J, Wu XB, Wang Y, Wang Y, Wu Y, Nie M, Li Z, Ma C, Chen X, Zhou JY, Tan R, Yang BL, Zen K, Zhang CY, Chen YG, Zhao Q. Heterochromatin protein HP1 γ promotes colorectal cancer progression and is regulated by miR-30a. *Cancer Res* 2015; 75: 4593–4604

Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht V, Wang EY, Schatz F. Decidual cell regulation of hemostasis during implantation and menstruation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 828: 188–193

Logan PC, Steiner M, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Cell cycle regulation of human endometrial stromal cells during decidualization. *Reprod Sci* 2012; 19: 883–894

Lucas ES, Vrljicak P, Muter J, Diniz-da-Costa MM, Brighton PJ, Kong C-S, Lipecki J, Fishwick KJ, Odendaal J, Ewington LJ, Quenby S, Ott S, Brosens JJ. Recurrent pregnancy loss is associated with a pro-senescent decidual response during the peri-implantation window. *Commun Biol* 2020; 3: 37

Maaskant RA, Bogic LV, Gilger S, Kelly PA, Bryant-Greenwood GD. The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 396–405

Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and re-generation of the uterine endometrium. *Endocr J* 2008; 55: 795–810

Matsui N, Kawano Y, Nakamura S, Miyakawa I. Changes in vascular endothelial growth factor production associated with decidualization by human endometrial stromal cells in vitro. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 138–143

Mizuno K, Tanaka T, Umesaki N, Ogita S. Establishment and characterization of in vitro decidualization in normal human endometrial stromal cells. *Osaka City Med J* 1998; 44: 105–115

Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 297–310

Nastri CO, Gibreel A, Raine-Fenning N, Maheshwari A, Ferriani RA, Bhattacharya S, Martins WP. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev* 2012: CD009517

Ng S-W, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4092

Nie XQ, Li YH, Zhou T, Lu C, Li D, Xiong ZL, Deng YH. Effect of An Atmospheric Plasma Jet on the Differentiation of Melanoblast Progenitor. *Curr Med Sci* 2022; 42: 629–634

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Reprint of: Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril* 2019; 112: e93-e115

Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol* 2018; 17: 220–227

Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. *Hum Reprod Update* 2019; 25: 114–133

Pabona JMP, Zeng Z, Simmen FA, Simmen RCM. Functional differentiation of uterine stromal cells involves cross-regulation between bone morphogenetic protein 2 and Kruppel-like factor (KLF) family members KLF9 and KLF13. *Endocrinology* 2010; 151: 3396–3406

Palejwala S, Tseng L, Wojtczuk A, Weiss G, Goldsmith LT. Relaxin gene and protein expression and its regulation of procollagenase and vascular endothelial growth factor in human endometrial cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 1743–1748

Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, Weiss F-U, Evert M, Huebner NO, Guenther C, Heidecke CD, Kramer A, Bussiahn R, Weltmann K-D, Pati O, Bender C, Bernstorff W von. Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC cancer* 2012; 12: 473

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2020; 113: 533–535

Qian K, Hu L, Chen H, Li H, Liu N, Li Y, Ai J, Zhu G, Tang Z, Zhang H. Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology* 2009; 150: 4734–4743

Qu X, Fang Y, Zhuang S, Zhang Y. Micro-RNA miR-542-3p suppresses decidualization by targeting ILK pathways in human endometrial stromal cells. *Sci Rep* 2021; 11: 7186

Quentien M-H, Manfroid I, Moncet D, Gunz G, Muller M, Grino M, Enjalbert A, Pellegrini I. Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *J Biol Chem* 2002; 277: 44408–44416

Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006; 368: 601–611

Retis-Resendiz AM, González-García IN, León-Juárez M, Camacho-Arroyo I, Cerbón M, Vázquez-Martínez ER. The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium. *Clin Epigenetics* 2021; 13: 116

Rotering H, Hansen U, Welp H, Dell'Aquila AM. Kaltes atmosphärisches Plasma und „advanced negative pressure wound therapy“. *Z Herz- Thorax- Gefäßchir* 2020; 34: 52–61

Saadati F, Mahdikia H, Abbaszadeh H-A, Abdollahifar M-A, Khoramgah MS, Shokri B. Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment. *Sci Rep* 2018; 8: 7689

Sailer U. kINPen® MED – The Precise Cold Plasma Jet. In: Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, Emmert S, Hrsg. *Textbook of Good Clinical Practice in Cold Plasma Therapy*. Cham: Springer International Publishing, 2022: 281–305

Saleh L, Otti GR, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 155

Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, Roelen BAJ, Quenby S, Kuijk EW, Kavelaars A, Heijnen CJ, Regan L, Macklon NS, Brosens JJ. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PloS one* 2010; 5: e10287

Samalecos A, Reimann K, Wittmann S, Schulte HM, Brosens JJ, Bamberger A-M, Gellersen B. Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 76

Schulte MMB, Tsai J, Moley KH. Obesity and PCOS: the effect of metabolic derangements on endometrial receptivity at the time of implantation. *Reprod Sci* 2015; 22: 6–14

Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, Seebauer C, Rebl H, Grambow E, Vollmar B, Nebe JB, Metelmann H-R, Woedtke T von, Emmert S, Boeckmann L. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers* 2020; 12: 269

Shen X, Hu Y, Jiang Y, Liu H, Zhu L, Jin X, Shan H, Zhen X, Sun L, Yan G, Sun H. Krüppel-like factor 12 negatively regulates human endometrial stromal cell decidualization. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433: 11–17

Stoikos CJ, Harrison CA, Salamonsen LA, Dimitriadis E. A distinct cohort of the TGFbeta superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Hum Reprod* 2008; 23: 1447–1456

Strowitzki T. Infertilität bei Frauen: Neueste Entwicklungen. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2013; 56: 1628–1632

Strowitzki T, Germeyer A. Endometrium unter reproduktionsmedizinischen Aspekten. *Gynäkologe* 2016; 49: 762–770

Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Wolff M von. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 617–630

Su L, Liu R, Cheng W, Zhu M, Li X, Zhao S, Yu M. Expression patterns of microRNAs in porcine endometrium and their potential roles in embryo implantation and placentation. *PloS one* 2014; 9: e87867

Sun H, Su J, Wu T, Wang F, Kang J, Zhang J, Xing X, Cheng Y, Zhang Y. CARM1 is heterogeneous in mouse four-cell embryo and important to blastocyst development. *Reproduction* 2020; 159: 91–104

Takahashi H, Nabeshima Y, Ogata K, Takeuchi S. Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA complementary to human decidual prolactin mRNA. *J Biochem* 1984; 95: 1491–1499

Takano M, Lu Z, Goto T, Fusi L, Higham J, Francis J, Withey A, Hardt J, Cloke B, Stavropoulou AV, Ishihara O, Lam EW-F, Unterman TG, Brosens JJ, Kim JJ. Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2334–2349

Teh W-T, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 1419–1430

Tesfaye D, Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Sohel MMH, Pandey HO, Hoelker M, Schellander K. Potential role of microRNAs in mammalian female fertility. *Reprod Fertil Dev* 2016; 29: 8–23

Toth B, Würfel W, Germeyer A, Hirv K, Makrigiannakis A, Strowitzki T. Disorders of implantation - are there diagnostic and therapeutic options? *J Reprod Immunol* 2011; 90: 117–123

Tseng L, Gao JG, Chen R, Zhu HH, Mazella J, Powell DR. Effect of progestin, antiprogesterone, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1992; 47: 441–450

Turocy J, Williams Z. Novel therapeutic options for treatment of recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2021; 116: 1449–1454

Wang XB, Qi QR, Wu KL, Xie QZ. Role of osteopontin in decidualization and pregnancy success. *Reproduction* 2018; 155: 423–432

Wang Y, Lv Y, Gao S, Zhang Y, Sun J, Gong C, Chen X, Li G. MicroRNA Profiles in Spontaneous Decidualized Menstrual Endometrium and Early Pregnancy Decidua with Successfully Implanted Embryos. *PloS one* 2016; 11: e0143116

Wang Z, Dai X, Chen Y, Sun C, Zhu Q, Zhao H, Liu G, Huang Q, Lan Q. MiR-30a-5p is induced by Wnt/ β -catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 465: 374–380

Wende K, Brandenburg R. Cold Physical Plasma: A Short Introduction. In: Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, Emmert S, Hrsg. *Textbook of Good Clinical Practice in Cold Plasma Therapy*. Cham: Springer International Publishing, 2022: 37–62

Xiong Z. Cold Atmospheric Plasmas: A Novel and Promising Way to Treat Neurological Diseases. *Trends Biotechnol* 2018; 36: 582–583

Zhang L, Liu X, Che S, Cui J, Ma X, An X, Cao B, Song Y. Endometrial Epithelial Cell Apoptosis Is Inhibited by a ciR8073-miR181a-Neurotensis Pathway during Embryo Implantation. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 14: 262–273

Zhang Q, Zhang H, Jiang Y, Xue B, Diao Z, Ding L, Zhen X, Sun H, Yan G, Hu Y. MicroRNA-181a is involved in the regulation of human endometrial stromal cell decidualization by inhibiting Krüppel-like factor 12. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13: 23

Zheng B, Zhu H, Gu D, Pan X, Qian L, Xue B, Yang D, Zhou J, Shan Y. MiRNA-30a-mediated autophagy inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to sorafenib. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 459: 234–239

Zimmermann J, Roskopf CC, Cantzler S, Kirsch J, Unger R, Weilemann H, Cantzler M, Linner M, Wunderl M, Maisch T. Plasma Care®. In: Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, Emmert S, Hrsg. *Textbook of Good Clinical Practice in Cold Plasma Therapy*. Cham: Springer International Publishing, 2022: 363–387

9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, Direktor der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie Bonn, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Herzlichen Dank an meinen Betreuer und Laborleiter Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil Matthias Stope, für seine hervorragende Betreuung im Labor und während der Schreibphase. Ihm verdanke ich ein interessantes Thema, einige konstruktive Kritik und viele inspirierende Ideen und Anregungen.

Bei Frau Subedi bedanke ich mich für ihr offenes Ohr, ihre Geduld und ihre Hilfsbereitschaft. Ebenso gilt mein Dank allen Kollegen und Kolleginnen im Forschungslabor, für die freundschaftliche Atmosphäre und die gegenseitige Hilfe.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, für ihre Unterstützung, Zeit und Geduld während des gesamten Studiums. Meinen Schwestern danke ich für ihr Verständnis und für die Ablenkung, wenn ich sie brauchte. Großen Dank gebührt meinem Mann, der sich jede meiner Ideen geduldig angehört hat, stets für mich da war und mich in meinem Vorhaben bestärkt hat.