

Aus dem Institut für Systemische
Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck
kommissarische Direktorin:
PD Dr. rer.-nat. Andrea Kruse

Die Rolle des Fas-Ligand - abhängigen Apoptoseweges in der murinen Schwangerschaft

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Torsten Schulze
aus Wilhelmshaven

Lübeck 2007

1. Berichterstatterin:	PD Dr. rer.-nat. Andrea Kruse
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Jürgen Brinckmann
Tag der mündlichen Prüfung:	19.12.2007
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	19.12.2007
gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach	
- Dekan der Medizinischen Fakultät -	

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Leukozyten im schwangeren Uterus der Maus	6
1.1.1	Uterine NK-Zellen	6
1.1.2	Monozyten/Makrophagen	8
1.1.3	Dendritische Zellen	9
1.1.4	Granulozyten	9
1.1.5	Lymphozyten	10
1.2	Der schwangere Uterus als immunprivilegiertes Organ - Mechanismen der mütterlich-fetalen Toleranz:	11
1.2.1	Das Immunprivileg innerhalb des Organismus	11
1.2.2	Der schwangere Uterus und die mütterlich-fetale Toleranz	12
1.3	Der Fas-Ligand-abhängige Apoptoseweg	16
1.3.1	Aktive Apoptose	16
1.3.2	Intrinsische Apoptose	18
1.3.3	Das Fas/Fas-Ligand-System im Immunprivileg und bei der mütterlich fetalen Toleranz	20
1.4	Zielsetzung	21
2	Material	22
2.1	Geräte	22

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	3
2.2 Chemikalien, Lösungen und Zusätze	23
2.3 Seren	24
2.4 Primärantikörper	24
2.5 Sekundärantikörper	26
2.6 Sonstige Reagenzien	26
2.7 Mäuse	26
3 Methoden	28
3.1 Vorbereitende Verfahren zu histologischen Untersuchungen	28
3.1.1 Beschichtung der Objektträger	28
3.1.2 Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern	28
3.2 Immunperoxidasefärbungen	29
3.3 Immunfluoreszenzfärbungen	29
3.3.1 Allgemein	29
3.3.2 TUNEL-Assay	30
3.3.3 Bildbetrachtung und -bearbeitung	31
3.4 Quantifizierung ausgewählter Leukozytensubpopulationen	31
3.5 Hamatoxylin-Eosin-Färbungen	32
3.6 Statistik	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Die Entwicklung der Plazenta in der murinen Schwangerschaft . .	34
4.2 Verteilung mütterlicher Leukozyten im schwangeren Uterus	40
4.3 Expression von Fas und Fas-Ligand in der murinen Schwangerschaft	45
4.3.1 Expression von Fas und Fas-Ligand im schwangeren Uterus	45
4.3.2 Expression von Fas und Fas-Ligand auf den Leukozyten im schwangeren Uterus	48
4.4 Schwangerschaften Fas- und Fas-Ligand-defizienter Mäuse	49

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	4
4.5 Physiologisches Vorkommen von Apoptose in der murinen Schwangerschaft	54
4.6 Untersuchungen zur Leukozytenverteilung und Apoptose im schwangeren Uterus der Maus unter pathologischen Bedingungen	54
5 Diskussion	59
6 Zusammenfassung	66
Abkürzungsverzeichnis	68
Literaturverzeichnis	71
Publikationen und Kongreßbeiträge	87
Danksagung	89
Lebenslauf	91

Kapitel 1

Einleitung

Die embryonale Entwicklung der Säugetiere ist abhängig von dem Vorhandensein einer funktionellen Plazenta. Ihre hochspezialisierten Zellen (Trophoblast, Entoderm und extraembryonales Mesoderm) bilden sich früh in der Entwicklung und ermöglichen die Implantation, verankern den Embryo im uterinen Gewebe und bilden fetale Gefäße, die Nahrungsstoffe, Gase und Stoffwechselprodukte transportieren. Zusätzlich beeinflusst die Plazenta endokrine, immunologische und stoffwechselphysiologische Funktionen der Mutter zum Vorteil des Embryos. In den letzten Jahren ist vor allem die Rolle der Plazenta als immunologischer Berührungspunkt zwischen zwei genetisch unterschiedlichen Organismen erkannt worden. Obwohl Fetus und Plazenta Merkmale der Mutter und des Vaters besitzen, kommt es während der Schwangerschaft zu keiner Abstoßungsreaktion. Eine besondere Rolle spielt der fetale Trophoblast, der eine Grenzschicht zwischen Fetus und mütterlichem Immunsystem darstellt. Mütterliche Leukozyten können physiologisch bis direkt an diese Grenzschicht gelangen, ohne das fetale Gewebe zu zerstören. Ein mögliches Erklärungsmodell könnte die Induktion von Apoptose durch Fas-Ligand sein, dem wichtigsten Induzenten der ligandenvermittelten Apoptose im Immunsystem.

1.1 Leukozyten im schwangeren Uterus der Maus

Die Vielfalt von Leukozyten im schwangeren Uterus ist ein Indiz dafür, dass dieser sehr wohl Ort vielfältiger immunologischer Aktivität ist. Sie treten mit dem Trophoblasten und dem Stroma in Kontakt, kommunizieren untereinander und nehmen somit Einfluss auf Proliferation, Migration und Produktion von Zytokinen. Im schwangeren Uterus der Maus befinden sich vorwiegend die uterinen Natural Killer Cells (uNK), dann die Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten und schließlich wenige Lymphozyten [1]. Die den Uterus infiltrierenden Leukozytensubpopulationen werden im folgenden vorgestellt:

1.1.1 Uterine NK-Zellen

Während NK-Zellen im peripheren Blut mit weniger als 15 % eine relativ kleine Population darstellen, sind sie im schwangeren Uterus sowohl des Menschen als auch der Maus mit über 70 % aller Leukozyten die dominierende Population [2]. Unreife uNK-Zellen sind in der *metrial gland* gelegen. Diese Struktur bildet sich am mesometrialen Pol des schwangeren Mäuseuterus zur Mitte der Schwangerschaft hin aus. Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass die hohe Zahl der uNK-Zellen innerhalb des schwangeren Uterus zumindest beim Menschen nicht durch Einwanderung sondern durch Proliferation innerhalb der *metrial gland* herrührt [3]. Bis Tag 11 der murinen Schwangerschaft ist diese Population in hoher Zahl anzutreffen, danach verringert sie sich. Möglicherweise spielt Apoptose dabei eine Rolle [4].

uNK-Zellen unterscheiden sich von denen im peripheren Blut. Beim Menschen

sind sie für CD56 positiv, tragen allerdings kein CD16 (Fc γ -RezeptorIII). Ebenso wie periphere NK-Zellen weisen sie spezifische Rezeptoren für MHC-I-Moleküle, *killing inhibitory receptors* (KIR) auf [5]. uNK-Zellen der Maus tragen an ihrer Oberfläche Thy 1.2 (CD90.2), asialoGM1 und IL2R β . Sie weisen zahlreiche zytoplasmatische Granula auf, in denen sich Perforin, Serinproteasen und Granzyme befinden [2, 6, 7].

Damit sind die uNK-Zellen von ihrer Ausstattung her eine mögliche Gefahr für fetale Zellen. Trotzdem kommt es in einer normal verlaufenden Schwangerschaft nicht zu zytolytischen Reaktionen von uNK-Zellen gegen fetales Gewebe. Die Bindung von nicht klassischen MHC-I-Molekülen auf dem Trophoblasten an die inhibierenden Rezeptoren der uNK-Zellen scheint die Zelle in ihrer zytolytischen Aktivität zu hemmen. Die Bedeutung der uNK-Zellen wird vielmehr im Umbau mütterlicher Gefäße sowie der Förderung der Invasion des Trophoblasten in den Uterus gesehen [8, 9].

Humane uNK-Zellen produzieren die Zytokine *Interferon- γ* (IFN- γ), *granulocyte-macrophage colony stimulating factor-1* (GM-CSF), *colony stimulating factor-1* (CSF-1) und TNF- α . Darüber hinaus werden von ihnen auch die in der Angiogenese wichtigen Faktoren *leukemia inhibitory factor* (LIF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *placental growth factor* und *Angiopoetin 2* freigesetzt.

In der murinen Schwangerschaft sind die uNK-Zellen der Hauptproduzent von IFN- γ . Mäuse, denen uNK-Zellen fehlen, weisen ein uterines Gefäßbett auf, in dem keine für die Schwangerschaft typische Weitung zu sehen ist [10, 11].

uNK-Zellen scheinen also eine wichtige Rolle bei der Ummodellierung des ute-

rinen Gefäßbettes zu spielen. Beim Menschen wird die Aufweitung der Spiralarterien und der damit einhergehende Verlust der glatten Muskulatur in Verbindung mit der Invasion extravillöser Zytotrophoblastzellen gebracht [12].

1.1.2 Monozyten/Makrophagen

Etwa 20 Prozent der mütterlichen Zellen im schwangeren Uterus sind Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie [1]. Sie befinden sich zunächst im Myometrium und in der *metrial gland*, werden aber auch in geringer Zahl in der Nähe von Blutgefäßen der zentralen Decidua basalis angetroffen [13]. Gewebsständige Makrophagen sind in Abhängigkeit von ihrem Aufenthaltsort phänotypisch sehr heterogen. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass Makrophagen-Subpopulationen nicht nur gemäß Reifestadium und Lokalisation, sondern auch in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsstadium für variierende Zytokinmuster und -konzentrationen verantwortlich sind [14]: Mittels einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR), der Makrophagen schwangerer Frauen beigefügt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass diese eine MLR signifikant stärker supprimieren konnten als periphere Monozyten [15]. Dagegen konnten Makrophagen, die Spontanaborten entnommen wurden, gerade dies nicht bewirken [16]. Ein weiteres Indiz für die Bedeutung der Rolle der Makrophagen während der Schwangerschaft liefern Mäuse, die Defekte für von Makrophagen benötigte Wachstumsfaktoren tragen. Sowohl *op/op* Mäuse, die defizient für CSF-1 sind als auch Mäuse mit einem Defekt für GM-CSF, weisen eine eingeschränkte Funktion der Makrophagen auf und sind nur eingeschränkt fortpflanzungsfähig [17]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Trophoblastzellen *macrophage inflammatory protein 1- α* (MIP 1- α) bilden, das die Einwanderung von Monozyten und uNK fördert [18].

1.1.3 Dendritische Zellen

Obwohl dendritischen Zellen eine besondere Rolle als Modulator einer Immunantwort zugestanden wird, ist das Wissen über dendritische Zellen während der Schwangerschaft noch vergleichsweise gering. Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die eine Immunantwort auslösen, aufrechterhalten und modulieren können. In Abhängigkeit von der Art des Antigens wird eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems ausgelöst oder periphere Toleranz induziert. Es existieren verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen [19].

Kürzlich konnten dendritische Zellen im schwangeren Uterus der Maus und des Menschen nachgewiesen werden [20, 21, 22, 23]. Allerdings herrscht weder in Bezug auf den definitiven Phänotyp der im schwangeren Uterus befindlichen dendritischen Zellen, noch auf die Funktion, Abstammung und das Migrationsverhalten Klarheit. Es wird diskutiert, dass sich in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu und anderen stimulierenden Signalen monozytäre Vorläuferzellen entweder zu Makrophagen oder zu dendritischen Zellen differenzieren [24].

1.1.4 Granulozyten

Mit ca. 5 % der Leukozyten im schwangeren Uterus sind die Granulozyten die nächstgroße Population [1]. Sie sind nach Parr vorwiegend an der Grenzschicht zwischen Trophoblast und Decidua basalis nachweisbar. Über ihre Funktion ist wenig bekannt, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass sie Zellreste von Deciduazellen phagozytieren, die durch die Invasion des Trophoblasten anfallen [6].

1.1.5 Lymphozyten

B- und $\alpha\beta$ -T-Zellen, Haupteffektoren der adaptiven Immunantwort, scheinen gerade während des frühen Stadiums einer normalen Schwangerschaft kaum vorzukommen. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nimmt die Zahl der $\alpha\beta$ -T-Zellen jedoch etwas zu. $\gamma\delta$ -T-Zellen hingegen werden häufiger angetroffen. Einer Annahme zufolge erkennen $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Decidua basalis Antigene des Trophoblasten und limitieren dessen Wachstum in die Decidua basalis [25]. Zu den kürzlich zu regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) zusammengefassten Zellen zählt man T-Zellen, die die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und *transforming growth factor- β* (TGF- β) freisetzen und somit die Aktivierung weiterer T-Zellen inhibieren können [26, 27]. Zu den T_{reg} -Zellen werden inzwischen auch die oben genannten $\gamma\delta$ -T-Zellen gezählt, da auch sie über Sekretion von IL-10 und TGF- β regulatorische Funktionen im schwangeren Uterus ausüben können [28, 29]. Eine weitere Population der T_{reg} -Zellen bilden $CD4^+CD25^+$ -Zellen. Diese werden als Schlüsselstelle bei der Herunterregulation einer überschießenden Immunreaktion angesehen [30, 31]. Auch im schwangeren Uterus konnten diese Zellen nachgewiesen werden. Einer jüngeren Studie zufolge ist jede vierte $CD4^+$ -Zelle im schwangeren Uterus eine $CD4^+CD25^+$ -Zelle [32].

1.2 Der schwangere Uterus als immunprivilegiertes Organ - Mechanismen der mütterlich-fetalen Toleranz:

1.2.1 Das Immunprivileg innerhalb des Organismus

Organe, die scheinbar von immunologischen Reaktionen ausgenommen sind, werden als immunprivilegiert beschrieben [33]. Dazu zählen das Gehirn und das Auge, die Testes und Ovarien, der schwangere Uterus sowie die Haarfollikel. Betrachtet man die Folgen einer Immunreaktion auf die entsprechenden Gewebe, dann erscheint ein Immunprivileg als durchaus zweckmäßig: Wird durch eine lokale Infektion der Glaskörper des Auges betroffen, wird rasch der Erreger samt infiziertem Gewebe vernichtet und an deren Stelle eine bindegewebige Narbe entstehen. An der Netzhaut ist eine Immunreaktion ähnlich zerstörerisch. Es kommt zur Vernarbung der neurosensorischen Netzhaut mit dem Pigmentepithel und der Aderhaut. Das führt zu einem irreversiblen Verlust der zentralen Sehschärfe [34].

Die immunprivilegierten Organe genießen also einen Schutz vor den Folgen einer Immunreaktion, um nicht in ihrer Funktion behindert zu werden. Zerstörungen dieser Gewebe durch das Immunsystem hätten fatale Folgen, da diese Gewebe schlecht regenerationsfähig, postmitotisch oder hochgradig differenziert sind. Zellverluste sind nicht kompensierbar. Toleranz gegenüber Fremdartigenen, etwa einem Virus, ist hier offenbar günstiger als dessen Elimination, die T-Zell vermittelte Zytolyse lokaler Zellen zur Folge hätte [35].

Mittlerweile weiß man, dass auch Fas-Ligand, ein wichtiger Effektor des pro-

grammierten Zelltodes, auf den im folgenden eingegangen werden wird, konstitutiv in immunprivilegierten Organen wie Auge, Testes und dem schwangerem Uterus exprimiert wird. Aktivierte T-Zellen, die Fas auf ihrer Oberfläche exprimieren, können somit eliminiert werden, bevor sie dem entsprechenden Organ Schaden zufügen können [36, 37, 38]. Es ist auch gelungen, experimentell eine immunprivilegierte Situation zu schaffen: So haben Bellgrau et al. FasL⁺ und FasL⁻ Sertoli-Zellen unter die Kapsel der Niere implantiert und festgestellt, dass die FasL⁺ Sertoli-Zellen nicht abgestoßen wurden. Lau et al. konnten in einem anderem Experiment Inselzellen des Pankreas gemeinsam mit FasL⁺ Myoblastenzellen unter der Nierenkapsel plazieren. Die diabetische Stoffwechsellage der Tiere konnte solange ausgeglichen werden, solange die Myoblastenzellen FasL⁺ waren. [37, 39].

1.2.2 Der schwangere Uterus und die mütterlich-fetale Toleranz

Sowohl von Seiten des mütterlichen als auch des fetalen Gewebes gehen Mechanismen aus, die zur mütterlich-fetalen Toleranz führen.

Regulatorische T-Zellen und Makrophagen

Für Regulatorische T-Zellen sowie Makrophagen konnte ein immunsuppressiver Effekt auf andere Leukozyten im Milieu des schwangeren Uterus nachgewiesen werden. Diese Zellen sind im vorigen Abschnitt beschrieben worden.

Vaskuläre Adhäsionsmoleküle

Um Leukozyten aus dem Blut zu dem Ort einer Entzündung oder in ein lymphatisches Gewebe zu dirigieren, bedarf es spezifischer Adhäsionsmoleküle. Bedenkt

man jedoch, mit welcher Geschwindigkeit Leukozyten im Blutstrom zirkulieren, wird ersichtlich, dass die Adhäsion und der Austritt aus der Blutbahn, in mehreren Schritten erfolgen muss: Zunächst wird ein erster Kontakt mit dem Endothel hergestellt (*tethering*), dann wird der Leukozyt abgebremst (*rolling*), nach Aktivierung durch Chemokine oder Entzündungsmediatoren kommt es zur stabilen Bindung mit dem Endothel (*arrest*). Erst dann kann die *Diapedese*, der Austritt aus der Blutbahn, erfolgen. Adhäsionsmoleküle haben darüber hinaus noch wichtige Funktionen bei der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Leukozyten. Bei einem Defekt für Adhäsionsmoleküle kann es durch ungenügende Rekrutierung von Leukozyten zu gravierenden, oft letal verlaufenden Krankheitsbildern kommen [40, 41].

Im schwangeren Uterus, in der Phase der initialen Plazentaentwicklung konnte ein spezielles Muster von vaskulären Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden. Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin- Superfamilie *mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)* und *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* fanden sich in bestimmten Mikrodomänen auf mütterlichen Gefäßen. Während der leukozytenggebundene Ligand des *VCAM-1*, das $\alpha 4\beta 1$ -Integrin auf uNK-Zellen gefunden wurde, tragen monozyten-ähnliche Zellen den Liganden von *MAdCAM-1*, das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin. Es ist daher denkbar, dass vaskuläre Adhäsionsmoleküle eine Rolle bei der Auswahl und Plazierung der Leukozyten im Milieu des schwangeren Uterus der Maus spielen [42].

Inaktivierung der Komplementkaskade

Ein durch den Trophoblasten produziertes Crry-Protein hemmt die Ablagerung der Komplementkomponenten C3 und C4 auf dem fetalen Gewebe und somit eine Komplement-vermittelte, den Fetus zerstörende Immunreaktion. Wie nötig dieser

zusätzliche Schutz fetalen Gewebes ist, zeigt die Tatsache, dass Schwangerschaften von Crry-defizienten Mäusen nicht erfolgreich beendet werden können. Erst eine Schwangerschaft von Crry und Komplement C3 doppelt defizienten Mäusen führt zu Nachwuchs. Beim Menschen ist dies nicht bekannt, es wird allerdings vermutet, dass der DAF in der menschlichen Schwangerschaft eine ähnliche Funktion hat [43].

Depletion freien Tryptophans

Die essentielle Aminosäure Tryptophan wird bei der Proliferation von T-Zellen benötigt. Im schwangeren Uterus der Maus wird vom Trophoblasten ein Enzym, die Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) gebildet, das Tryptophan degradiert und somit die Proliferation der T-Zellen hemmt. Dieser lokale Schutz scheint unverzichtbar zu sein, da der Fetus bei Mäusen, die kein Tryptophan katabolisieren, durch alloreaktive T-Zellen abgestoßen wird. Beim Menschen wird zwar auch vom Syncytiotrophoblasten IDO gebildet und es existiert auch ein verringerter Tryptophanspiegel im Plasma von Schwangeren, aber bislang fehlt der Nachweis wie im murinen System, dass der Tryptophanabbau essentiell für eine gelungene Schwangerschaft ist [44, 45, 46].

Expression nicht klassischer *MHC*-Moleküle

Da der Fetus semiallogen ist, also zur Hälfte väterliche und mütterliches Erbgut trägt, sind auch die Moleküle, die es dem Immunsystem präsentieren kann, zur Hälfte väterlichen - also körperfremden - Ursprungs. Nach der Theorie der *self-nonself-discrimination* muss dieses Gewebe eliminiert werden. Sollte der Trophoblast dem Immunsystem der Mutter tatsächlich uneingeschränkt paternale Epitope präsentieren, wäre eine Abstoßung des Fetus denkbar. Bestimmte Tumoren und Viren wie das CMV können dem Wirtsimmunsystem die Erkennung dadurch er-

schweren, dass sie die Expression von *MHC*-Klasse-I-Molekülen, deren Bindung an Fremdantigene unterbinden oder deren Abbau beschleunigen [47, 48].

Beim menschlichen Trophoblasten ist das Fehlen der HLA-A und HLA-B-Moleküle aus dem *Major Histocompatibility Complex (MHC)* der Klasse I sowie das der gesamten Klasse II augenfällig. In Spuren werden HLA-C und die dem *Minor Histocompatibility Complex* zugerechneten HLA-E und HLA-G exprimiert. Im Gegensatz zu den hochpolymorphen HLA-A und HLA-B sind diese nur in der Lage, eine beschränkte Auswahl an Antigenen zu präsentieren [49].

Das Vorkommen von *MHC*-Klasse-I-Molekülen hemmt NK-Zellen. Zellen, bei denen wie etwa innerhalb von Tumoren oder bei virusinfizierten Zellen die Expression von *MHC*-Klasse-I-Molekülen unterdrückt oder nur ungenügend ist, können leichter einer Zytolyse durch NK-Zellen anheimfallen. Es wird angenommen, dass eine Veränderung der Dichte an *MHC*-Klasse-I-Molekülen und eine Veränderung der Struktur von membrangebundenen Glykoproteinen aktivierend auf zytolytische NK-Zellen wirken können [50, 51]. Das oben bereits erwähnte, vom Trophoblasten exprimierte HLA-G, bindet inhibitorische Rezeptoren auf uNK. Damit werden die uNK an der Zytolyse von fetalem Gewebe gehindert [52].

Fas-Ligand

Dem Fas-Ligand abhängigen Apoptoseweg wird von zahlreichen Arbeitsgruppen eine Rolle beim Schutz des Fetus vor allem vor mütterlichen aktivierten alloreaktiven T-Zellen zugeschrieben [53, 54, 55, 56]. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich eingehender mit der Rolle von Fas-Ligand und der Apoptose.

1.3 Der Fas-Ligand-abhängige Apoptoseweg

Mit Apoptose, aus dem Griechischen für *Abwurf, Niedergang*, ist der gezielte Zelluntergang gemeint. Sowohl bei der Regulation biologischen Wachstums als auch bei der Selektion von Zellen des Immunsystems spielt Apoptose eine unverzichtbare Rolle. Grundsätzlich können die Auslöser, die Apoptose bewirken, sehr verschieden sein. Im wohl am besten untersuchten Mechanismus, durch Fas und Fas-Ligand, wird Apoptose über eine Rezeptor-Liganden-Assoziation aktiv induziert. Von einer passiven Induktion wird dann gesprochen, wenn gerade das Fehlen eines sonst vorhandenen Liganden zu einem programmierten Zelltod führt. [57]. Darüber hinaus existiert auch ein endogener, zumeist durch sogenannte *Stresssignale* eingeleiteter in die Apoptose mündender Pfad.

1.3.1 Aktive Apoptose

Activation induced cell death (AICD), der infolge einer Aktivierung von außen verursachte Zelltod, ist *der* primäre homöostatische Mechanismus des Immunsystems, um T-Zell-Reaktionen unter Kontrolle zu behalten, Autoimmunität zu vermeiden, Selbsttoleranz zu vermitteln und das Immunprivileg zu erhalten [58, 59, 60, 61, 36].

Die bekanntesten Effektoren sind, wie oben erwähnt, Fas-Ligand und sein Rezeptor Fas. Neben Fas und Fas-Ligand existieren noch zahlreiche weitere Ligand-Rezeptor-Interaktionen, die zur Apoptose führen, wie die Interaktion zwischen TNF und seinem Rezeptor TNFR-1. Sowohl Fas-Ligand als auch TNF gehören zur Tumornekrosefaktor-(TNF)-Superfamilie, Fas und TNFR-1 entsprechend zur Tumornekrosefaktorrezeptor-(TNFR)-Superfamilie. Zahlreiche degenerative oder

autoimmune Störungen werden mit einer Fehlregulation der Fas/Fas- Ligand abhängigen AICD in Verbindung gebracht [62]. Maus-Zuchtstämme, die einen funktionalen Defekt innerhalb des Genes für Fas, die sogenannte *Fas^{lpr}*-Mutation (die *lpr*-Maus) oder für Fas- Ligand, die *Fas^{gld}*-Mutation (die *gld*-Maus) tragen, entwickeln schwere lymphoproliferative Störungen und Autoimmunität [62, 63], die seine Ursache in einen Mangel an Antigen-induzierter T-Zell-Deletion in der Peripherie hat [64, 65].

T-Zellen exprimieren Fas und Fas- Ligand im Verlauf einer Aktivierung und werden nach wiederholter Antigenstimulation sensitiv für Fas/Fas-Ligand abhängige autokrin oder parakrin induzierte Apoptose [66, 67, 68].

Das Fas-Ligand-Homotrimer wird von Fas-Monomeren auf der Zielzelle erkannt. Drei Fas-Monomere vereinigen sich dann zu einem Homotrimer. Somit kommen auch die intrazellulären Enden der Fas-Moleküle in enge räumlichen Nähe. Adaptorproteine, die sogenannten Fas assoziierten Todesdomänen *Fas Associated Death Domains (FADD)*, binden nun intrazellulär an diese Enden. An diese wiederum binden Cysteinproteasen, die Proteinketten hinter Asparaginsäureresten spalten und daher als *Caspasen* bezeichnet werden. Zunächst ist dies die Procaspase 8, die dort in die Caspase 8 umgewandelt wird und neben der Procaspase 3 auch die Procaspase 8 selbst spalten kann. Ein ganzes System sich aktivierender Proteasen kommt somit in Gang. Die schließlich entstandene aktivierte Caspase 3 spaltet nun den Inhibitor der Caspase-aktivierbaren DNase (*I-CAD*), der an die Caspase-aktivierbare DNase gebunden ist. Eine nun nicht mehr in ihrer Aktivität gehemmte CAD dringt in den Zellkern ein, wo sie dann die DNA in für die Apoptose charakteristische Fragmente von 200 Basenpaare spaltet. Spätestens zu diesem Zeitpunkt ist die Zelle nicht mehr funktionsfähig.

Caspasen sind in der Lage, nach Aktivierung durch eine ebensolche Spaltung lawinenartig andere Procaspasen in Caspasen umzuwandeln und diesen Prozess somit nicht nur zu verstärken, sondern auch unumkehrbar zu machen. Es scheint von der Art der Zelle abzuhängen, wie groß die Kaskade sein muss, um Apoptose auszulösen. In einigen Zellen reicht dazu allein die Aktivierung der Caspase 8 aus [69]. Mit der Gerinnungs- und der Komplementaktivierung sind weitere selbstverstärkende Kaskaden bekannt, die über Spaltung eines inaktiven Vorläuferproteins in zumindest einen aktivierten Teil Folgeproteine *entsichern* kann.

Bei passiver Apoptose dagegen kommt es zum Zelluntergang nicht durch *Bindung* eines Liganden, sondern vielmehr durch das *Fehlen* der Bindung mit einem Liganden, etwa einem Wachstumsfaktor während der Bildung der Gliedmaßen in der Embryogenese [57].

1.3.2 Intrinsische Apoptose

Letztlich gibt es eine weitere Möglichkeit, den intrinsischen Pfad der Apoptose: Eine Beschädigung bzw. Schwellung der Mitochondrien kann zu einer Freisetzung von Cytochrom c führen. Im Cytoplasma bildet dies mit Apaf-1 einen Komplex, der Caspasen aktivieren kann. Dies sind nicht unbedingt dieselben wie in der extrinsischen Aktivierung, allerdings konvergiert auch deren Aktivierung in der Spaltung von I-CAD, dem Eindringen von CAD in den Zellkern und der darauf folgenden Hydrolyse der DNA in Doppelstrangabschnitte von 200 Basenpaaren Länge. Ein Onkogen, das bei einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) der B-Zell-Reihe isoliert worden war, das bcl-2, ist zum Beispiel in der Lage, durch Bindung an die Membran der Mitochondrien das Heraustreten von Cytochrom c aus den Mitochondrien zu verhindern. Somit kann Apoptose vermieden werden.

Bcl-2 gehört zu einer ganzen Familie ähnlicher Proteine, von denen die einen wie bcl-2 antiapoptotisch, andere hingegen wie bax und bad proapoptotisch wirken können. Diese Proteine sind in dimerisierter Form wirksam. So kann bcl-2 nur als Homodimer wirken, als Heterodimer mit bax als anderer Hälfte ist es wirkungslos. Insoweit ist die Ratio aus bcl-2 und bax entscheidend für Leben oder Untergang der Zelle und nicht die Menge eines Proteins allein [70, 71, 72].

Bei der Modulation des intrinsischen Pfades der Apoptose spielt das Protein p53 eine überragende Rolle. P53 kann durch sehr unterschiedliche Stimuli, die in der Literatur unter *Stresssignalen* gebündelt werden, aktiviert werden. Je nach Schädigung der Zelle kann durch p53 das Anhalten des normalen Zellzyklus, eine vorzeitige Zellalterung oder der programmierte Zelltod veranlasst werden. Viele bösartige Tumore weisen einen funktionellen Defekt für p53 auf. Unter anderem wegen dieser Eigenschaften wird ihm als *Wächter des Genoms* in der Krebsforschung hohes Interesse entgegengebracht. Bei der Entwicklung einer Gentherapie ist die Rekonstitution eines funktionalen p53 oft eines der vorrangigen Ziele. Wie p53 Apoptose auslöst, ist jedoch nur unzureichend verstanden [73, 74, 75, 76, 77].

Eine - intrinsische - Überexpression von bcl-2 kann eine extrinsische Aktivierung durch Fas aufheben und entsprechend umgekehrt die Gegenwart von TNF- α über Bildung des Transkriptionsfaktors NF κ B die Expression proapoptotischer Mitglieder der bcl-2-Familie bewirken und einen bcl-2 vermittelten Überlebensimpuls doch noch umkehren. Somit ist eine klare Trennung zwischen extrinsischer und intrinsischer Aktivierung schlicht nicht möglich.

1.3.3 Das Fas/Fas-Ligand-System im Immunprivileg und bei der mütterlich fetalen Toleranz

Bedenkt man die Möglichkeiten der aktiven Apoptose, so ist das Fas/Fas-Ligand-System wohl das am besten erforschte, aber bei weitem nicht das einzige. Tumor-Nekrose-Faktor α (*TNF- α*) und TNF-related apoptosis inducing ligand (*TRAIL*) sind ebenfalls sehr potente Induktoren, allerdings ist wenig bekannt über die Feinregulation der Induktoren untereinander. Man kann davon ausgehen, dass das Immunprivileg keine statische Situation darstellt, sondern einen aktiven Prozess, der vielfältiger Regulation unterliegt. Da das Fas/Fas-Ligand-System den wichtigsten Representanten der aktiven Apoptose im Immunsystem darstellt, wurde es während der Schwangerschaft untersucht [35, 53, 54, 55, 56, 78, 79, 80].

1.4 Zielsetzung

Die während der Schwangerschaft andauernde Toleranz des semiallogenen Feten durch den mütterlichen Organismus stellt ein immunologisches Paradox dar. Eine schwangerschaftsspezifische Modulierung des mütterlichen Immunsystems ist offenbar von besonderer Bedeutung für das Überleben und Wachstum des Feten. Insbesondere die Regulierung der im schwangeren Uterus vorliegenden Leukozyten hat einen großen Einfluss auf den Verlauf der Schwangerschaft.

Ziel dieser Arbeit war es, das spezifische Expressionsmuster von Fas und Fas-Ligand im schwangeren Uterus und den Einfluss des Fas-Ligand abhängigen Apoptoseweges auf die murine Schwangerschaft zu untersuchen. Es wurden nicht nur Untersuchungen von Schwangerschaften bei Wildtyp-Mäusen sondern auch bei Mäusen, die durch eine natürlich Mutation einen funktionellen Defekt für Fas oder Fas-Ligand haben, durchgeführt. Diese Experimente sollten helfen, die Bedeutung der die Apoptose induzierenden Moleküle Fas und Fas-Ligand in der murinen Schwangerschaft zu verstehen.

Von besonderem Interesse waren Untersuchungen zum Auftreten zur Leukozytenverteilung und Apoptose unter pathologischen und physiologischen Bedingungen. Dies könnte zum Verständnis der Regulation von Immunreaktionen beitragen, die an der Apoptose beteiligt sind. Da angenommen wird, dass die in der Maus vorkommenden Immunreaktionen in ähnlicher Weise im Mensch ablaufen, wäre die Erforschung dieser Aspekte möglicherweise für den Menschen von Relevanz. Somit könnte eine bessere Kenntnis der funktionellen Bedeutung der Fas-Ligand vermittelten Apoptose im schwangeren Uterus der Maus einen Anknüpfungspunkt für die Untersuchung immunologisch bedingter Störungen beim Menschen darstellen.

Kapitel 2

Material

2.1 Geräte

Analysenwaage LC 6200S; Sartorius, Göttingen

Digitalkamera Canon EOS 10 D; Canon Inc., Tokyo, Japan

Färbekammer Magic Immuno Staining Tray; Cell path plc, H-Hempstead, USA

Fluoreszenzmikroskop DMLM DC350F; Leica, Bensheim

Gefriermikrotom Kryostat CM 1850; Leica Bensheim

Gefriertruhe -80 °C; Nuaire, Plymouth, USA

Gewebe-Eindeckmedium Crystal Mount; Biomeda Corp., Foster City, CA, USA

Gitternetz (10 x 10 Felder, Größe 1 cm²); Leica, Bensheim

Laborwaage 12116 MP; Sartorius, Göttingen

Magnetrührer; Heidolph, Kehlheim

Mikrometer-Skala (100 Skalenteile, Länge 1 cm); Leica, Bensheim

Objektträger Super Frost; Menzel Gläser, Braunschweig

PAP Pen Liquid Blocker Slide Marker; Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Kanada

pH-Meter pHM 83 Autocal; Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Pipette Combi-Pipette Typ 3180L; Eppendorf, Hamburg

Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 200-1000 μ l; Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen, 1-10 μ l, 10-100 μ l, 200-1000 μ l; Greiner, Nürtingen

Pipettenspitzen, Combitips, steril, 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, 5 ml, 12,5 ml; Eppendorf, Hamburg

Reagenzgefäße, 1,5 ml; Sarstedt, Nümbrecht

Reagenzgefäße, 1,5 ml, mit Schraubdeckel; Sarstedt, Nümbrecht

Reagenzröhrchen; Sarstedt, Nümbrecht

Sterile Werkbank II AI B3; Nuair, Plymouth, USA

Tissue-Tek Cryomold Größen Biopsy, Intermediate, Standard; Sakura Finetechnical Co. Ltd., Tokyo, Japan

Wasserbad; GFL Labortechnik, Burgwedel

Zentrifuge Minifuge 5414 C; Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS; Heraeus Christ GmbH, Osterode

2.2 Chemikalien, Lösungen und Zusätze

Aceton; Merck, Darmstadt

Bovines Serumalbumin (BSA); Fluka Biochemika, Neu Ulm

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS); Cambrex Bioscience Verviers, Verviers, Belgien

Eosin (gelblich, alkohollöslich); Merck, Darmstadt

Ethanol; Merck, Darmstadt

Methylenblau; Merck, Darmstadt

Natriumazid; Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd

Poly- L- Lysin; Sigma, Taufkirchen

Saures Hämalaun nach Mayer; Merck, Darmstadt

Triton X-100

Wasserstoffperoxid; Merck, Darmstadt

2.3 Seren

Normales Mausserum; Dako, Hamburg

Normales Hamsterserum; Dako, Hamburg

Normales Rattenserum; Dako, Hamburg

Normales Ziegenserum; Dako, Hamburg

2.4 Primärantikörper

Die für diese Arbeit verwendeten monoklonalen Primärantikörper (mAk), ihre Bezugsquelle, ihr zu bindendes Antigen sowie dessen Lokalisation im Organismus der Maus sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Sofern diese Antikörper von anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurden, wird mit einer Literaturangabe auf die Erstbeschreibung des jeweiligen mAk verwiesen.

Verwendete Primärantikörper			
Klon	Antigen	Lokalisation	Bezugsquelle
TROMA-1	Cytokeratin K8	charakteristisch für einfache Epithelien	M.B. Omary, Stanford University [81]
30 H12	CD90.2 (Thy 1.2)	NK-Zellsubpopulation, T-Zellen	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
1A8	Ly-6G	Polymorphkernige Zellen	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
RB-8C5	Ly-6G und Ly-6C (Gr-1)	Polymorphkernige Zellen und Monozyten	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
17A2	CD3 ϵ	T-Zellen	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
GK1.5	CD4	T-Zell- Subpopulation	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
Ly-2	CD8	T-Zell- Subpopulation	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
F4/80	CI: A3-1	reife Makrophagen	Invitrogen Karlsruhe
M1/70	CD11b	Monozyten, aktivierte Granulozyten	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
3OG.12	CD45	alle Leukozyten, bei inflammatorischen Prozessen hochreguliert	BD Biosciences PharMingen, Heidelberg
RB40.34.4	CD62P (P- Selektin)	Plättchen, aktivierte EC	Dr. D. Vestweber, Universität Münster [82]
MFL3	CD95 (Fas) Ligand	Lymphozyten, kein Ge- webe ausgeschlossen [66, 67, 68, 83]	Becton Dickinson, Heidelberg
Jo2	CD95 (Fas)	Lymphozyten, kein Ge- webe ausgeschlossen [66, 67, 68, 83]	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 2.1: Verwendete Primärantikörper

2.5 Sekundärantikörper

biotyniliertes Esel- anti- Ratte- IgG; Dianova, Hamburg

monoklonales Maus- anti- Ratte- IgG2a, PE- oder FITC konjugiert; BD Biosciences PharMingen, Heidelberg

polyklonale Maus- anti- Ratte- IgG F(ab)₂ Fragmente, PE-konjugiert; Chroma-
probe, Mountain View, USA

2.6 Sonstige Reagenzien

Avidin- Biotin Blockierungssystem; Dako, Hamburg

DAB (Diaminobenzidin)- Kit; Vector Laboratories, Burlingame, USA

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche Diagnostics, Mannheim

Vectastain ABC- Kit; Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.7 Mäuse

Weibliche Balb/c, weibliche und männliche C57BL/6J-Wildtyp-, B6.MRL-*Tnfrsf6^{lpr}*/J- sowie B6Smn.C3-*Tnfrsf6^{gld}*/J-Mäuse wurden von Charles River Deutschland, Sulzfeld bezogen. Die Mäuse wurden bei einem 12- stündigen Tages- und Nachtrhythmus gehalten und erhielten Wasser und Futterpellets *ad libitum*. Zur Erzeugung allogener Schwangerschaften wurden Balb/c Weibchen mit C57BL/6J Männchen, für syngene Schwangerschaften weibliche C57BL/6J mit C57BL/6J Männchen über Nacht verpaart und am darauf folgenden Morgen voneinander getrennt. Dieser Tag wurde als Schwangerschaftstag 1 definiert. Da sich mit der Implantation einer befruchteten Eizelle die Vaginalflora verändert, wurden ab Tag 7 vaginale

Spülungen zur Überprüfung auf Schwangerschaft mit 40 μ l steriler isotonischer Kochsalzlösung vorgenommen. Nach Tötung der Tiere am Tag 9, 11, 12 und 14 durch CO₂-Begasung und anschließendem Genickbruch wurden die schwangeren Uteri entnommen. Wenn im Rahmen der Vaginalspülungen Blutungen beobachtet wurden (Verdacht auf spontanen Abort), erfolgte die sofortige Tötung des Tieres und Entnahme des Uterus. Die Anzahl der jeweils untersuchten Tiere und feto-maternalen Einheiten pro Experiment wird unter *Methoden* sowie *Ergebnisse* aufgeführt.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Vorbereitende Verfahren zu histologischen Untersuchungen

3.1.1 Beschichtung der Objektträger

Die Objektträger werden zur Entfettung 10 Minuten in eiskaltes Aceton getaucht, für 15 Minuten getrocknet, dann 10 Minuten mit 0,1 % Poly- L- Lysin in Aqua bidest. beschichtet und anschließend wieder getrocknet.

3.1.2 Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern

Das der Maus entnommene Gewebe wurde in Tissue- Tek Einbettmedium enthaltende Gewebsschälchen (*Cryomolds*) gelegt und bei -80°C eingefroren. Das Schneiden des Gewebes mit dem Kryostaten erfolgte bei einer Temperatur von -20°C . Die Schnittdicke des Gewebes betrug $6\ \mu\text{m}$. Die Kryoschnitte wurden auf die beschichteten Objektträger gebracht und 1 h getrocknet. Nach 10- minütiger Fixierung in eiskaltem Aceton trockneten sie eine weitere Stunde. Anschließend

wurden sie zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2 Immunperoxidasefärbungen

Die Gewebeschnitte wurden zur Blockierung unspezifischer Bindungen 10 Minuten 10 % normalen Ziegen Serum ausgesetzt. Zur Bindung endogenen Biotins wurde das Gewebe jeweils 15 Minuten mit Avidin und Biotin des Avidin- Biotin-Blockierungssystems der Firma Dako inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1 stündige Exposition des Gewebes gegenüber dem jeweiligen Ratte- anti- Maus Primärantikörper. Nach wiederholten 5 minütigen Waschschrinen mit PBS wurde zur Inaktivierung endogener Peroxidase 3 % wässriges H_2O_2 für 10 Minuten eingesetzt. Einer einstündigen Inkubation der Schnitte mit biotyniliertem Esel- anti- Ratte-IgG als Sekundärantikörper folgten weitere Waschschrine von jeweils 5 minütiger Dauer. Zur Verstärkung der Farbreaktion wurde das Gewebe mit präformiertem Avidin-Biotin/Meerrettichperoxidase- Makromolekülkomplex des ABC- Kits für 30 Minuten inkubiert und erneut mehrmals innerhalb 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurde der Komplex aus gebundenem Antikörper und Avidin-Biotin/Meerrettichperoxidase durch eine 3,3-Diaminobezidin/Nickelchlorid-Lösung des DAB- Kits 2-10 Minuten lang angefärbt. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte durch Methylenblau.

3.3 Immunfluoreszenzfärbungen

3.3.1 Allgemein

Zwei auf einer Zelle liegenden voneinander verschiedene Antigene können mittels Immunfluoreszenzfärbung simultan nachgewiesen werden. Die hierfür verwendeten Antikörper sind entweder mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoery-

thrin (PE) markiert. Die Gewebsschnitte wurden 15 Minuten mit 10 % normalem Mausserum inkubiert und nachfolgend 30 Minuten dem jeweiligen monoklonalen Primärantikörper exponiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde wiederholt mit PBS für 5 Minuten gewaschen. War der Primärantikörper nicht direkt markiert, folgte eine weitere 30 minütige Inkubation mit PE- konjugiertem Affinitäts- gereinigten polyklonalen Maus- anti- Ratte- IgG F(ab)₂ Fragmenten als Sekundärreagenz. Nach weiterem Waschen und 15 Minuten Inkubation mit 10 % normalem Rattenserum wurde das Gewebe für 30 Minuten einem gegen definierte Epitope der Maus gerichteten, direkt FITC- konjugierten Ratte- anti- Maus mAk ausgesetzt und erneut mit PBS gewaschen.

3.3.2 TUNEL-Assay

Die TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end-labelling assay (TUNEL assay)*)-Färbung macht sich die Eigenschaft der Terminalen Desoxynucleotidyltransferase (TdT) zunutze, Nukleotide an 3'-OH-Enden von DNA-Doppelstrangbrüchen zu binden. Da die in dieser Reaktion verfügbaren Desoxynukleotide an Fluorescein gekoppelt sind, kann man somit diese Brüche in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar machen. Doppelstrangbrüche existieren auch im begrenzten Ausmaß unter normalen Bedingungen in Zellkernen und werden in der Regel durch spezifische Enzyme korrigiert; ferner können bedingt durch die Präparation ebenfalls Doppelstrangbrüche verursacht werden, doch übersteigt die Anzahl der im Verlauf der Apoptose entstandenen Doppelstrangfragmente diese bei weitem. Eine apoptotische Zelle lässt sich somit in der Immunfluoreszenzmikroskopie leicht von einer normalen unterscheiden. Abweichend von der normalen Immunfluoreszenzfärbung müssen die Gewebeschnitte zuerst mit frisch hergestellter bei pH 7,4 eingestellter 4 % Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und dann 2 Minuten lang mit 0,1 % Triton X-100-Lösung in 0,1 %

Natriumzitratlösung auf Eis permeabilisiert werden. Dazwischen soll für eine halbe Stunde und danach in den folgenden Schritten für mindestens 5 Minuten mit PBS gewaschen werden. Die TdT wird mit einer Nukleotidlösung gemischt und auf die Objektträger aufgetragen. Eine Positivkontrolle wird durch Zugabe von DNase I, Grad I, erzielt, zur Negativkontrolle wird statt des Reaktionsgemisches lediglich die Nukleotidmischung aufgetragen. Eine halbstündige Inkubation in einem verdunkelten Gefäß bei 37°C schließt sich dem an. Danach kann mit den Schnitten genauso verfahren werden wie bei einer Immunfluoreszenzfärbung für ein oder zwei verschiedene Epitope.

3.3.3 Bildbetrachtung und -bearbeitung

Die Schnitte wurden am Tag der Färbungen mikroskopisch ausgewertet. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einer Digitalkamera (Leica, Bensheim bzw. Canon Inc., Tokyo, Japan) fotografiert und mit den Programmen Adobe Photoshop 6.0 und 7.0 (Adobe, Mountain View, CA, USA) und The GIMP 2.0 und 2.2 for UNIX (GNU Image Manipulating Program; Open Source Software unter der Lizenz der GPL) bearbeitet.

3.4 Quantifizierung ausgewählter Leukozytensubpopulationen

Pro Versuchsgruppe wurden 3 Tiere verwendet und pro Tier je 3 feto-maternale Einheiten untersucht. Von diesen wurden serielle Kryostatschnitte hergestellt. Dabei war darauf zu achten, dass eine Vergleichbarkeit von Schnitttiefe, -ausrichtung und -dicke erreicht wurde. Um ein doppeltes Zählen einzelner Zellen zu vermeiden, war zu beachten, dass die Schnittebene zweier Gewebsschnitte sich um min-

destens $42 \mu\text{m}$ unterschied. Zur mikroskopischen Quantifizierung der Zellpopulationen mittels eines Fluoreszenzmikroskops diente ein Gitternetz (10 x 10 Felder, Größe 1 cm^2 ; Leica, Bensheim). Bei einer 200-fachen Vergrößerung betrug die ausgewertete Fläche pro Gitternetz $0,25 \text{ mm}^2$. Der Durchmesser der uNK-Zellen wurde mit der Mikrometerskala (100 kleine und 10 große Skalenanteile, Länge 1 cm ; Leica, Bensheim) bestimmt. Bei einer 200-fachen Vergrößerung entsprach ein kleiner Skalenanteil einer Länge von $5 \mu\text{m}$.

3.5 Hamatoxylin-Eosin-Färbungen

Zur Übersichtsfärbung der Gewebsschnitte wurden die Objektträger für 5 Minuten in saurem Hämalaun nach Mayer gefärbt, unter fließend kaltem Leitungswasser gebläut und 10 Sekunden in eine 1 % Eosinlösung (gelblich, alkohollöslich) in 70 % Ethanol gestellt. Nachfolgendes Einstellen der Gewebsschnitte für 90 Sekunden in Leitungswasser, 10 Sekunden in 70 %, 10-15 Sekunden in 96 % und abschließend 2 Minuten in absolutem Ethanol regulierte die Farbnuancen einzelner Strukturen.

3.6 Statistik

Die statistische Analyse und Berechnung der Mediane der ausgezählten Leukozytenpopulationen erfolgte mittels Analyse-it (Analyse it Software Ltd, Leeds, UK). Nachdem die Varianz der Daten innerhalb einer Versuchsgruppe mit dem Kruskal-Wallis Test ermittelt worden war, erfolgte die Berechnung möglicher Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit dem ungepaarten Mann-Whitney-U Test. Ein Ergebnis wurde als signifikant erachtet, wenn $p < 0,05$ war.

Kapitel 4

Ergebnisse

Die Schwangerschaften, bei denen die folgenden Untersuchungen durchgeführt wurden, beziehen sich auf syngene Wildtyp C57BL/6J-Schwangerschaften. Bei den Untersuchungen zu Defekten für Fas und Fas-Ligand wurden ebenfalls syngene Schwangerschaften mit einem C57BL/6J-Hintergrund, die die natürlichen *Fas^{lpr}*- oder *Fas^{lgld}*-Mutationen aufwiesen, betrachtet. Untersuchungen zur Apoptose in der normalen Schwangerschaft und bei Spontanaborten wurden anhand von allogenen Balbc/C57BL/6J-Schwangerschaften angestellt.

Syngene C57BL/6J- und allogene Balbc/C57BL/6J-Schwangerschaften weisen nur sehr geringe Unterschiede auf. Die Infiltration von Leukozyten bei allogenen Schwangerschaften ist insgesamt etwas stärker, bezieht sich jedoch stets zu denselben Anteilen auf die normal in der Schwangerschaft auftretenden Leukozytensubpopulationen.

4.1 Die Entwicklung der Plazenta in der murinen Schwangerschaft

Während der hämochorialen Plazentabildung dringt der fetale Trophoblast in die mütterliche Decidua ein und kommt in direkten Kontakt mit mütterlichen Immunzellen. Im Laufe dieser Entwicklung lässt sich eine Abgrenzung bestimmter Zonen im schwangeren Uterus erkennen, die Decidua basalis, in die der Trophoblast hineinwächst und die Decidua capsularis, die nicht an der Plazentabildung beteiligt ist. Die Abbildung 4.1 zeigt diese Zonen im Verhältnis zu ihrer Lage im schwangeren Uterus.

Die Decidua basalis wird weiter unterteilt in die vaskuläre Zone, ein nahe dem Trophoblasten gelegenes Areal, welches stark dilatierte mütterliche Blutgefäße enthält, sowie die zentrale Decidua basalis, deren Gewebe kompakter und durch das Vorhandensein venöser Kanäle und Arterien charakterisiert ist. Im Verlauf der Schwangerschaft ist die Decidua basalis starken Umstrukturierungsprozessen unterworfen, da die Plazenta in diesen Bereich einwandert und während der weiteren Entwicklung mütterliches Gewebe ersetzt. Die Decidua capsularis ist an der Plazentabildung nicht beteiligt. Die Stadien der beginnenden Plazentation am Tag 9, der Mitte der Schwangerschaft (Tag 11) und der späteren Schwangerschaft (Tag 14) sind in den Abbildungen 4.2, 4.3 und 4.4 schematisch dargestellt.

Immunfluoreszenzmikroskopische Färbungen mit einem gegen Cytokeratin gerichteten mAk TROMA-1 stellen dabei den Trophoblasten dar. In Ausschnitten sind mit HE-Färbung dargestellte Anteile der Decidua basalis zu sehen. Am Tag 9 der Schwangerschaft ist noch der Rest des *Ectoplacental Cones* zu sehen, siehe Abbildung 4.2.

Im Vergleich zu Tag 9 der Schwangerschaft bleibt die Strukturierung des uterinen Gewebes in den oben beschriebenen deciduellen Strukturen am Tag 11 nahezu intakt, siehe Abbildung 4.3. Der fetale Trophoblast wandert tiefer in die Decidua basalis ein. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft löst sich die klare Unterteilung in Zonen langsam auf. Die Abbildung 4.4 zeigt dazu den Schwangerschaftstag 14: Der Trophoblast ersetzt nun einen großen Bereich des mütterlichen Gewebes der Decidua basalis, die im Vergleich zu Tag 9 und 11 der Schwangerschaft nur noch einen schmalen Saum bildet.

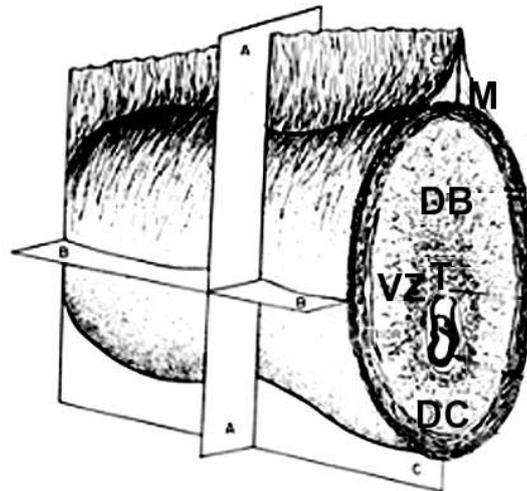


Abbildung 4.1: Geöffneter Situs einer schwangeren Maus und schematische Darstellung der Schnittebenen im schwangeren Uterus. Der Situs der Maus ist am Tag 9 der Schwangerschaft aufgenommen worden, die schematische Darstellung bezieht sich auf den Tag 8. (modifiziert nach: *The Biology of the Laboratory Mouse*, 2nd Ed., Jackson Laboratory, Editor Earl L. Green. Copyright 1966 McGraw-Hill, Inc.). M: Mesometrium, DB: Decidua basalis, VZ: vaskuläre Zone, T: Trophoblast, DC: Decidua capsularis.

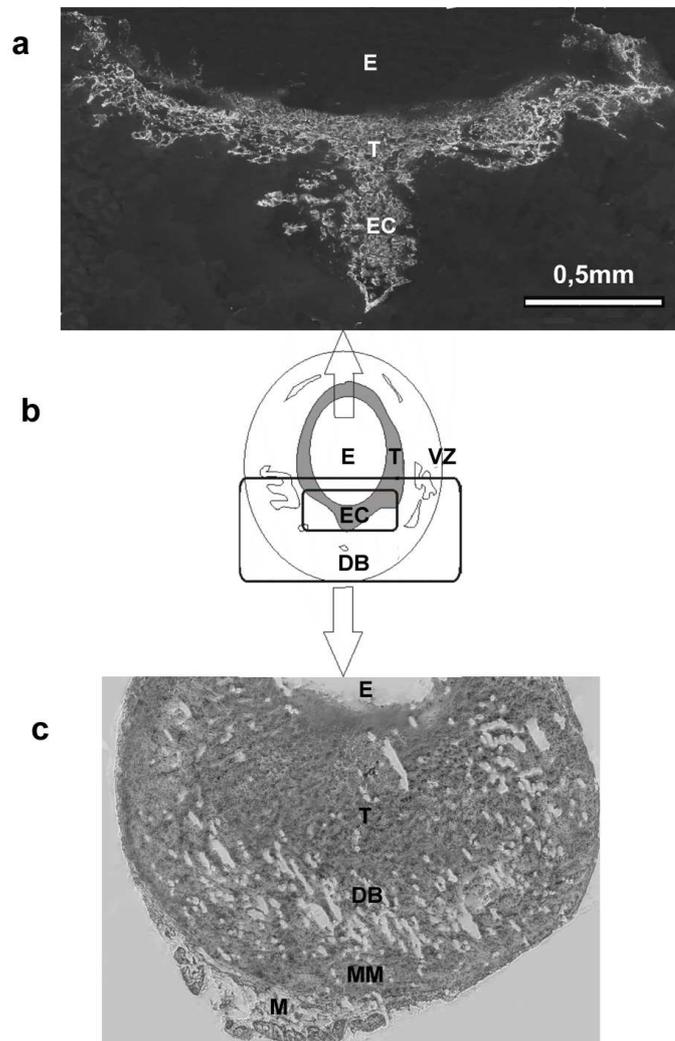


Abbildung 4.2: Immunfluoreszenzfärbung (a), Schema (b) und HE-Färbung (c) vom Tag 9 des Trophoblasten und der Decidua basalis einer syngen C57BL/6J-Schwangerschaft. Der invasive epitheliale Trophoblast ist mit dem FITC-konjugierten mAk gegen Cytokeratin TROMA-1 (weiß) angefärbt worden. Die Färbungen a und c sind jeweils mit Photoshop aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt worden. Reste des *Ectoplacental Cones* sind in der Abbildung a zu sehen. DB: Decidua basalis, E: Embryonalhöhle, EC: *Ectoplacental Cone*, MM: Muscularis mucosae, M: Mesometrium, T: Trophoblast, VZ vaskuläre Zone

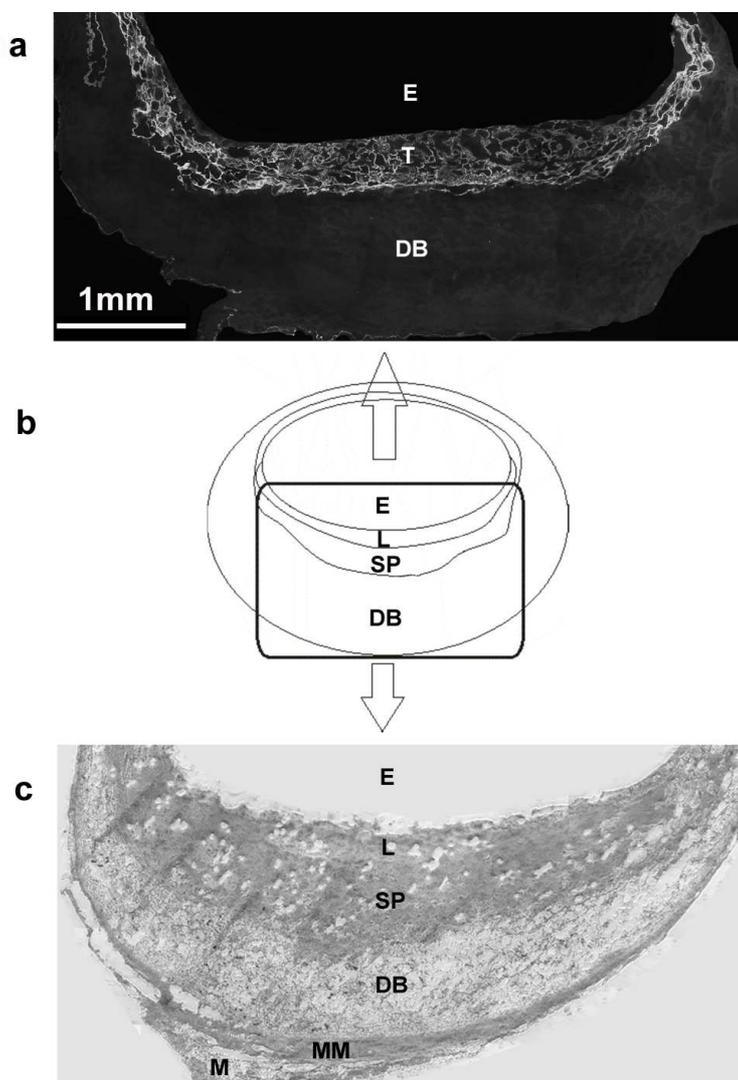


Abbildung 4.3: Immunfluoreszenzfärbung (a), Schema (b) und HE-Färbung (c) vom Tag 11 des Trophoblasten und der Decidua basalis einer syngenen C57BL/6J-Schwangerschaft. Der invasive epitheliale Trophoblast ist mit dem FITC-konjugierten mAk gegen Cytokeratin TROMA-1 (weiß) angefärbt worden. Die Färbungen a und c sind jeweils mit Photoshop aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt worden. DB: Decidua basalis, E: Embryonalhöhle, L: Labyrinthzone, MM: Muscularis mucosae, M: Mesometrium, SP: Spongiotrophoblast, T: Trophoblast, VZ vaskuläre Zone

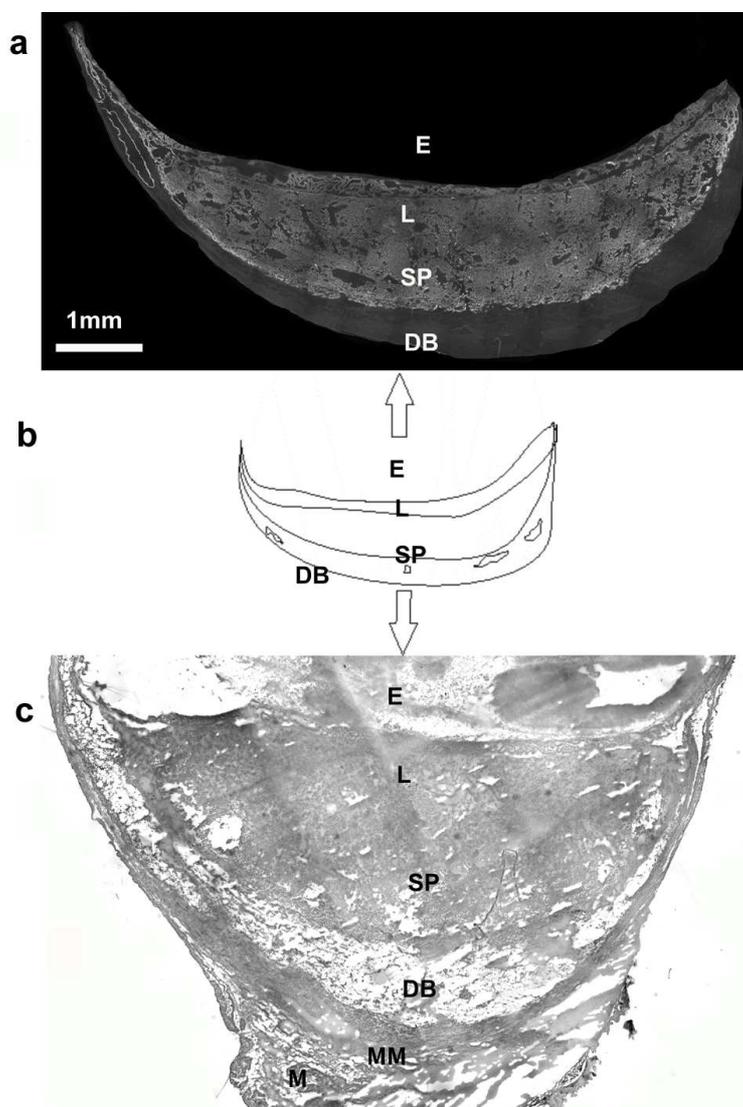


Abbildung 4.4: Immunfluoreszenzfärbung (a), Schema (b) und HE-Färbung (c) vom Tag 14 des Trophoblasten und der Decidua basalis einer syngen C57BL/6J-Schwangerschaft. Der invasive epitheliale Trophoblast ist mit dem FITC-konjugierten mAk gegen Cytokeratin TROMA-1 (weiß) angefärbt worden. Die Färbungen a und c sind jeweils mit Photoshop aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt worden. Der Trophoblast hat große Teile der Decidua basalis ersetzt, siehe a. DB: Decidua basalis, E: Embryonalhöhle, L: Labyrinthzone, MM: Muscularis mucosae, M: Mesometrium, SP: Spongiotrophoblast, VZ vaskuläre Zone

4.2 Verteilung mütterlicher Leukozyten im schwangeren Uterus

Innerhalb der abgrenzbaren Zonen der Decidua basalis im schwangeren Uterus lassen sich verschiedene Leukozytenpopulationen nachweisen, die sich in der ersten Hälfte der Schwangerschaft in einem einzigartigen, nicht überlappenden Muster anordnen. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft finden immer mehr Überlappungen der Leukozytenzonen statt.

Mithilfe monoklonaler Antikörper gegen ausgewählte Zelloberflächenmoleküle wurden die den schwangeren Uterus infiltrierenden Leukozyten an den Tagen 9, 11 und 14 der Schwangerschaft untersucht (Abbildungen 4.5, 4.6 und 4.7). Am Tag 9 der Schwangerschaft dominieren zwei Leukozyten-Subpopulationen in der Decidua basalis, Zellen der Monozyten/Makrophagenlinie (CD11b^{hi}, Gr-1^{lo}, Ly6G⁻) und uterine (u)NK-Zellen (Thy 1.2⁺). Granulozyten (CD11b^{lo}, Ly6C⁻, Ly6G⁺) sind in geringen Zahlen vertreten, T-Zellen (CD3⁺) kommen nur vereinzelt vor.

In diesem Stadium der Schwangerschaft sind Granulozyten auf mütterliche Blut-sinusoide im äußeren Bereich des einwandernden Trophoblasten beschränkt. Monozytäre Zellen und vereinzelte Lymphozyten kommen in den mütterlichen Blutgefäßen und im Gewebe der vaskulären Zone vor. uNK-Zellen befinden sich in der zentralen Decidua basalis und der *metrial gland* am Rande des Myometriums. An der Grenze zwischen zentraler Decidua basalis und Myometrium sowie auch in der darüber liegenden Serosa kommen Makrophagen vor, siehe Abbildung 4.5.

Am Tag 11 der Schwangerschaft bleiben die am Tag 9 beschriebenen Zonen weit-

gehend erhalten. Es konnte aber eine dramatische Zunahme aller die Decidua basalis infiltrierenden Leukozyten-Subpopulationen nachgewiesen werden. Zu dieser Zeit erreichen die uNK-Zellen ihre maximale Zellzahl und infiltrieren die gesamte Decidua basalis. Sie stehen im engen Kontakt zum einwandernden Trophoblasten, wie Abbildung 4.6 zeigt.

Die im Bereich der vaskulären Zone vorherrschende Leukozytenpopulation stellen weiterhin monozytäre Zellen dar, siehe Abbildung 4.6, gefolgt von einer vermehrten Zahl an Granulozyten und T-Zellen. In den mütterlichen Blutsinusoiden des äußeren Trophoblasten konnte eine vermehrte Infiltration von Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden. Vereinzelt kommen auch uNK-Zellen und T-Zellen vor.

Am Tag 14 kann keine Unterteilung in abgegrenzte Domänen mehr vorgenommen werden. Die Zahl der uNK-Zellen hat deutlich abgenommen. Monozytäre Zellen kommen hauptsächlich im Gewebe, Granulozyten dagegen vermehrt in den dilatierten Blutgefäßen vor. Makrophagen befinden sich weiterhin am Rande des Myometriums. Im Bereich der von Trophoblasten ausgekleideten Blutsinusoiden konnten vermehrt Granulozyten, aber auch Monozyten, T-Zellen und uNK-Zellen nachgewiesen werden, siehe Abbildung 4.7.

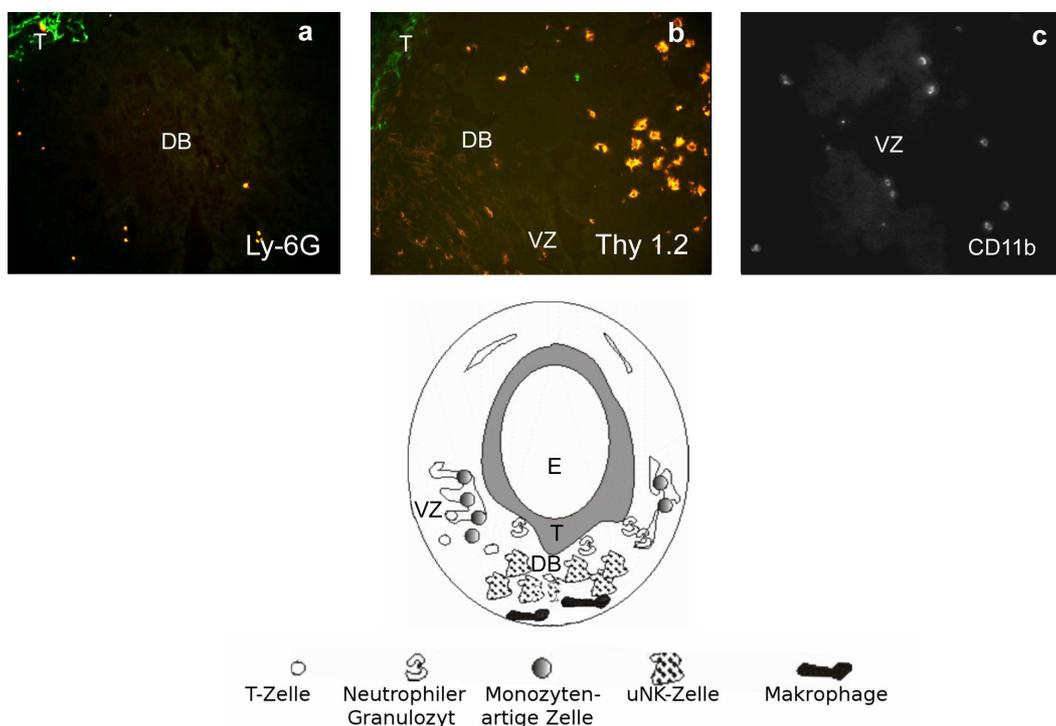


Abbildung 4.5: Organisation und Leukozytendarstellung am Tag 9 der Schwangerschaft mit schematischer Darstellung des schwangeren Uterus. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit den PE-markierten mAk 1A8 gegen Ly-6G (a), 30H12 gegen Thy 1.2 (b), sowie M1/70 gegen CD11b (c). Der Trophoblast wurde mit dem FITC-markierten mAk TROMA-1 gegen Cytokeratin dargestellt. Die Abbildung a zeigt die Verteilung Ly-6G⁺ Leukozyten im Bereich zwischen der zentralen Decidua basalis und der vaskulären Zone und dem Trophoblasten. Ly6-G⁺ Zellen (gelb) lassen sich in geringer Zahl sowohl in der vaskulären Zone als auch unmittelbar am äußeren Rand des Trophoblasten nachweisen (gelb, a). In der Abbildung b wird die Verteilung von Thy 1.2⁺ Leukozyten ebenfalls im Bereich zwischen der zentralen Decidua basalis und der vaskulären Zone dargestellt (gelb). Abbildung c zeigt CD11b⁺ Leukozyten in der vaskulären Zone. DB: Decidua basalis, E: Embryonalhöhle, T: Trophoblast, VZ: vaskuläre Zone. Vergrößerung: x200.

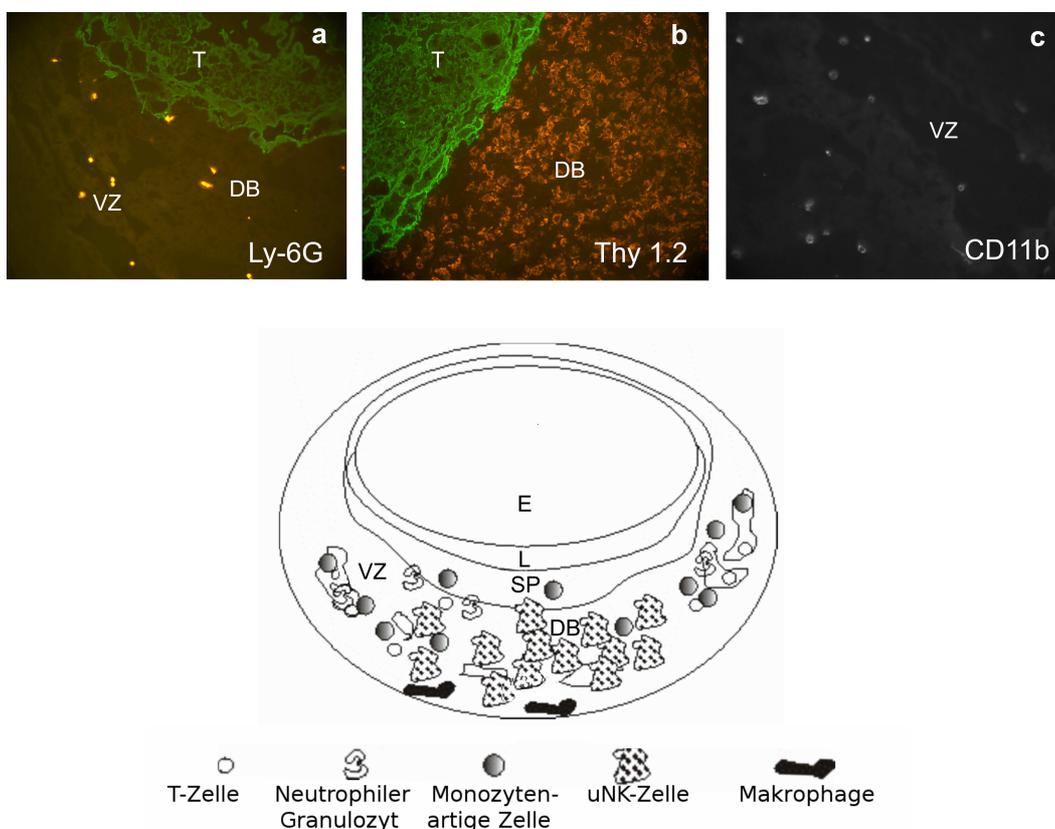


Abbildung 4.6: Organisation und Leukozytendarstellung am Tag 11 der Schwangerschaft mit schematischer Darstellung des schwangeren Uterus. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit den PE-markierten mAk 1A8 gegen Ly-6G (a), 30H12 gegen Thy 1.2 (b), sowie M1/70 gegen CD11b (c). Der Trophoblast wurde mit dem FITC-markierten mAk TROMA-1 gegen Cytokeratin dargestellt. Es kann eine allgemeine Zunahme der Anzahl aller Leukozytenpopulationen im Vergleich zum Schwangerschaftstag 9 nachgewiesen werden. Ly-6G⁺ Zellen (gelb) lassen sich am Tag 11 der Schwangerschaft vornehmlich in der vaskulären Zone, aber auch in unmittelbarer Nähe zum Trophoblasten nachweisen (grün, a). Am Tag 11 der Schwangerschaft ist die höchste Akkumulation von Thy 1.2⁺ erreicht. Diese dominieren im Bereich der Decidua basalis bis hin zum Trophoblasten (rot, b). Abbildung c zeigt die Verteilung von CD11b⁺ Zellen in der vaskulären Zone (weiß). DB: Decidua basalis, E: Embryonalhöhle, L: Labyrinthzone, SP: Spongiotrophoblast, T: Trophoblast, VZ: vaskuläre Zone. Vergrößerung: x200.

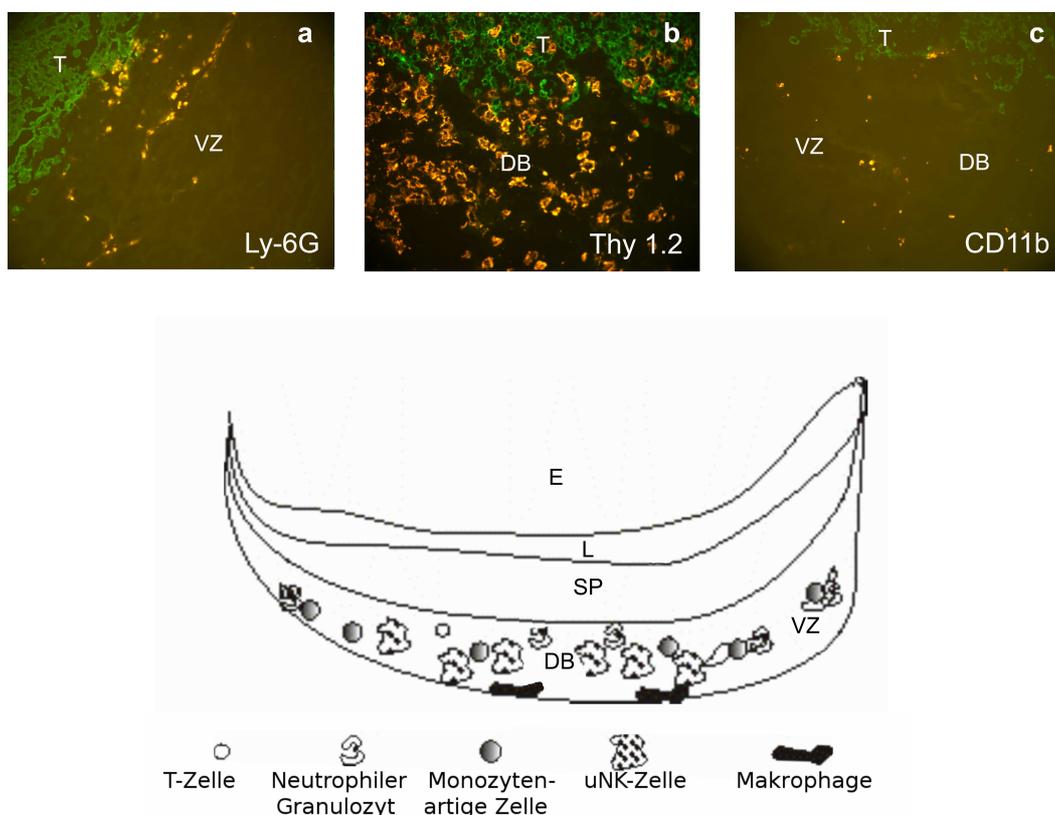


Abbildung 4.7: Organisation und Leukozytendarstellung am Tag 14 der Schwangerschaft mit schematischer Darstellung des schwangeren Uterus. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit den PE-markierten mAk 1A8 gegen Ly-6G (a), 30H12 gegen Thy 1.2 (b) und M1/70 gegen CD11b (c). Der Trophoblast wurde mit dem FITC-markierten mAk TROMA-1 gegen Cytokeratin dargestellt. Am Tag 14 finden sich Ly-6G⁺ Zellen (gelb) hauptsächlich in den dilatierten Blutgefäßen, aber auch in unmittelbarer Nähe des Trophoblasten (grün, a). Die Zahl der Thy 1.2⁺ uNK-Zellen hat gegenüber Tag 11 abgenommen (gelb, b). Sie kleiden jedoch immer noch den Bereich der Decidua basalis bis hin zum Trophoblasten aus. CD11b⁺ Zellen befinden sich am Tag 14 im Bereich der Decidua basalis (gelb, c) DB: Decidua basalis, SP: Spongiotrophoblast, T: Trophoblast, L: Labyrinthzone, VZ: vaskuläre Zone, E: Embryonalhöhle. Vergrößerung: x200.

4.3 Expression von Fas und Fas-Ligand in der murinen Schwangerschaft

Fas und Fas-Ligand sind die am besten untersuchten Effektoren der ligandenvermittelten Apoptose und spielen eine wichtige Rolle in der murinen Schwangerschaft [56, 84, 85, 86, 87]. Um das Fas/Fas-Ligand-System in der murinen Schwangerschaft zu untersuchen, ist die Kenntnis der Verteilung vom Apoptose-induzierenden Fas-Ligand wie auch seines Rezeptors Fas nötig. In den folgenden Abschnitten wird deren Verteilung im schwangeren Uterus und speziell auf den den schwangeren Uterus infiltrierenden Leukozyten dargestellt.

4.3.1 Expression von Fas und Fas-Ligand im schwangeren Uterus

Zum Zeitpunkt der beginnenden Plazentabildung wurde sowohl die Expression von Fas als auch die Expression von Fas-Ligand im schwangeren Uterus untersucht. Doppelfärbungen mit FITC-konjugiertem anti-Cytokeratin mAk TROMA-1 und PE-konjugiertem anti-Fas-Ligand mAk Jo2 zeigten eine Expression von Fas-Ligand auf einzelnen Trophoblastenzellen vor allem im äußeren Bereich des einwandernden Trophoblasten an der Grenze zur Decidua basalis (Abbildung 4.8).

Eine hohe Expression von Fas konnte am Tag 9 der murinen Schwangerschaft auf Stromazellen der Decidua basalis, die an den Trophoblasten angrenzen, nachgewiesen werden. Fas wird zudem auf einzelnen Trophoblastenzellen exprimiert, die die Reste des *Ectoplacental Cones* umgeben, siehe Abbildung 4.8. Am Tag 11 der Schwangerschaft wird Fas weiterhin auf decidualen Stromazellen in unmittelbarer Nähe zum Trophoblasten exprimiert. Insgesamt ist die Expression von

Fas etwas vermindert im Gegensatz zur beginnenden Plazentation. Die Expression von Fas kann in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft weiterhin auf deciduellen Stromazellen in unmittelbarer Nähe des Trophoblasten nachgewiesen werden. Zusätzlich wird Fas am Tag 14 der Schwangerschaft auch auf einzelnen Trophoblastenzellen in Bereichen exprimiert, die Fas-Ligand⁺ sind. Einzelne Endothelzellen der Gefäße sowohl in der vaskulären Zone als auch im Mesometrium zeigen eine schwache Expression von Fas.

Am Tag 9 der Schwangerschaft konnte Fas-Ligand nicht nur auf dem Trophoblasten sondern auch auf einzelnen Endothelzellen der deciduellen Gefäße nachgewiesen werden. Vereinzelt konnte Fas-Ligand auch auf Decidualzellen um den Trophoblasten dargestellt werden. In der Mitte der Schwangerschaft (Tag 11), ist das Verteilungsmuster von Fas-Ligand insgesamt gleich geblieben. Einzelne Zellen des stark ausgedehnten Trophoblasten an der Grenze zur mütterlichen Decidua basalis tragen Fas-Ligand. Innerhalb der Decidua basalis sind Fas-Ligand-Moleküle ebenfalls auf vereinzelt Stromazellen nachweisbar. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, am Tag 14, ist die Expression von Fas-Ligand im Vergleich zur Mitte der Schwangerschaft reduziert. Es sind nur noch wenige vereinzelt Fas-Ligand⁺ Zellen im Bereich des Trophoblasten wie auch in der Decidua basalis nachweisbar.

Die Decidua capsularis hingegen ist während der gesamten Schwangerschaft nicht anfärbbar für Fas oder Fas-Ligand.

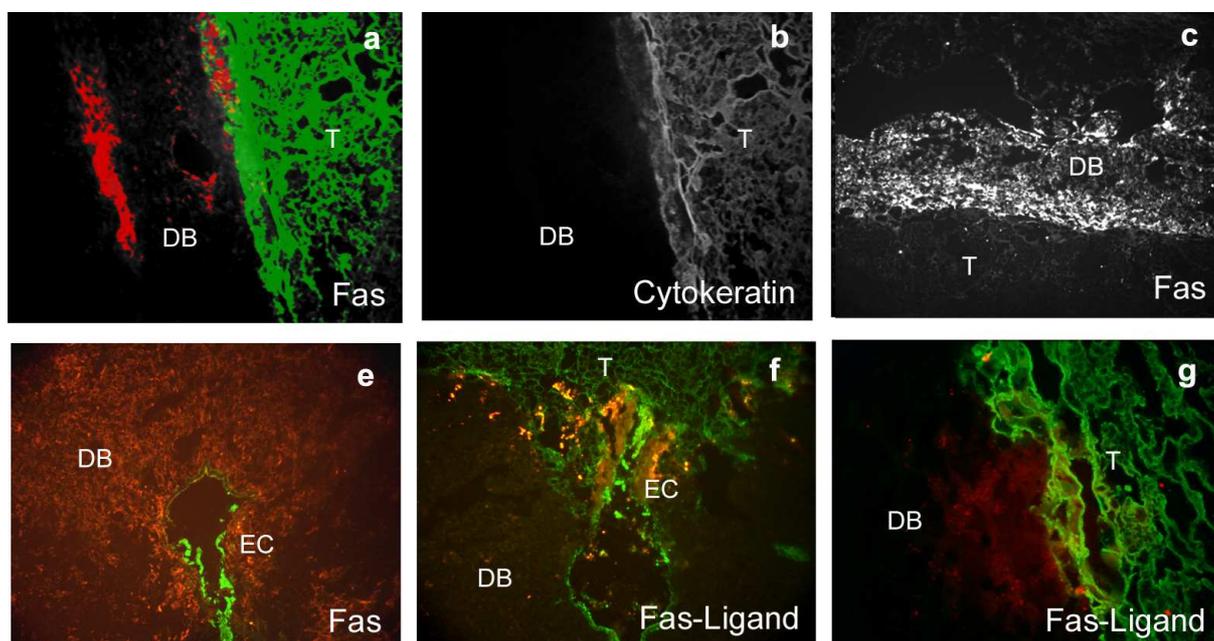


Abbildung 4.8: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Fas- und Fas-Ligand-Expression an den Schwangerschaftstagen 9 und 11. Die Fas-Expression wird dargestellt mit dem mAk Jo2, der Trophoblast wird mit dem gegen Cytokeratin gerichteten mAk TROMA-1 angefärbt. Am Tag 9 der Schwangerschaft ist das den Trophoblasten umgebene Stroma kräftig anfärbbar für Fas (a, b). Abbildung b zeigt den mit anti-Cytokeratin mAk TROMA-1 dargestellten Trophoblasten. Abbildung c zeigt die Fas-Expression auf dem den Trophoblasten umgebene Stroma am Tag 11 der Schwangerschaft. Fas-Ligand wird durch Färbung mit dem mAk MFL3 dargestellt. Am Tag 9 der Schwangerschaft können Reste des *Ectoplacental Cones* des Trophoblasten dargestellt werden (d und e, grün). Lediglich das den *Ectoplacental Cone* umgebene Stroma ist kräftig Fas⁺ (d, rot), während sich der *Ectoplacental Cone* selbst für Fas-Ligand anfärben lässt (e, rot). Fas-Ligand hingegen findet sich nur auf vereinzelten Zellen des zur Decidua basalis ausgerichteten Trophoblasten (f, rot). DB: Decidua basalis, EC: *Ectoplacental Cone* T: Trophoblast, VZ: vaskuläre Zone. Vergrößerung: x200.

4.3.2 Expression von Fas und Fas-Ligand auf den Leukozyten im schwangeren Uterus

Die Expression von Fas und Fas-Ligand auf mütterlichen Leukozyten kann möglicherweise Aufschluß darüber geben, inwieweit diese Zellen in der Lage sind, deciduales oder fetales Gewebe über den Fas-Ligand-abhängigen Apoptoseweg zu eliminieren oder inwieweit sie selbst empfänglich für über Fas-Ligand vermittelte Apoptose sind.

An den Schwangerschaftstagen 9, 11 und 14 lassen sich jedoch nur Leukozyten in sehr geringem Prozentsatz nachweisen, die für Fas oder Fas-Ligand positiv sind. Im Vergleich zu den Tagen 9 und 14 der Schwangerschaft konnte am Tag 11 kein Unterschied in der Expression gefunden werden. Am Tag 11 besteht der weitaus größte Teil der Leukozyten im schwangeren Uterus aus uNK-Zellen. Es kommt an diesem Schwangerschaftstag zur maximalen Akkumulation von infiltrierenden Leukozyten in die Decidua basalis. In der Tabelle 4.1 ist die Expressionshäufigkeit für Fas und Fas-Ligand auf Leukozyten am Tag 11 der Schwangerschaft aufgeführt, die Marker für uterine NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, monozytenartige Zellen oder T-Zellen tragen. Verwendet wurden PE-markierte mAk gegen Fas (Jo2) und Fas-Ligand (MFL3). Die zelltypischen Oberflächenmarker für mütterliche uterine Leukozyten wurden mit FITC-konjugierten mAk gegen CD 90.2 (30H12), CI:A3-1 (F4/80), Gr-1 (RB-8C5), CD11b (M1/70) und CD3 ϵ (17A2) dargestellt.

Expression von Fas und Fas-Ligand auf Leukozyten				
	Klon	Antigen	Fas ⁺	Fas-Ligand ⁺
uNK-Zellen	30 H12	CD90.2	< 5 %	< 1 %
Makrophagen	F4/80	CI: A3-1	< 5 %	< 5 %
Granulozyten	RB-8C5	Gr-1	< 5 %	< 5 %
Monozyten	M1/70	CD11b	< 1 %	< 1 %
T-Zellen	17A2	CD3 ϵ	< 1 %	< 1 %

Tabelle 4.1: Fas- und Fas-Ligand-Expression auf mütterlichen uterinen Leukozyten am Tag 11 der Schwangerschaft. Von drei verschiedenen Mäusen wurden jeweils zwei fetomaternalen Einheiten ausgewählt und von diesen wurden zehn Schnitte untersucht. Pro Leukozytentyp wurden fünf nicht überlappende Ausschnitte im schwangeren Uterus ausgezählt. Die Oberflächenmoleküle wurden mit dem jeweiligen FITC-konjugierten mAk gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit den PE-markierten mAk gegen Fas (Jo2) und Fas-Ligand (MFL3).

4.4 Schwangerschaften Fas- und Fas-Ligand-defizienter Mäuse

Fas und Fas-Ligand spielen eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung autoreaktiver oder auch nach einer Entzündung nicht mehr benötigter Leukozyten. Defekte für Fas und Fas-Ligand führen unter anderem zu einer durch Akkumulation von Leukozyten verursachten Lymphadenopathie. Im schwangeren Uterus der Maus ist das Vorhandensein von funktionsfähigen Leukozyten, besonders von uNK-Zellen, von entscheidender Bedeutung für das Gelingen einer Schwangerschaft. uNK-Zellen lassen sich bereits an den frühen Schwangerschaftstagen 6 und 7 im Uterus nachweisen. Sie proliferieren im schwangeren Uterus und erreichen

ihre maximale Akkumulation am Tag 11. Von da an nimmt ihre Zahl kontinuierlich bis zum Ende der Schwangerschaft wieder ab. Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Abwesenheit von funktionstüchtigen uNK-Zellen zu einem unreifen Gefäßbett, einer daraus resultierenden Mangelversorgung des Feten und schließlich zu einer Verringerung der Anzahl von Nachkommen führt, [56]. Um den Einfluß des Fehlens von Fas bzw. des Fas-Ligand auf die Entwicklung der uNK-Zellen in der Decidua basalis zu untersuchen, wurde die Größe und die Anzahl der uNK-Zellen innerhalb der Deciduen von B6-*gld*-, B6-*lpr*- und B6-*Wildtyp*-Mäusen am Tag 11 verglichen. In der Literatur fanden bislang nur die für funktionellen Fas-Ligand defiziente B6-*gld*-Mäuse Berücksichtigung. Verwendet wurden mindestens drei Mäuse pro Mausstamm, von diesen jeweils mindestens drei Einheiten mit je 10 Schnitten. Diese mussten einen Mindestabstand von 42 μm aufweisen. Die uNK-Zellen wurden mit dem anti-Thy 1.2 mAk 30 H12 dargestellt. Interessanterweise konnte in Bezug auf die Anzahl der uNK-Zellen in der Decidua basalis zwischen den drei untersuchten Mausstämmen kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Jedoch fand sich, dass die uNK-Zellen bei B6-*gld* und auch bei B6-*lpr*-Mäusen signifikant kleiner waren als die bei normalen B6-*Wildtyp*-Kontrollmäusen. Wiesen die uNK-Zellen im Mittel 22 μm Durchmesser auf, so war das bei den B6-*gld*- und B6-*lpr*-Mäusen nur 20 μm . Eine vermehrte Infiltration oder das Fehlen anderer den schwangeren Uterus infiltrierenden Leukozyten konnte nicht festgestellt werden. Die Abbildung 4.9 zeigt die Anzahl der uNK-Zellen pro 0,25 mm^2 bei B6-*lpr*- und B6-*gld*-Mäusen am Schwangerschaftstag 11, die Abbildung 4.10 zeigt die Größe der uNK-Zellen am Tag 11.

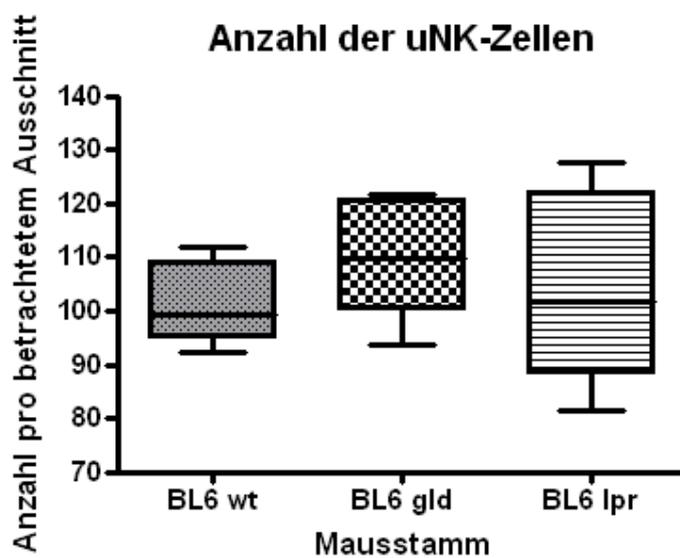


Abbildung 4.9: Anzahl der uNK-Zellen pro $0,25 \text{ mm}^2$ von B6-Wildtyp-, B6-*gld*- und B6-*lpr*-Schwangerschaften. Die Box- und Whisker-Plots zeigen keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Anzahl der uNK pro $0,25 \text{ mm}^2$ (Angabe des Median, Perzentil und Spannweite).

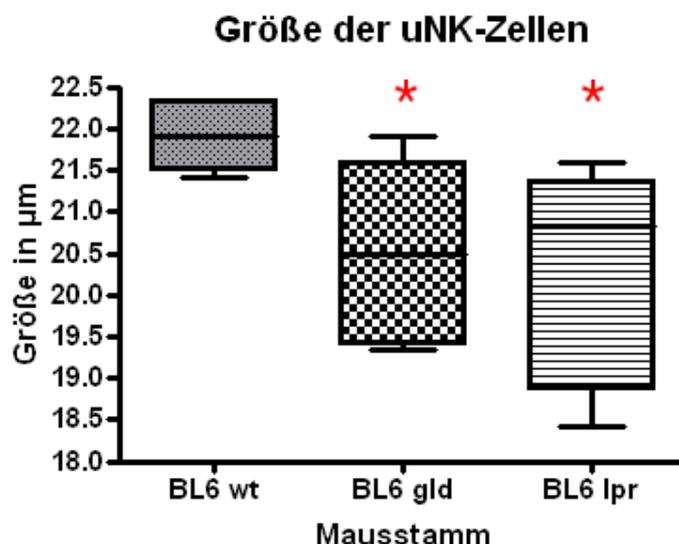


Abbildung 4.10: Größe der uNK-Zellen in μm in einem Vergleich von B6-Wildtyp-, B6-*gld*- und B6-*lpr*-Schwangerschaften am Tag 11. Die mit * markierten Box- and Whisker-Plots zeigen einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe der C57BL/6J-Mäuse (* : $p < 0,05$). Die uNK-Zellen der B6-*gld*- und B6-*lpr*-Mäuse waren signifikant kleiner als die von B6-Wildtyp-Mäusen (Angabe des Median, Perzentil und Spannweite).

Die Gefäßumbildung in der Decidua basalis wird entscheidend von der IFN- γ -Produktion durch uNK-Zellen während der ersten Hälfte der Schwangerschaft beeinflusst. Das Auftreten einer hohen Anzahl nicht funktionstüchtiger uNK-Zellen im schwangeren Uterus kann möglicherweise zu einem mangelnden Umbau des Gefäßbettes und einem nicht schwangerschaftsgerechten Aufbau des Decidualgewebes führen. Es konnte jedoch trotz kleinerer uNK-Zellen weder bei B6-*gld*- noch bei B6-*lpr*-Mäusen eine Veränderung im Bereich der Decidua basalis im Vergleich zu B6-Wildtyp-Mäusen festgestellt werden: Das Stroma zeigt eine normale Zellularität. Die Plazenten waren von vergleichbarer Größe.

Die Abbildung 4.11 zeigt die Anzahl der Nachkommen für B6-Wildtyp ($n=20$),

für B6-*lpr* (n=32) und für B6-*gld* (n=11). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Nachkommen nachgewiesen werden. Die Nachkommen bei den hier untersuchten Schwangerschaften waren nicht kleiner als bei normalen Mäusen. Aborte konnten nicht nachgewiesen werden.

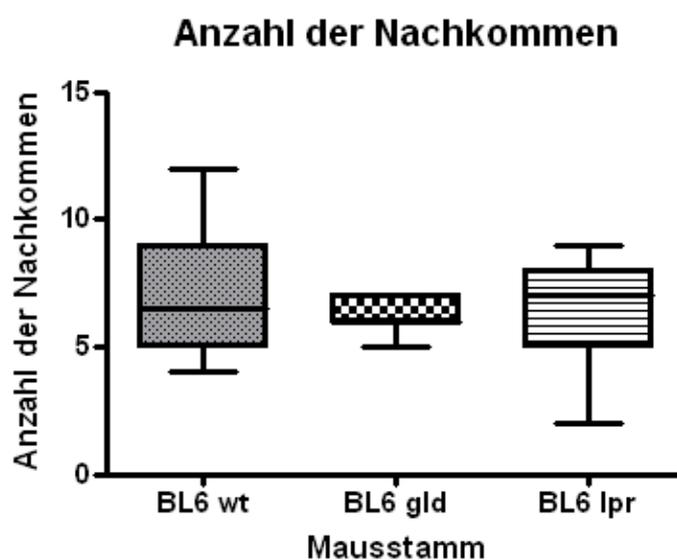


Abbildung 4.11: Anzahl der Nachkommen von B6-*Wildtyp*-, B6-*gld*- und B6-*lpr*-Mäusen. Es wurden dabei für B6-*Wildtyp*-Mäuse 20 Schwangerschaften, für B6-*gld*-Mäuse 11 und für B6-*lpr*-Mäuse 32 Schwangerschaften berücksichtigt. Hinsichtlich der Anzahl der Nachkommen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Mausstämmen festgestellt werden (Angabe des Median, Perzentil und Spannweite).

4.5 Physiologisches Vorkommen von Apoptose in der murinen Schwangerschaft

Apoptose ist nicht nur unter physiologischen Bedingungen ein Regulator im Immunsystem, sondern findet auch in Geweben mit hohem Zellumsatz oder schnell wachsenden Geweben wie Epithelien statt. Es konnten allerdings während der Schwangerschaft an den Tagen 11, 13 und 14 nur sehr wenige apoptotische Leukozyten gefunden werden. Es konnte in den Bereichen der an den Trophoblasten angrenzenden Decidua basalis und innerhalb des Trophoblasten nur vereinzelt apoptotische Zellen nachgewiesen werden, siehe Abbildung 4.13, b. Verwendet wurde der Fluorescein-markierte TUNEL-Assay, mit dem apoptotische Zellkerne anfärbbar werden.

4.6 Untersuchungen zur Leukozytenverteilung und Apoptose im schwangeren Uterus der Maus unter pathologischen Bedingungen

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Vaginalspülungen zur Überprüfung auf eine vorliegende Schwangerschaft ab Tag 7 post coitum wurden bei den Mäusen gelegentlich vaginale Blutungen an unterschiedlichen Schwangerschaftstagen festgestellt. Es wurde dann der Uterus sofort entnommen. Im Gegensatz zu blass-rosa aussehenden fetomaternalen Einheiten normal verlaufender Schwangerschaften waren die abortiven Einheiten durch Einblutungen blaurot gefärbt. Untersucht wurden fetomaternale Einheiten von Aborten der Schwangerschaftstage 11 (n=2), 13 (n=2) und 14 (n=2).

Von den entnommenen Uteri wurden Kryostatschnitte angefertigt und immunhistologische Färbungen mit mAk gegen Cytokeratin und definierte Leukozytenoberflächenantigene durchgeführt. Apoptotischen Zellen wurden durch den TUNEL-Assay (FITC) detektiert.

Abortive Uteri sind durch einen degenerativen Trophoblasten charakterisiert. Um eine relative Vergleichbarkeit der Gewebe zu gewährleisten, wurde nur solches Gewebe für weitere Untersuchungen verwendet, in welchem noch für Cytokeratin positiver fetaler Trophoblast nachweisbar war. Bei dem so ausgewählten Untersuchungsmaterial ließen sich hinsichtlich der Rekrutierung mütterlicher Immunzellen Gemeinsamkeiten feststellen, die unabhängig vom untersuchten Schwangerschaftstag waren.

Die an abortiven fetomaternalen Einheiten durchgeführten immunhistologischen Färbungen zeigten eine extreme Infiltration des fetalen Trophoblasten und der mütterlichen vaskulären Zone durch myeloide Leukozyten. Diese zeigten einen ungewöhnlich aktivierten Phänotyp (Gr-1^{hi} , CD11b^{hi}), siehe Abbildung 4.12. Auch potentiell alloreaktive T-Zellen (CD4^+ , CD8^+ - Subpopulationen) konnten im Bereich des degenerierten Trophoblasten nachgewiesen werden, Abbildung 4.13.

Bei normalen Schwangerschaften zeigen monozytäre Zellen an der fetomaternalen Grenzschicht eine starke Expression von CD11b und eine schwache Expression von Gr-1 (CD11b^{hi} , Gr-1^{lo}), während sich Granulozyten mit Anti-Gr-1 mAk RB6-8C5 stark anfärben lassen, aber nur eine schwache Reaktivität mit Anti-CD11b mAk M1/70 zeigen (CD11b^{lo} , Gr-1^{hi}). CD11b wird jedoch auf Granulozyten nach Aktivierung sehr schnell hochreguliert [88].

Um festzustellen, ob es sich bei den $CD11b^{hi}$ $Gr-1^{hi}$ exprimierenden Leukozyten, die im Bereich des degenerierten Trophoblasten in abortiven fetomaternalen Einheiten nachgewiesen wurden, um Monozyten oder Granulozyten handelt, wurden zusätzliche Färbungen mit dem mAk 1A8 durchgeführt. Im Gegensatz zu dem mAk Gr-1, der gegen die beiden Epitope Ly-6G und Ly-6C gerichtet ist, erkennt der mAk 1A8 spezifisch Ly-6G, das auf Granulozyten ($Ly-6G^+$) aber nicht auf Monozyten ($Ly-6G^-$) vorkommt. Immunhistologische Färbungen mit dem mAk 1A8 ergaben, dass die Mehrzahl der hochaktivierten Zellen Granulozyten darstellte, gefolgt von monozytären Zellen. Die Färbungen mit dem TUNEL-Assay zeigten bei abortiven Uteri sowohl eine hohe Rate an Apoptose unter den für CD11b und Gr-1 positiven myeloiden Leukozyten im Bereich des Trophoblasten als auch am Trophoblasten selbst, an Stellen der Gewebsdegeneration.

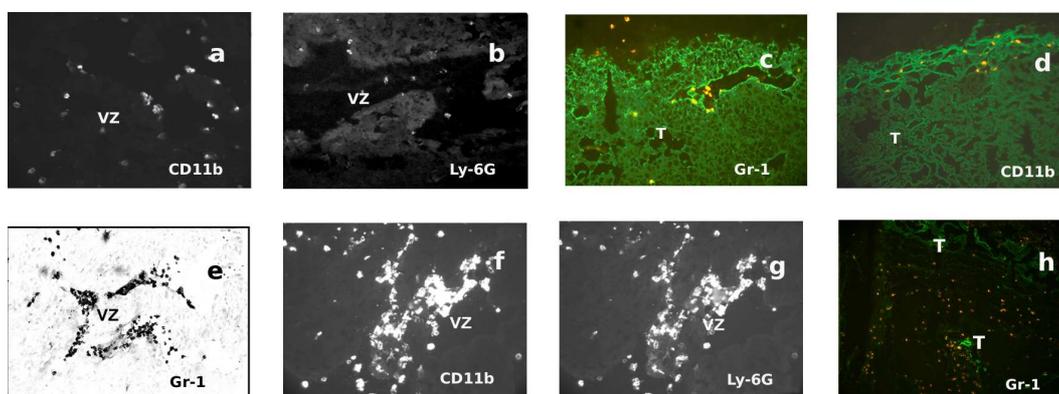


Abbildung 4.12: Immunhistologische und Immunfluoreszenz-Färbung der Decidua basalis am Schwangerschaftstag 13 von normalen und abortiven allogenen BALB/c x C57BL/6J-Schwangerschaften. a-d, h: Die Schnitte zeigen die vaskuläre Zone (a-b) und die mütterlich/fetale Grenzschicht (c-d) der normalen Decidua basalis am Schwangerschaftstag 13. Die mütterlichen Blutgefäße in der vaskulären Zone beinhalten vornehmlich monozytäre Zellen in ihrem Lumen, welche sich intensiv mit dem gegen CD11b gerichteten Antikörper M1/70 anfärben lassen (a). Ly-6G positive Granulozyten kommen nur in geringer Zahl vor (b). Der invasive Trophoblast wird mit dem FITC-konjugierten mAk gegen Cytokeratin dargestellt (grün, c-d, h). Lediglich mütterliche Blutsinusoiden, die von Trophblastenzellen ausgekleidet sind, weisen Gr-1⁺ Granulozyten (gelb, c) und CD11b^{hi} monozytäre Zellen (gelb, d) auf. e-h: Abortiver Uterus am Tag 13 der Schwangerschaft. Es kann eine dramatische Infiltration der vaskulären Zone durch myeloide Zellen gezeigt werden, die den Marker Gr-1 tragen *und* darüber hinaus auch eine starke Reaktivität mit dem anti-CD11b mAk M1/70 aufweisen (e-f). Diese Zellen infiltrieren mütterliche Blutgefäße und das Gewebe der vaskulären Zone (e-g) sowie den degenerierten Trophoblasten (h). Eine Färbung mit gegen das Antigen Ly-6G gerichteten mAk 1A8 (g), der Granulozyten (Ly-6G⁺), aber keine Monozyten (Ly-6G⁻) in der Peripherie markiert, konnte zeigen, dass die Mehrzahl der infiltrierenden Zellen aktivierte Granulozyten sind. Vergrößerung: x200

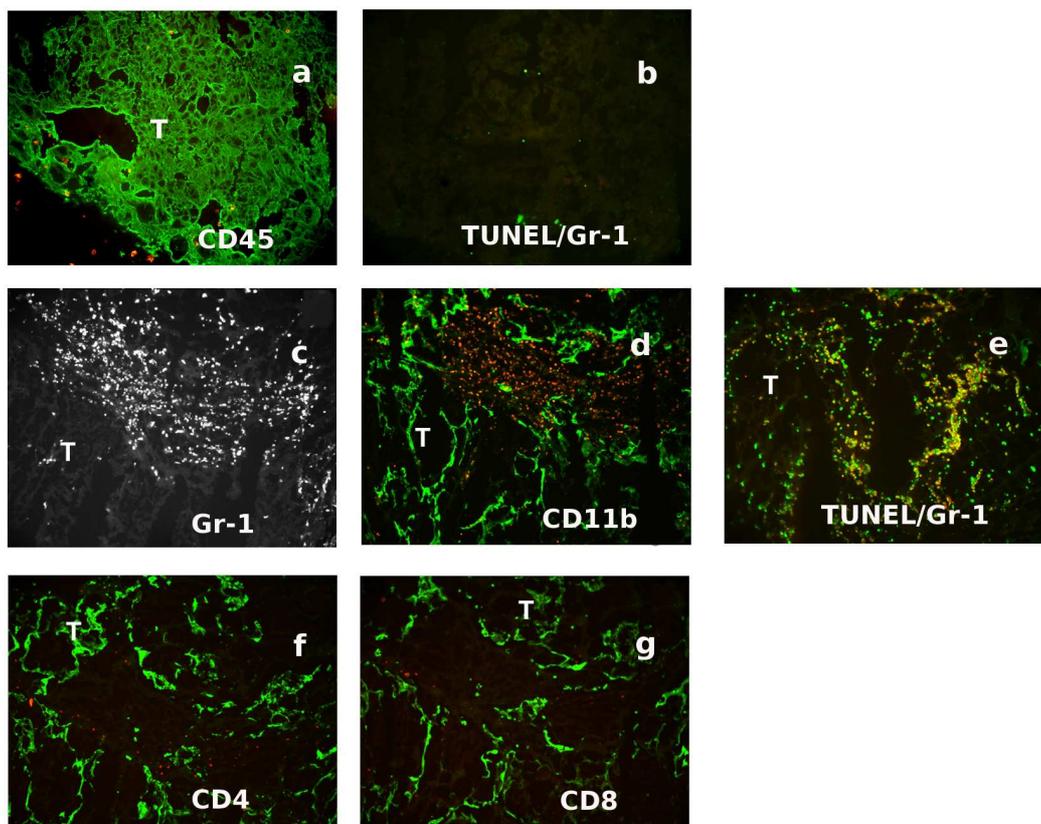


Abbildung 4.13: Immunfluoreszenzfärbung normaler und abortiver muriner Uteri am Tag 14 der Schwangerschaft. Der epitheliale Trophoblast wurde mit FITC-konjugiertem mAk gegen Cytokeratin identifiziert (grün, a, d, f-g). Der fetale Trophoblast in einer normal verlaufenden Schwangerschaft enthält nur geringe Zahlen von infiltrierenden $CD45^{+}$ Leukozyten. Nur der Trophoblast, der Blutsinusoiden am Rande des äußeren Trophoblasten auskleidet, weist maternale Leukozyten auf (a). Apoptotische Zellen kommen nur vereinzelt im Bereich des Trophoblasten vor (b). Dagegen wird in abortiven Uteri eine dramatische Akkumulation von myeloiden Zellen, die den Marker Gr-1 stark exprimieren (c) aber zusätzlich CD11b tragen (rot, d) nachgewiesen. $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen werden im Trophoblasten ebenfalls nachgewiesen, aber in deutlich geringerer Anzahl (rot, f-g). Apoptotische Zellen innerhalb des Trophoblasten wurden mit dem TUNEL-Assay (FITC, grün) nachgewiesen. Die den degenerierten Trophoblasten infiltrierenden $Gr-1^{hi}$ exprimierenden Granulozyten zeigen ebenfalls TUNEL-FITC / PE anti-Gr-1 Doppelpositivität (gelb, e). Vergrößerung: x200

Kapitel 5

Diskussion

Im schwangeren Uterus - sowohl beim Menschen als auch bei der Maus - finden sehr dynamische Umbauprozesse statt. Darüber hinaus ist das Milieu des schwangeren Uterus charakterisiert durch die Anwesenheit verschiedener Leukozytenpopulationen mit teilweise direktem Kontakt zum fetalen Trophoblasten. Inzwischen ist bekannt, dass diese an wesentlichen Umstrukturierungsprozessen des Gewebes beteiligt sind und immunregulatorische Funktionen ausüben [9, 20, 89, 90, 91, 92]. Für die Rekrutierung und Migration mütterlicher Leukozyten werden vaskuläre Adhäsionsmoleküle und Chemokine in der Decidua basalis, für die Funktionen, die sie erfüllen, Zell-Zell-Kontakte sowie lösliche Faktoren wie Cytokine eine wichtige Bedeutung zugeschrieben [42, 93, 94]. Die Fähigkeit zur induzierbaren Apoptose wird ebenfalls im Zusammenhang mit einer erfolgreichen Schwangerschaft diskutiert [35, 53, 54, 55, 56, 78, 79, 80].

Apoptose ist ein unverzichtbarer Teil jeglicher Form von Wachstum und Entwicklung im menschlichen Organismus [95, 96]. Der nach Aktivierung exogen verursachte programmierte Zelltod, *Activation induced cell death (AICD)* hat als wichtigsten Effektor den Fas-Ligand und spielt eine bedeutende Rolle in der

Homöostase des Immunsystems und der Bewahrung des Immunprivilegs. Allerdings ist Fas-Ligand nicht der einzige Induktor aktiver Apoptose. Die meisten stammen wie der Fas-Ligand aus der Tumornekrosefaktorsuperfamilie, wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) selbst und der TNF-related-apoptosis-inducing-ligand (TRAIL). Es wird angenommen, dass sie weniger stark Apoptose induzieren als Fas-Ligand [36, 56, 58, 59, 60, 61].

Fas und Fas-Ligand wurden zunächst auf Lymphozyten und NK-Zellen nachgewiesen. Inzwischen ist eine Expression in vielen Geweben, vor allem immunologisch privilegierten Organen wie Auge und Testis, nachweisbar. Auch in anderen Geweben, die immunologisch nicht privilegiert sind, konnten sowohl Fas als auch Fas-Ligand gefunden werden [97]. Im Verlauf der Schwangerschaft konnte ein sich wandelndes Expressionsmuster von Fas und Fas-Ligand im schwangeren Uterus nachgewiesen werden.

Zum Zeitpunkt der beginnenden Plazentation am Tag 9 der Schwangerschaft lässt sich Fas-Ligand innerhalb des schwangeren Uterus zunächst nur vereinzelt auf Trophoblastenzellen, auf einzelnen Endothelzellen der Gefäße der Decidua basalis sowie auf einzelnen deciduellen Stromazellen in unmittelbarer Umgebung des Trophoblasten nachweisen. Im Laufe der Schwangerschaft nimmt die Expression von Fas-Ligand weiter ab und beschränkt sich vornehmlich auf einzelne Trophoblastenzellen und auf Endothelzellen der mütterlichen Gefäße im Bereich der Decidua basalis.

Fas hingegen wird stärker exprimiert: Zu Beginn der Plazentation sind ein Großteil der an den Trophoblasten angrenzenden mütterlichen Stromazellen der Decidua basalis Fas positiv. Fas findet sich nur sehr selten auf vereinzelt Zellen des

äußeren Trophoblasten. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft reduziert sich die Expression von Fas so, dass nur noch deciduale Stromazellen in unmittelbarer Nähe zum Trophoblasten für Fas anfärbbar sind. Am Tag 14 kann man schließlich Fas wieder auf einzelnen Trophoblastenzellen finden, sowie auf einzelnen Endothelzellen der mütterlichen Gefäße im Bereich der vaskulären Zone sowie des Mesometriums. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression von Fas und Fas-Ligand deckt sich mit dem in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster [56].

Die Expression von Fas-Ligand auf der Decidua basalis und dem Trophoblasten wurde dahin gehend diskutiert, dass aktivierte Leukozyten vom semiallogenen Fetus abgehalten werden können [56]. Ob darüber hinaus löslicher Fas-Ligand, das laut Literatur vom Trophoblasten sezerniert wird, effektiv Apoptose induzieren kann, ist noch nicht hinreichend untersucht worden [98, 99]. Das stark exprimierte Fas auf dem den Trophoblasten umgebenen Deciduagewebe könnte den Trophoblasten bei der Invasion in die Decidua basalis unterstützen. Dieser Eindruck wird auch dadurch gestützt, dass sowohl für Fas als auch Fas-Ligand positive Endothelien in der Decidua basalis nachgewiesen werden konnten. Die zeitweise auftretende Coexpression von Fas und Fas-Ligand auf Trophoblastenzellen könnte eine Rolle beim Wachstum und Umbau des Trophoblasten spielen. Bereits auf Bronchialepithelien konnte ein Mechanismus des Fas-Ligand-assistierten *Turnovers* in beanspruchten Geweben beschrieben werden. Fas und Fas-Ligand können dabei sogar auf derselben Zelle gefunden werden, die durch Autostimulation Apoptose begeht [66, 97].

Von besonderer Bedeutung jedoch ist, inwieweit die den schwangeren Uterus infiltrierenden Leukozyten empfänglich für Fas-Ligand-vermittelte Apoptose sind

oder selbst in der Lage sind, mittels Fas-Ligand Apoptose zu induzieren. Es wurde deswegen die Expression von Fas und Fas-Ligand auf den den Uterus infiltrierenden Leukozyten untersucht. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen gegen ausgewählte Zelloberflächenantigene und Fas bzw. Fas-Ligand ergaben, dass in der normal verlaufenden Schwangerschaft nur 0 - 5 % der infiltrierenden Leukozyten Fas bzw. Fas-Ligand exprimieren

Da auch andere Moleküle als Fas und Fas-Ligand an der Induktion von Apoptose beteiligt sein können, wurde untersucht, in welchen Bereichen des schwangeren Uterus Apoptose nachweisbar ist. Interessanterweise konnte Apoptose bei normal verlaufenden Schwangerschaften nicht in dem decidualen Gewebe oder dem Trophoblasten nachgewiesen werden. Der Fetus wies im Rahmen seiner natürlichen Gewebeneu- und umbildung apoptotische Zellkerne auf. Laut Literatur konnte im Bereich der dem Uteruslumen zugeneigten Decidua capsularis Apoptose unter anderem im Uterusepithel nachgewiesen werden. Das ist vereinbar mit entsprechenden Untersuchungen über die Autoregeneration stark beanspruchter Gewebe [97, 100, 101].

Unter pathologischen Bedingungen einer Schwangerschaft hingegen ist Apoptose ein häufiges Ereignis. Es konnte an Aborten an Tag 11, 13 und 14 der Schwangerschaft der Maus gezeigt werden, dass es aufgrund der Hochregulation von vasikulärem P-Selektin auf mütterlichen Gefäßen der Decidua basalis und des Trophoblasten zu einer dramatisch erhöhten Rekrutierung von Granulozyten kommt, die einen ungewöhnlich aktivierten Phänotyp ($Gr-1^{hi}$, $CD11b^{hi}$) aufweisen. Diese aktivierten Granulozyten infiltrieren nicht nur die mütterlichen Gefäße und Gewebe, sondern auch den degenerativen Trophoblasten und unterlaufen dort eine Kernfragmentation. Neben apoptotischen Leukozyten konnten auch für die TUNEL-

Reaktion positive Trophoblastenzellen nachgewiesen werden [102]. Clark hatte bereits die Bedeutung von Granulozyten bei Mäusen mit einer hohen Abortrate dargestellt [103]. Die Depletion dieser Zellen führte zu einer Verminderung der Schädigung des fetalen Gewebes. Des weiteren sind spontane Aborte mit lokalen Entzündungsreaktionen und der Aktivierung von Komplement assoziiert, dessen Spaltprodukte, besonders das C5a, chemotaktisch auf Granulozyten wirken [104]. Die Induktion von Apoptose bei aktivierten Granulozyten im Rahmen von abortiven Prozessen könnte vom Organismus benutzt werden, um ungewünschte Effektorzellen zu entfernen und somit die Entzündungsreaktion auf den Uterus zu begrenzen.

Zwischen dem Vorliegen funktionsfähiger mütterlicher Leukozyten in der Decidua basalis und dem Gelingen einer Schwangerschaft konnte eine enge Beziehung hergestellt werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Umbau des mütterlichen Gefäßbettes im schwangeren Uterus entscheidend von der Gegenwart reifer, IFN- γ -produzierender uNK-Zellen abhängt [8, 105, 106]). Es ist berichtet worden, dass Defekte innerhalb des Fas/Fas-Ligand-Systems eine Schwangerschaft erschweren und dass eine massive Infiltration von Leukozyten ab der Mitte der Schwangerschaft dem Plazentagewebe massiven Schaden verursachen. Dadurch sei letztlich auch die Anzahl der Nachkommen reduziert und die Häufigkeit von Aborten erhöht [56]. Um ein genaueres Bild über die Auswirkungen eines Defekts des Fas/Fas-Ligand-Systems in der Schwangerschaft zu gewinnen, wurden nicht nur B6-*gld*-Mäuse, die einen Defekt für Fas-Ligand aufweisen, untersucht, sondern auch Mäuse mit einem Defekt für den Rezeptor Fas, die B6-*lpr*-Mäuse. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Nachkommen von B6-*gld*- und B6-*lpr*-Mäusen im Vergleich zu normalen B6-*wildtyp*-Mäusen gefunden werden. Auch waren die Nachkommen nicht

kleiner als die von B6-*Wildtyp*-Mäusen. Die Gewebe der schwangeren Uteri von B6-*gld* bzw. B6-*lpr*-Mäuse wiesen keine Nekrosen oder atypische Gewebsstrukturen auf. Hinsichtlich der Anzahl der häufigsten und wichtigsten den schwangeren Uterus infiltrierenden Leukozytensubpopulationen, der uNK-Zellen, konnte sowohl bei den B6-*gld*- als auch den B6-*lpr*-Mäusen kein Unterschied zu den B6-*Wildtyp*-Mäusen am Tag 11 der Schwangerschaft festgestellt werden. Allerdings fand sich, dass sowohl B6-*gld*- als auch B6-*lpr*- Mäuse signifikant kleinere uNK-Zellen in der Decidua basalis aufwiesen.

Die uNK-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der deciduellen Gefäßumbildung, die eine wachstumsangemessene Versorgung des fetalen Gewebes mit Nährstoffen sicherstellt. Sie erreichen ihre maximale Zahl während der Mitte der Schwangerschaft. In der zweiten Hälfte reduziert sich ihre Zahl. Allerdings ist wenig über den dieser Zellverminderung zugrunde liegenden Mechanismus bekannt [8].

Kusakabe et al. postulieren, dass Fas-exprimierende uNK-Zellen über den Fas-Ligand vermittelten Apoptoseweg eliminiert würden [107]. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen an Mäusen mit einem funktionellen Defekt für Fas oder Fas-Ligand bestätigen nicht die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Frau Hunt [56]. Weder konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Nachkommen, bedingt durch eine höhere Abortrate, geringer als bei normalen Mäusen war, noch zeigten sich morphologische Unterschiede im Aufbau der schwangeren Uteri. Es konnte desweiteren keine vermehrte Einwanderung von Leukozyten, vor allem Granulozyten im schwangeren Uterus nachgewiesen werden.

Wenn, wie Clark und Chaouat vorschlagen, ein funktionierendes Fas/Fas-Ligand-

System für eine funktionierende Schwangerschaft verzichtbar ist, so muss das nicht bedeuten, dass Apoptose als solche in der Schwangerschaft verzichtbar wäre [80]. Es existiert eine Vielzahl von Effektoren der Apoptose, die im schwangeren Uterus gefunden werden und - zu einem großen Teil - vom Trophoblasten gebildet werden. Zu denen zählen TNF- α , TRAIL und LIGHT [108, 109, 110]. Aber auch Inhibitoren der Apoptose werden hier gebildet [111]. Möglicherweise existieren diese Mechanismen unabhängig voneinander. Ferguson et al. hatten mit ihren Untersuchungen zum Immunprivileg des Auges jedoch ein Muster sich gegenseitig bedingender Mechanismen gezeigt. So war in diesem Fall eine Abhängigkeit des Fas/Fas-Ligand-System von gleichzeitig vorliegendem TNF- α und TNF-Rezeptor II nachweisbar [112]. Die Untersuchung dieser Arbeit könnte darauf hinweisen, dass die Bedeutung der Apoptose in der murinen Schwangerschaft weniger in der Abwehr alloreaktiver mütterlicher Leukozyten als vielmehr in der Limitierung der Immunreaktion in einer Schwangerschaft unter pathologischen Bedingungen zu suchen sein könnte.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Im schwangeren Uterus der Maus finden sehr dynamische Umbauprozesse statt. In der Decidua basalis befinden sich verschiedene Leukozytenpopulationen mit teilweise direktem Kontakt zum Trophoblasten, die sowohl immunregulatorische Funktionen ausüben als auch direkt an den Umstrukturierungsprozessen des Gewebes beteiligt sind. Als wichtiger Mechanismus der mütterlich-fetalen Toleranz wird die Fas-Ligand abhängige Apoptose diskutiert. Während Fas vornehmlich auf dem den Trophoblasten umgebenden Gewebe der Decidua basalis exprimiert wird, konzentriert sich die Expression von Fas-Ligand fast ausschließlich auf vereinzelte Zellen des der Decidua basalis zugeneigten Trophoblasten. Der Anteil der Fas oder Fas-Ligand exprimierenden mütterlichen Leukozyten ist jedoch stets geringer als 5 %. Der Einfluß einer fehlenden Fas-Ligand abhängigen Apoptose wurde anhand von Mäusen mit einem funktionellen Defekt für Fas (B6-*lpr*-Mäuse) oder den Fas-Ligand (B6-*gld*-Mäuse) untersucht. Zwar zeigen die Ergebnisse, dass die uterinen NK-Zellen bei B6-*lpr*-und B6-*gld*-Mäusen kleiner als jene von Wildtypmäusen sind, jedoch hat dies weder einen Effekt auf den Gewebeaufbau des schwangeren Uterus noch auf die Anzahl der Nachkommen. Unter physiologischen Bedingungen lässt sich Apoptose lediglich im Embryo, jedoch nicht im Gewebe der Decidua basalis, dem Trophoblasten oder unter mütterlichen Leukozyten nachweisen. Unter den pathologischen Bedingungen eines Abortes hingegen findet sich sowohl im degenerierten Trophoblasten als auch unter den den Trophoblasten infiltrierenden aktivierten Granulozyten ein hoher Anteil apoptotischer Zellen. Die Untersuchung dieser Arbeit könnte darauf hinweisen, dass die Bedeutung der Apoptose weniger in der Abwehr alloreaktiver mütterlicher Leukozyten in einer normal verlaufenden Schwangerschaft als vielmehr in der Limitierung von - besonders durch aktivierte Granulozyten vermittelte - Immunreaktionen auf den Uterus in einer Schwangerschaft unter pathologischen Bedingungen zu suchen sein könnte.

Abkürzungsverzeichnis

AICD	activation induced cell death
ALPS	Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Caspase abhängige DNase
Caspase	<i>C</i> ysteinprotease, die hinter <i>A</i> sparaginsäureresten spaltet
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
CSF-1	colony stimulating factor-1
DAB	Diaminobenzidin
DAF	decay accelerating factor
DNA	deoxyribunucleic acid
dUTP	Desoxi-Uridintriphosphat
FADD	fas associated death domain
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
gld	generalized lymphoproliferative disease
GIMP	GNU image manipulating program
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HLA	human leukocyte antigen
IAP	inhibitors of apoptosis
I-CAD	Inhibitor der Caspase abhängigen DNase
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
KIR	killer inhibitory receptor
LIF	leukemia inhibitory factor
LIGHT	is homologous to <i>L</i> ymphotoxins, exhibits <i>i</i> nducible expression, and competes with Herpes Simplex Virus (HSV) glycoprotein D for <i>HVEM</i> , a receptor expressed by <i>T</i> lymphocytes
lpr	lymphoproliferation
mAk	monoklonaler Antikörper
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein- α
MLR	mixed lymphocyte reaction
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	phosphate buffered saline
TdT	Terminale Desoxinukleodityltransferase
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR-1 / 2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1 bzw. 2
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen

TUNEL	TdT dUTP nick end-labeling
uNK-Zellen	uterine Natürliche Killerzellen
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] De M, Wood GW: **Analysis of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from implantation through paturition.** *J Leukoc Biol* 1991, **50**:381–392.
- [2] Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL: **Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential.** *J Exp Med* 2003, **198**:1201–1212.
- [3] Kämmerer U, Marzusch K, Krober S, Ruck P, Handgretinger R, Dietl J: **A subset of CD56+ large granular lymphocytes in first-trimester human decidua are proliferating cells.** *Fertil Steril.* 1999, **71**:74–79.
- [4] Kusakabe K, Okada T, Sasaki F, Kiso Y: **Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods.** *J Vet Med Sci* 1999, **61**:1093–1100.
- [5] King A, Loke YW, Chaouat G: **NK cells and reproduction.** *Immunol Today* 1997, **18**(2):64–66.
- [6] Parr EL, Young LH, Parr MB, Young JD: **Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases.** *J Immunol* 1990, **145**(7):2365–2372.

- [7] Allen MP, Nilson-Hamilton M: **Granzymes D, E, F and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells.** *J Immunol* 1998, **161**:2772–2779.
- [8] Moffett-King A: **Natural killer cells and pregnancy.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:656–663.
- [9] King A, Loke YW: **On the nature and function of human uterine granular lymphocytes.** *Immunol Today* 1991, **12**:432–435.
- [10] Croy BA: **Hasn't time come to replace the term metrial gland?** *J Reprod Immunol* 1999, **42**:127–129.
- [11] Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA: **Interferon- γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy.** *J Exp Med* 2000, **192**(2):259–270.
- [12] Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteey K, Masutani M, Adamson SL: **Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta.** *Mol Cell Endocrinol* 2002, **187**:207–212.
- [13] Hunt JS, Robertson SA: **Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success.** *J Reprod Immunol* 1996, **32**:1–25.
- [14] Hunt JS: **Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells.** *J Reprod Immunol* 1989, **16**:1–17.
- [15] Mizuno M, Aoki K, Kimbara T: **Functions of macrophages in human decidual tissue in early pregnancy.** *Am J Reprod Immunol* 1994, **31**:180–188.

- [16] Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, Sargent I, Redman C: **Localization of tumor necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy.** *Clin Exp Immunol* 1992, **88**:174–180.
- [17] Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF: **Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice.** *Biol Reprod* 1999, **60**:251–261.
- [18] Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou C, Zhou Y, Huang L, Fisher SJ: **Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56bright natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1 α .** *J Exp Med* 2001, **193**:1199–1212.
- [19] Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ: **Ins and outs of dendritic cells.** *Int Arch Allergy Immunol* 2006, **140**:53–72.
- [20] Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kämpgen E, Dietl J: **Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells.** *Am J Pathol* 2000, **157**:159–169.
- [21] Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC: **Lineage, maturity and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy.** *Biol Reprod* 2004, **70**:1018–1023.
- [22] Kämmerer U: **Antigen-presenting cells in the decidua.** *Chem Immunol Allergy* 2005, **89**:96–104.
- [23] Blois SM, Kämmerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thomson AW, Klapp BF, Fernández N, Arck PC:

- Dendritic Cells: Key to Fetal Tolerance?** *Biol Reprod* [Epub ahead of print] 2007, June 27th.
- [24] Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC: **Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation.** *J Immunol* 1998, **160**:4587–4595.
- [25] Heyborne KD, Cranfill RL, Carding SR, Born WK, O'Brien RL: **Characterization of $\gamma\delta$ T lymphocytes at the maternal-fetal interface.** *J Immunol* 1992, **149**:2872–2878.
- [26] Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK: **CD28/B7 costimulation: a review.** *Crit Rev Immunol* 1998, **18**:389–418.
- [27] Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE: **CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function.** *Immunol Res* 1999, **19**:1–24.
- [28] Mincheva-Nilsson L: **Pregnancy and $\gamma\delta$ T cells: Taking on the hard questions.** *Reprod Biol Endocrinol*, <http://www.rbej.com/content/1/1/120> 2003, **1**:120.
- [29] Arck P, Dietl J, Clark D: **From the decidual cell internet: trophoblast recognizing T cells.** *Biol Reprod* 1999, **60**:227–233.
- [30] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: **Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance.** *Immunol Rev* 2001, **182**:18–32.

- [31] Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F: **CD4+CD25+T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependant mechanisms.** *J Exp Med* 2003, **197**:111–119.
- [32] Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG: **Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus.** *Nat Immunol* 2004, **5**(3):266–271.
- [33] Barker CF, Billingham RE: **Immunologically privileged sites.** *Adv Immunol* 1977, **25**:1–54.
- [34] Margalit E, Sada SR: **Retinal and optic nerve diseases.** *Artif Organs* 2003, **27**(11):963–974.
- [35] Griffith TS, Ferguson TA: **The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege.** *Immunol Today* 1997, **18**(5):240–244.
- [36] Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA: **Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.** *Science* 1995, **270**(5239):1189–1192.
- [37] Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC: **A role for CD95 ligand in preventing graft rejection.** *Nature* 1995, **377**(6550):630–632.
- [38] Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: **Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.** *Cell* 1993, **75**(6):1169–1178.
- [39] Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ: **Prevention of Islet Allograft Rejection with Engineered Myoblasts Expressing FasL in Mice.** *Science* 1996, **273**(5271):109–112.

- [40] von Adrian UH, Mackay CR: **T-cell function and migration. Two sides of the same coin.** *N Engl J Med* 2000, **343**:1020–1034.
- [41] Butcher EC, Picker LJ: **Lymphocyte homing and homeostasis.** *Science* 1996, **272**:60–66.
- [42] Fernekorn U, Butcher EC, Behrends J, Hartz S, Kruse A: **Functional involvement of P-selectin and MAdCAM-1 in the recruitment of $\alpha 4\beta 7$ -integrin-expressing monocyte-like cells to the pregnant mouse uterus.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:3423–3433.
- [43] Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, Molina H: **A critical role for murine complement regulator crry in fetomaternal tolerance.** *Science* 2000, **287**(5452):498–501.
- [44] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL: **Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.** *Science* 1998, **281**(5380):1191–1193.
- [45] Kamimura S, Eguchi K, Yonezawa M, Sekiba K: **Localisation and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta.** *Acz Med Okayama* 1991, **45**:135–139.
- [46] Schrocksnadel H, Baier-Bitterlich G, Dapunt O, Wachter H, Fuchs D: **Decreased plasma tryptophan in pregnancy.** *Obstet Gynecol* 1996, **88**:47–50.
- [47] Miller DM, Sedmark DD: **Viral effects on antigen processing.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**:94–99.
- [48] Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S: **Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth.** *Immunol Today* 2000, **21**:455–464.

- [49] Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A: **Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success.** *J Exp Med* 2004, **200**(8):957–965.
- [50] Ezekowitz RAB, Hoffman J: **Innate immunity.** *Curr Opin Immunol* 1998, **10**:9–53.
- [51] Fearon DT, Locksley RM: **The instinctive role of innate immunity in the acquired immune response.** *Science* 1996, **272**:50–53.
- [52] Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED: **Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, **94**(21):11520–11525.
- [53] Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barness E, Good RA: **Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion.** *Mol Hum Reprod* 1997, **3**(8):655–662.
- [54] Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A: **Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**(6):2188–2194.
- [55] Guller S LL: **The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces.** *Semin Reprod Endocrinol* 1999, **17**:39–44.
- [56] Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L: **Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated**

- leukocytes between the mother and the conceptus.** *J Immunol* 1997, **158**(9):4122–4128.
- [57] Drobyski WR, Komorowski R, Logan B, M G: **Role of the passive apoptotic pathway in graft-versus-host disease.** *J Immunol* 2002, **169**(3):1626–1633.
- [58] Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS: **Apoptosis and programmed cell death in immunity.** *Annu Rev Immunol* 1992, **10**:267–293.
- [59] Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K: **Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes.** *Immunol Today* 1993, **14**(7):338–339.
- [60] Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D: **Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack.** *Immunol Cell Biol* 2002, **80**(2):131–137.
- [61] Ashkenazi A, Dixit VM: **Death receptors: signaling and modulation.** *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305–8 1998, **281**(5381):1305–1308.
- [62] Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: **Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.** *Nature* 1992, **356**(6367):314–317.
- [63] Nagata S, Suda T: **Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations.** *Immunol Today* 1995, **1**:39–42.
- [64] Singer GG, Abbas A: **The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice.** *Immunity* 1994, **5**:365–371.

- [65] Wu J, Zhou T, Zhang J, He J, Gause WC, Mountz JD: **Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-*lpr/lpr* mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(6):2344–2348.
- [66] Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH: **Auto-crine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95).** *Nature* 1995, **373**(6513):438–441.
- [67] Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF: **Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas.** *Nature* 1995, **373**(6513):441–444.
- [68] Zhang HG, Su X, Liu D, Liu W, Yang P, Wang Z, Edwards CK, Bluethmann H, Mountz JD, Zhou T: **Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells.** *J Immunol* 1999, **162**(3):1423–1430.
- [69] Wajant H: **The Fas signaling pathway: more than a paradigm.** *Science* 2002, **296**:1635–1636.
- [70] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J: **Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14:18) chromosome translocation.** *Science* 1984, **226**:1097–1099.
- [71] Reed JC: **Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.** *J Cell Biol* 1994, **124**:1–6.
- [72] Reed JC: **Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies.** *Semin Hematol* 1997, **34**:9–19.

- [73] Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordan J: **p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection.** *J Physiol Biochem* 2004, **60**(4):287–307.
- [74] Harris SL, Levine AJ: **The p53 pathway: positive and negative feedback loops.** *Oncogene* 2005, **24**(17):2899–2908.
- [75] Xu X, Aprelikova O, Moens P, Deng CX, Furth PA: **Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice.** *Development* 2003, **130**(9):2001–2012.
- [76] Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, Henning W, Pedoux R, Wang XW, Hofseth LJ, Yang Q, Garfield SH, Sturzbecher HW, Harris CC: **p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination.** *Cancer Res* 2003, **63**(10):2596–2605.
- [77] Benchimol S: **p53-dependant pathways of apoptosis.** *Cell Death Differ* 2001, **8**:1049–1051.
- [78] Pongcharoen S, Bulmer JN, Searle RF: **No evidence for apoptosis of decidual leucocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege.** *Clin Exp Immunol* 2004, **138**(2):330–336.
- [79] Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V, Dubanchet S: **Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy.** *Am J Reprod Immunol* 1999, **42**:1–13.

- [80] Chaouat G, Clark DA: **FAS/FAS ligand interaction at the placental interface is not required for the success of allogeneic pregnancy in anti-paternal MHC preimmunized mice.** *Am J Reprod Immunol* 2001, **45**(2):108–115.
- [81] Oshima RG, Howe WE, Klier FG, Adamson ED, Shevinsky LH: **Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos.** *Dev Biol* 1983, **99**(2):447–455.
- [82] Weller A, Isenmann S, Vestweber D: **Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E-and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor .** *J Biol Chem* 1992, **267**:15176–15183.
- [83] Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H: **Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator.** *Blood* 2005, **105**(4):1396–1404.
- [84] Niederkorn JY: **See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege.** *Nat Immunol* 2006, **4**:354–359.
- [85] Neale DM, Mor G: **The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia.** *J Perinat Med* 2005, **33**(6):471–477.
- [86] Petroff MG: **Immune interactions at the maternal-fetal interface.** *J Reprod Immunol* 2005, **68**(1-2):1–13.
- [87] Bogovic Crncic T, Laskarin G, Juretic K, Strbo N, Dupor J, Srsen S, Randic L, Le Bouteiller P, Tabiasco J, Rukavina D: **Perforin and Fas/FasL cytolytic pathways at the maternal-fetal interface.** *Am J Reprod Immunol* 2005, **54**(5):241–248.

- [88] Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC: **Neutrophil Mac- 525 1 and MEL-14 adhesion 526 proteins inversely regulated by chemotactic factors.** *Science* 1989 1989, **245**:1238–1241.
- [89] Hunt JS: **Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells.** *J Reprod Immunol* 1989, **16**:1–17.
- [90] Arck PC, Rerrick DA, Steele-Norwood D, Croitoru K, Clark DA: **Murine T-cell determination of pregnancy outcome: I. Effects of strain, alpha-beta T cell receptor, gammadelta T cell receptor, and gammadelta T cell subsets.** *Am J Reprod Immunol* 1997, **37**(6):492–502.
- [91] Croy BA, Ashkar AA, Foster RA, DiSanto JP, Magram J, Carson D, Gendler SJ, Grusby MJ, Wagner N, Muller W, Guimond MJ: **Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy.** *J Reprod Immunol* 1997, **35**(2):111–133.
- [92] Vigano P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I: **Maternal-conceptus cross talk—a review.** *Placenta* 2003, **24 Suppl B**:S56–S61.
- [93] Red-Horse K, Drake PM, Gunn MD, Fisher SJ: **Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus. Reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles.** *Am J Pathol* 2001, **159**:2199–2213.
- [94] Fernekorn U, Kruse A: **Regulation of Leukocyte Recruitment to the Murine Maternal/Fetal Interface.** *Chem Immunol Allergy* 2005, **89**:105–117.
- [95] Risau W, Flamme I: **Vasculogenesis.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:73–91.

- [96] Sanders EJ, Wride MA: **Programmed cell death in development.** *Int Rev Cytol* 1995, **163**:105–173.
- [97] Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Mawas C, Birg F: **Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues.** *Mol Pathol* 1997, **50**(2):87–91.
- [98] Mikhailov VM: **Life cycle of decidual cells.** *Int Rev Cytol* 2003, **227**:1–63.
- [99] Pampfer S, Donnay I: **Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat.** *Cell Death Differ* 1999, **6**(6):533–545.
- [100] French LE, Hahne M, Viard I, Radlgruber G, Zanone R, Becker K, Muller C, Tschopp J: **Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover.** *J Cell Biol* 1996, **133**(2):335–343.
- [101] Harirah HM, Donia SE, Parkash V, Jones DC, Hsu CD: **Localization of the Fas-Fas ligand system in human fetal membranes.** *J Reprod Med* 2002, **47**(8):611–616.
- [102] Fernekorn U, Butcher EC, Behrends J, Karsten CM, Röbbke A, Schulze TJ, Kirchner H, Kruse A: **Selectin Platelet Plays a Critical Role in Granulocyte Access to the Pregnant Mouse Uterus under Physiological and Pathological Conditions.** *Biol Reprod* 2007, **76**:645–653.
- [103] Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrüecker HW, Levy GA: **Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase].** *J Immunol* 1998, **160**(2):545–549.

- [104] Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, Hollmann TJ, Casali P, Carroll MC, Wetsel RA, Lambris JD, Holers VM, Salmon JE: **Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1644–1654.
- [105] Trundley A, Moffett A: **Human uterine leukocytes and pregnancy.** *Tissue Antigens* 2004, **63**:1–12.
- [106] Moffett A, Regan L, Braude P: **Natural killer cells, miscarriage, and infertility.** *B M J* 2004, **329**(7477):1283–1285.
- [107] Kusakabe K, Otsuki Y, Kiso Y: **Involvement of the fas ligand and fas system in apoptosis induction of mouse uterine natural killer cells.** *J Reprod Dev* 2005, **51**(3):333–340.
- [108] Lee HO, Herndon JM, Barreiro R, Griffith TS, Ferguson TA: **TRAIL: a mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site.** *J Immunol* 2002, **169**(9):4739–4744.
- [109] Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, Hunt JS: **TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege.** *J Immunol* 1999, **162**(10):6053–6059.
- [110] Gill RM, Ni J, Hunt JS: **Differential expression of LIGHT and its receptors in human placental villi and amniochorion membranes.** *Am J Pathol* 2002, **161**(6):2011–2017.
- [111] Ka H, Hunt JS: **Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas.** *Am J Pathol* 2003, **163**(2):413–422.

- [112] Elzey BD, Griffith TS, Herndon JM, Barreiro R, Tschopp J, Ferguson TA:
Regulation of Fas ligand-induced apoptosis by TNF. *J Immunol* 2001,
167(6):3049–3056.

Publikationen und Kongreßbeiträge

Publikationen

Ferne Korn U, Butcher EC, Behrends J, Karsten CM, Röbbke A, Schulze TJ, Kirchner H, Kruse A: **Selectin Platelet Plays a Critical Role in Granulocyte Access to the Pregnant Mouse Uterus under Physiological and Pathological Conditions.** *Biol Reprod* 2007, **76**:645–653.

Kongreßbeiträge

Ferne Korn U, Butcher EC, Schulze TJ, Kruse A: **Upregulation of specialized vascular addressins in the pregnant mouse uterus might be involved in spontaneous abortion at the post-implantation stage.** *9. Tagung der Alps Adria Society for Immunology of Reproduction* **Plzeň 2004**

Behrends J, Ferne Korn U, Schulze TJ, Koritke P, Kruse A: **Unusual $\alpha_4\beta_7^+$ /CD11b⁺ cells in the pregnant mouse uterus display characteristics of myeloid dendritic cells.** *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaft für Immunologie* **Maastricht 2004**

Ferne Korn U, Butcher EC, Schulze TJ, Kruse A: **Upregulation of specialized vascular addressins in the pregnant mouse uterus might be involved in spontaneous abortion at the post-implantation stage.** *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaft für Immunologie Maastricht 2004*

Schulze TJ, Ferne Korn U, Behrends J, Hartz S, Rübke A, Kruse A: **Fas/FasL Expression Patterns in the Pregnant Mouse Uterus** *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Skandinavischen Gesellschaften für Immunologie Kiel 2005*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer.-nat. Andrea Kruse, die meine Arbeit betreut hat und nun kommissarisch das Institut für Systemische Entzündungsforschung leitet. Ihre wissenschaftliche Begeisterung habe ich als ansteckend und inspirierend empfunden. Ich möchte ihr für eine spannende Zeit danken.

Herrn Professor Holger Kirchner danke ich dafür, dass ich damals in seinem Institut diese Arbeit habe beginnen können und ich danke ihm auch für sein Interesse an dieser Arbeit.

PD Dr. med. Holger Hennig und PD Dr. med. Siegfried Görg danke ich dafür, dass sie stets da waren, wenn ich ihres Rates oder ihrer Erfahrungen bedurfte.

Darüber hinaus möchte ich vor allen meinen Kollegen Herrn Dipl.-Biol. Jochen Behrends, Frau Dr. rer.-nat. Doreen Finke, Frau Dr. rer.-nat. Uta Fernekorn und auch Frau Sylvia Greve, Frau Astrid Röbbke, Frau Dipl.-Humbiol. Katharina Randers sowie Herrn Robert Hörster herzlich für ihre Unterstützung bzw. sowohl wissenschaftliche als auch weniger wissenschaftliche Diskussionen danken.

Ich danke Herrn Dr. med. Christian Brockmann für die Anregungen zur statistische Auswertung. Herrn Dr. med. Frederick Klauschen gilt mein Dank für den Austausch über Linux und \LaTeX .

Den sonst nicht genannten Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Schließlich gilt ein besonderer Dank meinem Vater für seine Anteilnahme, sein offenes Ohr und sein Verständnis für einen gemeinsamen wissenschaftlichen Geist.

Lebenslauf

Name: Torsten Schulze
Geburtsdatum/-ort: 10. Januar 1975 in Wilhelmshaven
Eltern: Prof. Dipl.-Ing. Jürgen Hugo Schulze
Apothekerin Sigrid Schulze, geb.Bock (†)
Wohnort: Lödings Hof 1, Glockengießerstraße 77, 23552 Lübeck
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981-1985 Grundschule Neuende, Wilhelmshaven
1985-1987 Orientierungsstufe Bremer Straße, Wilhelmshaven
1987-1994 Max-Planck-Gymnasium, Wilhelmshaven
1994-1995 Zivildienst im Altenpflegezentrum Schortens, Friesland

Hochschulstudium

1995-2000	Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck
2000-2002	Praktisches Jahr
2000-2001	Chirurgie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, Frankreich
2001	Immunologie, Medizinische Universität zu Lübeck
2001-2002	Innere Medizin, Hospital de Valparaiso, Chile
2002	Abschluß des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck

Praktika/ Famulaturen

1995	Krankenpflegepraktikum Nordwestkrankenhaus, Sanderbusch
1998	Famulatur Immunologie, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona
1998-1999	Famulaturen Innere Medizin, Praxis Dr. Burhorn, Lübeck
2001	Praktikum Immunologie, Medizinische Universität zu Lübeck

Beruf

seit 2003	Zuerst Arzt im Praktikum, dann wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des UKS-H Campus Lübeck
seit 2004	stellvertretender Leiter Blutspenderlabor und stellvertretender Leiter Immunologie
seit 2005	Stellvertretender Stufenplanbeauftragter
seit 2007	Leiter Immunologie

Sonstiges

1987 Ausbildung zum Solo-Sopran, Royal School of Church Music
Halibury, England

1990-1991 *Head Chorister* im St. Jacobi Chor der
Royal School of Church Music, Wilhelmshaven

Sprachen: Englisch, Französisch, Spanisch, Latein