

Aus dem Institut für Systemische Entzündungsforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Köhl
vertreten in der
Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Einfluss Dendritischer Zellen auf die Entwicklung uteriner natürlicher Killerzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christian M. Karsten
aus Hamburg

Lübeck, 22. Juni 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Andrea Kruse

Tag der mündlichen Prüfung 23.11.2009

Zum Druck genehmigt, Hamburg den, 04.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Angeborenes Immunsystem	1
1.1.2	Adaptives Immunsystem	2
1.2	Leukozytenextravasation	3
1.3	Zelladhäsionsmoleküle	4
1.3.1	Selektine	4
1.3.1.1	P-Selektin	6
1.3.2	Integrine	6
1.4	Schwangerschaft	7
1.4.1	Die intrauterine Entwicklung der Maus	7
1.4.2	Organisation des murinen Uterus während der ersten Hälfte der Schwangerschaft	9
1.4.3	Mechanismen der mütterlich/fetalen Toleranz	11
1.4.3.1	Dendritische Zellen	11
1.4.3.2	Lymphozyten	12
1.4.3.3	Expression nichtklassischer MHC-Moleküle	12
1.4.3.4	Katabolismus von Tryptophan durch Indolamin-2,3- di-oxygenase	13
1.4.3.5	Inhibierung der Komplement-Aktivierung	13
1.5	Uterine NK Zellen	14

1.6	Zielsetzung	16
2	Material	17
2.1	Geräte, Chemikalien und Medien	17
2.1.1	Zellkulturmedien	19
2.1.2	Puffer	20
2.1.3	Lösungen	21
3	Methoden	22
3.1	Mäuse	22
3.1.1	Isolierung und Aufreinigung von Zellen aus der Maus	23
3.1.2	Langzeit <i>in vivo</i> Blockierungsversuche	23
3.2	Histologische Untersuchungen	23
3.2.1	Histologische Charakterisierung	23
3.2.2	<i>In situ</i> Immunlokalisation	24
3.2.2.1	Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin	24
3.2.2.2	Vorbereitung des Gewebes und Fixierung auf Objektträgern	24
3.2.2.3	Immunhistologische Antikörperfärbung	25
3.2.3	Bestimmung der Anzahl und Größe von Leukozyten	25
3.2.4	Bestimmung des Durchmessers von Gefäßen	26
3.3	Injektion von IL-12 und IL-15	27
3.4	Expressionsstudien	27
3.4.1	Isolation von mRNA	27
3.4.1.1	DNA-Verdau	28
3.4.1.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	28
3.4.2	<i>real time</i> RT-PCR	29
3.4.3	Auswertung der <i>real time</i> RT-PCR	32
3.4.4	Proteinextraktion	34

3.4.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
3.4.4.2	Protein-Array	34
3.5	Generierung von DC und adoptiver Transfer	35
3.6	Isolation von Leukozyten aus feto/maternalen Einheiten	36
3.6.1	Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten und BMDC	36
3.7	Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Die Bedeutung der vaskulären Adressine bei der Rekrutierung von dendritischen Zellen in den schwangeren Uterus der Maus	38
4.2	Der Einfluss von dendritischen Zellen auf die Entwicklung uNK-Zellen	39
4.2.1	Charakterisierung der uNK-Zellen	39
4.2.2	Interaktion zwischen uNK-Zellen und DC in der Decidua basalis	42
4.3	Eine verminderte Einwanderung von DC in den schwangeren Uterus führt zu einer reduzierten Anzahl und Größe von uNK-Zellen	44
4.4	Eingeschränkte Entwicklung der uNK-Zellen führt zu einer Verminderung ihrer Funktion	44
4.4.1	Untersuchung der Histologie des Uterus von ICAM-1 ^{-/-} - und MECA367 behandelter PS ^{-/-} -Mäusen am Tag 11 der Schwangerschaft	47
4.4.2	Adoptiver Transfer von Wildtyp DC in $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse	49
4.4.3	DC sind die Quelle für IL-12 und IL-15 im schwangeren Uterus der Maus	51
4.4.4	Substitution mit rmIL-12 und rmIL-15 stellte die Funktion von uNK Zellen in Uteri, denen CD11c ⁺ CD11b ⁺ dendritische Zellen fehlten, wieder her	53
5	Diskussion	58
6	Zusammenfassung	64

7 Anhang	76
7.1 Abkürzungen	76
7.2 Publikationen	78
7.3 Danksagung	79
7.4 Lebenslauf	80
7.5 Erklärung	81

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient dazu, einen Organismus vor Krankheitserregern zu schützen und somit das Überleben des Individuums zu sichern. Es wird zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität unterschieden. Die angeborene Immunabwehr ist unspezifisch und stellt die erste Verteidigungslinie bei einer Infektion dar. Die erworbene Immunabwehr ist spezifisch und durch ihre Fähigkeit zum Gedächtnis charakterisiert. Gleichzeitig muss das Immunsystem auch tolerant gegenüber körpereigenen Antigenen sein, damit die Immunantwort sich nicht gegen den eigenen Körper richtet. Neuere Erkenntnisse auf diesem Gebiet weisen darauf hin, dass die Grenzen zwischen den beiden fließend sind.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigung gegen in den Körper eindringende Pathogene. Die Erreger werden unspezifisch über humorale und zelluläre Komponenten bekämpft und beseitigt. Außerdem sezernieren die Zellen der angeborenen Immunität lösliche Faktoren, die weitere Zellen des Immunsystems rekrutieren und aktivieren. Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen und dendritische Zellen (DC) machen die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems aus. Diese werden durch lösliche Komponenten wie zum Beispiel dem Komplementsystem, sezernierte Zytokine, Interferone und Chemokine unterstützt. Im weiteren Sinne zählen auch die Plasmaproteinsysteme der Gerinnung/Fibrinolyse sowie das Kininsystem zu den unspezifischen Abwehrmechanismen. Die Unspezifität dieser Reaktion auf

Pathogene hat den Vorteil, dass es vom ersten Kontakt bis zum Auslösen einer Antwort sehr schnell geht. Dies geht aber auch zu Lasten der Effektivität, so dass es nicht immer gelingt, Pathogene vollständig zu beseitigen. Dann ist eine Unterstützung durch das adaptive Immunsystem unbedingt notwendig [1].

1.1.2 Adaptives Immunsystem

B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) und die von den B-Zellen produzierten Antikörper sind die Bestandteile der spezifischen Immunität. Über spezielle Rezeptoren, die diese Zellen auf ihrer Oberfläche exprimieren, sind sie in der Lage, Antigene spezifisch zu erkennen. T-Zellen benötigen hierfür allerdings die Unterstützung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Dringt ein fremdes Antigen in einen Körper ein, wird es im Idealfall von einer APC phagozytiert, prozessiert und in einer für T-Zellen erkennbaren Version auf der Oberfläche präsentiert. APC gehören zur angeborenen Immunabwehr und reagieren daher schnell auf eindringende Pathogene. Die wichtigsten APCs sind Makrophagen und DC. Die Präsentation der Antigene wird über *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I oder II vermittelt. Die MHC Klasse I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, die der Klasse II nur auf den APCs. Bei der Bildung von B- und T-Zellen kommt es zu einer genetischen Rekombination innerhalb der Rezeptor-Gene, so dass jeder Rezeptor eine andere Antigen-Spezifität aufweist. Diese ermöglicht die spezifische Erkennung einer Vielzahl unterschiedlichster Antigene. Erkennt eine T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) ein Antigen und erhält zusätzlich kostimulatorische Signale, z.B. durch Bindung von CD28 an CD80 oder CD86, wird sie aktiviert und expandiert. Es gibt mehrere Klassen an T-Zellen, die wichtigsten seien hier nur kurz erwähnt. $CD4^+$ T-Zellen werden als T-Helfer-Zellen oder T_H -Zellen bezeichnet. Eine aktivierte T_H -Zelle kann zu unterschiedlichen Effektorzellen ausdifferenzieren. Diese Effektorzellen werden dann als T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen und T_H17 -Zellen bezeichnet. Während T_H1 -Zellen über die Ausschüttung von $IFN-\gamma$ eher die zelluläre Immunabwehr stimulieren

(Makrophagen, cytotoxische T-Zellen, NK-Zellen), werden durch die Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13 durch T_H2 -Zellen, B-Zellen und somit die humorale Immunabwehr stimuliert. $CD8^+$ T-Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen genannt und haben direkte Effektorfunktion auf ihre Zielzellen. Sie erkennen Antigene, die über MHC Klasse I präsentiert werden und sind in der Lage, bei einem Antigenkontakt die präsentierende Zelle zu lysieren. Sowohl B- als auch T-Zellen bilden nach einer überstandenen Infektion so genannte Gedächtniszellen aus. Diese können im Falle einer Reinfektion mit einem bereits bekannten Antigen die Reaktion der adaptiven Immunität beschleunigen.

1.2 Leukozytenextravasation

Der Prozess der Leukozytenextravasation wird über die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel kontrolliert. Vermittelt werden diese Interaktionen über spezielle Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der zirkulierenden Zellen und ihre entsprechenden Rezeptoren bzw. Liganden auf dem Endothel oder über chemoattraktive Faktoren [2]. Die Extravasation lässt sich in mehrere Schritte unterteilen (Abb.1.1):

1. Initialer Zell-/Zellkontakt und Rollen der Leukozyten entlang der Endothel-Wand
2. Aktivierung der Leukozyten über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
3. Feste Anheftung der Leukozyten an die Gefäßwand
4. Diapedese

Die molekularen Faktoren, die für die Koordination der Leukozytenextravasation aus dem Blut in die Gewebe eine wichtige Rolle spielen, sind Adhäsionsmoleküle und Chemokine. Der initiale Kontakt und das Rollen wird normalerweise über Selektine vermittelt, aber auch über $\alpha4$ -Integrine. Zum Stoppen des Rollens muss der Leukozyt mit weiteren Adhäsionsmolekülen interagieren, den Integrinen. Bei ihren Liganden handelt es sich um gewebsspezifisch exprimierte Mitglieder der Ig-Familie der Adhäsionsmoleküle

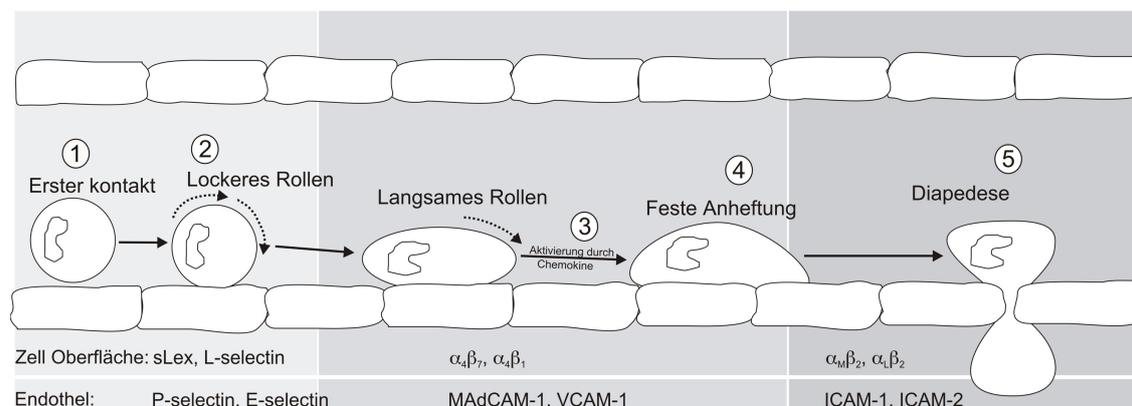


Abbildung 1.1: Bei der Leukozytenextravasation handelt es sich um einen Prozess der sich in mehrere Schritte aufteilen lässt. Zunächst gibt es den initialen Kontakt (1), Abstoppen des Rollens (2), Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (3), feste Anheftung (4), und die Diapedese (5). An diesen Prozessen sind die vaskulären Adhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin, MAdCAM-1, VCAM-1, ICAM-1 und -2 beteiligt.

(MAdCAM-1, VCAM-1, ICAM-1,2). Integrine müssen durch Chemokine aktiviert werden, um eine stabile Bindung zwischen dem Leukozyt und der Gefäßwand herstellen zu können. Die Zellen wandern dann durch das Endothel ins darunter liegende Parenchym. Diesen Prozess bezeichnet man als Diapedese.

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

1.3.1 Selektine

Bei den Selektinen handelt es sich um Mitglieder der C-Typ-Lektine (Abb. 1.2). Lektine sind Glykoproteine, deren charakteristische Eigenschaft die spezifische Bindung von Kohlenhydraten ist. Die Bezeichnung C-Typ deutet auf eine Calciumionen-Abhängigkeit der Kohlenhydrat-Bindung hin. Drei Selektine wurden bisher identifiziert: L-(*Leukozyten*), P-(*Plättchen*), und E-(*Endothel*)Selektin. Jedes Selektin hat eine lektinähnliche Domäne am N-Terminus gefolgt von einer EGF(*epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne

und mehreren sich wiederholenden Domänen, die Homologien zu Komplement-Regulator-Proteinen besitzen. Verankert in der Membran sind die Selektine über eine einzelne transmembrane Domäne. Innerhalb der Zelle befindet sich ein kurzer zytoplasmatischer Schwanz. Der Hauptunterschied zwischen den drei Selektin-Klassen ist die Anzahl der sich wiederholenden Sequenzen. L-Selektin hat zwei, E-Selektin hat sechs und P-Selektin neun dieser Sequenzen [3]. Darüber hinaus unterscheiden sie sich in der Lektin-Domänen, die nur 60 Prozent Homologien aufweist. Dies führt zu einer unterschiedlichen Spezifität für die Bindung der Kohlenhydrate.

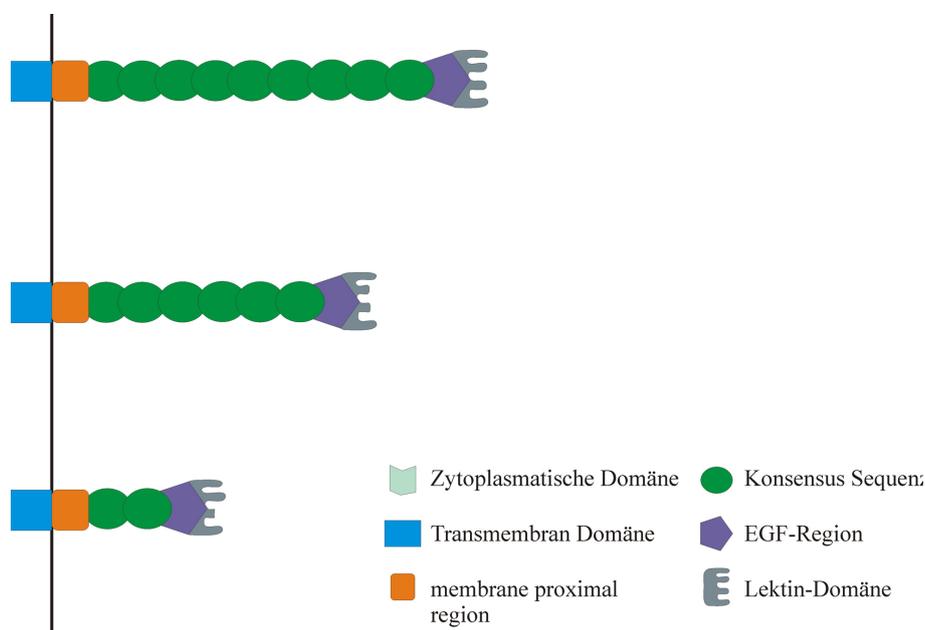


Abbildung 1.2: Strukturelle Organisation von Selektinen. Die n-terminale Domäne eines jeden Selektins ist homolog zu C-Typ-Lektinen und bindet die Kohlenhydrat-Gruppen ihrer entsprechenden Liganden. Gefolgt wird sie von einer EGF-ähnlichen Domäne und dann von einer unterschiedlichen Anzahl von kurzen Konsensus-Sequenzen.

L-Selektin wird von neutophilen und allen myeloiden Zellen, sowie von naiven T-Zellen und einigen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. Es ist für die Zirkulation von Leukozyten zu peripheren Lymphknoten bedeutend und an der Migration in entzündete Gewebe beteiligt [4]. E-Selektin wird von Endothelzellen in vielen Geweben exprimiert,

wenn diese durch Zytokine wie z.B. TNF-alpha oder IL-1 stimuliert wurden [5] und ist für die Rekrutierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten verantwortlich.

1.3.1.1 P-Selektin

P-Selektin wurde das erste Mal von Hsu [6] als ein Protein beschrieben, dass während der Aktivierung von Plättchen exprimiert wird. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass es auch von Endothel-Zellen der Blutgefäßen synthetisiert wird [7]. In diesen Zell-Typen ist das P-Selektin konstitutiv exprimiert und wird in sekretorischen Granula gespeichert. Im Falle der Plättchen befindet sich das gespeicherte P-Selektin in alpha-Granula, in den Endothel-Zellen wird es in den sogenannten Weibel-Palade Körperchen gelagert [6, 7]. Eine Stimulation der Zellen beispielsweise mit Histamin oder Thrombin verursacht eine schnelle Oberflächenexpression von P-Selektin innerhalb von 5-10 Minuten, weshalb es besonders für eine frühe Leukozytenrekrutierung verantwortlich ist [8]. Nach Expression auf der Endothel-Oberfläche wird P-Selektin schnell (innerhalb 30 - 40 min) durch Endozytose wieder internalisiert und recycelt [9, 10]. Eine lösliche Form des P-Selektin konnte ebenfalls identifiziert werden und könnte das Resultat einer proteolytischen Spaltung sein oder es könnte sich um eine Spleißvariante handeln, die von den Endothelzellen oder Plättchen gebildet wird.

1.3.2 Integrine

Bei den Integrinen, die an der Extravasation von Leukozyten beteiligt sind, handelt es sich um die $\alpha4$ -Integrine ($\alpha4\beta1$, $\alpha4\beta7$) und die $\beta2$ -Integrine ($\alpha M\beta2$ (CD11b) und $\alpha L\beta2$ (LFA-1)). Die $\alpha4$ -Integrine können, wie Selektine einen initialen Kontakt zum Endothelium herstellen, aber sie wirken vor allem in der späteren Phase der Extravasation mit [11, 12]. $\beta2$ -Integrine können keinen initialen Kontakt herstellen, sie sind nur an der späteren Phase der Extravasation beteiligt [13]. Integrine kontrollieren die Migration der Leukozyten zu ihren Zielorganen. Die Liganden der $\alpha4$ - und $\beta2$ Integrine sind

Mitglieder der vaskulären Immunglobulin (Ig)-Familien wie *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und die *intercellular adhesion molecules* ICAM-1 und ICAM-2 (u.a.). MAdCAM-1 wird auf dem Endothel der *high endothelial venules* (HEV) in den mukosalen Geweben und in den postkapitären Venolen der intestinalen lamina propria exprimiert, wo es das *Homing* von Lymphozyten die $\alpha 4\beta 7$ exprimieren, kontrolliert [12]. Bei den Liganden der $\beta 2$ -Integrine handelt es sich um die ICAMs. Die ICAMs gehören genau wie VCAM-1 und MAdCAM-1 zur Immunglobulin-Superfamilie. Es handelt sich bei den Mitgliedern dieser Gruppe um transmembrane Glykoproteine, die eine Ca^{2+} -unabhängige Adhäsion vermitteln. Sie kommen auf unterschiedlichsten Organen und Geweben vor und besitzen mindestens eine Ig-ähnliche Domäne, die auch für Antikörper charakteristisch ist. ICAMs werden auf dem Endothel unterschiedlichster Gewebe exprimiert. Bei Entzündungen wird ICAM-1 in den entzündeten Geweben hochreguliert [12]. Im Gegensatz zu den $\beta 2$ -Integrinen, die vorwiegend am letzten Schritt der Extravasation beteiligt sind, können die $\alpha 4$ -Integrine auch den initialen Kontakt und das Rollen vermitteln. Während der Diapedese migrieren die Leukozyten Schritt-für-Schritt über das Endothel in das darunterliegende Parenchym, wo Adhäsionsmoleküle und chemoattraktive Faktoren die Leukozyten zur gewünschten Position innerhalb des Gewebes leiten.

1.4 Schwangerschaft

1.4.1 Die intrauterine Entwicklung der Maus

Die im Eileiter befruchtete Eizelle bildet zunächst durch viele symmetrische Zellteilungen eine Masse totipotenter Zellen, die Morula. Sie ist von der Zona pellucida umgeben. Nach der Einwanderung der Morula aus dem Eileiter in den Uterus bildet sich aus ihr an Tag 3,5 der Schwangerschaft die Blastozyste. Diese besteht aus der inneren Zellmasse (ICM) und dem sie umgebenden Trophoektoderm. Durch Freisetzung aus der sie umgebenden Zona Pellucida wird die Blastozyste dann an Tag 4,25 - 4,5 aktiviert. Während der Tage

4,5 – 6 erfolgt die Implantation. Dabei lagert sich die Blastozyste an das Uterusepithel an. Ausgelöst durch die Implantation kommt es bei der Maus zu einer hormonell regulierten Veränderung des uterinen Stromas. Das Endometrium wird nun als Decidua bezeichnet [14]. Durch Transformation und Wachstum deciduärer Stromazellen, Rekrutierung von Immunzellen und Apoptose des Uterusepithels wird die frühe Implantationsphase eingeleitet. Das proliferierende, an die innere Zellmasse grenzende extra-embryonale Trophoektoderm bildet den Ekto-plazentarkonus, der in das mütterliche Gewebe einwandert, dort Blutgefäße eröffnet und an der Grenze zur mütterlichen Decidua ekto-plazentale Riesenzellen, die sogenannten Trophoblast-Riesenzellen, bildet. Diese werden aufgrund von andauernder DNA-Replikation und fehlender Zellteilung zu polyploiden Zellen. Sie synthetisieren Matrix-Metalloproteasen, die durch den Abbau der ECM die Invasion des Trophoblasten ermöglichen [15]. An den Tagen 8 bis 10 bildet sich die chorioallantoide Plazenta, die in folgende Bereiche eingeteilt werden kann: Die innen zum Embryo liegende Labyrinthzone, den darauf folgenden Spongiotrophoblast sowie die Trophoblasten-Riesenzellen als Grenzschicht zur mütterlichen Decidua. Die Labyrinthzone ist ein vom Chorion ausgebildetes kapillares System, das aus Trophoblastenzellen und mesodermalen Zellen besteht. Darin fließt in engen Kanälen mütterliches Blut, was bedeutet, dass es in direktem Kontakt mit den fetalen Trophoblastenzellen steht (hämochoriale Plazenta) [16]. Mütterlicher und fetaler Kreislauf bleiben jedoch stets voneinander getrennt. Der Spongiotrophoblast enthält ebenfalls von Trophoblastenzellen ausgekleidete mütterliche Blutsinusoide, die allerdings hinsichtlich ihrer Größe und Anzahl geringer sind als in der Labyrinthzone. Die Zone aus großen polyploiden Trophoblastenzellen bildet die Grenzschicht zu mütterlichen Zellen der Decidua basalis. Ab Tag 11 der Schwangerschaft ist die Organbildung des murinen Feten weitgehend abgeschlossen. Von diesem Zeitpunkt bis zur Geburt finden keine größeren Transformations-, sondern hauptsächlich Wachstumsprozesse statt. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft dringt die Plazenta weiter in die Decidua basalis ein. Dabei werden weitere Blutgefäße eröffnet. Nach 20-21 Tagen,

je nach Mausstamm, ist die Schwangerschaft beendet und es erfolgt die Geburt [16].

1.4.2 Organisation des murinen Uterus während der ersten Hälfte der Schwangerschaft

Der Uterus der Maus lässt sich in der kritischen Phase der Plazentaentwicklung (Tag 8-10) in histologisch definierte Zonen unterteilen: Die Decidua basalis und Decidua capsularis. In die Decidua basalis wandert der Trophoblast im Verlauf der Schwangerschaft ein. Die Decidua basalis lässt sich ihrerseits in die vaskuläre Zone und die zentrale Decidua basalis unterteilen. Die mütterlichen Leukozyten-Subpopulationen befinden sich in streng definierten Zonen der Decidua basalis, so genannten Mikrodomänen. Die vaskuläre Zone ist durch stark dilatierte mütterliche Gefäße charakterisiert und liegt nah beim einwandernden Trophoblasten (Abb. 1.3).

Auf den Endothelzellen der vaskulären Zone kann eine Coexpression von MAdCAM-1 und P-Selektin beobachtet werden. Ab der Mitte der Schwangerschaft wird dort zusätzlich VCAM-1 schwach exprimiert. Des Weiteren exprimieren die zu diesem Zeitpunkt stark dilatierten Gefäße ICAM-1 und -2. Sowohl Gewebe als auch Gefäße der vaskulären Zone enthalten zahlreiche monozytäre Zellen. Die zentrale Decidua basalis zeichnet sich durch ein sehr viel kompakteres Gewebe aus, in dem sich venöse Kanäle und Arterien befinden. An sie schließt sich das Myometrium an. Uterine NK-Zellen (uNK-Zellen) sind zu diesem Zeitpunkt der dominierende Leukozyten-Zelltyp. Die uNK-Zellen sind vornehmlich in der zentralen Decidua basalis um und in VCAM-1⁺ Gefäßen lokalisiert, nicht aber in der vaskulären Zone. Diese Gefäße exprimieren weder MAdCAM-1 noch P- oder E-Selektin [17]. Außerdem können neutrophile Granulozyten am äußeren Bereich des einwandernden Trophoblasten nachgewiesen werden. DC, Monozyten und vereinzelte T-Zellen kommen in den Blutgefäßen und im Gewebe der vaskulären Zone vor. Makrophagen und DC sind an der Grenze zwischen zentraler Decidua basalis und Myometrium zu finden [18, 19]. Die mütterlichen Blutsinusoide im äußeren Bereich des Trophoblasten an der Grenze zur

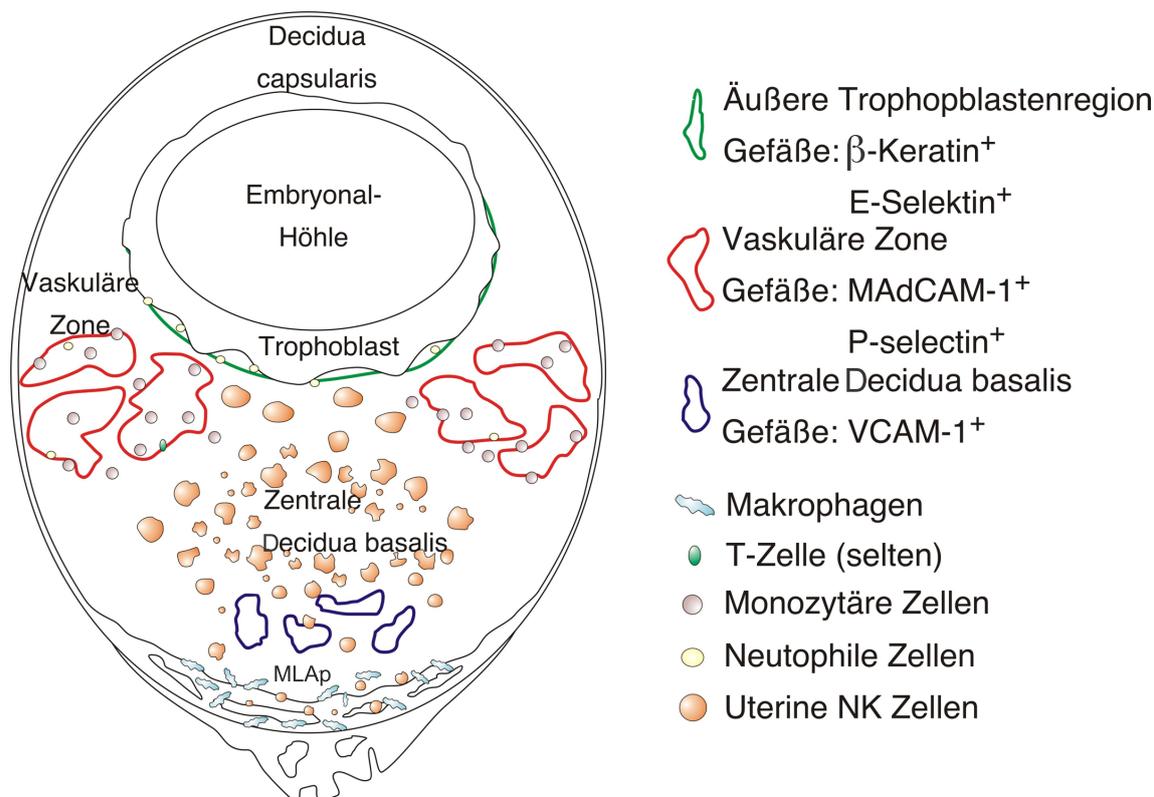


Abbildung 1.3: Organisation des schwangeren Uterus der Maus während der kritischen Phase der initialen Plazentaentwicklung (Tag 8 – 10 der Schwangerschaft) mit einer schematischen Übersicht der den Uterus infiltrierenden Leukozyten und ein Verteilungsmuster der vaskulären Adhäsionsmoleküle. Zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft lässt sich das mütterliche Gewebe des Uterus in drei histologisch unterscheidbare Zonen aufteilen: Die zentrale Decidua basalis und das Myometrium, die vaskuläre Zone und die Decidua capsularis, welche keine Rolle bei der Plazentaentwicklung spielt. Die eingewanderten Leukozyten befinden sich Subtyp-abhängig in unterschiedlichen Kompartimenten. Jede dieser spezialisierten Mikrodomänen ist gekennzeichnet durch eine sich nicht überlappende Expression vaskulärer Adhäsions-Rezeptoren, die bei der Rekrutierung der Leukozyten eine entscheidende Rolle spielen.

mütterlichen Decidua basalis sind durch die Expression von E-Selektin charakterisiert. Innerhalb dieser E-Selektin exprimierenden Sinusoide befinden sich überwiegend Granu-

lozyten. Die Decidua capsularis befindet sich von der Decidua basalis aus gesehen, auf der gegenüberliegenden Seite der Embryonalhöhle. Sie ist nicht an der Entwicklung der Plazenta beteiligt [20].

1.4.3 Mechanismen der mütterlich/fetalen Toleranz

Der semiallogene Trophoblast trägt sowohl mütterliche als auch väterliche Antigene und wird trotzdem nach der Implantation nicht abgestoßen. Tatsächlich sind, um den Erhalt des Konzeptus zu gewährleisten, unterschiedliche Mechanismen nötig, die eine Toleranz ihm gegenüber induzieren. Damit reiht sich der Uterus in eine Reihe anderer Organe ein, die aufgrund ihrer besonderen Beschaffenheit dem Immunsystem gegenüber privilegiert sind (z.B. Gehirn, Auge, Haarfollikel). Diese Organe haben gemein, dass eine Zerstörung von Zellen im Rahmen einer Immunantwort schlimmere Folgen hätte als eine tolerierte Infektion. Dennoch muss gerade im Uterus der Konzeptus auch vor eindringenden Pathogenen geschützt werden. Deshalb lässt sich im Uterus ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen fetomaternaler Toleranz und immunologischem Schutz beobachten. Einige der Mechanismen, die dem Schutz des Fetus dienen, sollen im folgenden etwas näher erläutert werden.

1.4.3.1 Dendritische Zellen

Bei der Maus sind mehrere DC-Populationen bekannt [21]. Zu diesen gehören die plasmazytoiden DC (pDC) und die myeloiden DCs (mDC). Myeloide dendritische Zellen konnten im schwangeren Uterus der Maus und des Menschen nachgewiesen werden [22, 23]. Ebenso in sehr geringer Anzahl die pDC [24]. Bei der Maus sind DC durch die Expression von CD11c charakterisiert und zeigen keine linienspezifische Marker für B- oder T-Zellen [25, 26]. DC sind in der Regel bei einer normal verlaufenden Schwangerschaft nicht aktiviert und wandern in den Lymphknoten und stimulieren dort T_{reg} [25]. Sie scheinen auch bei lokalen Immunreaktionen und bei der Reifung der uNK-Zellen eine Rolle zu

spielen [27].

1.4.3.2 Lymphozyten

B- und $\alpha\beta$ -T-Zellen sind bei normal verlaufenden Schwangerschaften, während der kritischen Phase der beginnenden Plazentaentwicklung, im Uterus kaum nachzuweisen. Eine Gruppe von T-Zellen, die T_{reg} (regulatorischen T-Zellen) spielen eine Rolle bei der Freisetzung von IL-10 und TGF- β . Beide wirken immunsupprimierend und hemmen die Aktivierung von T-Zellen [28, 29]. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren ebenfalls IL-10 und TGF- β und können somit auch über diesen Weg Funktionen ausüben. Dazu gehören auch die vereinzelt im Uterus vorhandenen $\gamma\delta$ -T-Zellen. Es wird vermutet, dass diese Zellen Trophoblasten-Antigene erkennen können und dadurch die Invasion des Trophoblasten kontrollieren [30].

1.4.3.3 Expression nichtklassischer MHC-Moleküle

Eine immunologische Besonderheit ist die Expression nicht-klassischer MHC-Moleküle auf den fetalen Trophoblastenzellen bei gleichzeitiger Herunterregulierung klassischer MHC-Moleküle. Am besten untersucht ist die Expression dieser nicht-klassischen MHC-Moleküle im humanen System. Menschliche Trophoblastenzellen exprimieren die nicht-klassischen MHC-Moleküle der Klasse G (HLA-G) und E (HLA-E), die zum *minor histocompatibility complex* gehören. Während des ersten Trimesters können auch geringe Mengen an HLA-C, der zum major histocompatibility complex gehört, nachgewiesen werden. Insbesondere das vom menschlichen Trophoblasten exprimierte HLA-G wurde mit einer lokalen Beeinflussung des mütterlichen Immunsystems in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass HLA-G exprimierende Trophoblastenzellen mit KIR's auf uNK Zellen interagieren und so einer Lyse entgehen [31]. HLA-E hingegen ist der Ligand für den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor CD94/NKG2A. Durch seine Expression kann ebenfalls eine NK-Zell abhängige Zelllyse verhindert werden [32].

1.4.3.4 Katabolismus von Tryptophan durch Indolamin-2,3- dioxygenase

Aktivierte T-Zellen stellen eine Gefahr für den Fötus dar. Daher gibt es im schwangeren Uterus der Maus Mechanismen, um deren Aktivierung zu inhibieren. T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung und Proliferation Tryptophan [33]. Das auf der Plazenta exprimierte Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) baut die für T-Zellen wichtige Aminosäure ab [34]. Wird IDO gehemmt, führt dies zu einer Abstoßungsreaktion des Feten durch aktivierte T-Zellen [35]. Auch bei humanen Schwangerschaften ist die Tryptophankonzentration im Plasma reduziert [36].

1.4.3.5 Inhibierung der Komplement-Aktivierung

Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen Enzymvorstufen, die am Ort einer Infektion durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Es gibt drei Wege der Komplementkaskade:

1. Klassischer Weg
2. Alternativer Weg
3. Mannosebindendes Lektin (MBL)-Weg

Jeder dieser Wege mündet in der Aktivierung der C3-Konvertase, dem zentralen Enzym des Komplementsystems. Es spaltet den Komplementfaktor C3 in seine Komponenten C3a und C3b. Der Rezeptor für C3b ist das $\alpha M\beta 2$ -Integrin (CD11b/CD18), welches auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu finden ist. Die Ablagerung von C3b auf dem semiallogenen Trophoblasten würde zu einer Immunreaktion und damit zu seiner Zerstörung führen. Im Uterus der schwangeren Maus wird daher ein komplementregulierender Faktor (*Crry*) exprimiert, der die Ablagerung von C3b auf dem Trophoblasten verhindert [36]. Beim Menschen könnten Faktoren wie decay accelerating factor (DAF), CD59 oder monocyte chemoattractant protein (MCP), die von der humanen Plazenta exprimiert werden, diese Aufgabe übernehmen.

1.5 Uterine NK Zellen

Humane und murine Schwangerschaften sind durch einen massiven Einfluss von NK-Zellen in den Uterus charakterisiert. Diese Schwangerschaft-assoziierten uterinen NK-Zellen (uNK-Zellen) stammen vermutlich von preNK-Zellen ab, die in lymphoiden Geweben, vor allem in Milz und Lymphknoten, nachgewiesen werden [37]. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren sie die *common gamma chain* (γc) und CD122 (β -Kette des IL-2 und -15 Rezeptors). Im Gegensatz zu reifen uNK fehlen ihnen aber noch die Oberflächenmoleküle NK1.1, CD49b und Ly49 [38]. Die reifen uNK der Maus exprimieren auf ihrer Oberfläche Thy1.2 (CD90.2), NK1.1, asialo-GM1, IL2R β , LFA-1 (CD11a), CD49b und Ly49, welches die Rolle des auf humanen peripheren und deciduellen NK vorkommenden *killing inhibitory receptors* (KIR) entspricht. Weiterhin zeichnen sich murine uNK-Zellen durch eine Reaktivität mit dem Lektin *Dolichos biflorus Agglutinin* (DBA) aus. DBA bindet an N-acetyl D-galactosamin, welches in der Plasmamembran von uNK-Zellen vorkommt. Es reagiert nicht mit anderen Lymphozyten oder peripheren NK-Zellen. Anhand der Reaktivität mit DBA lassen sich die uNK-Zellen in vier Subtypen einteilen (Abb.1.4), die sich durch ihren Reifungsgrad unterscheiden [39].

Wie die pre-uNK ihren Weg in den Uterus finden und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die pre-uNK über die Gefäße des zentralen Decidua basalis und *mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy* (MLAp) in den Uterus einwandern und dass bei diesem Prozess das Adhäsionsmolekül VCAM-1 eine Rolle spielen könnte [18, 40]. In Mäusen können die uNK-Zellen ab dem 5. Tag der Schwangerschaft im schwangeren Uterus der Maus beobachtet werden [41, 42]. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft proliferieren und differenzieren diese Zellen und nehmen drastisch an Größe zu (bis zu $50\mu m$). Je größer die uNK-Zellen werden, desto mehr intrazelluläre Granula können detektiert werden. Die Granula enthalten NK-Zell-typische Substanzen wie Perforin, Serin-Proteasen und Granzyme [43]. Die uNK-Zellen sammeln sich in dem Bereich, der als MLAp bezeichnet wird. Dieser Bereich liegt zwi-

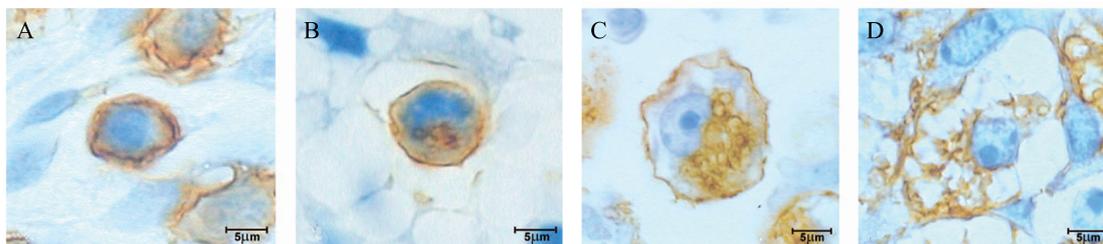


Abbildung 1.4: Reifestadien der uNK-Zellen. Von links nach rechts nimmt die Größe und Granularität der uNK-Zellen zu. In A-D sind die unterschiedlichen Reifestadien der uNK-Zellen dargestellt. A) kleine, runde, agranuläre uNK-Zellen mit einem Durchmesser von ca. $9\mu\text{m}$ B) etwas größere, runde uNK-Zellen mit sich entwickelnden Granula mit einem Durchmesser von ca. $13\mu\text{m}$ C) zeigt die Form, die wohl die aktivste Form der uNK-Zelle darstellt: groß, rund mit vielen Granula. Diese Zellen haben im Mittel einen Durchmesser von ca. $26\mu\text{m}$. D) uNK-Zelle, die bereits im Übergang zur Apoptose ist. Die Zellform lässt sich nicht mehr mit Bestimmtheit definieren. Die Größe liegt bei diesen Zellen bei $>30\mu\text{m}$. Paffaro et al. 2003 [39]

schen der Plazenta und dem Myometrium des Uterus. Sie erreichen ihre maximale Anzahl in der Mitte der Schwangerschaft (Tag 12). Die Funktion der uNK-Zellen im schwangere Uterus der Maus wurde durch Versuche an *knockout* Mäusen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass diese Zelle eine der wichtigsten Quellen für $\text{IFN-}\gamma$ im Uterus darstellen [44]. Für die Differenzierung der uNK-Zellen ist das Zytokin IL-15 notwendig. Ashkar et al. zeigten 2003, dass IL-15 defiziente Mäuse kaum uNK-Zellen haben. Die Decidua basalis dieser Mäuse blieb hypozellulär und die Entwicklung der MLAp war nicht vollständig und auch die Modifikation der Spiralarterien blieb aus [92]. Im Uterus der Maus wird IL-15 bis zu Tag 11 transkribiert, zu späteren Zeitpunkten der Schwangerschaft kann es nicht mehr nachgewiesen werden [45]. Das Fehlen von uNK-Zellen oder $\text{IFN-}\gamma$ verhinderte in diesen Experimenten die normale, schwangerschaftsassozierte Umstrukturierung des Uterus (Veränderungen der endometrialen Blutgefäße u.a.). Allerdings wurde auch festgestellt, dass weder die uNK-Zellen noch das $\text{IFN-}\gamma$ essentiell für eine erfolgreich verlaufende Schwangerschaft sind [44, 46].

1.6 Zielsetzung

Bei der Induktion, Aufrechterhaltung und Regulation von Immunantworten spielen dendritische Zellen eine Schlüsselrolle. Sie beeinflussen aber auch die Reifung und Funktion von NK-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beziehung zwischen den dendritischen Zellen und den uNK-Zellen während der Schwangerschaft untersucht werden. *In vivo* Inhibitionsstudien und Versuche mit *knockout* Mäusen haben gezeigt, dass auch die im Uterus vorkommenden NK-Zellpopulationen, die uNK-Zellen, von den dendritischen Zellen in ihrer Reifung beeinflusst werden. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, sollen Mäuse, bei denen die Einwanderung von dendritischen Zellen in den schwangeren Uterus gehemmt wird (MECA367 behandelte PS^{-/-}-Mäuse bzw. ICAM^{-/-}-Mäuse) mit WT-Mäusen verglichen werden. Zunächst wird eine phänotypische Charakterisierung der uNK-Zellen in den Testgruppen sowohl *in situ*, als auch durchflusszytometrisch durchgeführt. Des Weiteren sollen die uNK-Zellen isoliert und auf Funktionalität untersucht werden. Als Indikator hierfür wird die Expression von IFN- γ gewählt, da uNK-Zellen die Hauptproduzenten dieses Zytokins sind. Über IFN- γ werden viele schwangerschaftsbezogene Veränderungen im Uterus induziert. Dendritische Zellen können sowohl über den direkten Kontakt als auch über die Ausschüttung von Zytokinen die uNK-Zellen beeinflussen. Wichtige Zytokine, besonders IL-12 und IL-15 sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Daher soll weiterhin untersucht werden, ob die Menge dieser beiden Zytokine in Mäusen mit inhibierter Rekrutierung dendritischer Zellen in den Uterus reduziert ist. Wäre dies der Fall, sollte die Rolle dieser Zytokine bei der Reifung der uNK-Zellen durch Substitutionsversuche geklärt werden. Um die Wichtigkeit der dendritischen Zellen bei diesen Prozessen zu beweisen, sollen in so genannten *adoptive transfer*-Experimenten dendritische Zellen aus WT-Mäusen gewonnen und Mäusen injiziert werden, denen diese Zellen im Uterus fehlten. Diese Versuche sollen Aufschluss geben, ob und wie dendritische Zellen die Funktion der uNK-Zellen und somit die Entwicklung des mütterlichen Gewebes beeinflussen.

2 Material

2.1 Geräte, Chemikalien und Medien

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Typ	Hersteller
Absaugpumpe	INOTECH, Dottikon, Schweiz
Biofuge 13	Heraeus SEPATECH, Osterode am Harz
Dialyseschlauch Dialysis Tubing, Cellulose Membrane, 25 x 16mm	Sigma-Aldrich
Einmalspritzen, steril, d = 0,7 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Färbekammer (Magic Immuno Staining Tray)	Cell Path plc (Hemel, Hempstead)
Falcon Cell Strainer (100µm/40µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fettstift (Liquid Blocker)	Daido Sangyo Co., Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop (DMLM DC 350F)	Leica, Bensheim
Gefriermikrotom (Leica CM 1850)	Leica, Bensheim
Kunststoffröhrchen, steril, Schraubverschluß, 15/50mL	Sarstedt AG Nümbrecht
Megafuge 1.0R	Heraeus SEPATECH, Osterode am Harz
Micro tubes, 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Nanodrop	PeqLab, Erlangen
Nunc Stericup Filtrationssystem	Millipore, Scwalbach
Optical tubes and caps	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µL)	Greiner, Nürtingen
Stabpipetten, steril, 1, 5, 10, 25 mL	Greiner, Nürtingen
Sterile Pipettenspitzen (10,100, 1000µL)	BIOzym Diagnostik, Olendorf
Separationssäules, Größe MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
TaqMan [®] ABI Prism 7700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tissue-Tek [®] Cryomold [®] Standard	Sakura Finetek Inc., Torrance, USA
Tray for multiply [®] 0,2 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Vortex, Relax 2000	Heidolph, Schwabach
6 Loch-Platte	DB Falcon, Heidelberg
Zentrifuge (2-15K)	Sigma, Osterode am Harz

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
7 AAD	Sigma-Aldrich, München
Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Destilliertes Wasser	Apotheke Universität Lübeck, Lübeck
<i>Dolichos biflorus agglutinin</i> (DBA)	Vector Lab, Burlingame, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Kollagenase D, Typ IV	Sigma-Aldrich, München
Lymphocyte LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Protein-G-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Trockeneis	Apotheke Universität Lübeck, Lübeck

Tabelle 2.3: Verwendete Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka Biochemika, Neu Ulm
Fetales Kälberserum, Mycoplex (FKS)	PAA Laboratories, Cölbe
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer	LIFE-Technologies, Paisley, UK
D-Glucose	Merck, Darmstadt
RPMI1640 Medium ohne L-Glutamin	
L-Glutamin, 200 mM	BioWhittacker, Heidelberg
Kulturmedium DMEM	BioWhittacker, Heidelberg
Kulturmedium RPMI 1640	BioWhittacker, Heidelberg
beta-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Cambrex, Verviers, Belgien
Penicillin 10.000 E/mL	BioWhittacker, Heidelberg
Streptomycin 10.0000 μ L	BioWhittacker, Heidelberg
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe

Tabelle 2.4: Laborbedarf

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser, unterschiedliche Formen	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch (Dialysis Tubing, Cellulose Membrane, 25 x 16 mm)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einmalkanülen BD Microlance 3, steril, 0,45 x 13 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen, steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebe-Eindeckmedium Crystal Mount	Biomeda, Forster City, CA, USA
Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Instruments, Nussloch
Kulturplatte, 24-Loch	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluss, 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Latex-Einmalhandschuhe	Ansell, München
Nunc Stericup Filtrationssystem	Milipore, Schwalbach
Objektträger Super Frost	Menzel Gläser, Braunschweig
PAP Pen Liquid Blocker Slide Marker	Cedarlane Lab, Burlington, Ontario, Kanada
Pipettenspitzen (div.)	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (div.)	Greiner, Nürtingen
Röhrchen fürs Durchflusszytometer, 600 μ l	Greiner, Nürtingen
Separationssäulen, Größe MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Stabpipetten, steril, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner, Nürtingen
Tissue-Tek Cryomold, Größen Biopsy, Intermediate und Standard	Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellsieb, 100 μ m	BD Falcon, Heidelberg

2.1.1 Zellkulturmedien

Standardmedium:

- RPMI 1649
- 10 % FKS
- 1% L-Glutamin
- 100IU/ml Penicillin
- 100 μ g/ml Streptomycin

BMDC-Medium:

- RPMI 1640
- 10 % FKS

- 1% L-Glutamin
- 100IU/ml Penicillin
- 100 μ g/ml Streptomycin
- β -Mercaptoethanol (1:1000 in PBS)
- 20 ng/ml rmGM-CSF

2.1.2 Puffer

MACS-Puffer/500 ml PBS (sterilfiltriert), pH 7,4:

- 2,5g BSA
- 0,33g EDTA (2mM)

Bindungspuffer/1000 ml, pH 7,0 (sterilfiltriert):

- 1,08 g Natriumdihydrogenphosphat
- 3,27 g Dinatriumhydrogenphosphat
- auffüllen mit destilliertem Wasser

Neutralisationspuffer/100 ml, pH 9,0 (sterilfiltriert):

- 12,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- 2 ml konz. Salzsäure
- auffüllen mit destilliertem Wasser

Elutionspuffer/100 ml, pH 2,7 (sterilfiltriert):

- 0,75 g Glycin
- 1 ml konz. Salzsäure
- auffüllen mit destilliertem Wasser

Saponin-Puffer in PBS gelöst:

- 0,1 % Saponin
- 0,5 % BSA

2.1.3 Lösungen

Isotonische (0,9 %ige) Kochsalzlösung/100 ml (sterilfiltriert):

- 150 mM NaCl (0,88 g)
- auffüllen mit destilliertem Wasser

Kollagenasalösung/10 ml:

- 20 mg Kollagenase D
- 100 μ l HEPES-Puffer (1M)
- auffüllen mit destilliertem Wasser

3 Methoden

3.1 Mäuse

Versuche an den Mäusen wurden durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Versuchsnummer: 29/A3/97). Die C57BL/6J Mäuse wurden bei Charles River Deutschland Sulzfeld erworben. Alle anderen Mäuse (ICAM-1^{-/-} (C57BL/6.129S4- *ICAM1*^{tm1Jcgr}/J [47], P-Selektin^{-/-} (PS^{-/-}, C57BL/6.129 S2-Selp^{tm1Hyn}/J [48]) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Die Tiere wurden in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität Lübeck gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Der künstliche Tag- und Nachtrhythmus war auf jeweils 12 Stunden eingestellt. Syngene Schwangerschaften wurden durch die Verpaarung von Weibchen eines Stammes mit dem Männchen desselben Stammes erzeugt. Die Verpaarung erfolgte über Nacht, ein Indiz für eine erfolgreiche Verpaarung war das Vorhandensein eines vaginalen Plugs. Hierfür wurde am nächsten morgen eine Sichtkontrolle durchgeführt. Der Tag an dem die Tiere als "Plug positiv" gekennzeichnet wurden, war der 1. Tag der Schwangerschaft. Um das Ergebnis abzusichern, wurden die Mäuse ab dem 7. Tag der Schwangerschaft einem weiteren Test unterzogen. Hierfür wurde mit 40µl isotonischer Kochsalzlösung eine Vaginalspülung durchgeführt und an den Tagen 8-11 wiederholt. Nach der Implantation einer befruchteten Eizelle verändert sich die Vaginalflora, diese manifestierte sich bei der Spülung durch die Bildung einer viskosen Flüssigkeit. Dieser Effekt bleibt bei einer nicht erfolgten Schwangerschaft aus. Mäuse, bei denen einer dieser Tests negativ ausfiel, wurden aus Gründen des Tierschutzes von den Versuchen ausgeschlossen. Die Tiere wurden am Versuchstag (meist der 11. Tag der Schwangerschaft) durch CO₂-Begasung und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und die schwangeren Uteri entnommen.

3.1.1 Isolierung und Aufreinigung von Zellen aus der Maus

Die zur Isolierung von Zellen gewonnenen feto/maternale Einheit (fmE) wurden zunächst in einer mit PBS gefüllten Petrischale mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die fmE in einer Kollagenaselösung für 45 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (100µm) in ein 50 ml Röhrchen gegeben, um vorhandene Gewebestücke aus der Lösung zu entfernen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit MACS-Puffer auf 20 ml aufgefüllt, um die Enzymreaktion der Kollagenase zu stoppen. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 250 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS gelöst. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt, um diese auf entsprechende Zelldichten einstellen zu können.

3.1.2 Langzeit *in vivo* Blockierungsversuche

Vom Tag 7 bis Tag 10 der Schwangerschaft wurden C57BL/6J- bzw. PS^{-/-}-Mäusen pro Tag je 500µg des blockierenden mAk - MECA367 (anti-MAdCAM-1) bzw. HERMES-1 (anti-humanes CD44 / Isotypkontrolle) - *i.p.* injiziert. Die optimale Konzentration des mAk wurde in Vorversuchen ermittelt, die in der Habilitationsschrift von Frau Dr. Kruse beschrieben sind. Die Tiere wurden am 11. Tag der Schwangerschaft wie oben beschrieben getötet und die Uteri entnommen.

3.2 Histologische Untersuchungen

3.2.1 Histologische Charakterisierung

Für die Evaluierung der allgemeinen Morphologie des Uterus und dem Aufbau der Blutgefäße wurde eine so genannte Diff-Quick-Färbung durchgeführt. Das Diff-Quick-Färbeset besteht aus einer Fixierungs- und zwei Färbelösungen (beinhalten Eosin und Thiazin-Blau). Bei einer Diff-Quick-Färbung werden alle Zellen und deren Kerne angefärbt. Für die Färbung werden die Lösungen in Färbeküvetten überführt. Die zu färbenden Objektträger werden in jede einzelne dieser Lösungen jeweils sieben mal für eine Sekunde

eingetaucht. Angefangen mit der Fixierlösung über die Eosin-Lösung hin zur Thiazin-Blau-Lösung. Im Anschluss wurde überschüssige Färbelösung unter laufendem Wasser abgespült und dann die Schnitte luftgetrocknet. Danach konnten die Gewebeschnitte unter dem Durchlichtmikroskop untersucht werden.

3.2.2 *In situ* Immunlokalisation

3.2.2.1 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Durch die initiale Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin kommt es auf deren Oberfläche zu unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Kryoschnitt, was eine bessere Haftung zur Folge hat. Hierfür wurden die Objektträger für 10 Minuten in Aceton inkubiert und von Fett und Staub befreit. Die so vorbereiteten Objektträger wurden im Anschluss für 15 Minuten in eine 0,1 %ige Poly-L-Lysin-Lösung überführt. Vor ihrer Verwendung wurden die Objektträger getrocknet. Die Inkubationen wurden bei 4°C durchgeführt.

3.2.2.2 Vorbereitung des Gewebes und Fixierung auf Objektträgern

Die aus den Mäusen entnommenen feto/maternalen Einheiten (fmE) wurden in Cryomold Gewebeschälchen eingebettet. Hierfür wurden jeweils maximal drei fmE in Schälchen, in denen Einbettmedium vorgelegt war, überführt. Um ein gleichmäßiges durchfrieren zu gewährleisten wurden die so vorbereiteten fmE zügig auf Trockeneisplatten überführt. Nach vollständigem Gefriervorgang wurden die Proben beschriftet und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Der Schneidvorgang am Kryostat wurde bei einer Temperatur von -20°C durchgeführt, um ein Brechen der Kryotomschnitte beim Auftragen auf die beschichteten Objektträger zu verhindern. Die FMEs wurden auf eine Dicke von 6µm geschnitten und auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger überführt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde getrocknet. Zum Abschluss wurden sie für 15 Minuten in Aceton fixiert und dann bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.2.3 Immunhistologische Antikörperfärbung

Nach dem Auftauen wurden die Cryoschnitte 15 Minuten in Aceton inkubiert und anschließend luftgetrocknet. Vor den folgenden Färbeschritten wurde mit Hilfe eines Fettstiftes die Position des Schnittes auf dem Objektträger markiert, um ein Verlaufen der aufgetragenen Lösungen während der Inkubationszeiten zu verhindern. Die Objektträger wurden in einer Färbekammer fixiert. Vor der Färbung wurden die Cryoschnitte 5 Minuten mit PBS rehydriert. Die weitere Färbung erfolgte in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern. Abb. 3.1 zeigt das Färbeschema für die verschiedenen verwendeten Antikörper. Die biotinylierten Antikörper wurden über mit Fluorochrom markiertes Streptavidin detektiert. Endogene Streptavidin-Bindungsstellen, die zu einer unspezifischen Färbung führen würden, mussten vor einer Färbung abgesättigt werden. Hierfür wurden die Schnitte zunächst für jeweils 10 Minuten mit einer aus zwei Komponenten bestehenden Avidin-Biotin-Blocking-Solution inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit normalem Maus-Serum behandelt (NMS, 10 Minuten), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die mAk wurden jeweils für 15 Minuten auf die Schnitte gegeben und im Dunkeln inkubiert.

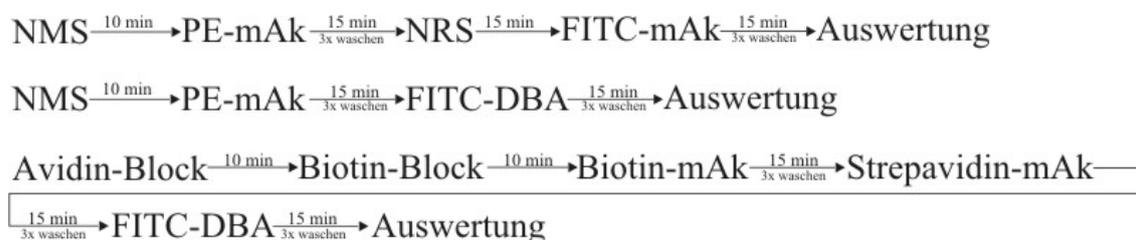


Abbildung 3.1: Färbeschema. NMS = Normales Maus Serum; NRS = Normales Ratten Serum

3.2.3 Bestimmung der Anzahl und Größe von Leukozyten

Für jede Versuchsgruppe wurden mindestens drei Mäuse verwendet und pro Maus drei fmE (à 10 Gewebeschnitte) untersucht. Von diesen wurden wie oben beschrieben serielle Gefrierschnitte hergestellt. Zum Auszählen wurde nur jeder 10. Objektträger ausgewählt um Mehrfachzählungen gleicher Zellen auszuschließen. Zur Quantifizierung der Zellpopu-

lationen wurde ein Gitternetz im Okular des Mikroskopes verwendet. Die Fläche dieses Gitternetzes entsprach bei einer 400fachen Vergrößerung einer Fläche von $0,25\text{mm}^2$. Pro Gewebeschnitt wurden 5 dieser Flächen in definierten Zonen ausgezählt (Abb. 3.2) [39]. Die Größe der Zellen wurde mit der Analyse-Software Photoshop CS3 extendet gemessen. Dieses Programm verfügt über ein Werkzeug zur Größenbestimmung auf Fotos. Eingestellt auf die richtige Größenordnung wurde die Software über Eichobjektträger, die jeweils bei 100x-, 200x- und 400x-Facher Vergößerung aufgenommen wurden. Diese Objektträger verfügen über eine Skala mit definierten Abständen. Diese wurden mit der Software vermessen und die Abstände manuell eingetragen. Diese Einstellungen dienten dann zur exakten Messung der Zellgrößen auf den Objektträgern.

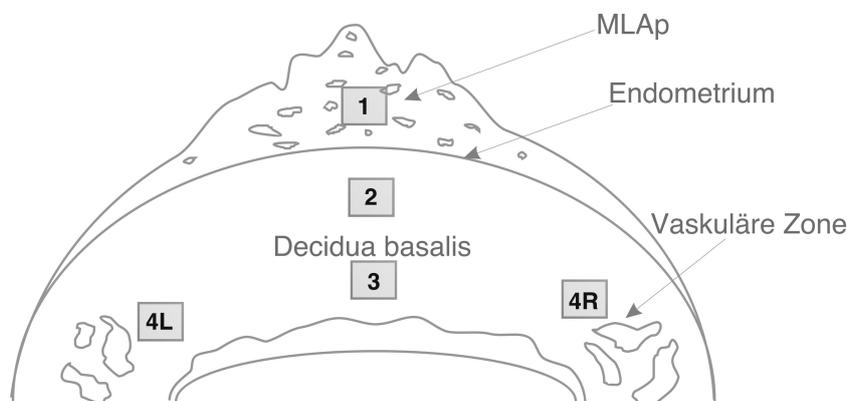


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der mesometrialen Seite einer fmE mit der Einteilung in Zonen nach Paffaro et al. [39] am 11. Tag der Schwangerschaft. MLAp = mesometrail lymphoid aggregate of pregnancy,

3.2.4 Bestimmung des Durchmessers von Gefäßen

Die Morphologie der Wand mütterlicher Gefäße ist ein guter Indikator für die Entwicklung des Uterus in Bezug auf die volle Funktionalität der deciduellen Leukozytenpopulationen. Eine Möglichkeit zur Bewertung ist die Berechnung des Verhältnisses des Gesamtdurchmessers eines Gefäßes zu dessen Lumendurchmesser. Hierfür wurden Kryoschnitte mit der Diff-Quick-Technik, wie oben beschrieben, gefärbt. Am Mikroskop wurden Aufnahmen von den Gefäßen bei einer 400fachen Vergrößerung angefertigt. Diese Aufnahmen wurden

anschließend am PC mit Hilfe der Software Adobe Photoshop CS3 extendet ausgewertet und die Gefäße wie oben für die Zellen beschrieben vermessen. Zwei Werte wurde bestimmt (siehe Abb. 3.3): a) Der Gesamtdurchmesser (GD) b) der Lumendurchmesser (LD). Drei Mäuse pro Testgruppe wurden untersucht und von jeder Maus mindestens 10 Schnitte von je zwei fmE.

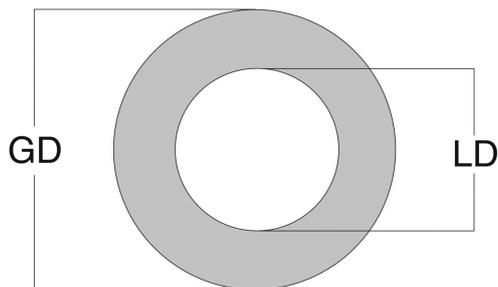


Abbildung 3.3: Für die Bestimmung des Verhältnisses von Gesamtdurchmesser (GD) zu Lumendurchmesser (LD) wurden diese beiden Entfernungen mit einer speziellen Software gemessen.

3.3 Injektion von IL-12 und IL-15

Um die Beteiligung von IL-12 und IL-15 an der Entwicklung der uNK-Zellen zu untersuchen, wurden Mäusen mit eingeschränkter Einwanderung von dendritischen Zellen *murine recombinant* (mr)IL-12 und/oder mrIL-15 *i.p.* gespritzt. Die Mäuse wurden mit diesen Zytokinen vom 7. bis zum 10. Tag der Schwangerschaft behandelt. Die gespritzte Konzentration betrug 50 U pro Tag und Zytokin. Die Uteri wurden am 11 Tag der Schwangerschaft, wie oben beschrieben, entnommen und entweder eingebettet oder für eine Expressionsstudien verwendet.

3.4 Expressionsstudien

3.4.1 Isolation von mRNA

Die Zellen aus den Uteri wurden, wie oben beschrieben gewonnen und auf eine Zellzahl von 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. Diese wurden erneut für 10 Minuten bei 4°C und 250

x g zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 600 μ l Lysepuffer (RLT Plus Puffer, RNeasy Mini Kit, Qiagen), der mit 1% β -Mercaptoethanol versetzt war, gelöst, auf eine QIAshredder Homogenisator Säule (Qiagen) gegeben und bei 15.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Zum Durchfluss wurden 600 μ l 70% Ethanol pipettiert. Als Durchfluss wird der Teil der Lösung bezeichnet, der durch die Säule im Verlauf der Zentrifugation in ein Auffangröhrchen gelangt. Diese Lösung wurde dann auf eine Qiagen RNeasy Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 μ l RW1 Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf die Säule pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 8.000 x g für 15 Sekunden. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und 500 μ l RPE Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wurde wiederholt, allerdings mit einer Zentrifugationsdauer von 120 statt 15 Sekunden. Nach Verwurf des Durchflusses wurde die Säule mit maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute in der Zentrifuge getrocknet. Durch eine abschließenden Zentrifugation bei 8.000 x g für 30 Sekunden wurde die RNA schließlich mit 50 μ l RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert.

3.4.1.1 DNA-Verdau

Eventuell vorhandene genomische DNA in der RNA-Probe kann zu Verfälschungen der PCR- Ergebnisse führen, daher wurde noch ein DNA-Verdau durchgeführt. Der Verdau erfolgte mit einem Kit der Firma Ambion. Die Proben wurden zunächst mit DNase versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit einem *DNase inactivating reagent* abgestoppt (für 2 Minuten), und anschließend für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der Gesamte-RNA wurde am Photometer gemessen. Hierzu wurde die Probe mit DEPC-Wasser verdünnt (1:20) und die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Die Messung bei 260 nm erlaubt eine direkte Aussage über die Menge an

vorhandenen Einzelstrang-RNA (OD von 1 = 40 mg/ml ssRNA). Das Verhältnis der OD-Werte bei einer Wellenlänge von 260 zu 280 nm beschreibt die Reinheit des Gesamt-RNA und sollte bei 1,8 liegen. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2 *real time* RT-PCR

Die Expression von IFN- γ und IL-15 wurde mit Hilfe der *real time* RT-PCR am TaqMan® bestimmt. Die *real time* RT-PCR ist eine Methode, die es erlaubt, die Amplifikation des PCR-Produktes direkt an einem geeigneten Ausgabegerät zu verfolgen. Sie basiert auf der Anwendung von fluorogen markierten Sonden und der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase. Die Sonde trägt an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluorezein-Derivat) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat). Dieses Ende trägt zusätzlich ein 3'-OH blockierendes Phosphat. Der Quencher-Farbstoff ist über ein Linkermolekül (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst sequenzspezifisch an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die *Taq*-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde zerschnitten wird. Kommt es zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche - und damit auch der FET - zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Freie, nicht-hybridisierte, Sonden werden hingegen nicht hydrolysiert. Entsprechend der Menge der amplifizierten cDNA und somit der Anzahl freigesetzter Reportermoleküle steigt das Fluoreszenzsignal mit jedem Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst (Abb. 3.4).

Zum Nachweis von RNA, z.B. bei Expressionsstudien, wird vor der eben beschriebenen PCR noch eine reverse Transkription (RT) durchgeführt, bei der die RNA in cDNA

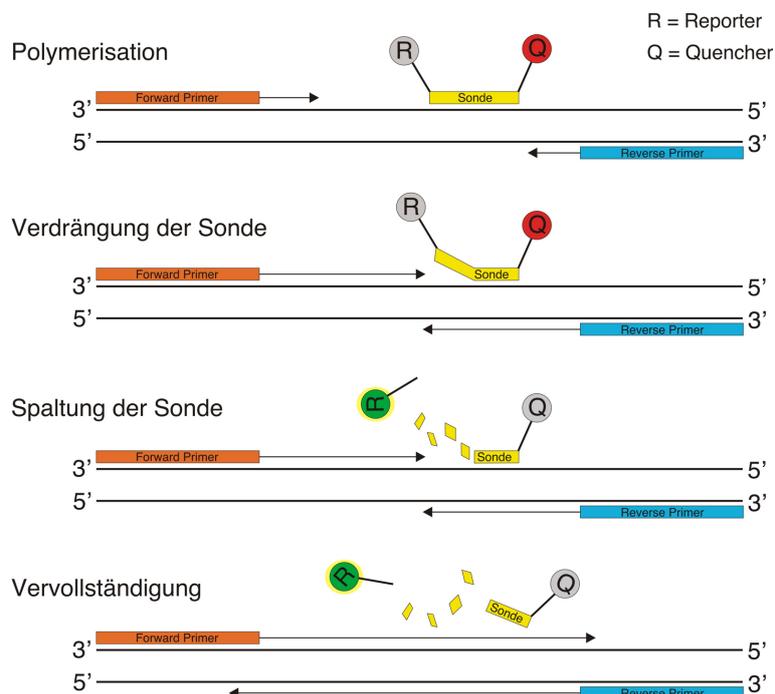


Abbildung 3.4: Prinzip des 5'-3' Nuklease-Assays. Die TaqMan Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern hybridisiert, enthält einen Reporter Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher Farbstoff am 3'-Ende. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher supprimiert die Fluoreszenz. Während der PCR-Reaktion wird durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5' Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt. Erst jetzt kann die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten. Modifiziert nach Strachan and Read, 1999.

umgeschrieben wird. Bei der one step real-time RT-PCR – wie wir sie durchgeführt haben – erfolgt das Umschreiben der RNA zu cDNA und die Real-time PCR in einem Reaktionsgefäß, d.h. beide Enzyme, reverse Transkriptase (Superscript) und AmpliTaq Gold DNAPolymerase, werden gemeinsam dem Reaktionsansatz beigefügt. Um eine semi-quantitative Expressionsanalyse machen zu können, wurde von jeder Probe neben dem zu untersuchenden Gen auch eine PCR mit einem so genannten *house keeping* Gen durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Gen, das in jeder Zelle obligatorisch exprimiert wird. Das hier benutzte Gen war die murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

(GAPDH). Für den Nachweis von IFN- γ und IL-15 wurden die TaqMan® Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems verwendet (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Gene Expression Assays der Zytokine IFN- γ und IL-15

Gen-Name	Assay	Ampliconlänge
NM 008337 (IFN- γ)	Mm99999071-m1	63 bp
NM 008357 (IL-15)	Mm00434210-m1	73 bp

Primer und Sonde der endogenen Kontrolle (GAPDH) wurden ebenfalls von Applied Biosystems bezogen. Die Sonden für die Detektion von IL-15 und IFN- γ tragen den Reporterfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), für die Detektion der GAPDH wurde der Reporter VICTM verwendet. Für die Real-time RT-PCR wurde zunächst in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß ein Mastermix für alle Proben erstellt. Dieser wurde zu je 20 μ l auf eine der Probenzahl entsprechenden Menge Reaktionsgefäße (0,5 ml) verteilt. Danach wurden jeweils 50 ng (5 μ l) der bei Raumtemperatur aufgetauten RNA mit dem Mastermix vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und anschließend in den Heizblock des TaqMan® gestellt. Daraufhin wurde die Software programmiert und das zuvor eingestellte PCR-Programm gestartet. Der Puffer enthält das Enzym AmpliTaq Gold, eine modifizierte Form der AmpliTaq Polymerase. Das Enzym wird inaktiv geliefert und erst durch eine 9 - 12 minütige Inkubation bei 95°C irreversibel aktiviert. In seiner aktivierten Form entsprechen die Eigenschaften und Leistungsdaten dieses Enzyms denen der AmpliTaq DNA Polymerase. Vorzeitige Primer-Dimer-Bildung werden aber bei der Herstellung des Mastermixes mit der inaktiven AmpliTaq Gold verhindert. Die Real-Time RT-PCR startete mit der reversen Transkription. Diese erfolgte für 30 min. bei einer Temperatur von 48°C. Danach begann der klassische Reaktions- und Amplifikationszyklus der PCR. Dieser setzte sich aus der Denaturierung der cDNA bei 95°C für 15 s und der Hybridisierung (Annealing) der Primer und der DNA Neusynthese bei der primerspezifischen Annealingtemperatur von 61°C für 1 min. zusammen. Diese beiden Schritte wurden 50 x

wiederholt. Dem Zyklus geht eine Aktivierung der Ampli-Taq-Gold-Polymerase und eine vollständige Denaturierung der Ausgangs cDNA für 10 Minuten bei 95°C voraus (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Gene Expression Assays der Zytokine IFN- γ und IL-15

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	48°C	30 min
Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase	95°C	10 min
Denaturierung der cDNA	95°C	15 sek
<i>Annealing</i> und DNA-Neusynthese	61°C	1 min

Die Daten der Real-time RT-PCR wurden in jedem Zyklus mehrfach bei der Annealing Temperatur aufgenommen. Die Gültigkeit des Versuchs wurde durch eine so genannte - RT Kontrolle jeder Probe bestimmt. Diese enthielt alle Komponenten der normalen Real-time RT-PCR außer der reversen Transkriptase. Dadurch konnten Verunreinigungen mit DNA, an die die Primer binden können, ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden auch noch no template controls (NTC) mitgeführt, bei denen der Mastermix ohne die Zugabe von RNA auf Bildung eines Amplifikates getestet wurde. Die RNA-Menge wurde hier durch DEPC- H_2O ersetzt.

3.4.3 Auswertung der *real time* RT-PCR

Das Signal einer TaqMan® PCR repräsentiert die Veränderung in der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenz-spezifischen Sonde. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz werden mit Hilfe eines dem Reaktionspuffer zugesetzten passiven Referenzfarbstoffs (ROX) ausgeglichen. Dieser normalisierende Effekt geht in die Berechnungen über den Rn-Wert ein. Der Rn-Wert (normalisiertes Reportersignal) entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffes

dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffs. Unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Volumenschwankungen (Pipettierfehler) können somit ausgeglichen werden. Dabei repräsentieren $Rn+$ Werte die relative Fluoreszenz von Ansätzen mit Probenmaterial, während $Rn-$ Werte die Fluoreszenz von NTCs darstellten. Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basieren, werden ausgeglichen, indem das binnen der ersten paar PCR-Zyklen erstellte Hintergrundsignal vom jeweiligen Rn Wert abgezogen wird. Dieser Wert wird als ΔRn -Wert bezeichnet. Der sogenannte Threshold Cycle (CT-Wert) drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Es gilt: Je mehr Ziel-Gen in der Ausgangsprobe vorhanden ist, desto kleiner ist der CT-Wert. Zudem ist der CT-Wert abhängig von der Effektivität der PCR-Reaktion, welche hauptsächlich von der Primereffektivität beeinflusst wird. Für die Quantifizierung erstellt das System eine Standardkurve CT über $(\log N)$ der Startkopienzahl und ermittelt davon über Interpolation die Startkopienzahl der zu untersuchenden Proben. In einem PCR-System mit 100 % Effizienz nimmt der CT-Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab. Zur Bestimmung der Expressionsaktivität der Proben wurde die vergleichende CT-Methode, auch $\Delta\Delta CT$ -Methode genannt, angewendet. Dazu wurde zunächst die Differenz aus dem CT-Wert des house keeping genes und dem CT-Wert des zu untersuchenden Genes gebildet (ΔCT). Da in der Amplifikationkurve der ΔRn logarithmisch aufgetragen wurde, musste der Semi-quantifizierungswert als $2\Delta CT$ ausgedrückt werden. Zur Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes wurde folgende Formel verwendet: $\Delta CT = \Delta C_{T, X} - \Delta C_{T, kb}$ ($C_{T, x}$: Thresholdwert für die endogene Amplifikationskontrolle; $C_{T, kb}$: Threshold für den normalisierten Wert der Zielsequenz des Kalibrators; Kalibrator : Probe, die als Grundlage für die Erstellung vergleichender Ergebnisse dient (hier: C57BL/6J-Mäuse)) Die Expressionsrate des untersuchten Genes wurde als prozentualer Anteil der Expression des Kalibrators angegeben. War die Expressionsrate des untersuchten Gens höher als die des Kalibrators, war das untersuchte Gen hoch reguliert. War sie niedriger, war das Gen herunter reguliert.

3.4.4 Proteinextraktion

Die Gewebe wurden wie oben beschrieben gesammelt. Das Pellet wurde für 30 Minuten in 500 μl *Protein Extraction Buffer I* inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde diesmal mit 500 μl *Protein Extraction Buffer I* überschichtet und für 15 Minuten inkubiert (auf Eis). Der Überstand wurde gesammelt und enthielt die Kernproteine. Wurde eine Gesamt-Proteinanalyse durchgeführt, wurden beide Proteinfractionen vereint.

3.4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die extrahierte Proteinmenge wurde photometrisch, nach der Bradford-Methode bestimmt. Vor jeder Messung wurde eine Eichgerade mit BSA angefertigt. Die Proben wurden jeweils zweimal gemessen, der Wert einer Wasserprobe wurde jeweils vom Messwert abgezogen.

3.4.4.2 Protein-Array

Fast alle zellulären Funktionen werden durch Proteine vermittelt. Für die Bestimmung der Expression eines bestimmten Gens ist es wichtig, neben der mRNA auch das tatsächliche Protein zu messen, da es zwischen diesen beiden Werten zu Diskrepanzen kommen kann. RNA kann beispielsweise nach der Transkription abgebaut oder durch andere Prozesse an der Translation gehindert werden. So muss ein hoher mRNA-Wert nicht auch gleichzeitig einem hohen Protein-Wert entsprechen. Protein-Arrays sind sehr nützlich, da sie es erlauben, die Menge einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine mit einer Messung zu bestimmen. Auf dem Array, den wir uns von RayBiotech Inc. für unsere Bedürfnisse eigens haben zusammenstellen lassen, sind die Antikörper auf einer Nylon-Membran gebunden. Die Durchführung richtete sich strikt nach den Vorgaben des Herstellers. Alle Puffer und Lösungen wurden zusammen mit den Membranen gebrauchsfertig geliefert. In unserem Fall waren die Membranen mit Antikörpern gegen IFN- γ , IL-2, IL-15, IL-21, IL-10, IL-12p70, MCP-1, MIP-1 α , TNF α und VEGF bestückt. Bevor die Proben auf die

Membranen gegeben werden konnten, mussten diese mit 1 x Blocking Puffer vorbehandelt werden, dies geschah über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgegossen und die Membranen mit 100 µg des Proteins der zu untersuchenden Probe überschichtet. Nach einer 2 stündigen Inkubationszeit wurde die Probe entfernt und die Membranen je drei mal mit je 2 ml Wasch-Puffer I und anschließend mit Wasch-Puffer II gewaschen (jeweils 5 Minuten). Die Membranen wurden zur Detektion der Proteine mit einem biotinylierten anti-Maus Antikörper-Cocktail überschichtet und 2 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden die Membranen wie oben beschrieben gewaschen. Nun wurden die Membranen mit streptavidinkonjugiertem HRP über Nacht inkubiert (bei 4°C). Am nächsten Morgen wurden die Membranen wieder gewaschen. Jede Membran wurde dann mit 0,5 ml einer frisch angesetzten Substratlösung beschichtet. Nach der 2 minütigen Inkubation wurden die Lösung von der Membran gekippt und mit einem Labortuch so gut wie möglich getrocknet, ohne die Oberfläche der Membran zu berühren. Die Membranen wurden zwischen zwei Plastikfolien eingespannt und so schnell wie möglich zum Auslesegerät transportiert. Die Auswertung erfolgte am IL350 von GEHealthcare mit Hilfe der Imagequant TL-Software.

3.5 Generierung von DC und adoptiver Transfer

Zellen für die *in vitro* Generierung von DC wurden aus Ober- und Unterschenkelknochen von C57Bl/6J Mäusen (Spender Mäuse) gewonnen. Mit Hilfe einer 26G Kanüle wurden diese anschließend mit etwa 5 ml Medium von jeder Seite ausgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden durch einen Cell-Strainer (100µm) gegeben und mit Medium gewaschen (250g, 10 min, 20°C). Das Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und anschließend die Vitalität der Zellen bestimmt (Trypanblau-Färbung). 1,25 x 10⁶ Zellen wurden in 5 ml BMDC-Medium mit 20 ng/ml rekombinantem murinen GM-CSF ausgesät. Am dritten Tag der Kultur wurde neues Medium hinzugegeben, am Tag 6 wurden 5 ml des Überstandes verworfen und mit 5 ml frisches Medium ausgetauscht. Nach 8 Tagen wurde der Überstand gesammelt und leicht adhärente Zellen durch Spülen mit Medium von den Kulturschalen gelöst. Um eine möglichst große Zellausbeute zu erzielen, wurden die rest-

lichen Zellen (adhärenten Zellen) durch 5-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA und anschließendem Spülen mit Medium gelöst. Nach Zentrifugation (300g, 10 min, 20°C) wurden die Zellen am Coulter ACT 8 gezählt und erneut pelletiert. Für den adoptiven Transfer wurden den Empfänger-Mäusen ($\beta 7^{-/-}$) etwa $1,5 \times 10^7$ der generierten Knochenmarks-DC (*bone marrow derived dendritic cells*, BMDC) in 200 μ l sterilem PBS resuspendiert.

3.6 Isolation von Leukozyten aus feto/maternalen Einheiten

Für die Isolierung der uterinen NK-Zellen wurde die MACS- (*magnetic assisted cells sorting*) verwendet. Nach dem Kollagenaseverdau wurden die Zellen gewaschen und gezählt. Um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper zu minimieren, wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten auf Eis mit FC-Block (0,25 μ g/ 1×10^7 Zellen) inkubiert. Zum Markieren der uNK Zellen wurden die Thy1.2 magnetic Beads von Miltenyi verwendet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen und auf eine MACS-Säule gegeben. Um schwach gebundene Thy1.2 negativen Zellen aus der Säule zu lösen, wurde diese im Anschluss noch drei mal mit je 1 ml MACS-Puffer gespült. Um die uNK Zellen aus der Säule zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und mit 1 ml MACS-Puffer gefüllt. Der MACS-Puffer wurde dann unter Verwendung von Druck mittels eines Pistills durch die Säule gepresst. Bei diesem Vorgang lösen sich die durch die paramagnetischen Kügelchen an die Säule gebundenen Thy1.2 positiven Zellen ab und lassen sich in einem geeigneten Gefäß sammeln. Die so gewonnenen Zellen wurden gewaschen und in 100 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Ein Teil dieser Probe wurde am FACS gemessen, um die Effektivität der Prozedur zu überprüfen. Der Rest wurde für Expressionsstudien verwendet, wahlweise auf Protein- oder RNA-Ebene.

3.6.1 Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten und BMDC

Das Pellet wurde in 100 μ l PBS resuspendiert. Um eine unspezifische Bindung der monoklonalen Antikörper zu verhindern, wurde die Probe für 10 Minuten mit 10 Prozent (10 μ l) NMS und Fc-Block blockiert. Die Inkubation fand bei 4°C statt. Im Anschluss

konnten die Antikörper (anti CD11c-APC, anti CD19-APC-Cy7, anti CD3e-PE, DBA-FITC, Thy1.2-PerCP je $1\mu\text{l}$) zu der Probe gegeben werden. Der so gefärbte Ansatz wurde im Dunkeln bei 4°C für 15 Minuten inkubiert, anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 4°C , 1200 rpm) und in $500\mu\text{l}$ PBS resuspendiert. Die so gewonnene gefärbte Zellsuspension wurde am Durchflusszytometer gemessen.

3.7 Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Für den statistischen Vergleich von Versuchsgruppen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und der ungepaarte Mann-Whitney-U Test angewendet. Das Ergebnis wurde für $p < 0,01$ als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Bedeutung der vaskulären Adressine bei der Rekrutierung von dendritischen Zellen in den schwangeren Uterus der Maus

Die endothelialen Adhäsionsmoleküle MAdCAM-1 und P-Selektin (PS) werden im Uterus selektiv auf den mütterlichen Blutgefäßen der vaskulären Zone während der ersten Hälfte der Schwangerschaft exprimiert. Beide sind an der Rekrutierung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin ($\beta 7^+$) exprimierenden Leukozyten in den schwangeren Uterus der Maus beteiligt [17]. Die Mehrzahl dieser $\beta 7^+$ Zellen sind myeloide dendritische Zellen (DC) [26] die durch die gleichzeitige Expression von CD11c und CD11b charakterisiert sind. Sie tragen keine linienspezifische Marker für T-, B- oder NK-Zellen (Abb. 4.1). Der letzte Schritt bei der Extravasation wird zusätzlich über vaskuläres ICAM-1 kontrolliert, es wird auf allen mütterlichen Gefäßen innerhalb des schwangeren Maus-Uterus exprimiert. Die Blockierung von MAdCAM-1 in schwangeren Wildtyp- (WT, C57BL/6J) oder PS^{-/-}-Mäusen mit Hilfe des mAk MECA367 vom Tag 7 bis 10 der Schwangerschaft oder das Fehlen von ICAM-1 wie bei ICAM-1^{-/-}-Mäusen führt zu einer verminderten Einwanderung von CD11c⁺ CD11b⁺ dendritischen Zellen in den schwangeren Uterus der Maus, im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Mäusen und solchen, die mit dem mAk HERMES-1 gegen humanes CD44 behandelt wurden [17, 49]. In Tabelle 4.1 ist eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse zu sehen. $\beta 7$ -Integrin *knock-out* Mäusen, denen das β -Integrin fehlt (β ^{-/-}-Mäuse) sind ebenfalls durch das Fehlen von myeloiden CD11c⁺ dendritischen Zellen an der mütterlich/fetalen-Grenzschicht charakterisiert [17].

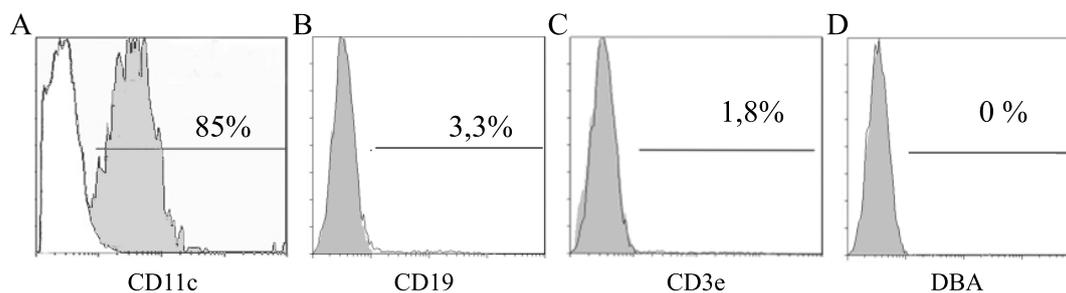


Abbildung 4.1: Durchflusszytometrische Analyse der $CD11c^+ \beta7^+$ DC im Uterus der schwangeren Maus am Tag 11 der Schwangerschaft. Die Histogramme A-D) zeigen die Expression von CD11c, CD19, CD3e und DBA. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei verschiedenen Messungen.

4.2 Der Einfluss von dendritischen Zellen auf die Entwicklung uNK-Zellen

Die Untersuchungen zur Bedeutung der vaskulären Addressine bei der Rekrutierung von DC in den schwangeren Uterus der Maus zeigten, dass sich das Fehlen der DC im Uterus negativ auf die Entwicklung von uNK-Zellen ausgewirkt [17]. Uteri mit verminderter bzw. fehlender Rekrutierung von DC waren durch geringere Anzahl und Größe von uNK-Zellen charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss der DC auf die Entwicklung von uNK-Zellen genauer untersucht. Zunächst wurde dafür eine Charakterisierung und Quantifizierung von uNK-Zellen in Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) durchgeführt.

4.2.1 Charakterisierung der uNK-Zellen

Die Charakterisierung der uNK-Zellen wurde vorwiegend am Tag 11 der Schwangerschaft in verschiedenen Bereichen des schwangeren Uterus der Maus durchgeführt. Dieser Tag wurde gewählt, da in diesem Stadium der Schwangerschaft die uNK-Zellen ihre maximale Anzahl erreichen und sie in der gesamten Decidua basalis bis hin zum Trophoblasten zu finden sind [50, 51, 52]. Um die Bezeichnung der einzelnen Bereiche im Uterus zu vereinfachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Terminologie von Paffaro et al. [39] verwendet. Hierbei wird der Uterus in vier Zonen aufgeteilt. Die erste Zone (Zone I) umfasst

Tabelle 4.1: Einwanderung von DC im Rahmen von Inhibitionsstudien bei *knockout*- und Wildtyp-Mäusen.

Test-Gruppe ¹	CD11c ⁺	CD11c ⁺ CD11b ⁺
C57BL/6J	6,3 ± 0,8	4,2 ± 0,9
C57BL/6J + HERMES-1	7,2 ± 0,8	5,9 ± 0,6
C57BL/6J + MECA367	5,6 ± 0,4	1,5 ± 0,5*
ICAM-1 ^{-/-}	2,7 ± 1,3*	0,4 ± 0,3*
PS ^{-/-} +MECA 367	1,9 ± 0,4*	0,3 ± 0,1*

¹Effekt des blockierenden Antikörpers MECA367 in WT und PS^{-/-}-Mäusen oder des Fehlens von ICAM-1 wie bei ICAM-1^{-/-}-Mäusen auf die Anzahl CD11c⁺ DC und myeloider CD11c⁺ CD11b⁺ DC im schwangeren Uterus der Maus. Die Injektion von HERMES-1 hatte keinen Einfluss auf die Rekrutierung von DC. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen pro 0,25mm² innerhalb der vaskulären Zone. (Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz), n=3)

das Myometrium und die MLAp, die Zone II liegt in der zentralen Decidua basalis, als Zone III wird der Grenzbereich zwischen der Decidua und dem Trophoblasten bezeichnet und Zone IV befindet sich in der vaskulären Zone (Abb. 4.2). Zunächst wurde mit Hilfe typischer uNK-Zellmarker (Thy1.2 und DBA) und einem allgemeinen NK-Zellmarker (NK1.1) eine Verteilungsanalyse durchgeführt (Abb. 4.2 D). DBA ist ein Lektin, dass an endständiges N-Acetylgalactosamin auf den Membranen und intrazellulären Granula der uNK-Zellen bindet [39]. Die Charakterisierung und Quantifizierung der uNK-Zellen erfolgte am Mikroskop. Die Größe der Zellen wurde mit der Software Adobe Photoshop CS3 bestimmt.

Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass es sich bei den uNK-Zellen nicht um eine homogene Gruppe von Zellen handelte, sondern um Zellen die durch ein unterschiedliches Expressionsmuster der oben aufgeführten Oberflächenmarker charakterisiert sind. Es konnten drei Gruppen beobachtet werden: 1. NK1.1⁺Thy1.2⁺DBA⁻-Zellen, 2. NK1.1⁻Thy1.2⁺DBA⁻-Zellen, 3. NK1.1⁻Thy1.2⁺DBA⁺-Zellen. Diese drei Gruppen unterschieden sich nicht nur bezüglich der Expression der verwendeten Markern, sondern auch durch ihre Lokalisation (Abb. 4.2) und ihre Größe (Abb. 4.3). In der Zone I konnten

am Tag 11 der Schwangerschaft alle drei uNK-Zell-Subpopulationen gefunden werden. Die uNK-Zellen in dieser Zone sind im Vergleich zu den uNK-Zellen in den anderen Zonen klein ($14\mu\text{m} \pm 1,6$). In der Zone II, III und IV finden sich nur noch die uNK-Zell-Populationen die nicht NK1.1 exprimieren. Die Größe der Zellen in diesen Bereichen nahm mit Annäherung an den Trophoblasten zu. Allerdings beschränkt sich die Größenzunahme auf die $\text{NK1.1}^- \text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^+$ uNK-Zell-Subpopulation. Diese hatten eine durchschnittliche Größe von $23,4\mu\text{m} \pm 2,8$, wobei einzelne Zellen eine Größe von bis zu $48\mu\text{m}$ erreichten. Die Zellen der $\text{NK1.1}^- \text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^-$ uNK-Zell-Subpopulation nahmen nicht signifikant an Größe zu, sie hatten weiterhin eine durchschnittliche Größe von ca.

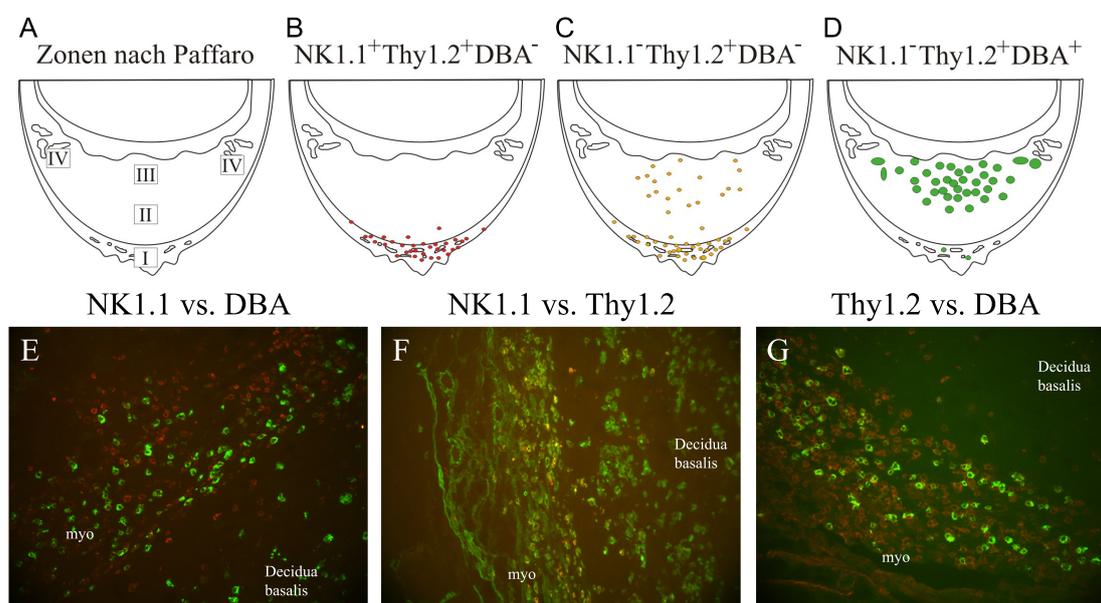


Abbildung 4.2: Verteilung von uNK-Zell-Subpopulationen im Uterus. A-D) Schematische Darstellung des Uterus am Tag 11 der Schwangerschaft. A) Zonen nach Paffaro et al. [39], B) Lokalisation der $\text{NK1.1}^+ \text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^-$, C) der $\text{NK1.1}^- \text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^-$ -Zellen und D) der $\text{NK1.1}^- \text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^+$ -Zellen. Als Beispiel für die unterschiedliche Expression der Oberflächenmarker auf den uNK-Zellsubpopulationen sind in E-G Fluoreszenzfärbungen gezeigt. Gefärbt wurde jeweils mit PE konjugierten NK1.1 mAk und FITC konjugierten DBA-Lektin (E), PE konjugierten NK1.1 mAk und FITC konjugierten Thy1.2 mAk (F) und PE konjugierten Thy1.2 und FITC konjugierten DBA-Lektin (G). Aufgenommen wurden die Bilder bei einer 100x-Fachen Vergrößerung.

$14\mu\text{m} \pm 4,4$. Obwohl diese Zellpopulation im gesamten Uterus zu finden ist, befindet sich ihr Hauptvorkommen in den Zonen I und II. In den Zonen III und IV sind nur noch vereinzelte $\text{NK1.1}^- \text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^-$ uNK-Zellen zu finden.

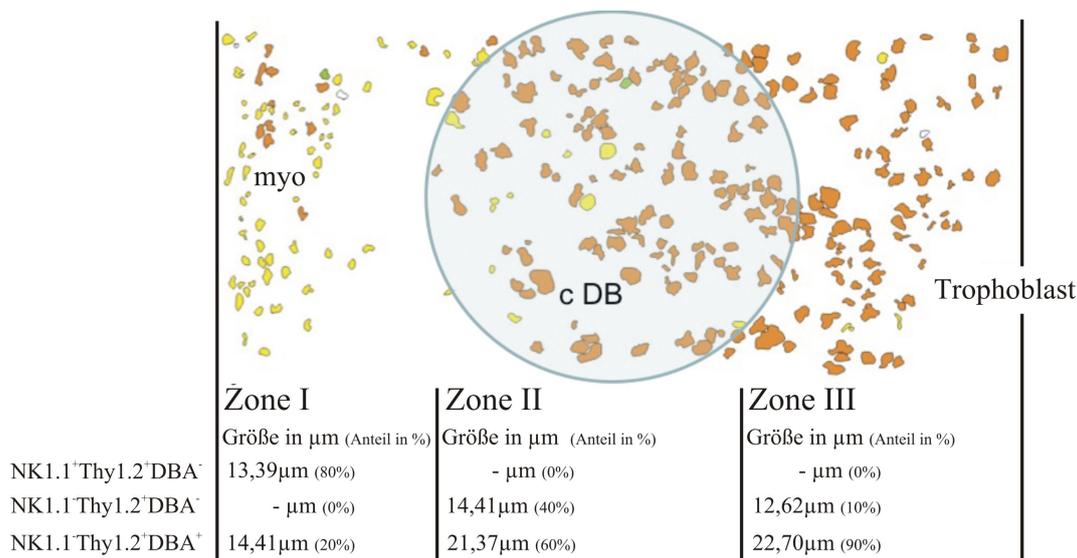


Abbildung 4.3: Unterschiedliche Verteilung der uNK-Zellpopulationen im Uterus der Maus. Originalgetreue Übertragung von einem Gewebe-Schnitt einer C57BL/6J Maus-Uterus am 11. Tag der Schwangerschaft. myo = Myometrium, cDB = zentrale Decidua basalis. Gelb = $\text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^-$ (in Zone I auch NK1.1^+), Orange = $\text{Thy1.2}^+ \text{DBA}^+$. In der Tabelle sind neben der Durchschnittsgröße der uNK-Zellen in den einzelnen Regionen auch die prozentuale Verteilung der einzelnen Subpopulationen angegeben.

4.2.2 Interaktion zwischen uNK-Zellen und DC in der Decidua basalis

DC scheinen einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung von uNK-Zellen zu haben. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass es Interaktionen zwischen DC und uNK-Zellen im Bereich der zentralen Decidua basalis gibt. Diese DC wandern über die vaskuläre Zone in die Decidua basalis ein und verweilen dort [26]. In diesem Bereich wurde eine Vielzahl an uNK-Zellen beobachtet, die sich in einem engen Kontakt zu DC befanden (Abb. 4.4). Bei Färbungen mit mAk gegen stromales ICAM-1 konnte festgestellt werden, dass dieser Bereich eine sehr niedrige Expression von stromalem ICAM-1 aufweist (Abb. 4.5). Unreife uNK-Zellen der MLAp sind an dieser Interaktion nicht beteiligt, daher

wurden sie für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt.

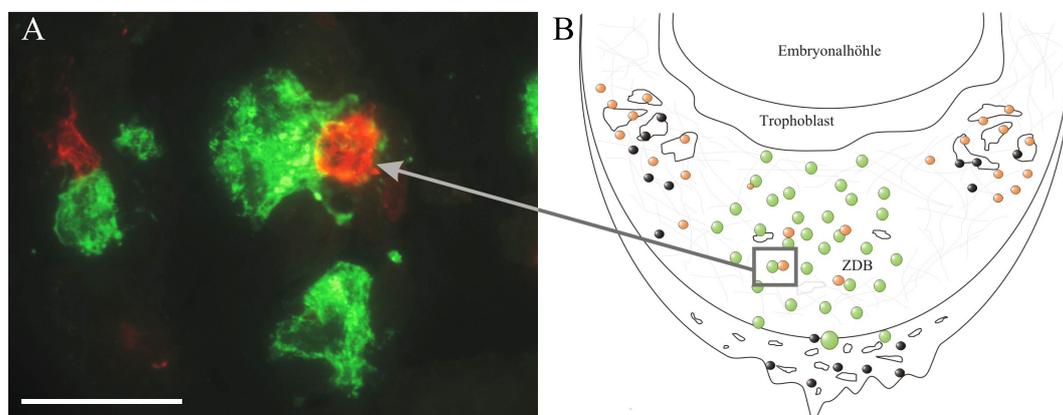


Abbildung 4.4: Interaktion zwischen uNK-Zellen und DC innerhalb der Decidua basalis. Gezeigt ist in A) die Interaktion zwischen einer uNK-Zellen und einer DC am Tag 11 der Schwangerschaft innerhalb der Decidua basalis. Gefärbt wurde mit PE konjugiertem anti-CD11c mAk und FITC konjugiertem DBA-Lektin. Balken = 50 μ m. B) Schematische Darstellung des schwangeren Uterus am Tag 11 der Schwangerschaft mit unterschiedlichen DC Subpopulationen. zDB = zentrale Decidua basalis.

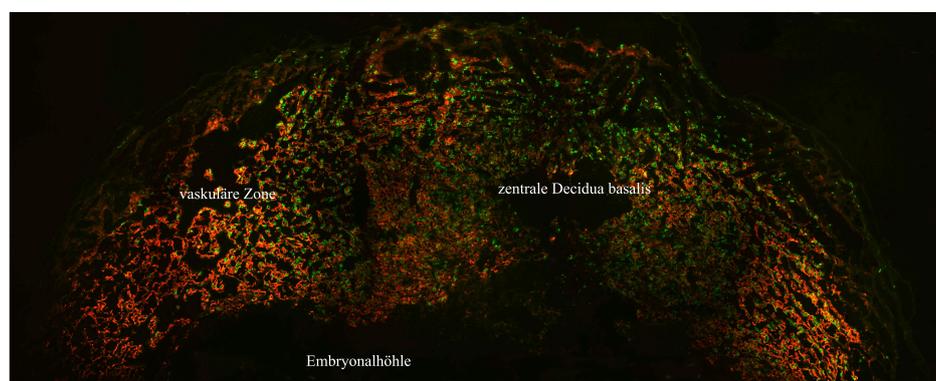


Abbildung 4.5: uNK-Zellen in einem Bereich mit niedriger ICAM-1-Expression. Gezeigt ist ein Querschnitt eines Uterus aus einer C57Bl/6J Maus am Tag 11 der Schwangerschaft. Die unterinen NK Zellen (grün, mit DBA-FITC gefärbt) befinden sich in einem Bereich mit niedriger ICAM-1 Expression (rot, ICAM-1-PE gefärbt). 100-fache Vergrößerung.

4.3 Eine verminderte Einwanderung von DC in den schwangeren Uterus führt zu einer reduzierten Anzahl und Größe von uNK-Zellen

Die Auswirkungen, die eine verminderte Einwanderung myeloider DC auf die Entwicklung der uNK Zellen hatte, wurde ebenfalls am Tag 11 der Schwangerschaft untersucht. Dazu wurden zunächst Größe und Anzahl der uNK-Zellen bestimmt. Hierfür wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem mAk Thy1.2 und dem Lektin DBA durchgeführt. Von den so gefärbten Schnitten wurde Fotos angefertigt, die mit Hilfe von Photoshop CS3 extendet ausgewertet wurden. Auf einer definierten Fläche von $0,25 \text{ mm}^2$ wurden Thy1.2⁺ DBA⁺ Zellen ausgezählt. Pro Schnitt wurde dies für 5 Zählfelder, pro Uterus für 10 Schnitte und pro Maus für 3 FMEs durchgeführt und an drei Mäusen untersucht. Der unreife uNK-Zellen enthaltene Bereich der MLAp (Zone I) wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Alle Untersuchungen wurden an syngenen Schwangerschaften von Mäusen mit einem C57BL/6J Hintergrund (Wildtyp, ICAM-1^{-/-}, PS^{-/-} + MECA367) am Tag 11 der Schwangerschaft durchgeführt. Bei ICAM-1^{-/-}-Mäusen, als auch bei MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen, bei denen die Einwanderung der CD11c⁺ CD11b⁺ DC gehemmt war, wurde eine signifikant verringerte Anzahl als auch Größe der uNK-Zellen im Vergleich zum WT festgestellt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Thy1.2-PE (rot) und DBA-FITC (grün) gefärbten uNK-Zellen innerhalb der Decidua basalis zeigen den Unterschied bezüglich der Anzahl und Größe zwischen Wildtyp und den ICAM-1^{-/-}- bzw. MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen Abb. 4.6 A-C).

4.4 Eingeschränkte Entwicklung der uNK-Zellen führt zu einer Verminderung ihrer Funktion

uNK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung des mütterlichen uterinen Gefäßbettes, die Invasion des Trophoblasten als auch für die Implantation und Entwicklung der Plazenta. Diese Aufgabe der NK-Zellen erfolgt über die Produktion einer

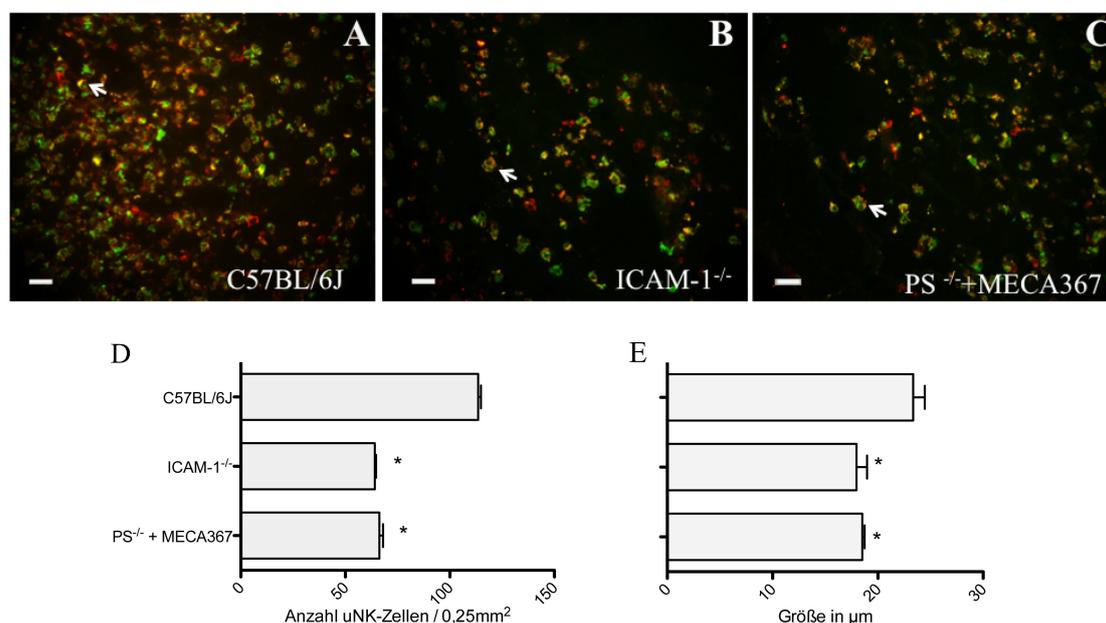


Abbildung 4.6: Anzahl und Größe von uNK-Zellen gemessen in Mäusen mit inhibierter Rekrutierung von DC in den schwangeren Uterus im Vergleich zum Wildtyp. A-C Immunfluoreszenz-Färbung von C57BL/6J-, ICAM-1^{-/-} bzw. MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen, am Tag 11 der Schwangerschaft. uNK-Zellen wurden mit Thy1.2-PE (rot) und DBA-FITC (grün) gefärbt, doppelpositive Zellen sind gelb (Pfeil). Der Balken entspricht 50µm. D) Anzahl uNK-Zellen im Uterus für C57BL/6J-, ICAM-1^{-/-} und MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen auf einer Fläche von 0,25 mm². E) Durchschnittliche Größe dieser Zellen in µm. Die Balken zeigen den Mittelwert ± SD von drei Mäusen pro untersuchter Gruppe. Signifikanz wurde mithilfe des Mann-Whitney U-Tests berechnet, wobei ein p<0,01 als signifikant angesehen wurde. n=3.

Vielzahl von löslichen Faktoren wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Eines der wichtigsten von den uNK-Zellen in diesem Zusammenhang produzierten Zytokine ist IFN- γ . Daher wurde untersucht, ob sich neben der Auswirkung auf die Größe und Anzahl der uNK-Zellen auch eine Veränderung in der IFN- γ Expression im Gewebe des schwangeren Uterus bei Mäusen mit verminderter Einwanderung CD11c⁺ CD11b⁺ DC nachweisen lässt.

Hierfür wurde mit Hilfe der *real time* RT-PCR die Expression von IFN- γ bei Leukozyten, die aus dem Uterus isoliert wurden am Tag 11 der Schwangerschaft in Wildtyp-,

ICAM-1^{-/-}- bzw. MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die IFN- γ Expression bei ICAM-1 defizienten bzw. mit MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant niedriger war. Sie exprimierten nur etwa 25 % - im Falle der ICAM-1^{-/-}-Mäuse - und 30% - im Falle der mit MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäuse - der IFN- γ Menge, die in Wildtyp-Mäusen gemessen wurde (Abb 4.7 A). Eine weitere Frage war, ob die Reduktion der IFN- γ Expression im Gewebe des schwangeren Uterus nur auf die verringerte Anzahl der uNK-Zellen zurückzuführen war oder ob die uNK-Zellen in ihrer Funktion beeinträchtigt waren. Dazu wurden uNK-Zellen die eine Reaktivität mit DBA und Thy1.2 zeigten über anti-Thy1.2 gelabelte Mikrobeads aus dem schwangeren Uterus von Wildtyp-, ICAM-1^{-/-}- bzw. MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen am 11. Tag der Schwangerschaft isoliert (Reinheit 88 %). Für die Untersuchung der Expression wurden die Zellen aus den Testgruppen und Kontrollen auf die gleiche Zellzahl eingestellt (1×10^6), anschließend wurde die mRNA extrahiert und

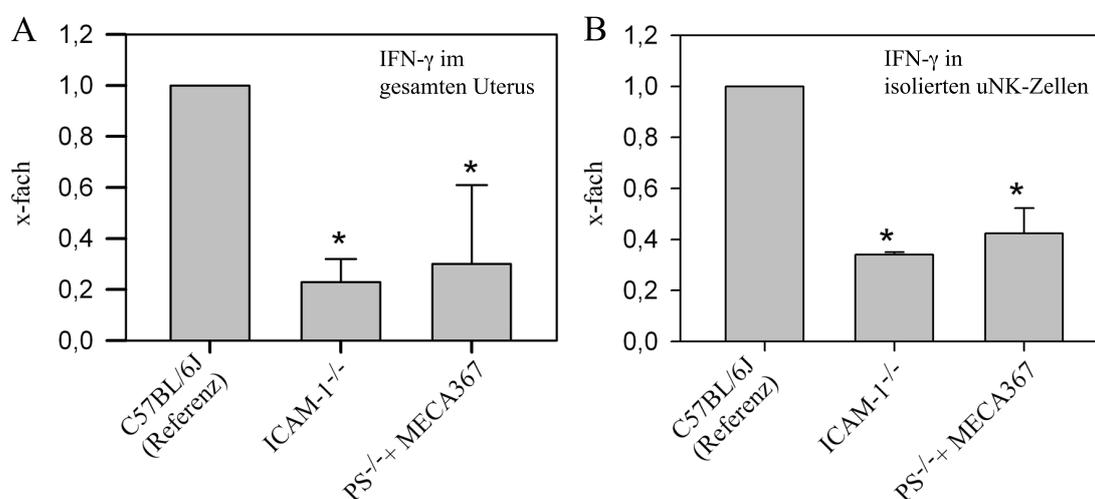


Abbildung 4.7: IFN- γ -Expression von C57BL/6J-, ICAM-1^{-/-}- und MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen. In A) ist die IFN- γ Expression für die Gesamtheit aller Zellen im Uterus angegeben. B) Zeigt die Ergebnisse für die Expression von IFN- γ in isolierten uNK-Zellen (Reinheit 88 %). C57BL/6J diente als Referenz, deren Expression mit 1 gleichgesetzt wurde. Die Expressionen der ICAM-1^{-/-}- und PS^{-/-} + MECA367-Mäuse wurde zur Referenz mit Hilfe der $\Delta\Delta$ ct-Methode ins Verhältnis gesetzt. Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz) n=3.

die Expression von IFN- γ gemessen (Abb 4.7 B). Das Ergebnis zeigt, dass die Funktion der uNK-Zellen in Mäusen mit verminderter Einwanderung von DC im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen stark reduziert war. So lag die Menge an IFN- γ , die in ICAM-1^{-/-}-Mäusen gemessen wurde bei 34% und die in PS^{-/-}-Mäusen bei 42% im Vergleich zu der, die in Mäusen des Wildtyps gemessen wurde. Die Unterschiede waren jeweils hoch signifikant ($p < 0,01$).

4.4.1 Untersuchung der Histologie des Uterus von ICAM-1^{-/-}- und MECA367 behandelter PS^{-/-}-Mäusen am Tag 11 der Schwangerschaft

Um zu überprüfen, ob sich eine verminderte IFN- γ -Produktion auf die Ausbildung der mütterlichen Gefäße und die Zellularität der Decidua basalis auswirkt, wurden histologische Untersuchungen an Diff-Quick gefärbten Kryostatschnitten vom Tag 11 des schwangeren Uterus durchgeführt. Wie in Abb. 4.8 A-C dargestellt ist, ist die Wandmuskulatur der mütterlichen Gefäße bei Mäusen mit verminderter Anzahl, Größe und Funktionalität der uNK-Zellen stark verdickt.

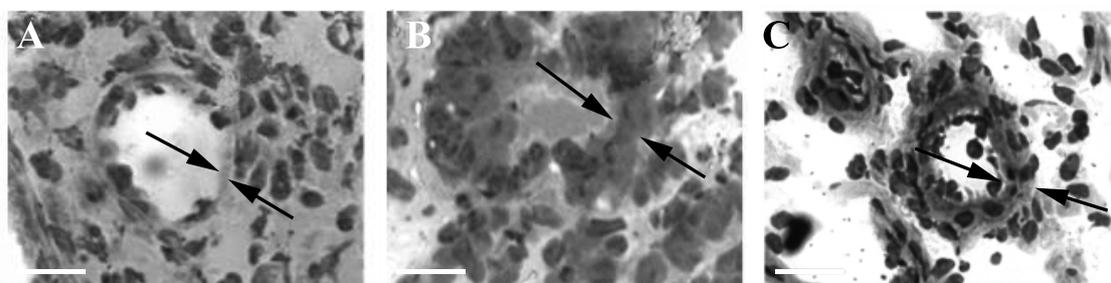


Abbildung 4.8: Darstellung mütterlicher Gefäße innerhalb der Decidua basalis. Dargestellt sind die Gefäßwände von C57BL/6J- (A), ICAM-1^{-/-} (B) und MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen am Tag 11 der Schwangerschaft. Die Schnitte von ICAM-1^{-/-}- und mit MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen hatten eine dickere Gefäßwandmuskulatur als die C57BL/6J-Mäuse. Balken = 30 μ m. Die Pfeile zeigen auf die Innen- und Aussenwand der Gefäße. Balken=30 μ m. Die dargestellten Gefäße sind repräsentativ für jeweils vier Mäuse.

Ein wichtiger Indikator neben der reinen phänotypischen Begutachtung der Blutgefäße

stellt die Berechnung des Verhältnisses vom Durchmesser des gesamten Blutgefäßes zu dessen Lumen dar [46]. Bei Mäusen des Wildtyps lag dieses Verhältnis bei $1,40 \pm 0,13$. ICAM-1^{-/-}-Mäuse hatten stark verdickte Gefäßwände, daher stieg das Verhältnis auf $1,98 \pm 0,26$ an. Das gleiche galt für PS^{-/-} + MECA367, bei diesen stieg das Verhältnis zwischen dem Gefäßdurchmesser zum Gesamtdurchmesser der Spiral-Arterie auf $1,96 \pm 0,24$ an (4.2).

Tabelle 4.2: Verhältnis des Gefäßdurchmessers zum Gesamtdurchmesser der Spiral-Arterien.

Test-Gruppe²	Gefäß-/Gesamtdurchmesser-Ratio
C57BL/6J	$1,40 \pm 0,13$
ICAM-1 ^{-/-}	$1,98 \pm 0,26^*$
PS ^{-/-} +MECA 367	$1,96 \pm 0,24^*$

² Gemessen in Mäusen am Schwangerschaftstag 11 mit oder ohne beeinträchtigtter uNK Zell Entwicklung. (Ein p von $<0,01$ wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz) n=3)

Die Gefäße von Mäusen bei denen die Einwanderung CD11c⁺ CD11b⁺ dendritischer Zellen behindert ist und die durch eine eingeschränkte Differenzierung der uNK-Zellen charakterisiert sind, zeichneten sich durch ein höheres Verhältnis von Gefäßdurchmesser zum Lumendurchmesser aus.

4.4.2 Adoptiver Transfer von Wildtyp DC in $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse

Um die Beteiligung der DC an der Reifung der uNK-Zellen zu überprüfen, wurden adoptive Transferexperimente durchgeführt. Hierfür wurden Knochenmarkszellen aus Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) gewonnen und über 7 Tage in Gegenwart von GM-SCF kultiviert. Nach Ablauf der 7 Tage wurden aus dieser Kultur die CD11c⁺ Zellen (BMDC) mit Hilfe von anti-CD11c Microbeads isoliert. Die durchflusszytometrische Kontrolle der Aufreinigung ergab eine Reinheit von 85% CD11c⁺ Zellen. Die phänotypische Charakterisierung der Zellen mit mAk gegen CD11c, CD19, CD3e ergab das 84% der CD11c⁺-Zellen, CD11b exprimieren. Die Zellen zeigten keine linienspezifischen Marker für T- und B-Zellen. 3×10^6 dieser CD11c⁺ BMDC wurden in $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse täglich vom 7. bis zum 10. Tag *i.v.* injiziert. Für diese Versuche wurden $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse gewählt, da der Effekt, der in ICAM-1^{-/-}- bzw. in mit MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen zur verminderten Einwanderung der DC führt, nicht durch die Gabe von Wildtyp-DC kompensiert werden kann. In beiden Fällen kommt es zu der verringerten Einwanderung durch das Fehlen bzw. die Blockierung von vaskulären Adressinen in den mütterlichen Blutgefäßen. Bei $\beta 7^{-/-}$ -Mäusen fehlt das für die Interaktion mit MAdCAM-1 wichtige Integrin $\beta 7$, welches auf DC exprimiert wird und in der Rekrutierung dieser Zellen in den Uterus beteiligt ist [17]. Wie bei ICAM-1^{-/-}- bzw. bei mit MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen kommt es zu einer verminderten Einwanderung von CD11c⁺ CD11b⁺ DC und in Folge dessen zu einer im Vergleich zum Wildtyp verringerten Anzahl und Größe der uNK-Zellen [17]. Die Ergebnisse des adoptiven Transfers sind in Abb 4.10 dargestellt. Sowohl die Anzahl als auch die Größe der uNK-Zellen der mit BMDC behandelten $\beta 7^{-/-}$ -Mäusen entsprachen den Werten die für Wildtype-Mäuse gemessen wurden. Ebenfalls konnte eine Normalisierung der IFN- γ Expression und die damit eng zusammenhängende mütterliche Gefäßstruktur beobachtet werden (Tab. 4.3).

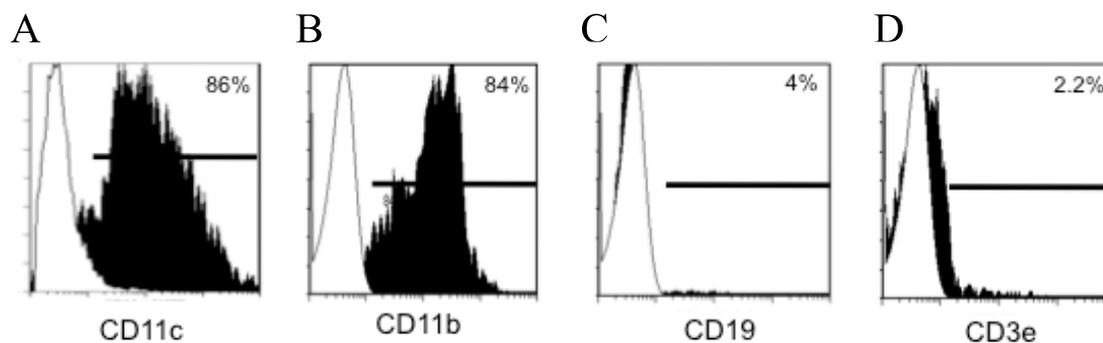


Abbildung 4.9: Charakterisierung der aus den Knochenmarkskulturen gewonnenen DC. Für den adoptiven Transfer wurden die aus den Wildtyp-Mäusen gewonnenen CD11c⁺ dendritischen Zellen mit Hilfe der MACS-Technik angereichert. Diese Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert (A-D). Es waren zu 84% CD11c⁺ CD11b⁺ (die Anzahl CD11b⁺-Zellen in (B) bezieht sich nur auf Zellen, die auch CD11c⁺ sind). Sie exprimierten keine linienspezifischen Marker wie CD19 oder CD3e. Das Ergebnis ist repräsentativ für 4 unabhängige Messungen.

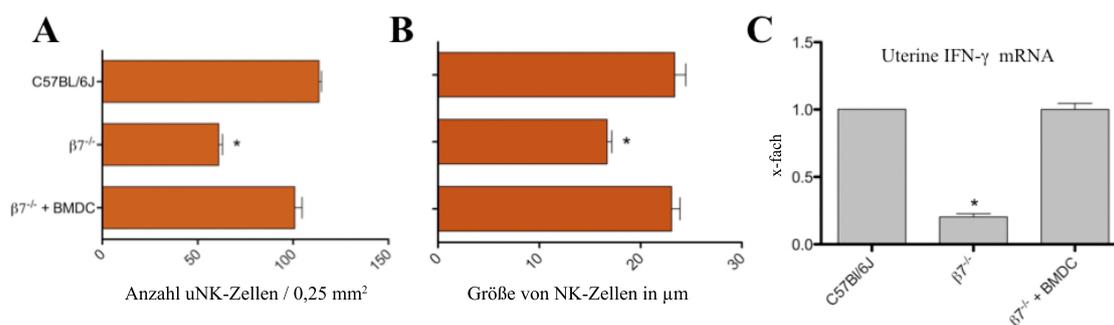


Abbildung 4.10: Adoptiver Transfer von BMDC in Mäuse mit verminderter Einwanderung von DC. BMDC wurden aus C57BL/6J-Mäusen (Wildtyp) gewonnen und in $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse injiziert. Die unbehandelten $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse sind durch eine reduzierte Anzahl und Größe von uNK-Zellen (A, B), eine erniedrigte IFN- γ -Expression (C) und ein erhöhtes Verhältnis von Gefäßdurchmesser zum Durchmesser des Lumens im Vergleich zum WT charakterisiert. 3×10^6 BMDC (Reinheit ca. 85 %) aus C57BL/6J-Mäusen wurden den $\beta 7^{-/-}$ -Mäusen täglich von Tag 7 bis zum Tag 10 der Schwangerschaft *i.v.* injiziert. Der adoptive Transfer der BMDC aus Wildtyp-Mäusen führte zu einer Normalisierung der Zellzahl, -größe (A, B) und der IFN- γ Expression der uNK-Zellen (C). Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD von mindestens drei Experimenten (* $p < 0,01$). Die Berechnung der Signifikanz (Wildtyp gegen Test-Gruppe) erfolgte mittels des Mann-Whitney U Tests.

Tabelle 4.3: Verhältnis des Gefäßdurchmessers zum Gesamtdurchmesser der Spiral-Arterie vor und nach adoptiven Transfer von BMDC.

Test-Gruppe ³	Gefäß-/Gesamtdurchmesser-Ratio
C57BL/6J	1,40 ± 0,13
$\beta 7^{-/-}$	2,00 ± 0,05*
$\beta 7^{-/-}$ + BMDC	1,53 ± 0,14*

³ gemessen in Mäusen am Schwangerschaftstag 11 mit oder adoptiven Transfer von 3×10^6 CD11c⁺ BMDC von Tag 7 bis Tag 10 im Vergleich zum Wildtyp. (Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz) n=3)

4.4.3 DC sind die Quelle für IL-12 und IL-15 im schwangeren Uterus der Maus

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Zytokinen wie z.B. IL-12 und IL-15 die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von NK-Zellen in der Peripherie induziert [53].

Im schwangeren Uterus der Maus scheint vor allem IL-15 eine entscheidende Rolle bei der Proliferation der uNK-Zellen zu spielen [54]. Um zu überprüfen, ob die Verringerung der Zahl der uNK-Zellen im Uterus von ICAM-1^{-/-} oder mit MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen auf eine reduzierte Menge IL-15 zurückzuführen war, wurde die mRNA-Expression von IL-15 am Tag 11 der Schwangerschaft untersucht. Zusätzlich wurde die Proteinmenge von IL-12 und IL-15 innerhalb dieser Gewebe bestimmt. In den Testgruppen mit verminderter Einwanderung der myeloiden DC konnten nur 30% (ICAM-1^{-/-}) bzw. 44% (PS^{-/-}+MECA367) der Menge an exprimiertem IL-15 nachgewiesen werden, die in den Kontrollmäusen gemessen wurde (Abb. 4.11 A). Neben der Messung der mRNA wurde außerdem die Proteinmenge über einen Protein-Array bestimmt.

Auch hier war die gemessene Menge an IL-15 deutlich unter der, die bei Referenzmäusen gemessen wurde. Mit Hilfe des Protein-Arrays konnte zusätzlich die Proteinmenge von IL-12 bestimmt werden. Die untersuchten Test-Gruppen wiesen auch hier eine signifikante Reduktion der Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 4.11 B und

C).

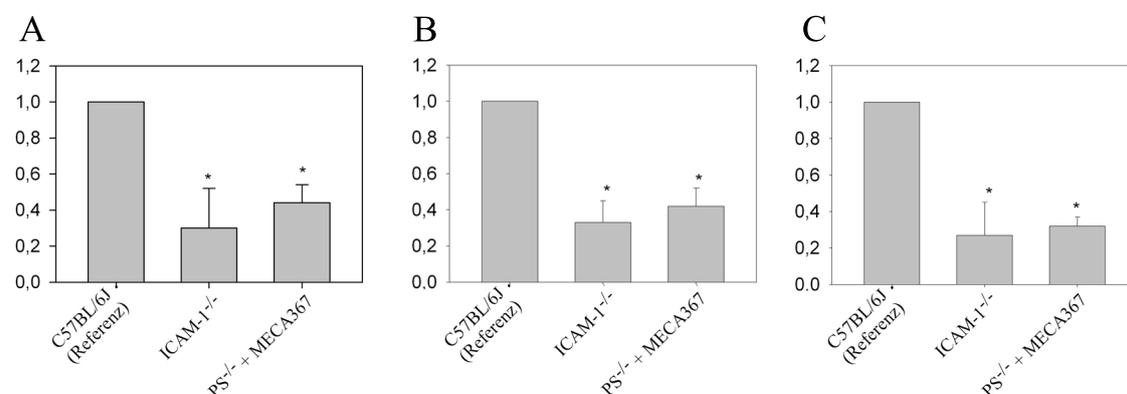


Abbildung 4.11: Expression von IL-12 und IL-15 in Uteri von Mäusen mit eingeschränkter Einwanderung von CD11c⁺ CD11b⁺ dendritischer Zellen. (A) Ergebnis der *real time* RT-PCR-Messung von IL-15 mRNA (B) und (C) zeigen die Ergebnisse der Messung von IL-15 und IL-12 auf Protein-Ebene bestimmt mit Hilfe eines Protein-Arrays (RayBiotech). Gemessen wurde dies in Uteri von ICAM-1^{-/-}, mit MECA367 behandelten PS^{-/-} und C57BL/6J-Mäusen (Referenz) am Tag 11 der Schwangerschaft. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SD, Für jede Testgruppe wurde mindestens 3 Tiere untersucht. Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz). n=3

Um zu überprüfen, ob die DC für die Produktion von IL-12 und IL-15 verantwortlich sind, wurden diese Zellen mit Hilfe von anti-CD11c Microbeads aus dem Uterus-Gewebe am Tag 9 der Schwangerschaft isoliert und durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Analysen zeigten, dass die isolierten DC keine linienspezifischen Marker für T-Zellen (CD3e) oder B-Zellen (CD19) exprimierten, zudem waren sie negativ für die uNK-Zellmarker Thy1.2 und DBA. Die Überprüfung der Reinheit der isolierten DC ergab einen Wert von 85%. Aus den Isolierten CD11c⁺-Zellen wurden Proteine extrahiert und auf die Expression von IL-12 und IL-15 hin untersucht. Beide Zytokine konnten in den Lysaten der uterinen DC detektiert werden (Abb. 4.12).

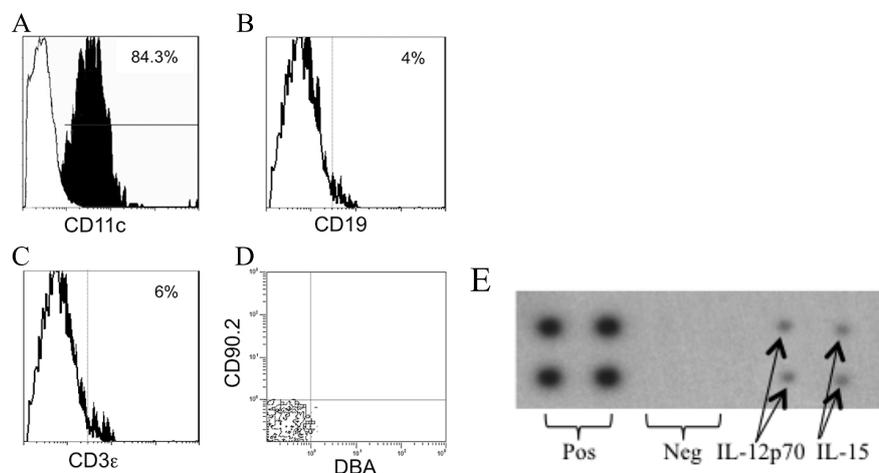


Abbildung 4.12: Dendritische Zellen exprimieren IL-12 und IL-15. Um herauszufinden, ob die DC eine Quelle für IL-12 und IL-15 darstellen, wurden $CD11c^+$ aus dem Uterus der Maus (C57BL/6J) isoliert am Tag 9 der Schwangerschaft mittels anti-CD11c Microbeads isoliert (Reinheit 85%). Die Zellen waren für CD11c positiv (A) und für CD19 (B), CD3 (D), DBA (E) negativ. Der IL-12 und IL-15 Gehalt dieser Zellen wurde mit einem Protein-Array (E) gemessen. Die Grafiken repräsentieren eines von drei Experimenten.

4.4.4 Substitution mit rIL-12 und rIL-15 stellte die Funktion von uNK Zellen in Uteri, denen $CD11c^+$ $CD11b^+$ dendritische Zellen fehlten, wieder her

Die bisher ausgeführten Ergebnisse wiesen auf eine Rolle der DC als wichtige Produzenten von IL-12 und IL-15 im schwangeren Uterus der Maus hin. Um zu überprüfen, in wie weit die Entwicklung der uNK-Zellen von dem Vorhandensein dieser Zytokine abhängt, wurden Substitutionsversuche durchgeführt. In diesen wurden den $ICAM-1^{-/-}$ bzw. den mit MECA367 behandelten $PS^{-/-}$ -Mäusen täglich an den Schwangerschaftstagen 7 bis 10 jeweils 50 U von IL-12 und IL-15 entweder einzeln oder in Kombination *i.p.* injiziert. Die alleinige Gabe von IL-15 führte zu einem Anstieg der Anzahl und Größe der uNK-Zellen in $ICAM-1^{-/-}$ bzw. in MECA367 behandelten $PS^{-/-}$ -Mäusen, die der von Wildtyp-Mäusen entsprach (Abb 4.13). Die Messung der $IFN-\gamma$ -Expression in den mit IL-15 behandelten Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Tieren. Die alleinige Gabe von IL-12 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl und Größe der

uNK-Zellen. Auch hier ließ sich bezogen auf IFN- γ -Expression kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Mäusen feststellen. Wurden IL-12 und IL-15 gleichzeitig den Mäusen von Tag 7 bis 10 der Schwangerschaft injiziert, konnte sowohl ein signifikanter Unterschied der Anzahl und Größe der uNK-Zellen als auch der IFN- γ -Expression im Vergleich zu den nicht mit Zytokinen behandelten ICAM-1^{-/-}- bzw. MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Die kombinierte Gabe dieser beiden Zytokine führte zu Werten, die denen entsprachen, wie sie bei den Wildtyp-Mäusen gemessen wurden. Bezogen auf die IFN- γ -Expression konnte dieses Ergebnis sowohl für den gesamten Uterus als auch für die isolierten uNK-Zellen bestätigt werden (Abb 4.14). IFN- γ spielt im Uterus eine wichtige Rolle bei der Gefäßaufweitung und Angiogenese. Bei Mäusen, denen DC im Uterus fehlten, konnten mütterliche Gefäße beobachtet werden, die im Vergleich zum Wildtyp verdickte Gefäßwände hatten. Da die Gabe von IL-12 und IL-15 zu einem Anstieg der IFN- γ -Expression führte, wurde überprüft, ob dieser Anstieg einen Einfluss auf den Phänotyp der Entwicklung der mütterlichen Blutgefäße hatte. Bezogen auf das Verhältnis zwischen dem Gesamtdurchmesser und des Lumendurchmessers der Gefäße zeigte sich, dass die alleinige Gabe von IL-15 oder IL-12 zu keinem signifikanten Unterschied des Verhältnisses im Vergleich zu den nicht mit Zytokinen behandelten Mäusen führte. Wurden beide Zytokine in Kombination injiziert, nahm die Dicke der Gefäßwände deutlich ab. Die Messung des Verhältnisses zwischen dem Gesamtdurchmesser und des Lumendurchmessers der Gefäße ergab, dass der Wert sich nicht signifikant von dem der Wildtyp-Mäuse unterschied (Abb 4.15 und Tab.4.4).

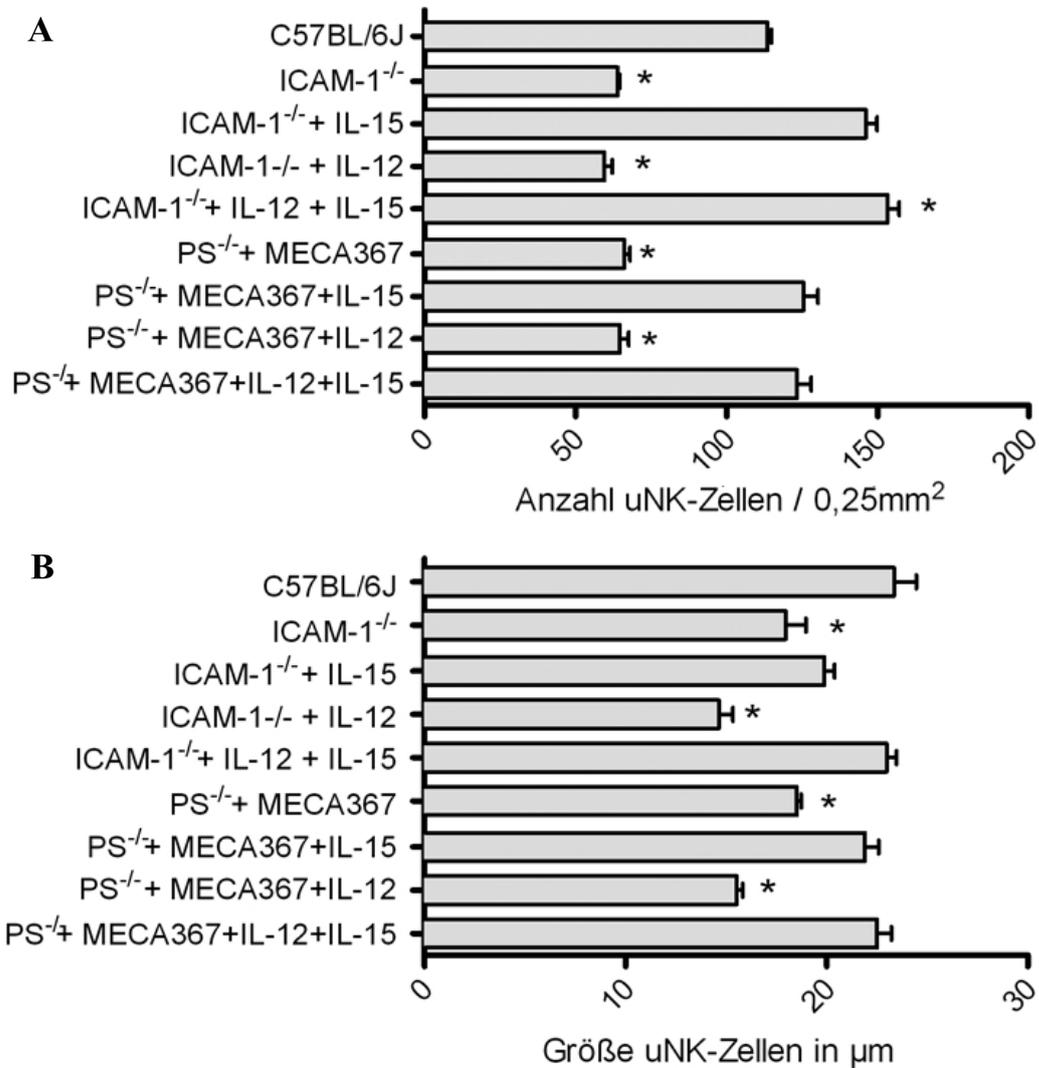
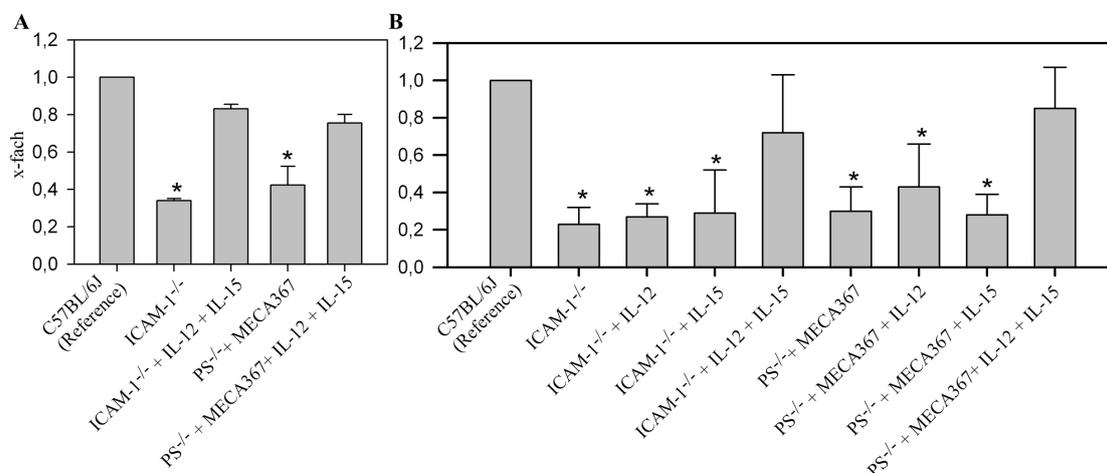
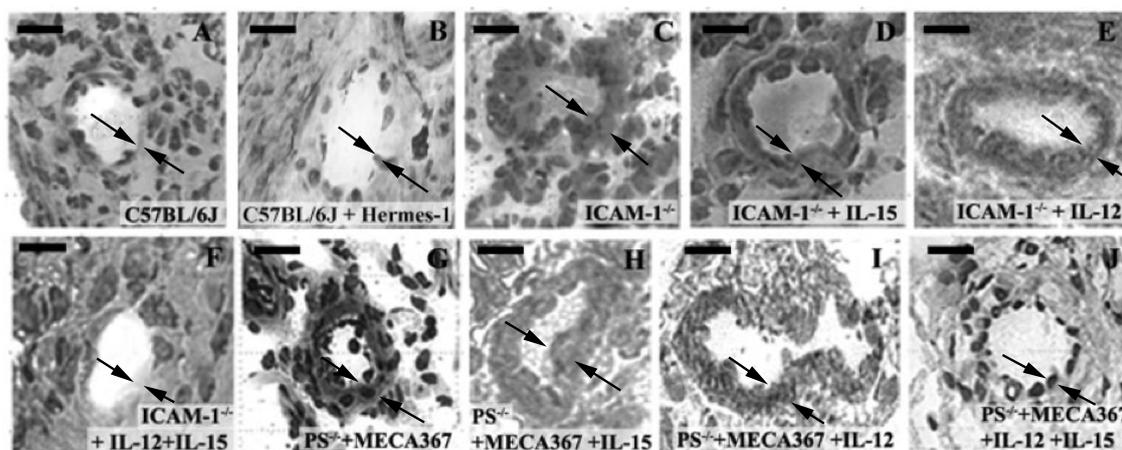


Abbildung 4.13: Veränderte Größe und Anzahl von uNK-Zellen in Mäusen die eine inhibierte Einwanderung von CD11c⁺ CD11b⁺ dendritischen Zellen in den Uterus aufweisen. (A) zeigt die Anzahl uNK-Zellen im Uterus für ICAM-1^{-/-} und MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen, mit oder ohne Injektion von IL-12, IL-15 oder IL-12 + IL-15 im Vergleich zum WT, auf einer Fläche von 0,25 mm². In (B) ist die durchschnittliche Größe dieser Zellen in µm dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD von drei Mäusen pro untersuchter Gruppe. Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz) n=3



Abbildungung 4.14: IFN- γ -Expression bei C56BL/6J- ICAM-1^{-/-}- und MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen, vor und nach Gabe von Zytokinen (IL-12, IL-15, IL-12 und IL-15) am Tag 11 der Schwangerschaft. (A) Ergebnisse für die Expression von IFN- γ in isolierten uNK-Zellen (Reinheit 88 %). In (B) ist die IFN- γ Expression für die Gesamtheit aller Zellen im Uterus angegeben. C57BL/6J diente als Referenz, die Expression wurde mit 1 gleichgesetzt. Die Expressionen der ICAM-1^{-/-}- und PS^{-/-} + MECA367-Mäuse wurde zur Referenz mit Hilfe der $\Delta\Delta$ ct-Methode ins Verhältnis gesetzt. Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz), n=3



Abbildungung 4.15: Gefäßwände von C57BL/6J- (A), ICAM-1^{-/-} (B) und MECA367 behandelten PS^{-/-}-Mäusen, vor und nach Gabe von Zytokinen am Tag 11 der Schwangerschaft. A-J zeigen mütterliche Blutgefäße innerhalb der Decidua basalis. Nur die Gefäße der Mäuse, die sowohl mit IL-12 und IL-15 behandelt wurden, zeigten eine mit dem Wildtyp (A, B) vergleichbare Gefäßwandstruktur (F und J). Balken = 30 μ m. Die Pfeile zeigen auf die Innen- und Aussenwand der Gefäße. Die dargestellten Gefäße sind repräsentativ für jeweils vier Mäuse.

Tabelle 4.4: Verhältnis des Gefäßdurchmessers zum Gesamtdurchmesser der Spiral-Arterie.

Test-Gruppe ⁴	Gefäß-/Gesamtdurchmesser-Ratio
C57BL/6J	1,40 ± 0,13
ICAM-1 ^{-/-}	1,98 ± 0,26*
ICAM-1 ^{-/-} + IL-12	1,69 ± 0,19*
ICAM-1 ^{-/-} + IL-15	1,69 ± 0,16*
ICAM-1 ^{-/-} + IL-12 + IL-15	1,42 ± 0,15
P-Selektin ^{-/-} +MECA 367	1,96 ± 0,24*
P-Selektin ^{-/-} + MECA 367 + IL-12	2,08 ± 0,15*
P-Selektin ^{-/-} + MECA 367 + IL-15	2,29 ± 0,37*
P-Selektin ^{-/-} + MECA 367 + IL-12 + IL-15	1,42 ± 0,14

⁴ Gemessen in Mäusen am Schwangerschaftstag 11 mit oder ohne beeinträchtigteter uNK Zell Entwicklung. (Ein p von <0,01 wurde als signifikant (*) angesehen (Test-Gruppen gegen Referenz), n=4)

5 Diskussion

Bei der Schwangerschaft handelt es sich um einen sehr komplexen, multifunktionalen Prozess, bei dem die Einwanderung des semiallogenen Trophoblasten in das mütterliche Gewebe der Decidua streng kontrolliert ist. Dies ist nötig, um die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen und somit sein normales Wachstum zu gewährleisten. Eine wichtige Rolle bei diesem Prozess kommt den Leukozyten zu. Sie haben beispielsweise einen großen Anteil an den Umbauprozessen, die im Uterus im Laufe der Schwangerschaft stattfinden. Außerdem sind sie maßgeblich an der Toleranzinduktion beteiligt, die eine Abstoßung des Fötus verhindert [55, 56]. Die Einwanderung dieser Leukozytenpopulationen in den Uterus unterliegt einer strengen Kontrolle. Zelluläre Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Faktoren spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Durch die nicht überlappende Expression dieser Moleküle kommt es zur Ausbildung von Mikrodomänen innerhalb des Uterus mit einem typischen Muster an Zellen. In der vaskulären Zone, deren Gefäße durch die Expression von P-Selektin, MAdCAM-1 und ICAM-1 charakterisiert sind, finden sich monozytäre Zellen. Die Mehrzahl dieser Zellen trägt den Homingrezeptor $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf der Zelloberfläche. Die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen ergab, dass es sich vorwiegend um myeloide $CD11c^+$ DC handelte [26]. Inhibitionsstudien mit blockierenden mAk und Versuche mit *knockout* Mäusen zeigten, dass die Extravasation von $\alpha 4\beta 7^+ CD11c^+$ DC sowohl über P-Selektin als auch über MAdCAM-1 erfolgt. In diesen Versuchen wurde eine drastisch reduzierte Einwanderung von $\alpha 4\beta 7^+ CD11c^+$ DC in die vaskuläre Zone des schwangeren Uterus festgestellt. Es wird vermutet, dass P-Selektin die Adhäsion der Leukozyten, vor allem die der myeloiden DC auf dem aktivierten Endothelium vermittelt und darüber hinaus an der Initiation des

Rollens während der Leukozytenextravasation beteiligt ist. Dieser Schritt ist wichtig, damit das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf den Leukozyten sich an seinen Rezeptor MAdCAM-1 auf dem Gefäß-Endothel binden kann. Das Gleiche galt für Mäuse, denen ICAM-1 fehlte. ICAM-1 ist beteiligt am letzten Schritt der Extravasation der $\alpha 4\beta 7^+$ -Zellen und ihrer Einwanderung in die vaskuläre Zone. Es bindet an $\beta 2$ -Integrin, welches sich auf der Oberfläche der den Uterus infiltrierenden Leukozyten befindet. Mäuse, bei denen die Einwanderung der $\alpha 4\beta 7^+$ CD11c⁺ DC -Subpopulation inhibiert wurde, waren charakterisiert durch eine verminderte Anzahl und Größe der uNK-Zellen. Weiterhin zeichneten sich diese Mäuse durch eine hypozelluläre Decidua basalis und durch verdickte Wände der mütterlichen Blutgefäße aus [17]. Gleiche Beobachtungen, bezogen auf die Histologie der Decidua wurden für Mäuse beschrieben, denen uNK-Zellen oder IFN- γ fehlten [57]. Die Produktion von IFN- γ ist eine der Hauptaufgaben der uNK-Zellen, nur etwa 10% des im Uterus gemessenen IFN- γ stammt von anderen Zellen. IFN- γ beeinflusst die Gefäßaufweitung und Angiogenese im Uterus. Studien von Ashkar et al. [44] zu Folge exprimiert die Gesamtheit der Zellen im Uterus, abzüglich der Menge, die von uNK-Zellen stammt, weniger als eine IU IFN- γ pro Implantationsstelle, und dieses Level bleibt während der gesamten Schwangerschaft konstant. Für eine vollständige Remodellierung der decidualen Blutgefäße ist eine Konzentration von mehr als fünf IU pro Implantationsstelle nötig, die nur in Anwesenheit von uNK-Zellen im Uterus erreicht wird [58]. Ashkar et al. [46] konnten zeigen, dass Zellen die aus SCID-Mäusen gewonnen wurden und in alymphoide Mäuse transferiert wurden, zu einer Wiederherstellung einer normalen uNK-Zellpopulation führten. Diese Rekonstitution der uNK-Zellen oder auch die direkte Injektion von rmIFN- γ in die alymphoiden Mäuse führte zu einer normalen Entwicklung des Uterus, die dem einer Wildtyp-Maus entsprach [46, 59, 60]. Um zu untersuchen, ob ein Fehlen von DC die IFN- γ -Menge im Uterus der Maus beeinflusst, wurde dessen Expression in Mäusen untersucht, die durch das Fehlen von myeloiden DC charakterisiert sind. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Mäuse mit einer im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Anzahl

an DC und uNK-Zellen auch signifikant weniger IFN- γ exprimieren. Ein Grund für die geringere IFN- γ -Menge könnte die im Vergleich zum Wildtyp geringere Anzahl an uNK-Zellen im untersuchten Gewebe sein. Da diese die Hauptquelle des uterinen IFN- γ sind, wirkt sich eine verminderte Anzahl der Zellen auch stark auf dessen Gesamtmenge im Uterus aus. Um dies auszuschließen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die uNK-Zellen aus den Uteri der Testmäuse isoliert, diese auf die gleiche Zellzahl eingestellt und dann die IFN- γ mRNA gemessen. Und auch hier konnte eine Reduktion der IFN- γ -Menge bei den Mäusen mit inhibierter Einwanderung von DC festgestellt werden.

Um die Hypothese zu beweisen, dass es sich um DC handelt, die die Entwicklung und IFN- γ -Expression der uNK-Zellen beeinflussen, wurden Versuche an Mäusen durchgeführt, denen das Integrin $\beta 7$ fehlte. Die DC dieser $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse haben kein $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, welches der Ligand für MAdCAM-1 ist. Da bei diesen Mäusen der Defekt, der zur verminderten Einwanderung der DC führt, nicht auf dem Endothel lokalisiert ist, sondern auf der Zelloberfläche, war es möglich, die DC der $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse durch Wildtyp-DC zu ersetzen. Die Wildtyp-DC wurden aus Knochenmarkskulturen gewonnen und über einen adoptiven Transfer in die $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse gebracht. Die im Anschluss an den Transfer durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Effekte die durch das Fehlen der DC im Uterus auftraten, durch die Injektion der Wildtyp-DC kompensiert werden konnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die $\alpha 4\beta 7^+ CD11c^+$ DC innerhalb des Uterus mit den uNK-Zellen interagieren und Einfluss auf deren Entwicklung und Funktion haben [49]. Dieser Einfluss könnte entweder über einen direkten Zell/Zell-Kontakt und/oder über die Ausschüttung von löslichen Faktoren vermittelt werden. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie, konnte ein direkter Zell/Zell-Kontakt zwischen DC und uNK-Zellen im Grenzbereich zwischen der vaskulären Zone und der zentralen Decidua basalis beobachtet werden [26]. Das Gleiche konnte auch beim Menschen nachgewiesen werden [56]. Zytokine spielen bei der Kommunikation zwischen Zellen eine wichtige Rolle und sind bezogen auf die Induktion von Aktivierung, Differenzierung und Wachstum während ei-

ner Immunreaktion unerlässlich. So ist bekannt, dass die Zytokine IL-12 und IL-15 einen Einfluss auf die Entwicklung peripherer NK-Zellen ausüben [61, 62, 63, 64, 65, 66, 67]. Daher wurde die Rolle dieser beiden Zytokine bei der Entwicklung von uNK-Zellen innerhalb dieser Arbeit genauer untersucht. Hierfür wurden Experimente an Mäusen durchgeführt, denen ICAM-1 oder P-Selektin fehlten. In diesen Mäusen wurde überprüft, ob sich die exprimierte Menge von IL-12 und IL-15 im Uterus von Mäusen, die durch eine verminderte Anzahl an DC im Uterus charakterisiert sind, von der in Wildtyp-Mäusen gemessenen unterscheidet. Diese Versuche wurden auf Protein-Ebene und im Falle von IL-15 zusätzlich auf mRNA-Ebene durchgeführt. Die mRNA von IL-15 wurde in allen Testgruppen - mit Ausnahme der $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse - gemessen und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass Uteri mit verminderter Einwanderung von DC und eingeschränkter Entwicklung der uNK-Zellen geringere Level an IL-12 und IL-15 im Vergleich zum WT aufweisen. Sowohl in den ICAM-1 $^{-/-}$ - als auch in den mit MECA367 behandelten PS $^{-/-}$ -Mäusen konnten signifikant reduzierte Mengen dieser beiden Zytokine gemessen werden. Um die Hypothese zu untermauern, dass die DC für die Produktion dieser Zytokine im Uterus verantwortlich sind, wurden Versuche an isolierten DC durchgeführt. Diese wurden auf die Expression von IL-12 und IL-15 Proteinen hin untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass die decidualen DC eine Quelle von IL-12 und IL-15 im Uterus darstellen könnten. Welche Rolle diese beiden Zytokine bei der Reifung der uNK-Zellen spielen, konnte bei Versuchen gezeigt werden, bei denen ICAM-1 $^{-/-}$ -Mäusen oder mit MECA367 behandelten PS $^{-/-}$ -Mäusen, diese Zytokine vom 7. bis zum 10. Tag der Schwangerschaft injiziert wurden. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass durch die alleinige Injektion von IL-15 die Anzahl und Größe der uNK-Zellen deutlich erhöht wurden und erreichten sowohl bei den ICAM-1 $^{-/-}$ - als auch bei den PS $^{-/-}$ -Mäusen wieder einen Zustand wie bei den unbehandelten Wildtyp-Kontrollen.

Bei Wildtyp-Mäusen führte eine Injektion von IL-15 zu keiner Erhöhung der uNK-Zellzahl. IL-15 vermittelt seine Wirkung über den IL-15 Rezeptor (IL-15R α), der auf der

Oberfläche der DC lokalisiert ist. Studien an peripheren NK-Zellen zufolge sind sowohl IL-15 als auch der IL-15R α für die Entwicklung der NK-Zellen erforderlich. So fehlen IL-15^{-/-} sowie IL-15R α ^{-/-} Mäuse die NK-Zellen [68, 69]. Weiterhin ist bekannt, dass eine Hochregulation des IL-15R α mit der IL-15 Präsentation auf reifen DC korreliert [64]. So konnten Dubois et al. [70] und Ferlazzo et al. [64] zeigen, dass DC den NK-Zellen das IL-15 ausschließlich über den membrangebundenen IL-15R α präsentieren. Eine Aktivierung der NK-Zellen über IL-15, vermittelt durch DC, kann somit nur über einen direkten Zell/Zell-Kontak erfolgen. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten bestätigen, dass es in einem Bereich der zentralen Decidua basalis zu einer Interaktion zwischen deciduellen DC und uNK-Zellen kommt [26]. Allerdings wirft dies die Frage auf, warum die uNK-Zellen trotz fehlenden DC im Uterus durch freies IL-15 aktiviert werden konnten. King et al. [71] zeigten, dass der IL-15R α in geringer Menge auf uNK-Zellen exprimiert wird und so durchaus eine direkte Aktivierung der uNK-Zellen über freies IL-15 erfolgen könnte. Die alleinige Gabe von IL-12 hatte keinen Einfluss auf die Größe oder die Anzahl der uNK-Zellen. Eine kombinierte Gabe beider Zytokine resultierte in einer Größe und Anzahl der uNK-Zellen die Vergleichbar mit der des Wildtyp war. Zudem konnte eine deutliche Zunahme der IFN- γ -Expression beobachtet werden. Bezogen auf die Morphologie der mütterlichen Gefäße innerhalb der Decidua konnte beobachtet werden, dass die Gewebsschnitte der mit IL-15 behandelten Mäuse immer noch eine hypozelluläre Decidua basalis hatten und die Wände der sich dort befindlichen Gefäße dicker waren als bei den Wildtyp Kontrollen. Wurde IL-15 in Kombination mit IL-12 gespritzt, fand ein normaler Umbau des Uterus statt, der mit dem des Wildtyps vergleichbar war. Die Gabe von IL-12 führte zwar zu einer leicht erhöhten IFN- γ -Expression, aber reichte alleine nicht aus, um sie auf das Wildtyp-Niveau anzuheben, da in diesem Fall wohl die Anzahl der uNK-Zellen zu niedrig zu sein scheint. Bei humanen peripheren NK-Zellen ist eine Abhängigkeit der IFN- γ Expression von einer IL-12 Stimulation bekannt [64, 72, 61, 73]. In diesem Fall wurde das IL-12 von DC produziert. Auch für murine uNK-Zellen wurde die Abhängig-

keit der IFN- γ -Expression von IL-12 schon bestätigt [58]. Die IL-12 Produzenten im schwangeren Uterus der Maus konnten bisher aber nicht eindeutig bestimmt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse untermauern allerdings die Vermutung, dass nicht nur die Proliferation der uNK-Zellen, sondern auch die Stimulation zur Expression von IFN- γ , ähnlich wie bei den peripheren NK-Zellen, über die DC erfolgt. Sie sind die Hauptquelle des uterinen IL-12 und IL-15.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mäusen denen DC myeloiden Ursprungs im Uterus fehlen, charakterisiert sind durch eine verminderte Anzahl und Größe von uNK-Zellen. Diese sind nicht nur in ihrem Phänotyp und in ihrer Entwicklung eingeschränkt, sondern auch in ihrer Funktion. Diese Mäuse zeigten eine hypozelluläre Decidua basalis und verdickte Wände der mütterlichen Blutgefäße, was Hinweise auf eine eingeschränkte IFN- γ -Expression sind. uNK-Zellen sind die Hauptproduzenten dieses Zytokins. Eine Normalisierung der Verhältnisse auf Wildtyp-Niveau erfolgte nach der Injektion von IL-12 und IL-15. Die Versuche zu den einzelnen Zytokinen ließen den Schluss zu, dass IL-15 für die Proliferation und IL-12 für die Stimulation der uNK-Zellen zuständig sind. Experimente in denen DC aus Wildtyp-Mäusen isoliert und $\beta 7^{-/-}$ -Mäusen injiziert wurden, untermauerten die Hypothese, dass DC für die Entwicklung und Funktion von uNK-Zellen wichtig sind.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen den myeloiden dendritischen Zellen und uNK-Zellen untersucht. Bei den dendritischen Zellen handelte es sich um $\alpha 4\beta 7$ -Integrin⁺ Zellen, die im Verlauf der Leukozytenextravasation über die Bindung an P-Selektin und MAdCAM-1 und später auch an ICAM-1 in den Uterus der Maus einwandern. Die uNK-Zellen stellen die zahlenmäßig größte Leukozytenpopulation im Uterus dar und spielen beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Gefäßaufweitung während der Schwangerschaft. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die DC die Entwicklung und Funktion der uNK-Zellen maßgeblich beeinflussen. Die inhibierte Einwanderung der DC führte zu einer reduzierten Anzahl und Größe der uNK-Zellen und zu einer verminderten IFN- γ -Expression. Dies hatte einen negativen Einfluss auf die Organisation des Uterusgewebes und auf die Struktur der mütterlichen Blutgefäße innerhalb der Decidua basalis. Eine entscheidende Rolle bei diesen Prozessen kam den Zytokinen IL-12 und IL-15 zu. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine von DC produziert werden und einen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion der uNK-Zellen haben. So wurde in Uteri von Mäusen mit inhibierter Einwanderung der DC im Vergleich zum Wildtyp, eine deutlich verminderte Menge dieser Zytokine gemessen. Die mehrtägige Injektion dieser beiden Zytokine, führte zu einer Anzahl und Größe der uNK-Zellen, die mit denen der Wildtyp-Mäusen vergleichbar war. Ebenfalls wurde die Expression von IFN- γ gesteigert, die auch mit der Expression von Wildtyp-Mäusen vergleichbar war. Die gesteigerte IFN- γ -Menge hatte auch einen Einfluss auf die Organisation des Uterus. So konnte beobachtet werden, dass sich sowohl die Struktur des Decidua basalis als auch die der mütterlichen Blutgefäße innerhalb des Uterus normali-

sierten. Der adoptive Transfer von DC aus WT-Mäusen in $\beta 7^{-/-}$ -Mäuse unterstrich die Bedeutung des *crossstalks* zwischen DC und uNK-Zellen für die Umstrukturierung des unterinen Gewebes während der Schwangerschaft.

Literaturverzeichnis

- [1] P. Murphy, K. Travers and M. Walport. *Janeway, Immunology*. 7. edition edition, 2008.
- [2] E. C. Butcher, M. Williams, K. Youngman, L. Rott, and M. Briskin. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol*, 72:209–53, 1999.
- [3] D. Vestweber. Glycoprotein ligands of the two endothelial selectins. *Res Immunol*, 144(9):704–8; discussion 754–62, 1993.
- [4] S. D. Rosen. Ligands for l-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*, 22:129–56, 2004.
- [5] M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, Jr. Gimbrone, M. A., and B. Seed. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243(4895):1160–5, 1989.
- [6] S. Hsu-Lin, C. L. Berman, B. C. Furie, D. August, and B. Furie. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem*, 259(14):9121–6, 1984.
- [7] R. P. McEver, J. H. Beckstead, K. L. Moore, L. Marshall-Carlson, and D. F. Bainton. Gmp-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in weibel-palade bodies. *J Clin Invest*, 84(1):92–9, 1989.

- [8] K. D. Patel, S. L. Cuvelier, and S. Wiehler. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*, 14(2):73–81, 2002.
- [9] R. Hattori, K. K. Hamilton, R. D. Fugate, R. P. McEver, and P. J. Sims. Stimulated secretion of endothelial von willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein gmp-140. *J Biol Chem*, 264(14):7768–71, 1989.
- [10] M. Subramaniam, J. A. Koedam, and D. D. Wagner. Divergent fates of p- and e-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 4(8):791–801, 1993.
- [11] C. Berlin, R. F. Bargatze, J. J. Campbell, U. H. von Andrian, M. C. Szabo, S. R. Hasslen, R. D. Nelson, E. L. Berg, S. L. Erlandsen, and E. C. Butcher. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, 80(3):413–22, 1995.
- [12] E. C. Butcher and L. J. Picker. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272(5258):60–6, 1996.
- [13] H. Xu, J. A. Gonzalo, Y. St Pierre, I. R. Williams, T. S. Kupper, R. S. Cotran, T. A. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*, 180(1):95–109, 1994.
- [14] J. C. Cross, Z. Werb, and S. J. Fisher. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, 266(5190):1508–18, 1994.
- [15] C. L. Librach, Z. Werb, M. L. Fitzgerald, K. Chiu, N. M. Corwin, R. A. Esteves, D. Grobelyny, R. Galardy, C. H. Damsky, and S. J. Fisher. 92-kd type iv collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, 113(2):437–49, 1991.

- [16] J. C. Cross, M. Hemberger, Y. Lu, T. Nozaki, K. Whiteley, M. Masutani, and S. L. Adamson. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol*, 187(1-2):207–12, 2002.
- [17] U. Fernekorn, E. C. Butcher, J. Behrends, S. Hartz, and A. Kruse. Functional involvement of p-selectin and madcam-1 in the recruitment of alpha4beta7-integrin-expressing monocyte-like cells to the pregnant mouse uterus. *Eur J Immunol*, 34(12):3423–33, 2004.
- [18] A. Kruse, N. Martens, U. Fernekorn, R. Hallmann, and E. C. Butcher. Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. *Biol Reprod*, 66(2):333–45, 2002.
- [19] A. Kruse, R. Hallmann, and E. C. Butcher. Specialized patterns of vascular differentiation antigens in the pregnant mouse uterus and the placenta. *Biol Reprod*, 61(6):1393–401, 1999.
- [20] Rugh R. *The mouse - its reproduction and development*. Oxford Science Publications, Oxford, 1994.
- [21] K. Shortman and Y. J. Liu. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2(3):151–61, 2002.
- [22] U. Kammerer, M. Schoppet, A. D. McLellan, M. Kapp, H. I. Huppertz, E. Kampgen, and J. Dietl. Human decidua contains potent immunostimulatory cd83(+) dendritic cells. *Am J Pathol*, 157(1):159–69, 2000.
- [23] S. M. Blois, C. D. Alba Soto, M. Tometten, B. F. Klapp, R. A. Margni, and P. C. Arck. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod*, 70(4):1018–23, 2004.

- [24] S. M. Blois, C. D. Alba Soto, M. Tometten, B. F. Klapp, R. A. Margni, and P. C. Arck. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod*, 70(4):1018–23, 2004.
- [25] G. T. Belz, W. R. Heath, and F. R. Carbone. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol*, 80(5):463–8, 2002.
- [26] J. Behrends, C. M. Karsten, S. Wilke, A. Robke, and A. Kruse. Identification of itga4/itgb7 and itgae/itgb7 expressing subsets of decidual dendritic-like cells within distinct microdomains of the pregnant mouse uterus. *Biol Reprod*, 2008.
- [27] M. J. Oh and B. A. Croy. A map of relationships between uterine natural killer cells and progesterone receptor expressing cells during mouse pregnancy. *Placenta*, 29(4):317–23, 2008.
- [28] L. Mincheva-Nilsson. Pregnancy and gamma/delta t cells: taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:120, 2003.
- [29] P. Arck, J. Dietl, and D. Clark. From the decidual cell internet: trophoblast-recognizing t cells. *Biol Reprod*, 60(2):227–33, 1999.
- [30] K. D. Heyborne, R. L. Cranfill, S. R. Carding, W. K. Born, and R. L. O’Brien. Characterization of gamma delta t lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J Immunol*, 149(9):2872–8, 1992.
- [31] N. Rouas-Freiss, R. M. Goncalves, C. Menier, J. Dausset, and E. D. Carosella. Direct evidence to support the role of hla-g in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21):11520–5, 1997.
- [32] V. M. Braud, D. S. Allan, C. A. O’Callaghan, K. Soderstrom, A. D’Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J.

- McMichael. Hla-e binds to natural killer cell receptors cd94/nkg2a, b and c. *Nature*, 391(6669):795–9, 1998.
- [33] G. K. Lee, H. J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D. H. Munn, and A. L. Mellor. Tryptophan deprivation sensitizes activated t cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*, 107(4):452–60, 2002.
- [34] P. T. Daley-Yates, A. P. Powell, and L. L. Smith. Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, 96(2):222–32, 1988.
- [35] D. H. Munn, M. Zhou, J. T. Attwood, I. Bondarev, S. J. Conway, B. Marshall, C. Brown, and A. L. Mellor. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 281(5380):1191–3, 1998.
- [36] H. Schrocksnadel, G. Baier-Bitterlich, O. Dapunt, H. Wachter, and D. Fuchs. Decreased plasma tryptophan in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 88(1):47–50, 1996.
- [37] S. Chantakru, C. Miller, L. E. Roach, W. A. Kuziel, N. Maeda, W. C. Wang, S. S. Evans, and B. A. Croy. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine nk cell population of early pregnancy. *J Immunol*, 168(1):22–8, 2002.
- [38] C. A. Vosshenrich, T. Ranson, S. I. Samson, E. Corcuff, F. Colucci, E. E. Rosmaraki, and J. P. Di Santo. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of nk cell precursors and peripheral nk cells in vivo. *J Immunol*, 174(3):1213–21, 2005.
- [39] Jr. Paffaro, V. A., M. C. Bizinotto, P. P. Joazeiro, and A. T. Yamada. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by dba lectin reactivity. *Placenta*, 24(5):479–88, 2003.
- [40] T. D. Burrows, A. King, and Y. W. Loke. Expression of adhesion molecules by human decidual large granular lymphocytes. *Cell Immunol*, 147(1):81–94, 1993.

- [41] L. M. Zheng, S. V. Joag, M. B. Parr, E. L. Parr, and J. D. Young. Perforin-expressing granulated metrial gland cells in murine deciduoma. *J Exp Med*, 174(5):1221–6, 1991.
- [42] B. A. Croy, M. J. Guimond, J. Luross, A. Hahnel, B. Wang, and M. van den Heuvel. Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. *Am J Reprod Immunol*, 37(6):463–70, 1997.
- [43] E. L. Parr, L. H. Young, M. B. Parr, and J. D. Young. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J Immunol*, 145(7):2365–72, 1990.
- [44] A. A. Ashkar and B. A. Croy. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod*, 61(2):493–502, 1999.
- [45] W. Ye, L. M. Zheng, J. D. Young, and C. C. Liu. The involvement of interleukin (il)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med*, 184(6):2405–10, 1996.
- [46] A. A. Ashkar, J. P. Di Santo, and B. A. Croy. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med*, 192(2):259–70, 2000.
- [47] H. Xu, J. A. Gonzalo, Y. St Pierre, I. R. Williams, T. S. Kupper, R. S. Cotran, T. A. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*, 180(1):95–109, 1994.
- [48] T. N. Mayadas, R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes, and D. D. Wagner. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in p selectin-deficient mice. *Cell*, 74(3):541–54, 1993.

- [49] C. M. Karsten, J. Behrends, A. K. Wagner, F. Fuchs, J. Figge, I. Schmutde, L. Hellberg, and A. Kruse. Dc within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine nk cells. *Eur. J. Immunol.*, 39:1–12, 2009.
- [50] U. Kammerer, K. Marzusch, S. Krober, P. Ruck, R. Handgretinger, and J. Dietl. A subset of cd56+ large granular lymphocytes in first-trimester human decidua are proliferating cells. *Fertil Steril*, 71(1):74–9, 1999.
- [51] S. R. Delgado, B. A. McBey, S. Yamashiro, J. Fujita, Y. Kiso, and B. A. Croy. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J Leukoc Biol*, 59(2):262–9, 1996.
- [52] K. Kusakabe, T. Okada, F. Sasaki, and Y. Kiso. Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. *J Vet Med Sci*, 61(10):1093–100, 1999.
- [53] M. A. Degli-Esposti and M. J. Smyth. Close encounters of different kinds: dendritic cells and nk cells take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 5(2):112–24, 2005.
- [54] A. A. Ashkar, G. P. Black, Q. Wei, H. He, L. Liang, J. R. Head, and B. A. Croy. Assessment of requirements for il-15 and ifn regulatory factors in uterine nk cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol*, 171(6):2937–44, 2003.
- [55] S. M. Blois, U. Kammerer, C. Alba Soto, M. C. Tometten, V. Shaikly, G. Barrientos, R. Jurd, D. Rukavina, A. W. Thomson, B. F. Klapp, N. Fernandez, and P. C. Arck. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod*, 77(4):590–8, 2007.
- [56] U. Kammerer, M. von Wolff, and U. R. Markert. Immunology of human endometrium. *Immunobiology*, 209(7):569–74, 2004.
- [57] J. D. Greenwood, K. Minhas, J. P. di Santo, M. Makita, Y. Kiso, and B. A. Croy. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta*, 21(7):693–702, 2000.

-
- [58] J. H. Zhang, H. He, A. M. Borzychowski, K. Takeda, S. Akira, and B. A. Croy. Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killer cells. *Biol Reprod*, 69(2):404–11, 2003.
- [59] M. J. Guimond, J. A. Luross, B. Wang, C. Terhorst, S. Danial, and B. A. Croy. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in tge26 mice. *Biol Reprod*, 56(1):169–79, 1997.
- [60] M. J. Guimond, B. Wang, and B. A. Croy. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (scid) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. *J Exp Med*, 187(2):217–23, 1998.
- [61] C. Borg, A. Jalil, D. Laderach, K. Maruyama, H. Wakasugi, S. Charrier, B. Ryffel, A. Cambi, C. Figdor, W. Vainchenker, A. Galy, A. Caignard, and L. Zitvogel. Nk cell activation by dendritic cells (dcs) requires the formation of a synapse leading to il-12 polarization in dcs. *Blood*, 104(10):3267–75, 2004.
- [62] M. A. Cooper, J. E. Bush, T. A. Fehniger, J. B. VanDeusen, R. E. Waite, Y. Liu, H. L. Aguila, and M. A. Caligiuri. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*, 100(10):3633–8, 2002.
- [63] T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 97(1):14–32, 2001.
- [64] G. Ferlazzo, M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta, and C. Munz. Distinct roles of il-12 and il-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47):16606–11, 2004.
- [65] G. Ferlazzo, M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz. Human dendritic cells activate resting natural killer (nk) cells and are recognized via the nkp30 receptor by activated nk cells. *J Exp Med*, 195(3):343–51, 2002.
-

- [66] M. Lucas, W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele, and A. Diefenbach. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 26(4):503–17, 2007.
- [67] C. Munz, T. Dao, G. Ferlazzo, M. A. de Cos, K. Goodman, and J. W. Young. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood*, 105(1):266–73, 2005.
- [68] M. K. Kennedy, M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce, and J. J. Peschon. Reversible defects in natural killer and memory cd8 t cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*, 191(5):771–80, 2000.
- [69] J. P. Lodolce, D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. Il-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, 9(5):669–76, 1998.
- [70] S. Dubois, J. Mariner, T. A. Waldmann, and Y. Tagaya. Il-15 α recycles and presents il-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*, 17(5):537–47, 2002.
- [71] A. King. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*, 6(1):28–36, 2000.
- [72] M. Vitale, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, C. Romagnani, A. Thiel, L. Moretta, and A. Moretta. The small subset of cd56brightcd16⁻ natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol*, 34(6):1715–22, 2004.
- [73] T. A. Fehniger, M. H. Shah, M. J. Turner, J. B. VanDeusen, S. P. Whitman, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid, and M. A. Caligiuri. Differential cytokine and chemokine gene expression by human nk cells following activation with

il-18 or il-15 in combination with il-12: implications for the innate immune response.

J Immunol, 162(8):4511–20, 1999.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor®
APC	<i>antigen- presenting cell</i>
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DB	<i>Decidua basalis</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fc	Fragment, kristallisierbar
FITC	Fluoreszein- Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FME	Fetomaternale Einheit
FSC	<i>Forward side scatter</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GTH	Gemeinsame Tierhaltung
HCl	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

Tabelle 7.1: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IU	<i>international unit</i>
<i>k.o.</i>	<i>knock out</i>
IDC	lymphoide DC
MACS	<i>Magnetic associated cell sorting</i>
MAdCAM	<i>mucosal addressin cellular adhesion molecule</i>
mDC	myeloide DC
MDV	Makrophagen/Dendritische Zellen- Vorläuferzelle
MEV	Megakaryozyten/Erythrozyten- Vorläuferzelle
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Myo	Myometrium
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NK	natürliche Killer
NMS	Normales Mausserum
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plastazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PS	P- Selektin
R	Rezeptor
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RMPI	<i>Roosevelt Park Memorial Institute- Medium</i>
SDF	<i>stromal derived factor</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Tab.	Tabelle
Th	Helfer- T- Zelle
T _{reg}	regulatorische T- Zelle
VCAM	<i>vascular cellular adhesion molecule</i>
VZ	vaskuläre Zone
zDB	zentrale <i>Decidua basalis</i>

7.2 Publikationen

Karsten CM, Behrends J, Wagner AK, Fuchs F, Figge J, Schmudde I, Hellberg L, Kruse A. DC within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2009. 39: 1–12 (*in press*)

Karsten CM, Kruse A. The role of vascular addressins in implantations sites during successful and failing mouse pregnancies. *Immunol Invest.* 2008;37(5):449-66. Review.

Behrends J, **Karsten CM**, Wilke S, Röbbke A, Kruse A. Identification of ITGA4/ITGB7 and ITGAE/ITGB7 expressing subsets of decidual dendritic-like cells within distinct microdomains of the pregnant mouse uterus. *Biol Reprod.* 2008 Oct;79(4):624-32.

Ferneborn 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 Apr;76(4):645-53.

7.3 Danksagung

Frau **PD Dr. Andrea Kruse** möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und auch und vor allem für ihr Interesse an dieser Arbeit danken. Ihre Anregungen und Ratschläge zur Versuchsdurchführung und zum literarischen Hintergrund haben mir sehr geholfen. Auch hat sie mir die Möglichkeit geboten, mich in die Lehre einzubringen dafür mein herzlicher Dank. Herrn Prof. Dr. Holger Kirchner und Herrn **Prof. Dr. Jörg Köhl** danke ich, dass ich am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin die Dissertation beginnen und am Institut für Systemische Entzündungsforschung beenden durfte. Weiterhin gilt mein Dank Herrn **Prof. Dr. Jürgen Westermann** aus dem Institut für Anatomie, der sich als 1. Berichterstatter zur Verfügung gestellt hat.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Institutsmitgliedern danke ich für die wertvollen Tipps zur Durchführung von Versuchen, der ständigen Hilfsbereitschaft. Außerdem danke ich den Mitgliedern des ISEF für die angenehme Atmosphäre und das immer gute Arbeitsklima.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau und meiner Familie bedanken, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Marcel Karsten
Boschstrasse 49
22761 Hamburg

Tel.: (0 40) 8 90 19 149
E-Mail: C.Karsten@Gmail.com

Geb. am 08. 04. 1976 in Hamburg
verheiratet, deutsch



Schulbildung

1987–1995 Realschule und Gymnasium in Hamburg (Leistungskurse Biologie und Wirtschaftslehre)

Zivildienst

1996–1997 Rumond-Walter-Haus, Altenheim

Studium

1997–2004 Diplomstudiengang an der Universität Hamburg; Diplomarbeit: Charakterisierung eines nicht zur Gattung *Acidithiobacillus* gehörenden, acidophilen, Eisen(II)-Ionen oxidierenden Bakteriums

2003–2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut Mikrobiologie, Hamburg

2005–2009 Anfertigung der Dissertationsarbeit am Institut für Systemische Entzündungsforschung an der Universität zu Lübeck

Berufserfahrung

1997–2003 Freier Redakteur zuständig für Software bei der ComputerBILD

7.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Lübeck, den 4. Januar 2010