

Aus dem Institut für Systemische Entzündungsforschung

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

vertreten in der

Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

durch das Institut für Anatomie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Charakterisierung und funktionelle Bedeutung
von $\alpha_4\beta_7$ Integrin positiven Zellen
innerhalb des schwangeren Uterus der Maus

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von

Herrn Dipl.-Biol. Jochen Behrends

aus Norden

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichterstatter PD Dr. rer. nat. Andrea Kruse

Tag der mündlichen Prüfung 26.08.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.08.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Intrauterine Entwicklung der Maus	1
1.1.1	Bildung und Aktivierung der Blastozyste, Tag 3.5 bis 4.5 <i>p.c.</i>	1
1.1.2	Implantation der Blastozyste, Tag 4.5 bis 6 <i>p.c.</i>	2
1.1.3	Bildung des Dottersacks, Tag 6 bis 8 <i>p.c.</i>	2
1.1.4	Bildung der Plazenta, Tag 9 bis 10 <i>p.c.</i>	3
1.1.5	Fetales Wachstum und Geburt, Tag 11 bis 21 <i>p.c.</i>	5
1.2	Kontrolle der maternalen Immunantwort während der Schwangerschaft	5
1.2.1	Vom fetalen Gewebe vermittelte Toleranz	6
1.2.1.1	Inaktivierung der Komplementkaskade	6
1.2.1.2	Katabolismus von Tryptophan durch Indolamin-2,3-dioxygenase	7
1.2.1.3	Expression nicht-klassischer MHC Moleküle	7
1.2.1.4	Fas/FasL	8
1.2.2	Funktionen maternaler Leukozyten im schwangeren Uterus	8
1.2.2.1	Granulozyten	8
1.2.2.2	Lymphozyten	9
1.2.2.3	Uterine NK Zellen	9
1.2.2.4	Makrophagen	10
1.2.2.5	Dendritische Zellen	11
1.2.2.5.1	Subpopulationen dendritischer Zellen	11
1.2.2.5.2	Funktionen dendritischer Zellen	13
1.2.2.5.3	Die Expansion dendritischer Zellen	14
1.3	Die Leukozytenextravasation	14
1.3.1	Selektine	16
1.3.2	Integrine	17
1.3.3	Immunoglobulin-Superfamilie	18
1.3.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren	19
2	Zielsetzung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Laborbedarf	24

3.1.3 Chemikalien und Enzyme	25
3.1.4 Zellkulturmedien/-zusätze, Puffer, Lösungen	26
3.1.4.1 Zellkulturmedien	26
3.1.4.2 Puffer	27
3.1.4.3 Lösungen	27
3.1.5 Zelllinien	28
3.1.6 Mäuse	29
3.1.7 Primärantikörper und Sekundärkonjugate.....	29
3.1.8 Isotyp-Kontrollen	32
3.1.9 Seren.....	32
3.1.10 Immunoassay.....	33
3.1.11 Sonstige Reagenzien	33
3.1.12 Software	33
3.2 Methoden.....	34
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	34
3.2.1.1 Zelldichtebestimmung.....	34
3.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Hybridom- und Melanomzelllinien....	34
3.2.1.3 Kultivierung von Zellen	34
3.2.1.3.1 Hybridomzelllinien DATK32 und MECA-367.....	34
3.2.1.3.2 Melanomzelllinien B16F10 und Flt3L-B16F10.....	35
3.2.1.4 Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzelllinien.....	35
3.2.1.5 Isolierung und Aufreinigung von Zellen aus der Maus.....	36
3.2.1.6 Stimulation von Zellen für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen.....	39
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	39
3.2.2.1 Immunoassay (ELISA) zur Bestimmung der Flt3L-Konzentration	39
3.2.3 Tierexperimentelle Methoden	40
3.2.3.1 Angewandte Injektionsmethoden.....	40
3.2.3.1.1 Intraperitoneale Injektion in Mäuse	40
3.2.3.1.2 Subkutane Injektion in Mäuse.....	41
3.2.3.2 Vorbereitung und Präparation von Mäusen	41
3.2.3.3 Vorbereitung des entnommenen Blutes für einen Immunoassay.....	43
3.2.3.4 Injektion von Flt3L-B16F10 Zellen in die Maus zur <i>in vivo</i> DC Expansion...	43
3.2.3.5 Langzeit <i>in vivo</i> Inhibitionsstudien	44
3.2.3.5.1 Inhibitionsstudien am Chemokinrezeptor CCR5	44

3.2.3.5.2 Inhibitionsstudien an Zelladhäsionsmolekülen	44
3.2.4. Histologische Methoden.....	44
3.2.4.1 Histologische Charakterisierung	44
3.2.4.2 Immunperoxidase-Färbungen.....	45
3.2.4.3 <i>In situ</i> Immunlokalisation.....	45
3.2.4.3.1 Beschichtung der Objektträger.....	45
3.2.4.3.2 Verarbeitung des Gewebes und Fixierung auf Objektträgern.....	45
3.2.4.3.3 Immunhistologische Antikörperfärbung	46
3.2.5 Analytische Methoden.....	48
3.2.5.1 Ermittlung der Wurfgröße	48
3.2.5.2 <i>In situ</i> Quantifizierung von Leukozytenpopulationen.....	48
3.2.5.3 Durchflusszytometrie	49
3.2.5.3.1 Technische Voraussetzungen	49
3.2.5.3.2 Fluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie.....	51
3.2.5.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen.....	52
3.2.5.3.3.1 Lebend-Tod Färbung mit 7-AAD	52
3.2.5.3.3.2 Prozentuale Verteilung der Zellpopulationen	52
3.2.5.3.3.3 Relative MFI	53
3.2.5.4 Statistik.....	53
4 Ergebnisse	54
4.1 Zelladhäsionsmoleküle und deren Bedeutung für die Migration von $\alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten während der murinen Schwangerschaft	54
4.1.1 Struktur des Uterus am Tag 9 <i>p.c.</i> der murinen Schwangerschaft	54
4.1.2 Inhibierung von MAdCAM-1 und P-Selektin mit den Auswirkungen für die Rekrutierung von $\alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten in die VZ.....	56
4.2 Gating Strategie bei der durchflusszytometrischen Analyse.....	58
4.3 Charakterisierung dezidualer β_7^+ Leukozyten	59
4.4 Untersuchungen der CD11c ⁺ Leukozyten während der murinen Schwangerschaft am Tag 9 <i>p.c.</i>	62
4.4.1 Charakterisierung dezidualer CD11c ⁺ Leukozyten.....	62
4.4.2 Verteilung der CD11c ⁺ DC Subpopulationen innerhalb des murinen Uterus am Schwangerschaftstag 9 <i>p.c.</i>	66
4.4.3 Zytokinmessungen bei CD11c ⁺ und CD11c ⁻ Zellen	70

4.4.4 Die Anzahl der CD11c ⁺ DC im schwangeren Uterus der Maus verändert sich im weiteren Verlauf der Schwangerschaft	71
4.5 Die Expression von Chemokinrezeptoren auf Leukozyten im schwangeren murinen Uterus	73
4.5.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf DC	73
4.5.2 Die Beteiligung des Chemokinrezeptors CCR5 bei der Einwanderung von CD11c ⁺ DC in den schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 <i>p.c.</i>	75
4.5.3 Die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 auf uNK Zellen innerhalb des schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 <i>p.c.</i>	76
4.5.4 CCR5 ⁺ und CCR7 ⁺ Zellen an den Tagen 8, 9, 11, 14 <i>p.c.</i> der murinen Schwangerschaft.....	79
4.5.5 Reduzierte Wurfgröße bei CCR5 ^{-/-} Mäusen	81
4.6 Auswirkungen von Flt3L auf CD11c ⁺ DC im schwangeren Uterus der Maus	82
4.6.1 Anteil der CD11c ⁺ DC bei Flt3L behandelten und unbehandelten C57BL/6 Mäusen am Schwangerschaftstag 9 <i>p.c.</i>	82
4.6.2 Immunhistologische Analyse der dezidualen CD11c ⁺ DC bei Flt3L-B16F10 behandelten Tag 9 <i>p.c.</i> schwangeren C57BL/6 Mäusen	87
4.6.3 Histologische Veränderungen der DB bei Flt3L-B16F10 behandelten Tag 9 <i>p.c.</i> schwangeren C57BL/6 Mäusen	88
4.6.4 Erhöhte Anzahl von CD11c ⁺ DC innerhalb der iliakalen Lk bei Flt3L-B16F10 behandelten C57BL/6 Mäusen	88
4.6.5 Auswirkungen einer erhöhten Anzahl an DC im Uterus der Maus für den Schwangerschaftsverlauf.....	90
5 Diskussion	91
6 Zusammenfassung	103
7 Literaturverzeichnis.....	105
8 Anhang	123
8.1 Abkürzungsverzeichnis	123
8.2 Publikationen, Kongressbeiträge und Auszeichnungen	126
8.3 Danksagung.....	129
8.4 Lebenslauf	130
8.5 Erklärung.....	131

1 Einleitung

Das Immunsystem ist das körpereigene Schutzsystem der höheren Wirbeltiere. Es besteht aus der Gesamtheit aller Immunzellen eines Organismus einschließlich aller immunologisch kompetenten Organe und humoralen Komponenten. Aufgaben des Immunsystems sind das Erkennen von körperfremdem Material, die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu treffen, nach Induktion spezifische Abwehrreaktionen einzuleiten und sich in Form eines „immunologischen Gedächtnisses“ spezifischer Antigene zu erinnern. (Janeway *et al.*, 2002)

Die größte Herausforderung des Immunsystems ist dabei vielleicht nicht das Erkennen und die Beseitigung von Mikroorganismen oder xenogenetischen Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche eine große Vielfalt an Fremdanthigenen exprimieren, sondern das Erkennen und die Beseitigung von alloogenen Zellen, die dem Wirt ähneln. Eine Abstoßung von alloogenen Zellen kann bei allen tierischen Metazoen beobachtet werden, angefangen bei dem niedrigsten Stamm der Poriferen als auch bei primitiven Vertebraten wie Cyclostomata (Hildemann *et al.*, 1979; Fujii and Hayakawa, 1983). Die evolutionäre Konservierung lässt auf eine bedeutende Rolle der Bekämpfung allogener Zellen für das Überleben des Organismus schließen, aber beinhaltet auch ein spezielles Problem bei den höheren Säugetieren. Eutheria versorgen ihre Nachkommen während der Schwangerschaft über eine Plazenta, durch die das maternale Immunsystem den väterlichen Antigenen auf dem fetalen Gewebe ausgesetzt wird. Dieses erfordert eine Anpassung des maternalen Immunsystems, um die Abstoßung des alloogenen Fetus zu verhindern, dabei aber die Fähigkeit der Mutter zur Abwehr von Infektionen gewahrt bleibt.

1.1 Intrauterine Entwicklung der Maus

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt zwar auf dem murinen Schwangerschaftstag 9 *post coitum* (*p.c.*) sowie in einigen Untersuchungen zusätzlich auf den Tagen 8, 11 und 14 *p.c.*, dennoch soll auch auf die früheren und späteren intrauterinen Entwicklungsprozesse eingegangen werden.

1.1.1 Bildung und Aktivierung der Blastozyste, Tag 3.5 bis 4.5 *p.c.*

Nach der Befruchtung führt die Furchung der Eizelle zur Bildung der Morula, die durch die *zona pellucida* umgeben ist. Nach der Einwanderung der Morula aus dem Eileiter in

den Uterus am Tag 3.5 *p.c.* der Schwangerschaft bildet sich aus ihr die Blastozyste, die aus der inneren Zellmasse und dem sie umgebenden Trophoektoderm besteht (Abb.1.1A). Nach der Freisetzung der Blastozyste aus der sie umgebenden *zona pellucida* wird sie aktiviert und ist somit implantationskompetent (Tag 4.25 bis 4.5 *p.c.*). (Cross *et al.*, 1994)

1.1.2 Implantation der Blastozyste, Tag 4.5 bis 6 *p.c.*

Nach der Aktivierung erfolgt die Implantation der Blastozyste, die sich an das uterine Epithel anlagert (Rugh, 1990). Dieser Vorgang geschieht mit Hilfe einer erfolgreichen Kommunikation zwischen der Blastozyste und den maternalen Zellen (Abb.1.1B). Dabei wirken maternale Hormone wie Östrogen und Progesteron, die das Uterusepithel zur Sezernierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimulieren. Zudem sezerniert die Blastozyste Zytokine und exprimiert Zelladhäsionsmoleküle, die das Anheften an das maternale Epithel vermitteln (Damsky *et al.*, 1993). Die Implantation ist durch Veränderungen des uterinen Stromas gekennzeichnet, bei der unter dem Einfluss von Progesteron das maternale Endometrium zur Dezidua transformiert wird. Diese Dezidualisierung beinhaltet das Umschließen der Keimblase und fördert Reaktionen des maternalen Gewebes auf das Embryonalgewebe, die aus einer Erhöhung der Permeabilität uteriner Blutgefäße und einer verstärkten Rekrutierung inflammatorischer Zellen bestehen (Cross *et al.*, 1994).

1.1.3 Bildung des Dottersacks, Tag 6 bis 8 *p.c.*

Das polare Trophoektoderm proliferiert nach der Implantation und bildet den nachfolgend zur Plazenta werdenden Ektoplazentarkonus, der ab Tag 6 *p.c.* der Schwangerschaft in maternales Gewebe einwandert, Blutgefäße eröffnet und an der Grenze zur maternalen Dezidua ektoplazentale Riesenzellen bildet (Abb.1.1C). Der Ektoplazentarkonus entwickelt sich besonders stark, während die übrige Blastozystenwand eine frühe Rückbildung erfährt. Diese frühe Implantationsphase ist daher durch Transformation und Wachstum dezidualer Stromazellen, durch Rekrutierung von Immunzellen und durch Apoptose des Uterusepithels gekennzeichnet (Cross *et al.*, 1994).

Die ektoplazentalen Riesenzellen enthalten große Zellkerne und stellen trotz anhaltender DNA-Replikation ihre Zellteilung ein und werden dadurch zu polyploiden Zellen (Gardner and Davies, 1993), die eine spezialisierte Funktion besitzen. Die Invasion des Trophoblasten wird durch Proteinase ermöglicht, die vom Trophoblasten selbst

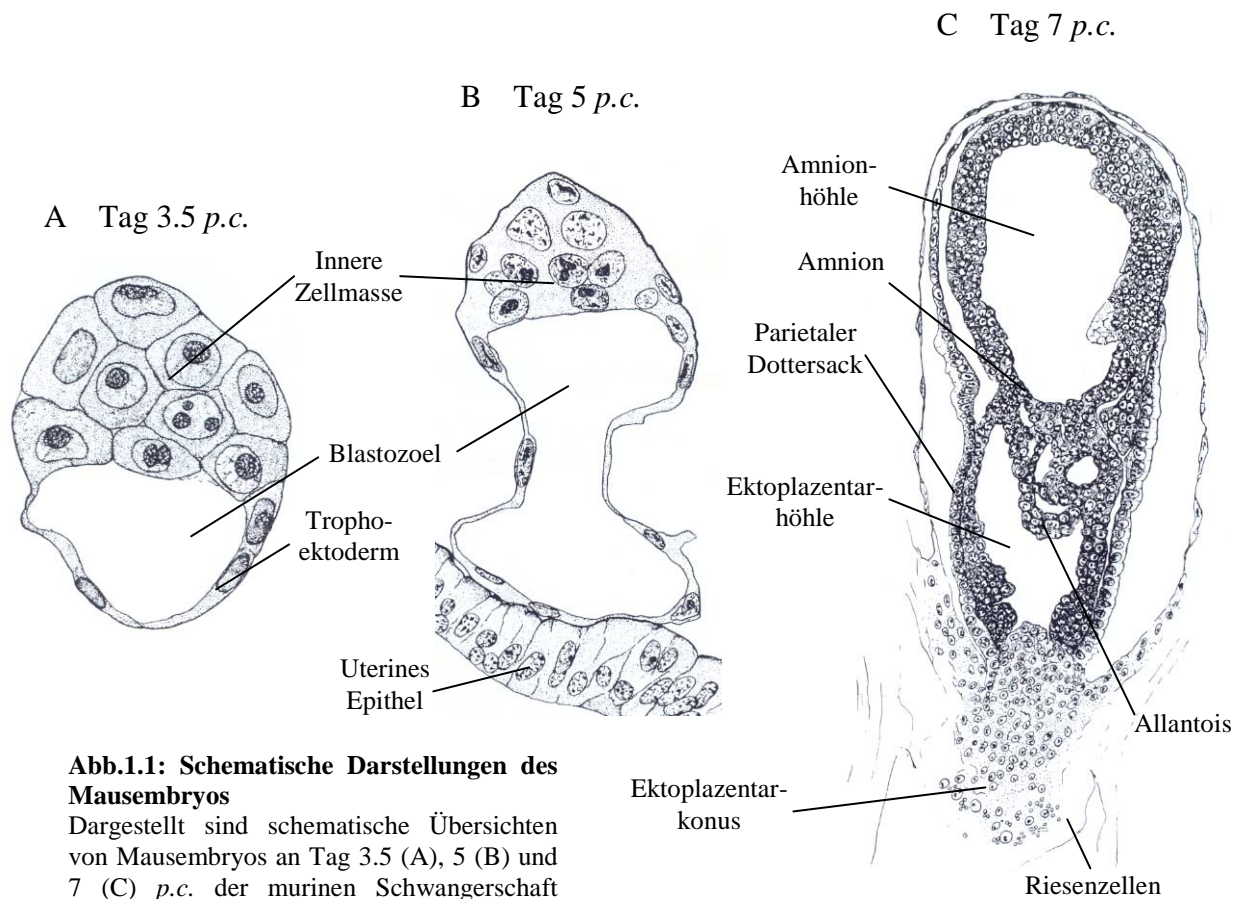


Abb.1.1: Schematische Darstellungen des Mausembryos

Dargestellt sind schematische Übersichten von Mausembryos an Tag 3.5 (A), 5 (B) und 7 (C) p.c. der murinen Schwangerschaft (Quelle: (Rugh, 1990), verändert).

sezerniert werden. Hierzu gehört Gelatinase B, eine Metallproteinase, die den Abbau der extrazellulären Matrix bewirken (Librach *et al.*, 1991; Behrendtsen *et al.*, 1992). Eine vermehrte Expression von Integrinen auf den Riesenzellen und ein Wechsel der Integrin Expression ist auch im weiteren Verlauf der Schwangerschaft von funktioneller Bedeutung für die Einwanderung des Trophoblasten in die Dezidua (Sutherland *et al.*, 1993; Damsky *et al.*, 1994). Der parietale Dottersack, bestehend aus parietalem Endoderm und Riesenzellen, stellt die früheste Form der Plazentaform und ist für die Aufnahme von Nährstoffen aus maternalem Blut, welches sich in angrenzenden Sinusoiden befindet, von großer Bedeutung. Ab Tag 7 p.c. entwickelt sich zudem die Allantois.

1.1.4 Bildung der Plazenta, Tag 9 bis 10 p.c.

Die sich bildende chorioallantoide Plazenta führt als mesodermale Anlage ohne Lumen ab Tag 9 p.c. der Schwangerschaft dem Ektoplazentarkonus Blutgefäße zu. Dadurch wird die Ektoplazenta stärker vaskularisiert und durch die Plazentation ersetzt. Somit ist nicht mehr der Dottersack, sondern die Plazenta für den Austausch von Nährstoffen, Gasen und Stoffwechselprodukten verantwortlich. Die Allantois wird partiell mit der Chorionplatte

verbunden und schließt die Plazenta zur Embryonalhöhle hin ab (Rugh, 1990). Unterbleibt eine Fusion, kommt es zu einem Abbruch der Schwangerschaft.

Die entstandene Plazenta kann von der Dezidua basalis aus begonnen in folgende Bereiche unterteilt werden: Eine Schicht mit Riesenzellen, gefolgt von dem Spongiotrophoblasten und der Labyrinthzone (Muntener and Hsu, 1977). Die Riesenzellen, die aus großen polyploiden Trophoblastzellen bestehen, bilden die Grenzschicht zu maternalen Zellen der Dezidua basalis. Der Spongiotrophoblast enthält von Trophoblastenzellen ausgekleidete, maternale Blutsinusoide, die allerdings hinsichtlich ihrer Größe und Anzahl geringer sind als in die in der Labyrinthzone. Das vom Chorion ausgebildete kapillare System, das eine große Oberfläche für den Nährstoff- und Gasaustausch darstellt, bildet die Labyrinthzone, die aus Trophoblastenzellen und mesodermalen Zellen besteht (Cross *et al.*, 1994). Maternales Blut steht in direktem Kontakt mit fetalen Trophoblastenzellen, daher auch die Bezeichnung einer hämochoriale Plazenta, wobei aber beide Kreisläufe immer voneinander getrennt bleiben.

Der maternale Anteil des schwangeren Uterus kann in histologisch definierte Zonen unterteilt werden (Abb.1.2): Die Dezidua basalis (DB), in die der Trophoblast einwandert, und die Dezidua capsularis, die für die weitere Entwicklung des Trophoblasten keine bedeutende Rolle mehr spielt. Die DB kann weiter in die vaskuläre Zone (VZ), die stark dilatierte Blutgefäße enthält, und die zentrale DB (zDB) unterteilt werden. An die zDB schließt sich das Myometrium (Myo) an.

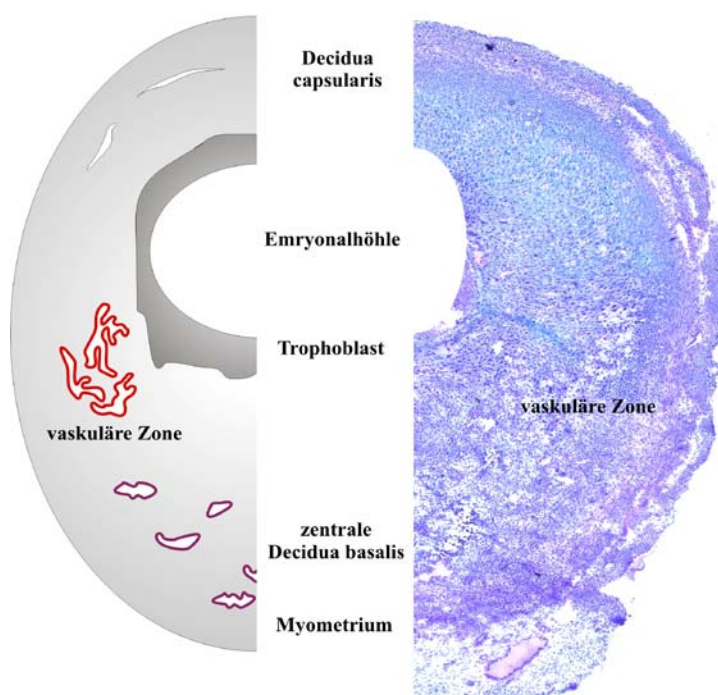


Abb.1.2: Der murine Uterus am Tag 9 p.c.

Es wird eine Einteilung des schwangeren Uterus einer C57BL/6J Maus am Tag 9 p.c. in verschiedene Mikrodomänen dargestellt. Dabei ist auf der linken Seite ein schematischer Aufbau und auf der rechten Seite eine Diff-Quick-Färbung gewählt.

1.1.5 Fetales Wachstum und Geburt, Tag 11 bis 21 p.c.

Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft dringt die Plazenta durch Wachstum tiefer in die maternale DB ein und nimmt an Größe zu (Abb.1.3A und B). Dabei entstehen zusätzliche, maternale Blutgefäße. Die Organbildung des Fetus ab Mitte der Schwangerschaft ist weitestgehend abgeschlossen und bis zur Geburt finden keine großen Transformationsprozesse, sondern vorwiegend Wachstumsprozesse statt (Cross *et al.*, 1994). Bei fortschreitender Schwangerschaft konnte gezeigt werden, dass die Stammzellen des Trophoblasten ihre Fähigkeit zur Differenzierung verlieren und weniger invasiv sind (Librach *et al.*, 1991). Die Geburt erfolgt nach dem Abschluss der intrauterinen Entwicklung des Embryo je nach Mausstamm am Tag 20 bis 21 p.c. der Schwangerschaft (Theiler, 1989).

A Tag 11 p.c.

B Tag 14 p.c.

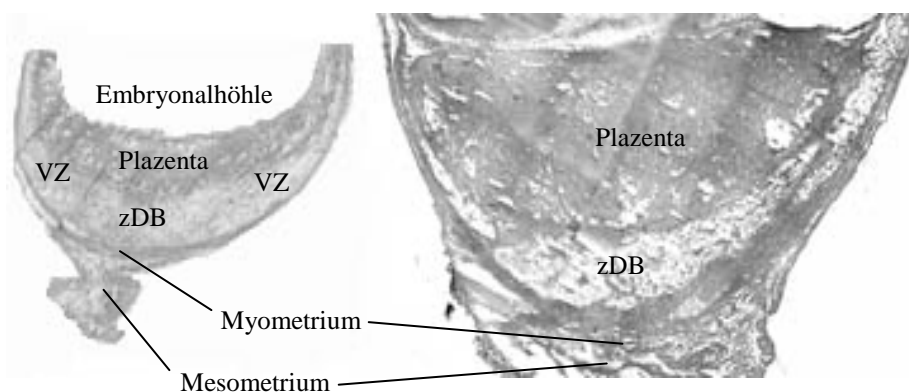


Abb.1.3: Der murine Uterus am Tag 11 und 14 p.c.

Dargestellt ist der schwangere Uterus einer C57BL/6J Maus am Tag 11 (A) und 14 (B) p.c. Gezeigt sind Diff-Quick-Färbungen, in die die Mikrodomänen eingezeichnet sind. VZ = vaskuläre Zone; zDB = zentrale Dezidua basalis.

1.2 Kontrolle der maternalen Immunantwort während der Schwangerschaft

Seit mehr als einem halben Jahrhundert versuchen Immunologen die Frage zu beantworten, wie der allogene Fetus eine maternale Immunantwort umgeht. Medawar vermutete, dass der semiallogene Fetus aufgrund einer Unterdrückung der maternalen Immunantwort geschützt wird (Medawar, 1953). Dieses als feto/maternale Toleranz bezeichnete Phänomen wird als ein Prozess verstanden, in dem multiple, überlappende Mechanismen wirksam sind, die einen Schutz des Fetus vor dem maternalen Immunsystem ermöglichen. Im folgenden soll auf eine Auswahl an Mechanismen zur Toleranzvermittlung gegenüber dem semiallogenen Fetus eingegangen werden, die von Seiten des maternalen Gewebes und Leukozyten als auch des fetalen Gewebes ausgehen.

1.2.1 Vom fetalen Gewebe vermittelte Toleranz

1.2.1.1 Inaktivierung der Komplementkaskade

Das Komplementsystem ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems und besteht aus etwa 30 verschiedenen hitzeempfindlichen Plasmaproteinen, die vielfältige Aufgaben erfüllen. Eine zentrale Rolle spielt das Komplementsystem in der antibakteriellen Immunabwehr, in der Modulation von Entzündungsreaktionen, in der Eliminierung von Immunkomplexen und in der Regulation der Antikörperproduktion (Bitter-Suermann and Burger, 1990; Fearon and Carter, 1995; Fischer *et al.*, 1996). Derzeit sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt: der klassische Weg, der mannanbindendes Lektin Weg und der alternative Weg. Alle drei Wege führen zur Bildung der C3 Konvertase, die in der Lage ist, C3 zu spalten und damit zu aktivieren. Als Spaltprodukte entstehen die Faktoren C3a und C3b. C3a wirkt als Mediator für lokale Entzündungen über eine Erhöhung der Vasopermeabilität und Beeinflussung der Mastzellaktivierung (Frank and Fries, 1991). C3b induziert weitere Komplementfaktoren (C5-C9), die einen membranangreifenden Komplex bilden und durch Porenbildung eine Zytolyse oder Bakteriolyse hervorrufen (Bhakdi *et al.*, 1990). Komplementspaltprodukte binden direkt an ein Pathogen und markieren es damit zur Phagozytose durch Monozyten, Granulozyten oder M ϕ , die den Rezeptor für C3b, das $\alpha_M\beta_2$ Integrin (CD11b/CD18) tragen.

Die Ablagerung von C3 auf dem fetalen Gewebe kann durch ein vom Trophoblasten produziertes Protein Crry gehemmt werden und eine durch das Komplementsystem vermittelte Immunreaktion gegen den Fetus bleibt aus (Xu *et al.*, 2000). Die Bedeutung dieses Proteins für den Schutz des fetalen Gewebes konnte an Crry^{-/-} Mäusen gezeigt werden, deren Embryonen eine Letalität von 100% betrug. Bei diesen führte die Ablagerung von C3 auf dem Trophoblasten zu einer Entzündung und zur Zerstörung des Gewebes. Dagegen war der Nachwuchs von doppelt defizienten Mäusen für Crry und C3 lebensfähig. Da es beim Menschen kein vergleichendes Protein gibt, aber das humane fetale Gewebe komplementregulierende Faktoren wie den *decay accelerating factor* (DAF), *membrane cofactor protein* (MCP) oder *membrane attack complex inhibitory factor* (CD59) sezerniert (Rooney *et al.*, 1993), wird vermutet, dass diese Faktoren eine ähnliche Funktion wie das Crry Protein bei Mäusen haben und den Fetus vor dem angeborenen Immunsystem der Mutter schützen.

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

Der Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan erfolgt durch das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), welches im ersten Schritt des Kynureninweges die oxidative Spaltung des Pyrrolringes von Tryptophan vermittelt (Daley-Yates *et al.*, 1988). Da Tryptophan für die Proliferation und Aktivierung von T Zellen benötigt wird (Lee *et al.*, 2002), resultierte eine Inhibierung des Abbaus von Tryptophan durch eine Inaktivierung von IDO in einer Abstoßungsreaktion des murinen Fetus durch aktivierte T-Zellen (Munn *et al.*, 1998). In der humanen Schwangerschaft konnte bislang nachgewiesen werden, dass IDO auf der menschlichen Plazenta erhöht exprimiert wird und während der Schwangerschaft die Konzentration von Tryptophan im Plasma reduziert ist (Kamimura *et al.*, 1991; Schrocksnadel *et al.*, 1996). IDO scheint eine vielfältige Rolle bei der Toleranzvermittlung zu spielen, da nicht nur fetales Gewebe dieses Enzym exprimiert, sondern auch maternale Monozyten, M ϕ und DC durch IFN γ induziert IDO sezernieren können (Carlin *et al.*, 1989; Fallarino *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003).

1.2.1.3 Expression nicht-klassischer MHC Moleküle

Ein weiterer Mechanismus, der für eine eingeschränkte Immunantwort gegenüber dem Fetus während der Schwangerschaft angesehen wird, ist die reduzierte Expression von klassischen MHC Moleküle auf fetalen Zellen. Da es bei murinen Schwangerschaften bisher keine Untersuchungen zu diesem Mechanismus gibt, soll stattdessen auf das humane System eingegangen werden. Beim menschlichen Trophoblasten sind weder die MHCI Moleküle HLA-A und HLA-B noch MHC- II Moleküle nachweisbar. Stattdessen wird das MHCI Molekül HLA-C und die dem minor histocompatibility complex zugehörigen HLA-G und HLA-E exprimiert, die im Gegensatz zum hochpolymorphen HLA-A und HLA-B nur eine beschränkte Auswahl an Antigenen präsentieren können (Hiby *et al.*, 2004). Bei gesunden Individuen wurde v.a. das vom Trophoblasten exprimierte HLA-G mit einer Beeinflussung des maternalen Immunsystems in Verbindung gebracht (Carosella *et al.*, 2001). Es könnte sein, dass HLA-G den Fetus vor NK Zellen vermittelter Lyse schützt, indem HLA-G exprimierende Trophoblastenzellen mit *killer immunoglobulin-like receptors* (KIRs) auf uNK Zellen interagieren (Rouas-Freiss *et al.*, 1997), und die Sezernierung von dezidualen Zytokinen beeinflussen (Loke and King, 2000). Von HLA-E ist bekannt, dass es durch die Interaktion des CD94/CD159 Rezeptors auf NK Zellen die Zytotoxizität dieser Zellen vermindert (Borrego *et al.*, 1998).

1.2.1.4 Fas/FasL

Das Fas/FasL System spielt eine entscheidende Rolle im Apoptoseweg und wird daher mit der Regulation von Immunantworten in Verbindung gebracht (Lenardo *et al.*, 1999). FasL (Fas-Ligand) verursacht Apoptose in Zellen, die auf ihrer Oberfläche Fas in Verbindung mit der dazugehörigen intrazellulären Signaltransduktionkette tragen. Von vielen Arbeitsgruppen wird FasL als ein Mechanismus zum Schutz des Fetus vor maternalen, alloreaktiven T-Zellen beschrieben (Uckan *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 1997; Kauma *et al.*, 1999). Die maternale Dezidua und das fetale Gewebe exprimieren FasL, welches das Wandern von aktivierten maternalen Zellen in die fetale Zirkulation und auch umgekehrt verhindert. An der feto/maternalen Grenzschicht konnte während der Schwangerschaft eine geringe, aber stetig ansteigende Apoptoserate gemessen werden (Jerzak *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Die mRNA von FasL konnte innerhalb der murinen Dezidua ab dem Schwangerschaftstag 6 *p.c.* und auf fetalen Endothelzellen ab dem Schwangerschaftstag 12 *p.c.* detektiert werden (Hunt *et al.*, 1997). Mäuse, die für FasL oder Fas defizient sind (gld oder lpr Mäuse), entwickeln schwere proliferative Störungen der Lymphozyten und Autoimmunität und fallen durch kleinere Wurfgrößen auf (Nagata and Suda, 1995; Hunt *et al.*, 1997). Werden humane FasL exprimierende Trophoblastenzellen zusammen mit CD3⁺ T Zellen kultiviert, gehen die T Zellen in Apoptose, die aber durch anti-FasL Ak verhindert werden kann (Coumans *et al.*, 1999). Die Entdeckung von CD3⁺ Fas⁺ T Zellen in der Dezidua lässt vermuten (Jerzak and Bischof, 2002), dass die FasL vermittelte Beseitigung von einwandernden Lymphozyten ein Mechanismus zum Schutz des fetalen Gewebes vor dem maternalen Immunsystem darstellt.

1.2.2 Funktionen maternaler Leukozyten im schwangeren Uterus

1.2.2.1 Granulozyten

Mit einem Anteil von 5% aller Leukozyten im schwangeren Uterus der Maus sind die Granulozyten vorwiegend an der Grenzschicht zwischen Trophoblast und DB nachweisbar (Parr *et al.*, 1990; De *et al.*, 1991). Über die Funktion dieser polymorphkernigen Zellen ist bislang wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass sie deziduale Zellreste phagozytieren, die durch den enzymatischen Abbau während der Invasion des Trophoblasten entstehen.

1.2.2.2 Lymphozyten

Der Anteil der B und T Zellen liegt bei murinen Schwangerschaften ohne Komplikationen bei ca. 1% aller Leukozyten innerhalb des Uterus (De *et al.*, 1991). Dabei nimmt der prozentuale Anteil im Verlauf der zweiten Schwangerschaftshälfte nur leicht zu. Der Anteil der $\alpha\beta$ -T Zellen ist sehr gering, doch ein größerer Anteil an $\gamma\delta$ -T Zellen scheinen in der DB Antigene des Trophoblasten erkennen zu können, wodurch dessen Wachstum limitiert wird (Heyborne *et al.*, 1992). Die $\gamma\delta$ -T Zellen werden zu einer phänotypisch heterogenen Gruppe von T Zellen zusammengefasst, die als regulatorische T Zellen (T_{reg}) beschrieben werden (Mincheva-Nilsson, 2003). Sie sollen in der Lage sein, regulatorische Funktionen im schwangeren Uterus der Maus auszuüben (Arck *et al.*, 1999). Gemeinsamkeiten der T_{reg} sind die Sezernierung der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und das *transforming growth factor β* (TGF β) sowie die Expression von CD152 (CTLA4), wodurch die Aktivierung weiterer T Zellen inhibiert oder eine negative Regulierung der Zellaktivierung ausgelöst werden kann (Greenfield *et al.*, 1998; Slavik *et al.*, 1999). $CD4^+ CD25^+$ Zellen bilden eine weitere Population der T_{reg} , die eine Schlüsselrolle bei der Inhibition einer Aktivierung des Immunsystems einnehmen (Sakaguchi *et al.*, 2001; Maloy *et al.*, 2003). Dabei wurde deutlich, dass die Vermittlung der unterdrückten antifetalen Immunantwort vor allem in den drainierenden Lk stattfindet (Aluvihare *et al.*, 2004).

1.2.2.3 Uterine NK Zellen

Uterine NK (uNK) Zellen sind die dominierende Population in der Dezidua während der humanen sowie murinen Schwangerschaft und stellen 70% der im Uterus befindlichen Leukozyten dar, wobei der Anteil der NK Zellen im Blut bei etwa 15% liegt (Koopman *et al.*, 2003). Die Migration der murinen uNK Zellen in die Dezidua erfolgt in Abhängigkeit von hormonellen Einflüssen sowie von IL-15 (Chantakru *et al.*, 2002). Die anfängliche Einwanderung und Proliferation von uNK Zellen ist stark und in der zDB lokalisiert (Moffett-King, 2002). Bis zur Hälfte der Schwangerschaft stabilisiert sich die Anzahl der uNK Zellen und nach dem Schwangerschaftstag 11 *p.c.* reduziert sich deren Anzahl durch Apoptose (Delgado *et al.*, 1996; Kusakabe *et al.*, 1999). Untersuchungen an transgenen Mäusen konnten zeigen, dass uNK Zellen eine Schlüsselrolle während der Plazentation oder der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft spielen. Mäuse des *tge26* Stammes haben weniger als 1% der uNK Zellen, die bei Kontrollmäusen gezählt werden, und besitzen eine hohe fetale Sterblichkeitsrate, die mit schwacher Entwicklung der

feto/maternalen Einheiten, ödematöser Dezidua und verdickten Blutgefäßen korreliert (Guimond *et al.*, 1998). Eine Wiederherstellung der Population an uNK Zellen in diesen tge26 Mäusen war über Knochenmarkstransplantationen möglich, führte zum Rückgang der pathologischen Erscheinungen und reduzierte die fetale Sterblichkeit. Mäuse, die für das *recombination activating gene 2* (RAG2) und für den Zytokinrezeptor *common gamma chain* (γ_c) defizient waren, zeigten eine Totaldefizienz an uNK Zellen und ähnliche pathologische Auffälligkeiten wie die tge26 Mäuse (DiSanto *et al.*, 1995;Greenwood *et al.*, 2000). Charakterisieren lassen sich die uNK Zellen über die Oberflächenmarker CD90.2 (Thy1.2), IL2R β , *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) sowie asialoGM1 (Croy *et al.*, 1985;Lala *et al.*, 1990;Kruse *et al.*, 2002;Paffaro, Jr. *et al.*, 2003). Das Muster der einzelnen Oberflächenmarker hängt vom Aktivierungszustand der uNK Zellen ab. Es wird angenommen, dass die uNK Zellen die Funktion maternaler Blutgefäße und die Invasion des fetalen Trophoblasten beeinflussen (Moffett-King, 2002). Die Bindung von nicht-klassischen MHC I Molekülen an KIR auf humanen uNK Zellen verhindert nicht nur die Lyse der Trophoblastenzellen, sondern verändert auch die von den uNK Zellen sezernierten Zytokine (King and Loke, 1991;Norwitz *et al.*, 2001). Diese sezernierten Zytokine können die Expression von Integrinen und die Produktion von Metalloproteasen beeinflussen. Das Zytokinrepertoire bei humanen und murinen uNK Zellen erstreckt sich von *colony-stimulating factor 1* (CSF-1) über TNF α bis zu IFN γ (Pollard *et al.*, 1987;Murphy *et al.*, 2005;Herington and Bany, 2007). In der Dezidua gehören die murinen uNK Zellen zu den Hauptproduzenten des uterinen IFN γ (Ashkar and Croy, 1999), weshalb sie für die Umgestaltung der dezidualen Gefäße im Uterus der Maus verantwortlich gemacht werden (Cross *et al.*, 2002).

1.2.2.4 Makrophagen

Makrophagen (M ϕ) entstehen aus zirkulierenden Monozyten, die durch Chemokine und Zytokine, wie beispielsweise das *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), aktiviert werden und in das Gewebe einwandern. Hormonelle Einflüsse wirken zusätzlich auf M ϕ . Östrogen verstärkt die Einwanderung von M ϕ , wohingegen Progesteron die Fähigkeit von Östrogen zur Vermittlung der Einwanderung von M ϕ inhibiert (Tibbetts *et al.*, 1999). Im lokalen Mikromilieu bilden die M ϕ je nach Gewebsart einen heterogenen Phänotyp aus und erfüllen gewebsspezifische Funktionen (van Furth, 1989). Im schwangeren Uterus der Maus werden etwa 20% aller Zellen zur Population der Monozyten und M ϕ gezählt (De *et al.*, 1991), die vorwiegend im Myo lokalisiert sind und zum Trophoblasten hin in ihrer

Anzahl abnehmen (Hunt *et al.*, 1985; Brandon, 1995). M ϕ scheinen nicht nur hinsichtlich ihres Reifestadiums und ihrer Lokalisation, sondern auch in Korrelation mit dem jeweiligen Schwangerschaftstag für ein verschiedenes Zytokinrepertoire und variierende Konzentrationen verantwortlich zu sein (Hunt, 1989; Lidstrom *et al.*, 2003). In uterinen murinen M ϕ konnte am Tag 1 *p.c.* die Sezernierung von inflammatorischen Proteinen wie IL-1 β und TNF α gemessen, doch während der Schwangerschaft war kein Protein nachweisbar (McMaster *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass eine post-transkriptionelle immunsupprimierende Regulation durch auto- oder parakrin sezerniertes Prostaglandin E2 vermittelt wird (Kunkel *et al.*, 1988). Die besondere Bedeutung der M ϕ für eine erfolgreiche Schwangerschaft wird an CSF-1 und *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) defizienten Mäusen deutlich. Beide für die M ϕ notwendigen Wachstumsfaktoren defizienten Mäuse zeigten eine eingeschränkte Funktion der M ϕ und nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Fortpflanzung (Robertson *et al.*, 1999).

1.2.2.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) gehören wie M ϕ und B Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) und werden als eine heterogene Zellfamilie beschrieben, zu deren Hauptaufgabe die Regulation des Immunsystems gehört (Banchereau and Steinman, 1998). In der Peripherie des Organismus nehmen sie Antigene auf, die prozessiert werden, migrieren zum regionalen Lymphknoten und regulieren über Interaktionen vor allem mit T Zellen die Immunantwort (Caux, 1998; Shortman and Liu, 2002).

1.2.2.5.1 Subpopulationen dendritischer Zellen

Als heterogene Zellfamilie unterscheiden sich die DC in ihrer Lokalisation, Expression von Oberflächenmarkern und Funktion voneinander (Lipscomb and Masten, 2002). Doch können die verschiedenen DC Subpopulationen *in vitro* aus CD34⁺ Knochenmarksvorläuferzellen oder aus Vorläuferzellen des Blutes generiert werden (Romani *et al.*, 1994; Caux *et al.*, 1996). *In vivo* nehmen der *fms-like-tyrosinkinase-3-Ligand* (Flt3L) und der GM-CSF bei der Generierung von *immature* DC (iDC) aus CD34⁺ Zellen im Knochenmark eine Schlüsselrolle in der Proliferation und weiteren Differenzierung der DC ein (Pulendran *et al.*, 2001; Bjorck, 2001). Der charakteristische Oberflächenmarker muriner DC ist das heterodimere Leukozytenintegrin CD11c (α_x Integrin), das zur Familie der Adhäsionsmoleküle gehört (Metlay *et al.*, 1990). Diese bestehen aus einer großen α -Kette (CD11c) und einer nicht kovalent gebundenen β -Kette

(CD18). Eine Einteilung der DC in verschiedene Subpopulationen erfolgte ursprünglich aufgrund ihrer Entstehung aus myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen (Wu *et al.*, 1996). So wurden myeloide DC als CD11b⁺ (α_M Integrin) und lymphoide DC als CD11b⁻ CD8 α ⁺ beschrieben (Maraskovsky *et al.*, 1996; Vremec and Shortman, 1997). Da aber ebenfalls CD8 α ⁺ DC aus myeloiden Progenitorzellen erzeugt werden konnten (Traver *et al.*, 2000), bedeutete die Bezeichnung lymphoid und myeloid nicht länger die hämatopoetische Herkunft, sondern wird nur noch aufgrund der CD8 α ⁺ Expression verwendet. Neben den Oberflächenmarkern (Tabelle 1.1) unterscheiden sich myeloide und lymphoide DC auch aufgrund ihrer spezifischen Expression von Zytokinen (Shortman and Liu, 2002). Plasmazytoide DC, die eine plasmazytoide Struktur zeigen und hohe Mengen an IFN α sezernieren können, werden über den Oberflächenmarker CD45RA charakterisiert.

Tab.1.1: Charakterisierung muriner DC Subpopulationen (Quelle: (Schuurhuis *et al.*, 2006), verändert)

Oberflächenmarker	Myeloide DC	Lymphoide DC	Plasmazytoide DC
CD4	+ oder -	-	±
CD11a	++	++	++
CD11c	++	++	±
CD31			-
CD36			+
CD38			++
CD40	+	++	+
CD44			++
CD45RA			++
CD54	++	++	++
CD123			+
MHCII	++	++	++

Die Höhe der Oberflächenexpression:

- = nicht vorhanden; ± = niedrig; + = mittel; ++ = hoch; freies Feld = keine Hinweise

1.2.2.5.2 Funktionen dendritischer Zellen

DC wandern *in vivo* als iDC über das Blut in Gewebe und Organe ein (Banchereau *et al.*, 2000). Dort bleiben die DC bis sie auf ein Antigen treffen, dieses aufnehmen und auf der Oberfläche präsentieren. Dieser Ausreifungsprozess führt dazu, dass die *mature* DC (mDC) in die lymphatischen Gewebe auswandern und dort eine Immunantwort initiieren können (Inaba *et al.*, 1993). Neben der Fähigkeit kostimulatorische Moleküle zu exprimieren, sezernieren DC nach deren Aktivierung eine Reihe löslicher Zytokine, wie IL-6, IL-10 und IL-12 (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999; Stephens *et al.*, 2003; Brzoza *et al.*, 2004). Von den DC sezerniertes IL-12 wirkt sich beispielsweise auf CD8⁺ T Zellen aus, die nur in Anwesenheit von IL-12 aktiviert werden können (Schmidt and Mescher, 2002). Somit gehört IL-12 neben der Antigenerkennung und der Kostimulation als weiterer Bestandteil zur Induktion einer Immunantwort über CD8⁺ T Zellen (Curtsinger *et al.*, 2003). Plasmazytoiden DC wird aufgrund der INF α Sezernierung eine zentrale Rolle bei der unspezifischen Abwehr von Viren zugeschrieben (Lian *et al.*, 2003). In Abhängigkeit von der Art des Antigens kann also eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems ausgelöst werden (Schuurhuis *et al.*, 2006). Aufgrund eines mangelnden Reifegrades können aber auch DC, die von der Entwicklungsgeschichte zwischen den iDC und mDC eingeordnet werden können und zum Teil als *premature* DC bezeichnet werden, eine periphere Toleranz induzieren (Lutz *et al.*, 2000).

Innerhalb des schwangeren Uterus der Maus und des Menschen konnten DC nachgewiesen werden (Blois *et al.*, 2004b; Kammerer, 2005). Die Anzahl der CD11c⁺ DC im Verlauf der murinen Schwangerschaft bleibt aber nicht konstant, sondern erhöht sich vom Tag 7 bis 9 *p.c.* der Schwangerschaft und verringert sich anschließend wieder (Blois *et al.*, 2004b). Dabei bildet die Subpopulation der myeloiden DC die Mehrheit der DC innerhalb des Uterus, die eine hohe Expression von IL-10 und eine geringe Expression von IL-12 zeigten. Diese Erkenntnis würde die Vermutung erlauben, dass myeloide DC eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Toleranz gegenüber dem fetalen Gewebe einnehmen, da sie die Förderung von T_{reg} vermitteln (Rutella *et al.*, 2006). Zusätzlich soll eine geringe Expression von MHCII Molekülen auf DC eine T Zellen Anergie und somit die fetale Akzeptanz fördern (Lutz and Schuler, 2002). Die Bedeutung der DC für eine erfolgreiche Schwangerschaft konnte anhand des CBA-J x DBA-2J Abortmodells unterstrichen werden. Bei einem adoptiven Transfer von DC, die aus dem Knochenmark von CBA-J Mäusen generiert wurden, sank die Abortrate auf 2.2% verglichen mit 23.8% bei unbehandelten CBA-J x DBA-2J Mäusen (Blois *et al.*, 2004a). Allerdings ist der

definitive Phänotyp der im schwangeren Uterus befindlichen DC, deren Funktion oder Migrationsverhalten weiterhin im Unklaren. Es wird außerdem diskutiert, dass sich aufgrund des Zytokinmilieus monozytäre Vorläuferzellen zu Makrophagen oder zu DC ausdifferenzieren könnten (Palucka *et al.*, 1998).

1.2.2.5.3 Die Expansion dendritischer Zellen

Für eine bessere Erforschung der DC sind Methoden entwickelt worden, um DC *in vivo* und *in vitro* vermehren zu können. Dieses ist z.T. notwendig, da DC nur ca. 1-2% aller Zellen im Gewebe exprimieren (Banchereau and Steinman, 1998). Dabei soll auf den zuvor schon erwähnten Flt3L eingegangen werden. Flt3L ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor aus der Familie der helikalen Zytokine, wird ubiquitär exprimiert und bindet an seinen Rezeptor CD135 (Lyman *et al.*, 1993). Der Tyrosinkinase-Rezeptor vom Typ III wird nur auf Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Injektionen von humanem und murinem Flt3L führten zu einem starken Anstieg von DC in verschiedenen Organen der Maus (Maraskovsky *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2003). Von der Expansion waren sowohl myeloide als auch lymphoide DC betroffen, die hohe Expressionen des kostimulatorischen Moleküls CD86 zeigten und dadurch in der Lage waren, T_{H2} und T_{H1} Zellantworten auszulösen (Pulendran *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurden aber auch tolerogene Einflüsse von durch Flt3L expandierte DC gegenüber T Zellen in einem Tumormodell beschrieben (Miller *et al.*, 2003). Zwar hat Flt3L einen Einfluss auf die generierten DC, doch bietet sich hiermit eine Methode an, durch die gezielt DC vermehrt werden können, was durch die Verabreichung von rekombinantem Protein oder in Form von Flt3L sezernierenden Tumorzellen erreicht werden kann (Mach *et al.*, 2000; Karsunky *et al.*, 2003).

1.3 Die Leukozytenextravasation

Damit Leukozyten aus dem Blut zu dem Ort einer Entzündung oder in ein lymphatisches Gewebe migrieren können, müssen die Leukozyten im Blutkreislauf an Endothelzellen der Gefäßwand in dem entsprechenden Gewebe in Kontakt treten. Anschließend muss die Gefäßwand durchdrungen werden, damit die Leukozyten ihren immunologischen Funktionen nachgehen können (Butcher and Picker, 1996; von Andrian and Mackay, 2000). Zelladhäsionsmoleküle, Chemokinrezeptoren und Chemokine vermitteln die Extravasation, die in verschiedenen Phasen abläuft (Abb.1.3). Zunächst wird ein initialer

Kontakt mit dem Endothel hergestellt, der am effizientesten über Selektine, die sich in hoher Expressionsdichte auf villösen Ausstülpungen der Leukozyten befinden, vermittelt wird. Das Entlangrollen des Leukozyten (rollende Adhäsion) erfolgt über α_4 Integrine und deren Kontakt zu MAdCAM-1 und VCAM-1 auf dem Endothel oder über stark exprimierte Selektine. Nach Aktivierung der Zelle über endothelial gebundene Chemokine oder löslich aktivierende Faktoren und deren Rezeptoren auf den Leukozyten kommt es zur festen Bindung mit dem Endothel (Kehrl, 2006). Die Aktivierung erfolgt über eine Konformationsänderung der Integrine auf der Leukozytenoberfläche und bewirkt eine erhöhte Affinität zu den auf den Endothelzellen exprimierten Liganden. Bei der anschließenden Diapedese sind ebenfalls α_4 oder β_2 Integrine mit ihren Liganden in Kombination mit anderen Rezeptoren und chemotaktischen Faktoren beteiligt.

Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle für die Extravasation kann anhand von Defekten für diese Moleküle erkannt werden. Bei ungenügender Rekrutierung von Leukozyten

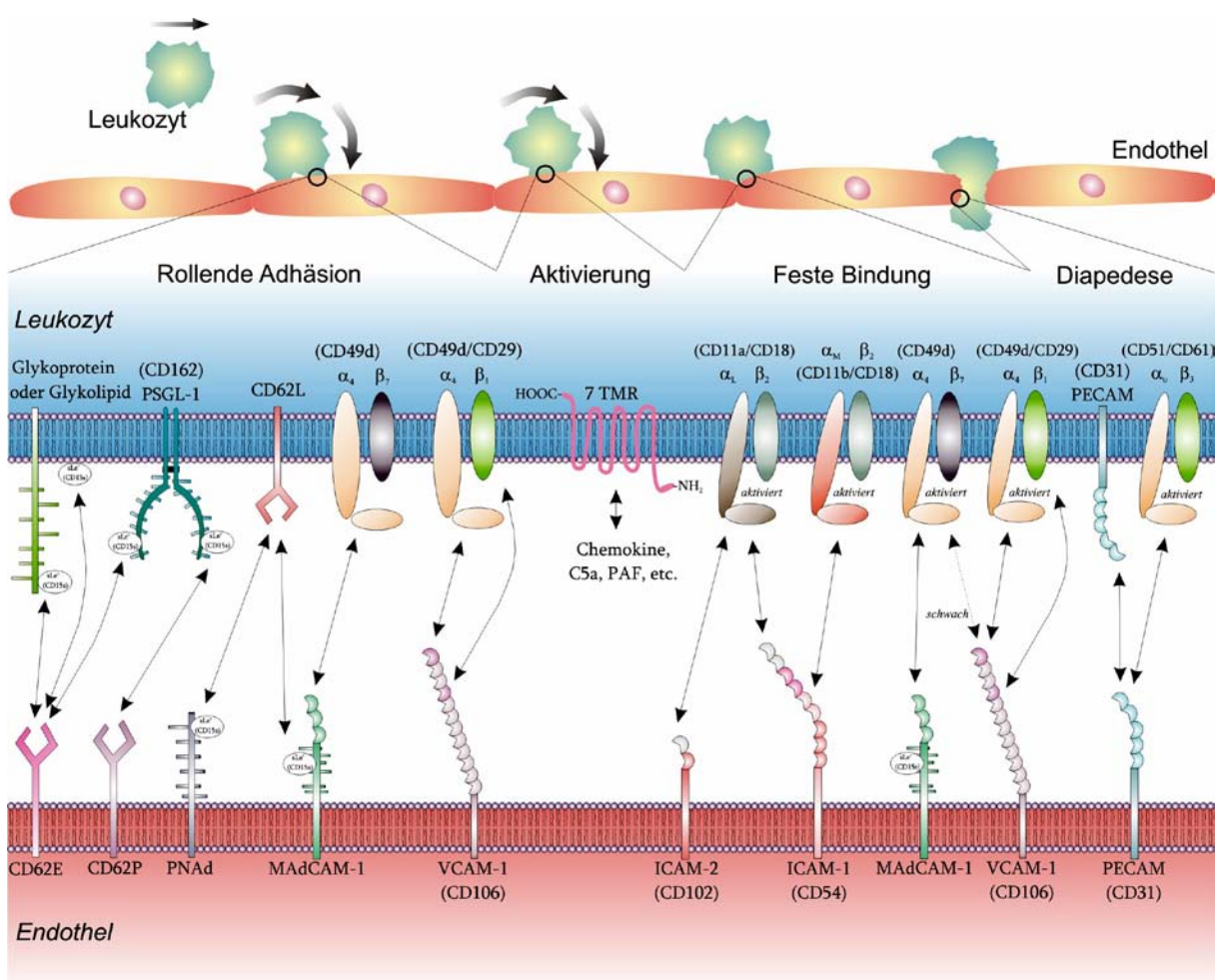


Abb.1.3: Extravasation von Leukozyten

Darstellung der wichtigsten in die Extravasation von Leukozyten involvierten Mediatoren. Die Leukozyteneinwanderung besteht aus mehreren Phasen, die durch Interaktionen spezialisierter Zelladhäsionsmoleküle mit ihren Liganden sowie durch das Vorhandensein aktivierender zellgebundener und löslicher Faktoren charakterisiert ist (Quelle: (von Andrian and Mackay, 2000), verändert).

kommt es zu gravierenden, meist letal verlaufenden Krankheitsbildern (Etzioni *et al.*, 1999). Somit beeinflussen die durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Interaktionen zwischen Leukozyten und dem Endothel die selektive Einwanderung spezifischer Leukozytenpopulationen in ein Gewebe und den Verlauf von Immunreaktionen. Die Einteilung der Zelladhäsionsmoleküle erfolgt in Selektine, Integrine, Immunglobulin-Superfamilie, Cadherine und Syndecane (Springer, 1995).

1.3.1 Selektine

Selektine bestehen aus Endothel-Selektin (E-Selektin), Plättchen-Selektin (P-Selektin) und Leukozyten-Selektin (L-Selektin), die wie zuvor schon erwähnt eine bedeutende Rolle bei dem initialen Kontakt zwischen dem Endothel und den Leukozyten vermitteln. Obwohl die Bindungsaffinität über das Tetrasaccharid Sialyl-LewisX sehr gering ist, bewirkt dieser Kontakt eine Verlangsamung des Leukozyten (Frenette and Wagner, 1996). In der Zellmembran sind die Selektine durch eine Transmembrandomäne, die nur eine kleine zytoplasmatische Einheit besitzen, verankert (Bevilacqua, 1993). Durch überlappende Bindungsmuster ist die Bildung unterschiedlicher Ligandenpaare möglich (Abb.1.3).

E-Selektin ist nicht konstitutiv in Endothelzellen vorhanden, sondern wird von diesen nach Aktivierung mit Zytokinen, wie z.B. IL-1, TNF α oder bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), exprimiert. Da E-Selektin synthetisiert werden muss, erreicht deren Konzentration erst nach 4-8h das Maximum und wird nach zellulärer Aktivierung innerhalb von 24h endozytotisch von der Zelloberfläche entfernt und im Lysosom abgebaut (Bevilacqua *et al.*, 1989).

P-Selektin ist in funktionsfähiger Form in Speichergranula der Zellen, den Weibel-Paladebodies des Endothelzellen und α -Granula der Thrombozyten, vorhanden. Eine Stimulation der Zellen mit Mediatoren wie Histamin oder Thrombin verursacht eine schnelle Oberflächenexpression von P-Selektin innerhalb von 10min, weshalb es besonders für eine frühe Leukozytenrekrutierung verantwortlich ist (Patel *et al.*, 2002). Zusätzlich kann P-Selektin nach der Zellaktivierung mit Zytokinen oder LPS neu synthetisiert werden (McEver, 1997). Nach der Exprimierung an der Zelloberfläche wird P-Selektin schnell wieder durch Endozytose internalisiert und in die Speichergranula zurückgeführt oder im Lysosom abgebaut (Setiadi *et al.*, 1995). Die Expression der Gene für P-Selektin, aber auch für E-Selektin, werden durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert.

L-Selektin ist konstitutiv auf den meisten Leukozytenpopulationen nachweisbar, wobei es auf den Mikrovilli lokalisiert ist. Nach der Aktivierung der Zelle wird L-Selektin innerhalb weniger Minuten proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten, weshalb L-Selektin eine für die Zelladhäsion modulierende Funktion zugesprochen wird (Hafezi-Moghadam and Ley, 1999). L-Selektin vermittelt zudem die Extravasation von Lymphozyten in lymphatisches Gewebe.

1.3.2 Integrine

Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die aus jeweils einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt sind. Derzeit sind 18 α -Ketten und 8 β -Ketten beschrieben, die zu bislang 24 bekannten Integrinen kombinieren können (Abb.1.4; (Luo *et al.*, 2007)). In ihrer Eigenschaft als Adhäsionsmoleküle dienen sie als Bindeglied zwischen benachbarten Zellen und der extrazellulären Matrix mit dem Zytoskelett und sind während des Zellwachstums, -differenzierung und -migration essentiell. Eine Besonderheit der Integrine ist, dass ihre Aktivierung, die durch Chemokine erfolgen kann, unabhängig von der Stärke ihrer Expression auf der Zelloberfläche reguliert werden kann (Hynes, 1992). Durch die Bindung der Integrine an einen spezifischen Liganden wird eine Konformationsänderung des Heterodimers hervorgerufen, die die intrazellulären Domänen für zyttoplasmatische Signalmoleküle zugänglich macht und so spezifische Signalkaskaden aktiviert, die eine Erhöhung der Affinität und Avidität der Integrine zu

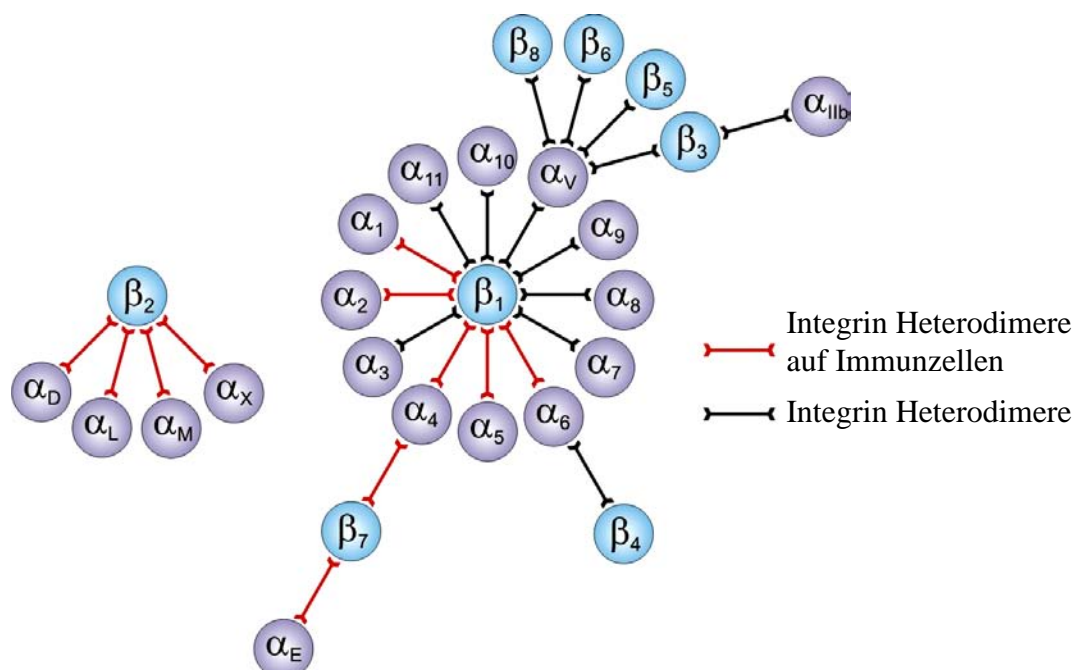


Abb.1.4: 24 Heterodimere

Grafisch dargestellt sind die 24 Kombinationsmöglichkeiten von Integrin α - und β -Ketten zu Heterodimeren (Quelle: (Luo *et al.*, 2007), verändert).

ihren Liganden bewirkt (Laudanna *et al.*, 2002). Die α_4 Integrine ($\alpha_4\beta_7$, $\alpha_4\beta_1$) und die β_2 Integrine ($\alpha_L\beta_2$ (CD11a), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b)) sind vor allem in die Extravasation von Leukozyten involviert. α_4 Integrine können wie Selektine einen initialen Kontakt zum Endothelium herstellen, aber sie wirken vor allem in späteren Phasen der Extravasation mit (Berlin *et al.*, 1995; Butcher and Picker, 1996). β_2 Integrine können keinen initialen Kontakt herstellen, sondern sind nur in den späteren Phasen der Extravasation beteiligt sind (Springer, 1994). Integrine kontrollieren somit die Migration der Leukozyten zu ihren Zielorganen. Die Liganden der α_4 und β_2 Integrine sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, wozu das *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1), das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und die *intercellular cell adhesion molecules* (ICAMs) gehören (Butcher and Picker, 1996).

1.3.3 Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSf) stellt eine große heterogene Familie von Zelladhäsionsmolekülen mit über 100 Mitgliedern dar (Walsh and Doherty, 1997). Die Mitglieder zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu Antikörpern, den Immunglobulinen. Zu dieser Familie gehören die zuvor erwähnten Liganden der α_4 und β_2 Integrine ICAM-1, -2, -3, VCAM-1 und MAdCAM-1 sowie das *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), welches sich vorwiegend auf dem Endothel zwischen zwei benachbarten Zellen befindet und für die transendotheliale Migration von Leukozyten verantwortlich gemacht wird (Muller *et al.*, 1993). Die IgSf ist durch eine variierende Anzahl an Immunglobulin-Domänen im extrazellulären Bereich des N-Terminus und durch eine oder mehrere folgende Fibronectin Typ III Domänen gekennzeichnet. Mitglieder der IgSf vermitteln eine Ca^{2+} unabhängige homotypische oder heterotypische Adhäsion. Beispielsweise zeigt das *neural cell adhesion molecule* (NCAM) eine homotypische Adhäsion, während ICAM eine heterotypische Interaktion mit Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten eingehen (Aplin *et al.*, 1998). Denn an die erste und zweite Immunglobulin-Domäne bindet CD11a und an die dritte Bindungsstelle CD11b. ICAM-1 vermittelt die Adhäsion immunkompetenter Zellen an aktiviertes Gewebe und die Aktivierung von T Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (Springer, 1990). VCAM-1 ist der Ligand von $\alpha_4\beta_1$ und wird während einer Entzündung auf nicht-mukosalem Gewebe exprimiert, wohingegen MAdCAM-1, der Ligand für $\alpha_4\beta_7$, auf mukosalem Gewebe vorkommt (Bevilacqua, 1993; Butcher and Picker, 1996).

1.3.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine Untergruppe der Zytokine, die eine entscheidende Rolle in der Regulation von zellulären Migrationsprozessen einnehmen (Olson and Ley, 2002). Darüber hinaus sind sie in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert (Segerer *et al.*, 2000; Segerer *et al.*, 2001). Bei den Chemokinen handelt es sich um kleine (ca. 8-14 kDa), meist basische und lösliche Moleküle, die eine Länge von 75-125 Aminosäuren haben. Eine Ausnahme bilden CXCL16 und Fractalkin, welche über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert sein können. Eine konservierte Sequenz von Aminosäuren wird zur Einteilung der Chemokine in vier Familien genutzt (Nelson and Krensky, 1998). Es gibt die zwei benachbarte Cysteine enthaltenden CC-Chemokine (Abb.1.5A) und die CXC-Chemokine, bei denen zwei vorhandene Cysteinreste durch eine andere Aminosäure getrennt vorliegen (Abb.1.5.B). Außerdem gibt es noch das CX3C-Chemokin Fractalkin und das XC-Chemokin Lymphotaktin. Für viele der bekannten Chemokine existieren mehrere Namen, so dass eine neue Nomenklatur eingeführt wurde (Zlotnik and Yoshie, 2000), bei der die Bezeichnung sich aus der Familie des Chemokins, einem L für *ligand* und einer Zahl zusammensetzt (z. B. CCL2 für MCP-1). In der vorliegenden Arbeit wurde aber die noch weit verbreitete ursprüngliche Nomenklatur verwendet. Die meisten Chemokine sind redundant; zusätzlich exprimieren die jeweiligen Leukozytenpopulationen mehrere Rezeptoren für ein oder mehrere Chemokine (Mantovani, 1999). So binden alle vier *monocyte chemoattractant protein* (MCP) Moleküle (MCP-1 bis MCP-4) an den Chemokinrezeptor CCR2, aber MCP-2 bis MCP-4 können auch an die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR3 binden (Tab.1.2), was der Regulation und Migration der Leukozyten im Gewebe dient. Chemokine werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen wie Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen sezerniert

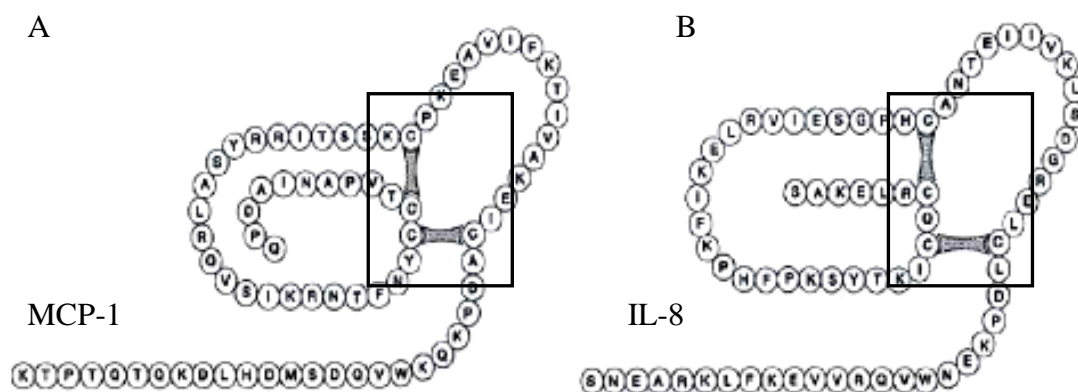


Abb.1.5: Chemokine

Abschnitt der Primärsequenz des CC-Chemokins MCP-1 (A) und des CXC Chemokins IL-8 mit den vier konservierten Cysteinresten (Quelle: (Baggiolini *et al.*, 1994) , verändert).

(Rollins *et al.*, 1990; Standiford *et al.*, 1991; Choi and Jacoby, 1992), die hinsichtlich ihres Sezernierungsmusters in zwei Gruppen unterteilt werden können. Konstitutive und oftmals gewebespezifisch exprimierte Chemokine sind an der Homöostase und Migration von Lymphozyten beteiligt. Dagegen sind inflammatorische Chemokine, die im Rahmen von Entzündungsprozessen gebildet werden durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF α , LPS oder IFN γ induzierbar (Olson and Ley, 2002).

Auch die jeweiligen Chemokinrezeptoren weisen gemeinsame strukturelle Motive auf. So handelt es sich bei den Rezeptoren um Membranproteine mit 7 Helices, deren intrazelluläre Signaltransduktion an G-Proteine gekoppelt ist. Die Chemokinrezeptoren werden in CCR1 bis CCR10, CXCR1 bis CXCR6, XCR1 und CX3CR1 eingeteilt (Murphy *et al.*, 2000). Nach der Bindung eines Chemokins an einen Rezeptor werden über eine G-Protein gekoppelte Signaltransduktion oder Endozytose unterschiedliche Reaktionen der Zelle induziert (Blanpain *et al.*, 2002). Dabei wird ein Chemokinrezeptor in Bereichen der Zelloberfläche exprimiert, die der höheren Konzentration des Chemokins

Tab.1.2: Chemokinrezeptoren und Chemokine

Chemokinrezeptor	Chemokine
CCR1	RANTES, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , HCC-1
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	Eotaxin-1 bis -3, RANTES, MCP-2, MCP-4
CCR4	TARC, MDC
CCR5	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2
CCR6	LARC, β -Defensin
CCR7	SLC, ELC
CCR8	I-309, TARC, MIP-1 β
CCR9	TECK
CCR10	CTACK, MEC
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, Gro- α , Gro- β , Gro- γ , ENA-78, NAP-2
CXCR3	IP-10, MIG, I-TAC
CXCR4	SDF-1
CXCR5	BCA1
CXCR6	CXCL16
XCR1	Lymphotactin
CX3CR1	Fractalkine

Quelle: (Baggiolini *et al.*, 1994; Bacon *et al.*, 2002)2), verändert

zugewandt sind (Olson and Ley, 2002). Die Expression der Chemokinrezeptoren auf Leukozyten ist stark vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand der Zellen abhängig. Aufgrund der Expression von Chemokinrezeptoren lassen sich auch unterschiedliche Subpopulationen bei den Leukozyten erkennen. So werden iDC (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6) über Chemokine zu den Orten der Entzündung rekrutiert (Cavanagh and von Andrian, 2002). Nach der transendothelialen Migration sind die Chemokine für deren gerichtete Bewegung innerhalb des Gewebes entlang eines Chemokingradienten von entscheidender Rolle. Nach einer Aktivierung der iDC über verschiedene Mediatoren werden die Chemokinrezeptoren wie CCR5 herunter- und die Expression von CCR7 hochreguliert (Flores-Romo, 2001). Der Ligand für CCR7, das *secondary lymphoid tissue chemokine* (SLC), wird auf Endothelzellen der Lymphgefäße und auf dem Stroma in der Zone der T Zellen lymphatischer Organe sezerniert und dort immobilisiert (Dieu *et al.*, 1998), wodurch die DC zum drainierenden Lymphknoten migrieren können.

Interessanterweise konnten während der Schwangerschaft im murinen Uterus verschiedene Chemokine nachgewiesen werden. Es wurden die Liganden für den Chemokinrezeptor CCR5 *macrophage chemotactic protein-1* (MCP-1) und *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) verstärkt sezerniert (Wood *et al.*, 1999).

2 Zielsetzung

Die Toleranz der Mutter gegenüber dem semiallogenen Fetus stellt ein immunologisches Phänomen dar, das durch multifunktionelle Mechanismen zu erklären versucht wird. Dabei hat die Regulierung des Zutritts maternaler Leukozyten zum schwangeren Uterus über Zelladhäsionsmoleküle und Chemokine einen Einfluss auf den Verlauf einer Schwangerschaft. *In vivo* Langzeit Inhibitionsstudien mit monoklonalen Antikörpern gegen die vaskulären Zelladhäsionsmoleküle MAdCAM-1 und P-Selektin führten zu einer Reduzierung von $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten im schwangeren Uterus der Maus und zeigten deren Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung von uNK Zellen an der feto/maternalen Grenzschicht (Ferne Korn *et al.*, 2004; Ferne Korn *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte der Phänotyp der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern in der Durchflusszytometrie und durch Immunfluoreszenzfärbungen zum kritischen Zeitpunkt der beginnenden Plazentaentwicklung bestimmt werden. Desweiteren sollte die Verteilung der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten und deren mögliche Interaktionen mit uterinen NK Zellen im schwangeren Uterus der Maus untersucht werden. Bei der Extravasation von Leukozyten spielen neben Zelladhäsionsmolekülen auch Chemokine und Chemokinrezeptoren eine maßgebliche Rolle. Leukozyten aus feto/maternalen Einheiten schwangerer Mäuse sollten auf die Expression von CCR2, CCR5 und CCR7 hin untersucht werden. Desweiteren sollte die Bedeutung von CCR5 für die Rekrutierung der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten in die Dezidua basalis durch Injektion des blockierenden monoklonalen Antikörpers MC68 und mit Hilfe von CCR5^{-/-} Mäusen bestimmt werden. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass die Mehrheit der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten zu den dendritischen Zellen gehören. Um die Bedeutung der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ dendritischen Zellen für die Schwangerschaft zu ermitteln, wurden dendritische Zellen durch Injektion von Flt3L sezernierenden Zellen *in vivo* expandiert und deren Auswirkung auf die murine Schwangerschaft untersucht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten Informationen über den Phänotyp der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten, die Expression von Chemokinrezeptoren für die Rekrutierung von dendritischen Zellen in den schwangeren Uterus und ihre Bedeutung für die murine Schwangerschaft erbringen. Die gewonnenen Kenntnisse könnten zu einem besseren Verständnis der Rolle dendritischer Zellen im schwangeren Uterus und den Verlauf der Schwangerschaft führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysenwaage LC 6200S	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank (Water Jacketed Incubator)	Labotect Labortechnik, Göttingen
Digitalkamera Canon EOS 10D	Canon, Tokyo, Japan
Digitalkamera Leica DC350F	Leica, Bensheim
Durchflusszytometer FC 500	Beckman Coulter, Krefeld
Durchflusszytometer LSRII	BD Biosciences, San Jose, USA
Durchlichtmikroskop Leitz Diaplan	Leica, Bensheim
ELISA-Washer	TECAN, München
Färbekammer Magic Immuno Staining Tray	CellPath PLC, Hemel Hempstead, UK
Fluoreszenzmikroskop DMLM DC350F	Leica, Bensheim
Gefriermikrotom Kryostat CM 1850	Leica, Bensheim
Gefriertruhe, -80°C	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Gitternetz (10 x 10 Felder)	Leica, Bensheim
Konfokales Mikroskop Leica TCS SP2	Leica, Bannockburn, IL, USA
Laborwaage 12116 MP	Sartorius, Göttingen
Magnetic cell separator MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mikrometer-Skala (100 Skalenteile, Länge 1cm)	Leica, Bensheim
pH-Meter pHM 83 Autocal	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipette Combi-Pipette Typ 3180L	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 200-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Shandon Cytospin3	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Spektralphotometer Hitachi U-3000	Hitachi, Tokyo, Japan
Sterile Werkbank II AI B3	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus Christ, Osterode

Wasserbad	GFL Labortechnik, Burgwedel
Wasserstrahlpumpe	Inotech, Nabburg
Zentrifuge Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge Minifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Christ, Osterode

3.1.2 Laborbedarf

Deckgläser, unterschiedliche Formen	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch Dialysis Tubing	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cellulose Membrane, 25 x 16mm	
Einmalkanülen BD Microlance 3	Becton Dickinson, Heidelberg
steril, 0.45 x 13 mm	
Einmalspritzen, steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Feindosierungsspritze, steril, 1 ml	B. Braun Melsungen, Melsungen
Gewebe-Eindeckmedium Crystal Mount	Biomed, Foster City, CA, USA
Heparinröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Instruments, Nussloch
Kryoröhrchen, steril	Greiner, Nürtingen
Kulturplatte, 24-Loch	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kunststoffröhrchen, steril,	Greiner, Nürtingen
mit Schraubverschluß, 15 ml, 50 ml	
Latex-Einmalhandschuhe	Ansell, München
Nunc Stericup Filtrationssysteme	Millipore, Schwalbach
Objektträger Super Frost	Menzel Gläser, Braunschweig
PAP Pen Liquid Blocker Slide Marker	Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Kanada
Pipettenspitzen,	Greiner, Nürtingen
1-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl	
Pipettenspitzen, Combitips, steril,	Eppendorf, Hamburg
0.5 ml, 1.25 ml, 2.5 ml, 5 ml, 12.5 ml	
Reaktionsgefäße, 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1.5 ml, mit Schraubdeckel	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen fürs Durchflusszytometer, 600µl	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 25cm ² , 75cm ² , 175cm ²	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellsieb, 40 µm	BD Falcon, Heidelberg

3.1.3 Chemikalien und Enzyme

7AAD	Sigma-Aldrich, München
Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Brefeldin A	eBioscience, San Diego, CA, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Destilliertes Wasser	Apotheke Universität Lübeck, Lübeck
<i>Dolichos biflorus agglutinin</i> (DBA)	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isofluran-Baxter	Baxter, Lessines, Belgien
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kollagenase D, Typ IV	Sigma-Aldrich, München
Konzentrierte Salzsäure	Merck, Darmstadt
Lymphocyte LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phorbol-myristat-Azetat	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Protein-G-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Saponin	Merck, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trockeneis	Apotheke Universität Lübeck, Lübeck
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Merck, Darmstadt

3.1.4 Zellkulturmedien/-zusätze, Puffer, Lösungen

Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka Biochemika, Neu Ulm
Fötales Kälberserum, Mycoplex (FKS); 30min bei 56°C inaktiviert	PAA Laboratories, Cölbe
HBSS (Hanks´ Balanced Salt Solution)	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer	LIFE-Technologies, Paisley, UK
D-Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin, 200mM	BioWhittacker, Heidelberg
Kulturmedium DMEM	BioWhittacker, Heidelberg
Kulturmedium RPMI 1640	BioWhittacker, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
PBS (Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline)	Cambrex, Verviers, Belgien
Penicillin 10.000 E/ml	BioWhittacker, Heidelberg
Streptomycin 10.000 µg/ml	BioWhittacker, Heidelberg
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe

3.1.4.1 Zellkulturmedien

DATK32-Medium:

- Standardmedium
- 2.25g D-Glukose/500ml
- 0.05mM β-Mecaptoethanol (2µl/500ml)
- 1% NaCl

Kryomedium zum Einfrieren von Zellen:

- FKS
- 10% DMSO

Standardmedium:

- RPMI 1640
- 10% FKS
- 1% L-Glutamin (2mM)
- 100IU/ml Penicillin
- 100µg/ml Streptomycin

3.1.4.2 Puffer

MACS-Puffer/500ml PBS (sterilfiltriert), pH 7.4:

- 2.5g BSA
- 0.33g EDTA (2mM)

Bindungspuffer/1000ml, pH 7.0 (sterilfiltriert):

- 1.08g Natriumdihydrogenphosphat
- 3.27g Dinatriumhydrogenphosphat
- mit destilliertem Wasser auffüllen

Neutralisationspuffer/100ml, pH 9.0 (sterilfiltriert):

- 12.4g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- 2ml konzentrierte Salzsäure
- mit destilliertem Wasser auffüllen

Elutionspuffer/100ml, pH 2.7 (sterilfiltriert):

- 0.75g Glycin
- 1ml konzentrierte Salzsäure
- mit destilliertem Wasser auffüllen

Saponin-Puffer (in PBS gelöst):

- 0.1% Saponin
- 0.5% BSA

3.1.4.3 Lösungen

Isotonische (0.9%ige) Kochsalzlösung/100ml (sterilfiltriert):

- 150mM NaCl (0.88g)
- mit destilliertem Wasser auffüllen

Additive Lösung/100ml:

- 1.5M NaCl (8.8g)
- 50mM KCl (0.37g)
- 10mM MgCl₂ (0.1g)
- 18mM CaCl₂ (0.26g)
- mit destilliertem Wasser auffüllen

Kollagenaselösung/10ml:

- 20mg Kollagenase D
- 1ml Additive Lösung
- 100µl HEPES-Puffer (1M)
- mit destilliertem Wasser auffüllen

PFA-Lösung, pH 7.4:

- 2% PFA in PBS gelöst

Zur Herstellung der Lösung wird PBS auf 50°C erwärmt. Zur Steigerung der Löslichkeit von PFA kann der pH-Wert mit NaOH auf 11 eingestellt werden.

Nach vollständiger Lösung des PFA wird mit HCl die Lösung auf den pH-Wert von 7.4 eingestellt.

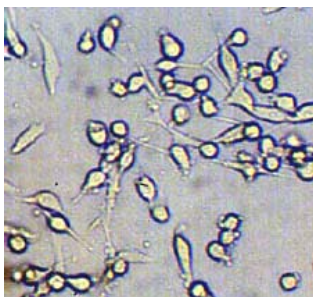
3.1.5 Zelllinien

Abb. 3.1: F1t3L-B16F10
Bei der mit F1t3L transfizierten B16F10 Zelllinie handelt es sich um adhärenente Zellen.

Die verwendeten murinen Hybridomzelllinien MECA-367 (produziert einen mAk gegen MAdCAM-1), DATK32 (produziert einen mAk gegen LPAM-1 [$\alpha_4\beta_7$]) und die Hybridomzelllinie B16F10 wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen. Letztere wird, wenn sie in C57BL/6 Mäuse injiziert wird, als gering immunogen beschrieben (Fidler and Nicolson, 1976). Daher wurde diese B16F10 Melanomzelllinie mit murinem F1t3L transfiziert (Mach *et al.*, 2000), um eine *in vivo* als auch *in vitro*

Quelle zur Produktion von größeren Mengen an F1t3L zur Verfügung zu haben. Diese adhärenent wachsende, F1t3L-B16F10 (Abb.3.1) benannte Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. E.C. Butcher (Stanford University, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

3.1.6 Mäuse

Versuche mit Mäusen, die während des Aufenthalts in den USA durchgeführt wurden, unterlagen der dortigen Genehmigung des „Stanford University Institutional Animal Care and Use Committee“. Sie wurden in Übereinstimmung mit „The Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Teaching and Research“ durchgeführt. Die Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig- Holstein genehmigte unter der Versuchsnummer 29/A3/97 die in Deutschland durchgeführten Tierversuche. Balb/c und C57BL/6J Mäuse (Weibchen und Männchen) wurden bei Charles River Deutschland, Sulzfeld erworben. Weibliche und männliche ICAM^{-/-} (C57BL/6.129S4-Icam1^{tm1Jcgr}/J (Xu *et al.*, 1994)), CCR5^{-/-} (C57BL/6.129P2-CCR5^{tm1Kuz}/J (Kuziel *et al.*, 2003)), P-Selektin^{-/-} (C57BL/6.129S2-Selp^{tm1Hyn}/J (Mayadas *et al.*, 1993)) und β_7 ^{-/-} (C57BL/6-Igfb7^{tm1Cgn}/J (Wagner *et al.*, 1996)) Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Der Tag- und Nachtrhythmus der Tiere lag bei je zwölf Stunden. Die Tiere erhielten Wasser und Futterpellets nach Belieben.

3.1.7 Primärantikörper und Sekundärkonjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk) und Sekundärkonjugate sind in der Tab.3.1 dargestellt. Dabei ist der Klon des mAks, sein bindendes Antigen, die IgG-Klasse (Isotyp), die Konjugierung, die über den jeweiligen mAk hauptsächlich identifizierbare Zellpopulation bzw. die Lokalisation des Antigens im Organismus, der Hersteller bzw. die Bezugsquelle und die in der Durchflußzytometrie bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzte Konzentration gelistet. Falls der mAk von anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurde, wird die Erstbeschreibung jenes mAks mit einer Literaturangabe versehen.

Tab. 3.1: Verwendete Primärantikörper und Sekundärkonjugate

Anti- gen	mAb (Klon)	IgG- Klasse	Konju- gation	Zellpopulation	Hersteller	Konz. µg/ml
CD3ε	145- 2C11	Hamster IgG1	FITC, PE	T-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg	35
						17
CD8α	53-6.7	Ratte IgG2a	FITC, PE, APC	T-Zellen (Teilpopulation)	BD Biosciences, Heidelberg	35
						17
						8

CD11b (α_m)	M1/70	Ratte IgG2b	FITC, APC-Cy7	myeloide Zellen, aktivierte T-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg	35 8
CD11c (α_x)	HL3	Hamster IgG1	FITC, PE, Biotin	DC	BD Biosciences, Heidelberg	35 17 35
CD11c (α_x)	N418	Hamster IgG1	APC	DC	eBioscience, San Diego, CA, USA	8
CD11c (α_x)	N418	Hamster IgG1	Paramagne- tische Partikel	DC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	1 μ l pro 1x10 ⁶ Zellen
CD14	rmC5-3	Ratte IgG1	PE	M ϕ , Granulozyten	BD Biosciences, Heidelberg	17
CD 16/32	2.4G2	Ratte IgG2b	-	NK Zellen, DC, M ϕ , Neutrophile	BD Biosciences, Heidelberg	80
CD 16/32	CT- 17.2	Maus IgG2a	-	NK Zellen, DC, M ϕ , Neutrophile	CALTAG Laboratories, Carlsbad, CA, USA	80
CD19	1D3	Ratte IgG2a	FITC	B-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg	35
CD29 (β_1)	KMI6	Ratte IgG2a	-	Leukozyten, EC, Epithelzellen	BD Biosciences, Heidelberg	40
CD44	Her- mes-1	Ratte IgG2a	-	humane Leukozyten, Erythrozyten	E.C. Butcher (Jalkanen <i>et al.</i> , 1986)	35
CD45R (B220)	RA3- 6B2	Ratte IgG2a	FITC PE-Cy5	B-Zellen, NK Zellen, DC	BD Biosciences, Heidelberg	35 8
CD49d (α_4)	PS/2	Ratte IgG2a	-	Interaktion mit β_1 (Leukozyten) oder β_7 (Lymphozyten, Monozyten)	BD Biosciences, Heidelberg	40
CD54 (ICAM-1)	3E2	Hamster IgG1	PE	HEV, vaskuläres EC, M ϕ , DC	BD Biosciences, Heidelberg	17
CD62P (P- Selektin)	RB40.2 4.4	Ratte IgG2a	-	Plättchen, aktivierte EC	D. Vestweber (Weller <i>et al.</i> , 1992)	35
CD68 (Macro- sialin)	FA-11	Ratte IgG2a	PE	Gewebsm ϕ , Langer- hans-Zellen, schwache Expression bei DC	Serotec, Düsseldorf	8
CD80 (B7-1)	16- 10A1	Hamster IgG1	FITC PE	M ϕ , DC, aktivierte B-Zellen	eBioscience, San Diego, CA, USA	17 8

CD83	Michel-17	Ratte IgG1	PE	reife DC, aktivierte Lymphozyten	eBioscience, San Diego, CA, USA	8
CD86 (B7-2)	GL1	Ratte IgG2a	PE	Lymphozyten, DC, M ϕ	BD Biosciences, Heidelberg	17
CD90.2 (Thy1)	30-H12	Ratte IgG2b	FITC PE	T-Zellen, NK Zellen (Teilpopulation)	BD Biosciences, Heidelberg	17 8
CD103 (α_E)	M290	Ratte IgG2a	FITC	Interaktion mit β_7 (Lymphozyten)	BD Biosciences, Heidelberg	35
CD106 (VCAM-1)	MK2.7	Ratte IgG2a	-	EC, FDC, Knochenmarkstroma	E.C. Butcher (Miyake <i>et al.</i> , 1991)	50
CD106 (VCAM-1)	429	Ratte IgG2a	-	EC, FDC, Knochenmarkstroma	eBioscience, San Diego, CA, USA	17
CD161c (NK1.1)	PK136	Maus IgG2a	PE	NK-Zellen, T-Zellen	BD Biosciences, Heidelberg	17
CD192 (CCR2)	MC21	Ratte IgG2b	-	T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, DC	M. Mack (Mack <i>et al.</i> , 2001)	3
CD195 (CCR5)	MC68	Ratte IgG2b	-	T-Zellen, NK Zellen, Monozyten	M. Mack (Mack <i>et al.</i> , 2001)	3
CD197 (CCR7)	4B12	Ratte IgG2a	PE	T-Zellen, DC Sub- population	eBioscience, San Diego, CA, USA	17
CD205 (DEC205)	NLDC-145	Ratte IgG2a	FITC	DC, epitheliale Thymuszellen	CALTAG Laboratories, Carlsbad, CA, USA	50
$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1)	DATK32	Ratte IgG2a	-	Lymphozyten, NK Zellen, Monozyten	ATCC (Andrew <i>et al.</i> , 1994)	17
β_7	M293	Ratte IgG2a	FITC, PE	Interaktion mit α_E (Lymphozyten) oder α_4 (Lymphozyten und Monozyten)	BD Biosciences, Heidelberg	35 17
F4/80	BM8	Ratte IgG2a	FITC, PE	reife M ϕ	eBioscience, San Diego, CA, USA	17 8
I-A/I-E	M5/114 .15.2	Ratte IgG2b	FITC, PE	I-A ^d und I-E ^d MHCII DC, M ϕ	BD Biosciences, Heidelberg	35 17
IL-12 (p40/p70)	C15.6	Ratte IgG1	APC	DC, M ϕ	BD Biosciences, Heidelberg	8
IL-15	AIO.3	Ratte IgG2a	-	viele Nicht-T-Zellen	eBioscience, San Diego, CA, USA	17
Ly-6G/ Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	Ratte IgG2b	FITC, PE	Granulozyten, Mono- zyten, NK Zellen, Lymphozyten	BD Biosciences, Heidelberg	35 17

MAd-CAM-1	MECA 367	Ratte IgG2a	-	HEV, chronische Entzündungsorte	ATCC (Streeter <i>et al.</i> , 1988)	50
Cyto-keratin 8	TRO MA-1	Ratte IgG1	FITC	Epithel	M.B. Omary (Oshima <i>et al.</i> , 1983)	1
n.d.	7/4	Ratte IgG2a	FITC	Neutrophile	AbD Serotec, Düsseldorf	35
PE	-	Maus IgG1	Paramagnetische Partikel	R-Phycoerythrin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	1µl pro 1x10 ⁶ Zellen
Ratte-IgG	-	Esel	Biotin	-	Dianova, Hamburg	4
Ratte-IgG	-	Maus	PE, FITC	-	Chromaprobe, Mountain View, USA	17
Ratte-IgG	-	-	Alexa Fluor® 568	-	eBioscience, San Diego, CA, USA	2
-	-	-	Streptavidin -FITC, -PE, -PE-Cy5	-	Dako, Hamburg	17 8
α-N-acetylglactosaminyl	-	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	FITC	uNK Zellen, weiße Pulpa der Milz, Spermien	Vector Lab., Burlingame, CA, USA	1

n.d. = nicht definiert

3.1.8 Isotyp-Kontrollen

Ratte-anti-Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM BD Biosciences, Heidelberg
 ohne Markierung, FITC, PE, PE-Cy5,
 APC oder APC-Cy7 konjugiert

Hamster-anti-Maus IgG1 BD Biosciences, Heidelberg
 biotinyliert, FITC, PE, PE-Cy5,
 APC oder APC-Cy7 konjugiert

3.1.9 Seren

Normales Maus- oder Ratten-Serum Sigma, Taufkirchen
 Normales Hamster- oder Ziegen-Serum Dako, Hamburg

3.1.10 Immunoassay

Mouse Flt-3 Ligand Immunoassay R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

3.1.11 Sonstige Reagenzien

Avidin-Biotin Blockierungssystem Dako, Hamburg
DAB-Kit Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Diff-Quik Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz
Vectastain ABC-Kit Vector Lab., Burlingame, CA, USA

3.1.12 Software

Adobe Acrobat Reader 5.0 Adobe Systems, München
CorelDRAW X3 Corel Systems, Ottawa, Canada
CXP Analysis Beckman Coulter, Krefeld
GraphPad Prism 4 GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Leica Confocal Software Leica, Bannockburn, IL, USA
Leica IM500 1.2 Leica, Bensheim
MicroSoft Excel 2003 Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
MicroSoft Word 2003 Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Photoshop 6.0 Adobe Systems, München
Volocity Improvion, Lexington, MA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer 0.4%igen Lösung des Vitalfarbstoffes Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden dann vier große Quadrate (bestehend aus je 16 kleinen Quadraten) ausgezählt und so die Anzahl (N)/ml ermittelt. Die Berechnung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{N/ml}$$

3.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Hybridom- und Melanomzelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei 100g und 4°C für 5min abzentrifugiert und in einem erforderlichen Volumen eiskaltem Kryomedium aufgenommen, um eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml einzustellen. Die Zellsuspension wurde zu je 1ml auf sterile Kryoröhrchen verteilt. Nachdem die Kryoröhrchen 15 min auf Eis verweilten, wurden sie bei -80°C eingefroren. Nach 1 bis 2 Wochen wurden die Kryoröhrchen mit der Zellsuspension zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt (ca. -200°C).

Um eingefrorene Zellsuspensionen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C möglichst schnell aufgetaut und durch Zentrifugation bei 100g und RT für 3min vom DMSO-haltigen Kryomedium separiert. Nach einem Waschschrift mit 5ml vom Kulturmedium RPMI 1640 konnten die Zellen in ihrem jeweiligen Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt werden.

3.2.1.3 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeitsgänge, die die Zellkultivierung betreffend, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Kultiviert wurden alle Zellen bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 5%.

3.2.1.3.1 Hybridomzelllinien DATK32 und MECA-367

DATK32 wurde im DATK32-Medium (3.1.4.1) kultiviert. Die Hybridomzelllinie, die den Antikörper MECA- 367 produziert, wurde im Standardmedium (3.1.4.1) gehalten. Bei

einem Farbumschlag des Indikators Phenolrot im Medium von rot zu gelb (gelb = sauer durch Laktatbildung) waren die Zellen zu verdünnen (im Verhältnis von 1:4). Dazu wurde in einer Zellkulturflasche frisches Medium vorgelegt und der verwendeten Zellkulturflasche entsprechend Zellsuspension hinzugefügt.

Um Antikörper aus den Kulturüberständen herzustellen, wurde die Zellkultur in 50ml Kunststoffröhrchen fraktioniert. Nach einer Zentrifugation über 10min bei 300g wurde der Überstand gesammelt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Das Pellet der Hybridomzelllinien wurde resuspendiert und konnte mit frischem Medium zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche gegeben werden.

3.2.1.3.2 Melanomzelllinien B16F10 und Flt3L-B16F10

Je 5×10^6 Zellen der B16F10 und der transfizierten Flt3L-B16F10 Zelllinie wurden in einer 175cm² Zellkulturflasche mit je 30ml Standardmedium kultiviert. Nach 3 Tagen erreichten sie eine Konfluenz von etwa 60%. Um die Zellen splitten zu können, wurde zunächst das Medium verworfen und die adhärennten Zellen mit HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 7ml Trypsin/EDTA für 4min bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 10ml Standardmedium hinzugegeben, die Zellen durch viermaliges Auf- und Abpipettieren vollständig durchmischt und in ein 50ml Kunststoffröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 200g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml Standardmedium resuspendiert. Danach konnten wieder 5×10^6 Zellen in eine 175cm² Zellkulturflasche mit 30ml Standardmedium eingesät werden.

3.2.1.4 Gewinnung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzelllinien

500µg mAk pro Tier und Schwangerschaftstag war für die Durchführung der Langzeit *in vivo* Inhibitionsstudien (3.2.3.6.2) erforderlich (Kruse *et al.*, 2002). Gewonnen wurden die mAk aus Kulturüberständen der Hybridomzelllinien MECA-367 und DATK32. Dazu wurden die gesammelten Zellkulturüberstände (3.2.1.3.1) im Verhältnis von 1:1 mit dem gleichen Volumen Bindungspuffer vermischt und durch ein Nunc Stericup Filtrationssystem (Porengröße 0.45µm) zur Entfernung von zellulären Partikeln filtriert. Die folgenden Arbeitsschritte bei der Gewinnung des mAk mussten bei einer Temperatur von 4°C ausgeführt werden. Als Vorbereitung wurden mit einem Dreiwegehahn ausgestattete 5ml Einmalspritzen zur Hälfte mit Watte befüllt, mit PBS durchtränkt und festgestopft (Achtung: die Flüssigkeit muss noch gut durch die Säule

laufen können). Beladen wurde die Säule mit einer Protein-G-Agarose Lösung. Die so hergestellten Protein-G-Säulen wurden mit 2ml 0.1M Glycin (pH 2.7) in PBS und darauffolgend mit PBS gespült. Für eine längere Lagerung konnten die Protein-G-Säulen mit PBS + NaN₃ befüllt und bei 4°C für eine spätere nochmalige Nutzung aufbewahrt werden. Vor der erneuten Nutzung musste aber das NaN₃ mit 20ml Bindungspuffer eluiert werden. Danach konnte der mit Bindungspuffer vermischte Kulturüberstand die Säule durchlaufen. Einem anschließenden Spülschritt mit 20ml Bindungspuffer erfolgte die Eluierung des mAk durch 20ml Elutionspuffer. Aufgefangen wurde das Eluat in 1.5ml Reaktionsgefäßen, die mit 58µl Neutralisationspuffer befüllt waren. Die Konzentration des in den Reaktionsgefäßen gesammelten Antikörpers konnte spektroskopisch durch die Messung der Extinktion bei 280nm bestimmt und nach folgender Formel berechnet werden (Johnstone and Thorpe, 1996):

$$c_{\text{Antikörper}} [\text{mg/ml}] = \frac{\text{Absorption}_{280\text{nm}}}{\epsilon_{280\text{nm}} \times 10 [\text{mg/ml}]} \times \text{Verdünnungsfaktor}; \epsilon_{280\text{nm}} \text{ IgG} = 13,6$$

Die Fraktionen mit einer Konzentration von mindestens 0.25mg/ml wurden vereinigt und mit Hilfe von NaOH und HCl auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Um das NaN₃ zu entfernen, wurde die Antikörperlösung in einen Dialyseschlauch gefüllt und unter Rühren bei 4°C für 3 Tage in sterilem PBS (bei täglichem Wechsel des Puffers) gereinigt. Danach wurde die Antikörperkonzentration nochmals am Photometer bestimmt. Damit das Volumen bei der *i.p.* Verabreichung des Antikörpers 500µl nicht überschritt, wurde die Antikörperlösung unter Verwendung des Microcon Mikrokonzentrators aufkonzentriert. Die dazu notwendigen Arbeitsgänge wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

3.2.1.5 Isolierung und Aufreinigung von Zellen aus der Maus

Die den schwangeren Tieren entnommenen fmE oder Lk wurden zur Verhinderung einer Kontamination mit Blut zweimal bei RT in einer mit PBS gefüllten Petrischale gewaschen. Dabei wurde durch einen kreuzartigen Schnitt bei den fmE das Ausbluten ermöglicht (eine Zusammenfassung der Isolierung und Aufreinigung von Zellen aus der Maus ist unter Abb.3.2 zu finden). Handelte es sich um den gleichen Inzuchtstamm, wurden diese fmE gemeinsam verarbeitet. Anschließend wurden die fmE in einer

Kollagenaselösung (versetzt mit 1ml der additiven Lösung) mechanisch zerkleinert. Von den Mäusen entnommenes Blut wurde mit PBS 1:1 verdünnt, auf Lymphocyte LSM 1077 geschichtet und stand nach einem Waschschrift weiteren Untersuchungen zur Verfügung (z.B. TRITC-Markierung oder Fluoreszenzfärbungen).

Die fmE und die Lk wurden bei 37°C für 45min enzymatisch mit der Kollagenase behandelt, um die Leukozyten aus dem Zellverband zu lösen und anschließend untersuchen zu können. Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (40µm) in ein 50ml Röhren gegeben, um Gewebestücke aus der Lösung entfernen zu können. Auf 20ml wurde dann die Zellsuspension mit MACS-Puffer eingestellt, um die Enzymreaktion der Kollagenase mit dem enthaltenen EDTA, dass die Ca²⁺-Ionen bindet, zu stoppen. 20ml Lymphocyte LSM 1077 wurde zuvor in ein weiteres 50ml Röhren

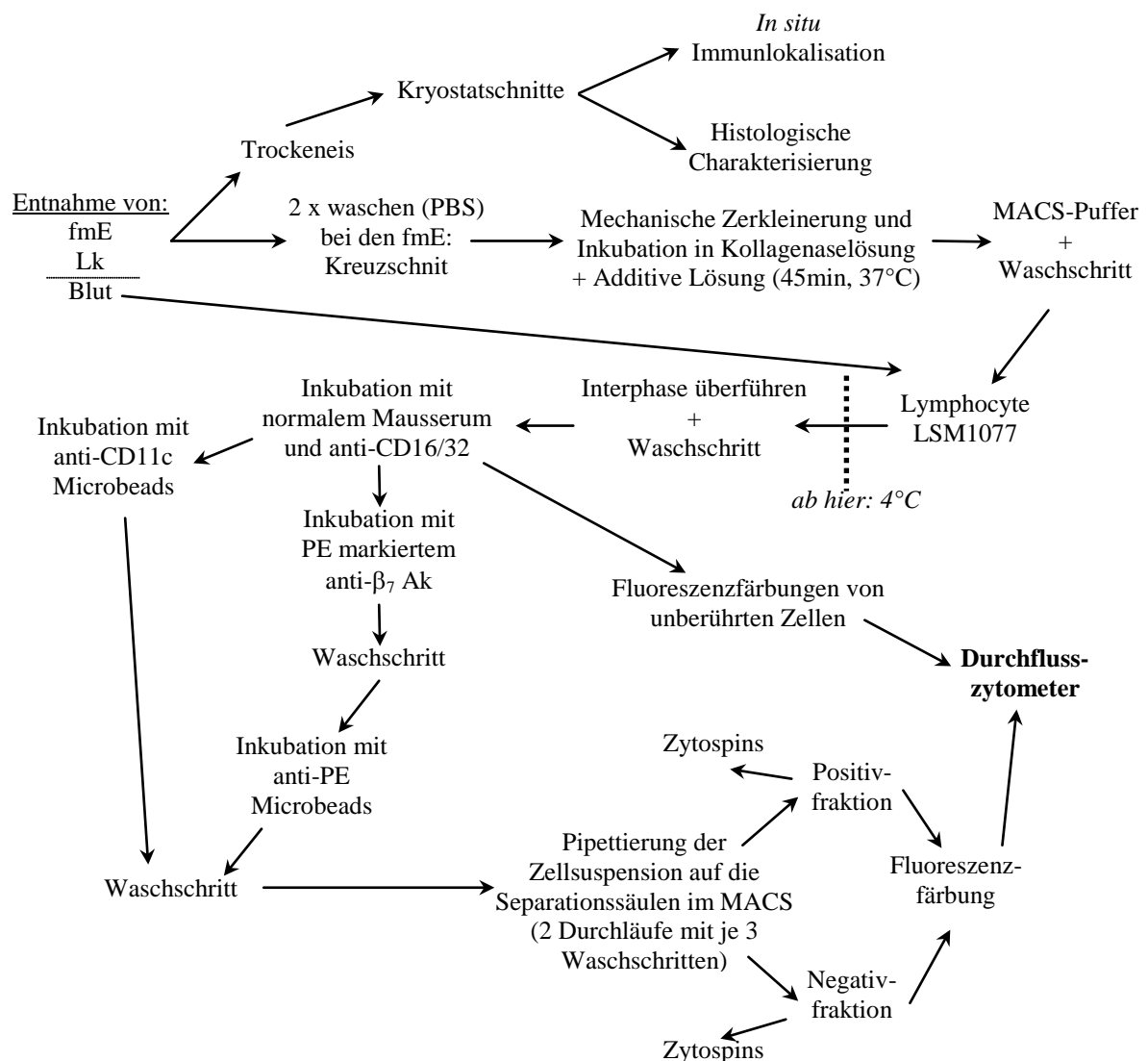


Abb.3.2: Fließschema über die Versuchsabläufe zur Untersuchung von Gewebe und Blut aus Mäusen

Schematisch dargestellt sind die unter 3.2.1.6, 3.2.3.2, 3.2.4, 3.2.5.3 genannten Methoden.

gegeben, auf das nun die Zellsuspension sehr vorsichtig geschichtet wurde. Es war darauf zu achten, dass das Lymphocyte LSM 1077 nicht unter 15°C war, da es sonst zu Verklumpungen innerhalb der Zellsuspension bei der Zentrifugation führen konnte, die eine Fortsetzung des Versuchs dann nicht mehr ermöglichten.

Die Zentrifugation erfolgte bei 15°C, 600g und ohne eingesetzte Bremse. Die durch die Zentrifugation entstandene Interphase zwischen dem Lymphocyte LSM 1077 und der Zellsuspension enthält alle Leukozyten, die eine geringere Dichte als 1.077 g/cm³ haben. Somit ist die Zellsuspension von Erythrozyten ($\rho \approx 1.1 \text{ g/cm}^3$), Granulozyten ($\rho \approx 1.09 \text{ g/cm}^3$) und zellulären Verklumpungen befreit. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein 15ml Röhrchen überführt und mit MACS-Puffer auf 14ml aufgefüllt.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C und vorgekühlten Lösungen durchgeführt.

Nach einer Zentrifugation von 10min bei 300g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100µl MACS-Puffer resuspendiert. Um unspezifische Bindungen der eingesetzten Ak zu verhindern, wurde die Zellsuspension 10%ig mit normalem Mausserum und 10%ig mit einem Ratte-anti-Maus oder Maus-anti-Maus CD16/32 Ak (bei der Verwendung von spezifischen unmarkierten Ratte-anti-Maus Ak, z.B. anti-CCR5) zur Blockierung der Fc-Rezeptoren für 10min vorinkubiert. Um unberührte Leukozyten aus den fmE oder den Lk zu analysieren, konnte nun eine Fluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt werden.

Um aber definierte Leukozytenpopulationen zu untersuchen und aufzukonzentrieren (β_7^+ und CD11c⁺ Zellen), wurden die Zielzellen mit paramagnetischen Partikeln, sogenannten Microbeads, markiert. Bei der Aufreinigung von β_7^+ Zellen mussten die Zellen zunächst einmal mit PE markiertem anti- β_7 Ak vorinkubiert und anschließend gewaschen werden, um die PE markierten Zellen mit anti-PE Microbeads isolieren zu können. Die CD11c⁺ Zellen konnten direkt mit anti-CD11c Microbeads markiert werden. Zu 1×10^7 Zellen wurden 10µl Microbeads zu der Zellsuspension hinzugefügt und für 15min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Volumen mit MACS-Puffer auf 5ml eingestellt und für 10min bei 300g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml resuspendiert und auf die zuvor mit 500µl MACS-Puffer equilibrierten Separationssäulen im MACS pipettiert. Die mit den Microbeads versehenen Zellen blieben in der Separationssäule hängen und werden als Positivfraktion bezeichnet. Zellen, die ohne Microbeads waren, wurden als Negativfraktion in einem Reagenzröhrchen aufgefangen. Nach drei Waschschrinen mit je 500µl MACS-Puffer wurde zur Erhöhung der Reinheit der Positivfraktion diese zügig mit Hilfe eines zur Säule gehörigen Plastikstopfens mit 1ml MACS-Puffer von der ersten auf

die zweite Separationssäule im MACS eluiert. Nach wiederholten Waschschritten (3 x 500µl MACS-Puffer) konnte die Positivfraktion zügig in ein Reagenzröhrchen eluiert werden. Eine Fluoreszenzfärbung der Zellen für die Durchflusszytometrie schloss sich dieser Aufreinigung an.

3.2.1.6 Stimulation von Zellen für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Um die von der Zelle produzierten Zytokine bestimmen und detektieren zu können, mussten die Zellen zuvor mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (500ng/ml) stimuliert werden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen/ml im Kulturmedium RPMI 1640, das mit PMA und Ionomycin versetzt wurde, aufgenommen und für 4h unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach 2h wurde Brefeldin A (10µg/ml) hinzugegeben. Brefeldin A wird von *Penicillium brefeldianum* produziert und hemmt den Transport von neusynthetisierten Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat mit der Folge, dass neu synthetisierte Proteine nicht sezerniert werden können und in der Zelle akkumulieren (Misumi *et al.*, 1986). Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen (200g, 5min). Darauf folgte zunächst die Oberflächenfärbung, gefolgt von einer Fixierung mit einer PFA-Lösung für 20min. Nach einem Waschschriff wurden die Zellen im Saponin-Puffer resuspendiert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde der Zellsuspension für 5min im Volumenanteil von 10% normales Rattenserum hinzugegeben. Anschließend wurden die spezifischen Antikörper für die Zytokine hinzugegeben. Als Kontrollfärbungen wurden Antikörper aus der entsprechenden Spezies und des gleichen Isotyps wie die spezifischen Antikörper durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 20min wurden die Zellen im Saponin-Puffer gewaschen und für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Immunoassay (ELISA) zur Bestimmung der Flt3L-Konzentration

Um die Flt3L-Konzentration im Serum von unbehandelten und mit Flt3L-B16F10 Zellen *s.c.* behandelten Mäusen bestimmen zu können, wurde der kommerziell erworbene „Mouse Flt-3 Ligand Immunoassay“ verwendet. Dieser Immunoassay (ELISA) basiert auf einem Verfahren zum quantitativen Nachweis von Antigenen, welches 1971 parallel von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt wurde (Avrameas and Guilbert, 1971; Engvall *et al.*, 1971). Bei dem vorliegenden Verfahren werden Antikörper gegen Flt3L an eine feste Phase gebunden und dann mit einer Probe Serum inkubiert. Befindet

sich das gesuchte Antigen in der Probe, dann wird es an den Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift wird ein enzymgekoppelter Detektionsantikörper zugefügt, der an das gebundene Antigen bindet. Um eine Farbreaktion zu erreichen, wird nach einem Waschschrift das Substrat des Enzyms hinzugegeben. Die Farbreaktion, die mit einem Photometer gemessen wird, lässt im Vergleich zu einem definierten Standard einen Rückschluss auf die Menge des vorhandenen Antigens zu. Der für Flt3L spezifische ELISA von R&D Systems wurde nach Herstellerangaben durchgeführt:

alle verwendeten Reagenzien werden auf RT gebracht, entsprechend verdünnt und vorbereitet → 50µl vom „Assay Diluent“ werden auf die Microtiterplatte gegeben → 50µl vom Standard, von der Kontrolle und der Probe werden auf die Platte pipettiert → die Platte wird für 2h bei RT inkubiert → 5 x mit Waschpuffer waschen → Inkubation der Platte mit 100µl „Flt-3 Ligand Conjugate“ für 2h → 5 x mit Waschpuffer waschen → Inkubation der Platte mit 100µl „Substratsung“ für 30min (im Dunkeln) → 100µl „Stop Solution“ hinzufügen → Optische Dichte bei 450nm (Korrekturwellenlänge bei 540nm) bestimmen → über die Standardkurve kann Flt3L Konzentration der Proben bestimmt werden.

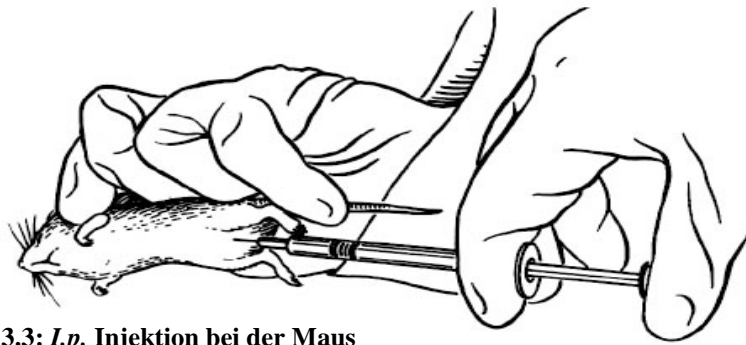


Abb. 3.3: *I.p.* Injektion bei der Maus

Bei der Verabreichung von blockierendem mAk oder der Injektion von Zytokinen wurde die Injektion *i.p.* durchgeführt (Quelle: (Reeves and Reeves, 2001), verändert).

3.2.3 Tierexperimentelle Methoden

3.2.3.1 Angewandte Injektionsmethoden

3.2.3.1.1 Intraperitoneale Injektion in Mäuse

Schwangeren Mäusen wurde am Tag 7 *p.c.* der blockierende mAk MC68 und an den Tagen 8-10 die inhibierenden mAk *i.p.* injiziert (Abb.3.3). Die Ak waren in PBS und in einem Volumen von 500µl gelöst.

3.2.3.1.2 Subkutane Injektion in Mäuse

Die Mäuse wurden am Schwangerschaftstag 1 *p.c.* bzw. vom Schwangerschaftstag 1-8 *p.c.* vor einer *s.c.* Injektion mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran-Baxter) für ca. 1min betäubt, um die Injektion durchführen zu können (Abb.3.5). Die notwendige Menge an Flt3L-B16F10 oder B16F10 Zellen wurde den Mäusen in 300µl Aqua ad injectabilia verabreicht.

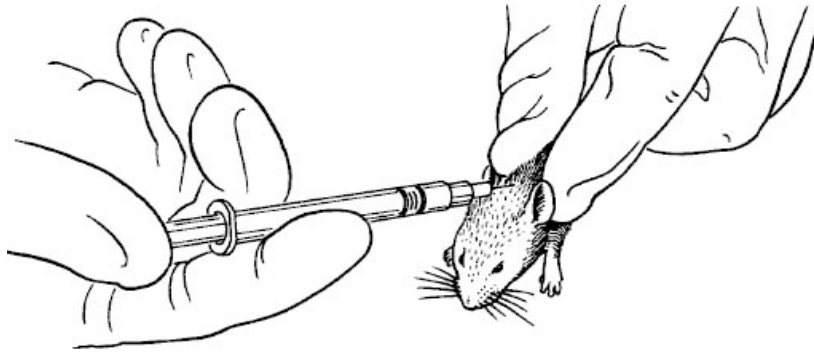


Abb. 3.5: S.c. Injektion bei der Maus

Bei der Verabreichung von Flt3L oder Flt3L-B16F10 Zellen wurde die Injektion *s.c.* durchgeführt (Quelle: (Reeves and Reeves, 2001), verändert).

3.2.3.2 Vorbereitung und Präparation von Mäusen

Syngene Schwangerschaften konnten durch die Verpaarung von Weibchen eines Stammes mit den jeweiligen Männchen erzeugt werden. Bei allogenen Schwangerschaften wurden Balb/c Weibchen mit C57BL/6J Männchen verpaart. Die Verpaarungen erfolgten über Nacht und am darauf folgenden Morgen wurden die Weibchen wieder von den Männchen getrennt. Der Tag nach der Verpaarung wurde als Tag 1 *p.c.* definiert. Ein Indiz für eine



Abb. 3.6: Vaginaler Plug
Ein vaginaler Plug kann am Tag 1 *p.c.* ein Indiz für eine erfolgreiche Begattung sein.



Abb. 3.7: Vaginalspülung
Handelt es sich bei einer Vaginalspülung mit NaCl am Tag 7 *p.c.* um eine viskose Flüssigkeit, ist dieses ein Hinweis für eine erfolgte Schwangerschaft.

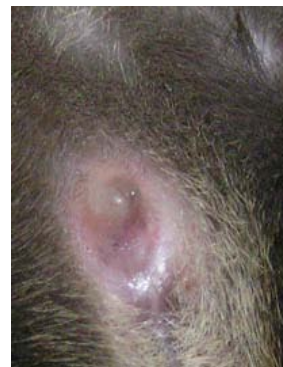


Abb. 3.8: Verengte Vaginalöffnung
Bei schwangeren Mäusen konnte eine Verengung der vaginalen Öffnung beobachtet werden.



Abb. 3.9: Kontrollgruppe
Bei nicht schwangeren Mäusen konnte eine Verengung der vaginalen Öffnung nicht beobachtet werden.

erfolgreiche Begattung ist das Vorhandensein eines vaginalen Plugs (Abb.3.6). 92% der Mäuse, die positiv für einen vaginalen Plug sind, resultieren in einer erfolgreichen Schwangerschaft (Rugh, 1990). Da wir die Höhe dieses Prozentsatzes nicht erreichten (unserer lag bei 70%, siehe auch Ergebnisse 4.6.5), sind die Mäuse auf Schwangerschaften hin zusätzlich überprüft worden.

Ab dem Tag 7 *p.c.* konnten mit 40µl isotonomischer Kochsalzlösung Vaginalspülungen durchgeführt werden. Nach der Implantation einer befruchteten Eizelle verändert sich die Vaginalflora und führt dadurch bei einem positivem Befund bei der Überprüfung zur Bildung einer viskosen Flüssigkeit (Abb.3.7). Dieses tritt bei einer nicht erfolgten Schwangerschaft nicht ein. Ein zusätzlicher Hinweis, um eine unnötige Tötung von Tieren zu verhindern, ist die visuelle Interpretation der Vaginalöffnung. Bei schwangeren Mäusen konnte eine verengte Öffnung gegenüber nicht schwangeren beobachtet werden (Abb.3.8 und Abb.3.9).

Nach der Tötung der schwangeren Tiere am Tag 8, 9, 11 oder 14 *p.c.* durch CO₂ Begasung und anschließender zervikaler Dislokation wurden die schwangeren Uteri in der Bauchhöhle freigelegt (Abb.3.10). Dazu wurde die Bauchdecke mit Ethanol gereinigt, um Verunreinigungen bei der Präparation zu vermeiden. Nach einem Schnitt durch die Bauchdecke von der Vagina bis zum Sternum und zwei folgenden lateralen Schnitten konnte die Bauchdecke an vier Nadeln aufgespannt werden. Für eine Blutentnahme musste der Intestinaltrakt beiseite präpariert werden, um freien Zugang zur Niere zu haben. Vor dem Öffnen der *aorta* und *vena renalis* wurde der Bauchraum mit PBS von ca. 30°C zweimal gespült, um eine Kontamination des Blutes durch in der Bauchhöhle



Abb. 3.10: Lage der fmE am Tag 9 *p.c.*
Nach der Öffnung der Bauchhöhle und der Verschiebung des Darmes liegen die fmE frei und können zur Entnahme vom Mesenterium getrennt werden.

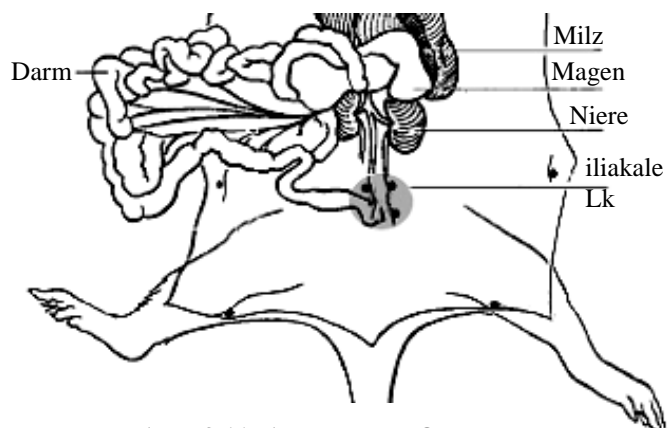


Abb. 3.11: Ausgewählte Organe der Maus
Eine grobe Übersicht stellt die Lage der iliakalen Lk dar, deren Lymphbahnen u.a. den Uterus der Maus durchziehen (Quelle: (Reeves and Reeves, 2001), verändert)

vorkommende M ϕ zu verhindern. Nach dem Schnitt durch die Adern wurde das Blut in ein Heparinröhrchen überführt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern und eine durchflusszytometrische Analyse zu ermöglichen. Sollte das Serum genutzt werden, wurde das Blut in ein 1.5ml Reaktionsgefäß ohne Heparin überführt und dann weiterverarbeitet. Anschließend konnten die fmE vom Mesenterium und den Ovarien getrennt und aus dem Bauchraum entnommen werden. An den Schwangerschaftstagen 9 und 11 *p.c.* sowie bei nicht schwangeren Mäusen wurden außerdem die den Uterus drainierenden iliakalen Lk, die aus 2-3 lumbaren und einem sakralen Lk bestehen (Hummel *et al.*, 1941;McDermott *et al.*, 1987), für weitere Untersuchungen verwendet (Abb.3.11). Die Anzahl der jeweils untersuchten Tiere, Blutanalysen, fmE oder Lk pro Experiment ist z.T. im Methodenteil oder direkt bei den Ergebnissen gelistet.

3.2.3.3 Vorbereitung des entnommenen Blutes für einen Immunoassay

Das von den Mäusen entnommene Blut wurde zur Analyse im Durchflusszytometer als auch zur Analyse im Immunoassay zur Bestimmung der Flt3L-Konzentration eingesetzt. Um das Serum nutzen zu können, wurde ein Teil des Blutes nicht mit Heparin versetzt und in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Um das Serum im Blut von den festen Bestandteilen trennen zu können, musste das Blut zunächst für 30min bei RT gerinnen und anschließend bei 300g für 3min zentrifugiert werden. Das Serum wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von mehreren Mäusen konnte das Serum von mehreren Mäusen gesammelt und bis zur Verwendung im Immunoassay bei -20°C eingefroren werden.

3.2.3.4 Injektion von Flt3L-B16F10 Zellen in die Maus zur in vivo DC Expansion

Die Arbeiten betreffend der *in vivo* Applikation von Flt3L-B16F10 oder B16F10 Zellen wurden im Labor von Dr. E.C. Butcher an der Stanford University, Palo Alto, CA USA durchgeführt. Die Zellen wurden für die Injektion geerntet und in sterilem PBS resuspendiert. Über eine Trypanblau-Färbung wurden die lebenden Zellen bestimmt und auf 5×10^6 Zellen/300 μ l PBS eingestellt, um dieses Volumen den Mäusen *s.c.* am Schwangerschaftstag 1 *p.c.* injizieren zu können. Die Mäuse wurden dann am Schwangerschaftstag 9 getötet und das Blut und das Gewebe wurden entnommen. Zusätzlich wurden zur Ermittlung der Wurfgröße unter dem Einfluss von Flt3L am Tag 21-22 *p.c.* die Mäuse getötet und die fmE untersucht.

3.2.3.5 Langzeit in vivo Inhibitionsstudien

3.2.3.5.1 Inhibitionsstudien am Chemokinrezeptor CCR5

An dem Schwangerschaftstag 7 *p.c.* wurde 500µg des blockierenden mAk MC68 (anti-CCR5) den Mäusen *i.p.* injiziert. Diese Menge reicht laut Prof. Dr. M. Mack (Universität Regensburg) aus, eine Blockade des Chemokinrezeptors CCR5 für 48h zu erreichen (Mack *et al.*, 2001). Die Tiere (pro Versuchsgruppe N=3) wurden am Tag 9 der Schwangerschaft getötet und ihre Uteri entnommen.

3.2.3.5.2 Inhibitionsstudien an Zelladhäsionsmolekülen

An den Tagen 8-10 *p.c.* der Schwangerschaft wurden je 500µg des blockierenden mAk (MECA-367 [anti-MAdCAM-1], DATK32 [anti- $\alpha_4\beta_7$], RB40.34.25 [anti-CD62P] oder Hermes-1 [anti-humanes CD44]) *i.p.* injiziert. Die optimale Konzentration der verwendeten Ak wurde in Vorversuchen ermittelt (Kruse, 2000). Die Tiere (pro Versuchsgruppe N=3) wurden am Tag 11 *p.c.* der Schwangerschaft getötet und ihre Uteri entnommen.

3.2.4. Histologische Methoden

3.2.4.1 Histologische Charakterisierung

Eine sogenannte Diff-Quik-Färbung wurde zur histologischen Charakterisierung der fmE durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Methode sind laut Herstellerangaben mit denen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) vergleichbar (Mohr, 1862). Die Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurden ca. 8-10s in die Diff-QuikFix-Lösung eingetaucht, was der Fixierung vor der eigentlichen Färbung diente. Darauf folgend wurde der Objektträger für dieselbe Zeitspanne in die Diff-QuikI-Färbelösung getaucht. Eosin, welches z.B. das Zytoplasma rötlich färbt, ist Hauptbestandteil dieser Lösung. Anschließend wird der Objektträger noch für 8-10s in die Diff-QuikII-Färbelösung gegeben, die einen Thiazid-Farbstoff erhält, der für die dunkelblaue Zellkernfärbung verwendet wird. Die unterschiedliche Dauer innerhalb der Lösungen verursacht verschiedene Farbtiefen, die individuell ausprobiert werden müssen. Die Färbung wird durch das vorsichtige Abspülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Danach können die Gewebeschnitte unter dem Durchlichtmikroskop untersucht werden.

3.2.4.2 Immunperoxidase-Färbungen

10min wurden die Gewebeschnitte zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10%igem normalen Ziegenerum inkubiert. Nach dem Absaugen des Serums wurde das endogene Biotin des Gewebes durch die Behandlung von jeweils 15 Minuten mit dem Avidin und Biotin des Avidin-Biotin-Blockierungssystems gebunden. Es folgte eine Inkubation des Gewebes mit dem Ratte-anti-Maus MAdCAM-1 für 60min. Nach zweimaligen Waschschritten mit PBS (binnen 5min) wurde zur Inaktivierung endogener Peroxidase 3%iges wässriges H₂O₂ für 10min eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit des Gewebes mit biotinyliertem Esel-anti-Ratte-IgG als Sekundärantikörper von 60min folgte ein weiteres zweimaliges Waschen mit PBS (binnen 5min). Um die Farbreaktion zu verstärken, wurde das Gewebe mit dem AvidinBiotin/Meerrettichperoxidase-Makromolekülkomplex des ABC-Kits für 30min inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen (binnen 5min). Anschließend konnte der Komplex aus dem gebundenen Antikörper und der Avidin-Biotin/Meerrettichperoxidase durch eine Inkubation von 5min mit der 3.3-Diaminobenzidin/Nickelchlorid-Lösung des DAB-Kits angefärbt werden. Danach erfolgte die Gegenfärbung des Gewebes mit Methylenblau für 30s. Um die Gegenfärbung zu stoppen, musste das Präparat mit Wasser abgespült werden. Nach dem Trocknen konnte das gefärbte Gewebe mit dem Eindeckmedium eingedeckelt werden.

3.2.4.3 In situ Immunlokalisation

3.2.4.3.1 Beschichtung der Objektträger

Um die notwendigen Objektträger zu entfetten, wurden sie für 10min in 4°C kaltes Aceton getaucht und anschließend getrocknet. Zur Beschichtung wurden die Objektträger dann für 10min in eine 0.1%ige Poly-L-Lysin Lösung gegeben und darauffolgend getrocknet. Nun konnten die Objektträger für die Fixierung der Kryostatschnitte vom Gewebe verwendet werden.

3.2.4.3.2 Verarbeitung des Gewebes und Fixierung auf Objektträgern

Das von der Maus entnommene Gewebe (fmE und Lk) wurde in Cryomold Gewebeschalchen eingebettet. Hierfür wurden je 2-3 fmE, oder die Lk in Jung Einbettmedium enthaltene Gewebeschalchen gelegt. Um ein schnelles Einfrieren zu ermöglichen, wurden die Gewebeschalchen auf Trockeneisplatten gelegt. Das eingelegte Gewebe wurde abgedeckt, beschriftet und konnte bei -80°C zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden. Beim Schneiden des Gewebes in einem Kryostaten wurde die

Temperatur auf -20°C heraufgesetzt, um das Brechen der Kryostatschnitte beim Auftragen auf die beschichteten Objektträger zu verhindern. Die Schnittdicke des Gewebes wurde auf $6\mu\text{m}$ eingestellt. Nachdem die Kryostatschnitte auf die beschichteten Objektträger aufgebracht wurden, folgte eine Trocknung für 1h. Bevor die Kryostatschnitte zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden konnten, mussten sie noch 10min in Aceton (4°C) fixiert und 1h getrocknet werden.

3.2.4.3.3 Immunhistologische Antikörperfärbung

Die Anfärbung bestimmter Moleküle durch Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die simultane Lokalisation mehrerer exprimierter Antigene. Hierfür werden Ak verwendet, die bereits an den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind (direkte Färbung) oder antigenspezifische unmarkierter Primär-Ak, die anschließend mit einem speziesspezifischen fluoreszenzmarkierten Sekundär-Ak inkubiert werden. Vorteil der direkten Fluoreszenzfärbung ist die geringere unspezifische Hintergrundfärbung. Die indirekte Färbung verursacht dagegen aufgrund der Verwendung von mehreren Ak auch

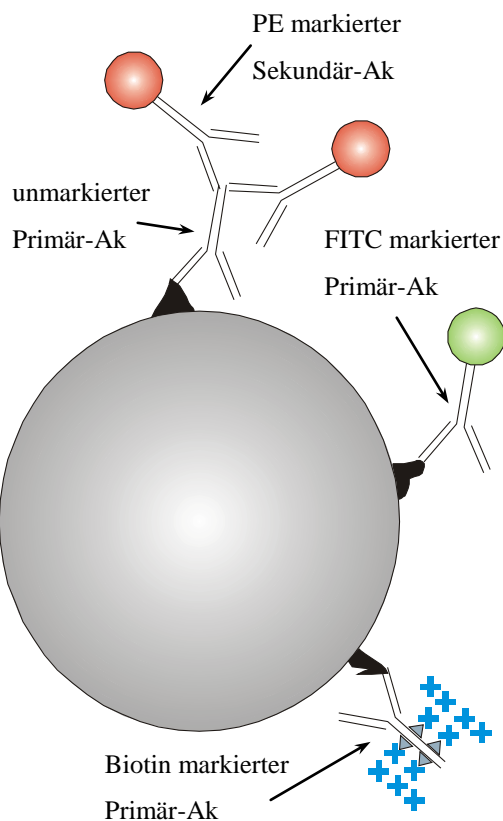


Abb.3.12: Schema der direkten und indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Dargestellt sind 3 Möglichkeiten von Immunfluoreszenzfärbungen mit unmarkierten, mit Fluorochrom oder mit Biotin markierten Primär-Ak.

mehr Möglichkeiten für diese unspezifisch zu binden. Der Vorteil der indirekten Färbung liegt jedoch in der Verstärkung des Fluoreszenzsignals durch Anlagerung mehrerer Sekundär-Ak an einen Primär-Ak. In der Praxis werden bei schwach exprimierten Antigenen indirekte Färbemethoden verwendet, ansonsten sollte aufgrund der geringeren unspezifischen Färbung ein direkt markierter Ak vorgezogen werden.

Für die Färbung wurde zunächst der Gewebeschnitt mit 10%igem normalen Mausserum für 15min inkubiert, damit unspezifische Bindungen zwischen dem Primär-Ak und dem Gewebe verhindert werden.

Anschließend wurde für 30min mit einem Primär-Ak inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschen mit PBS innerhalb von 5min erfolgte ein weiterer Blockierungsschritt mit dem Serum, welches aus der Spezies stammt, in dem der erste Ak generiert wurde, um unspezifische Bindungen an den Primär-Ak zu verhindern. Danach kann der Gewebeschnitt mit einem zweiten Ak inkubiert werden. Hat das Mikroskop mehr als 2 Filter zur Verfügung kann nach einem Blockierungsschritt mit einem weiteren Ak inkubiert werden. Die Färbungen wurden nach den vorhandenen Ak entsprechend durchgeführt (die Konzentrationen für die eingesetzten Ak sind der Tab.3.1 zu entnehmen). Es gab Ak, die direkt mit einem Fluorochrom markiert waren (z.B. anti-CD11b-FITC, anti- β_7 -PE, anti-CD11c-APC), andere Ak waren unmarkiert (z.B. anti-CCR5, anti-CD49d) und müssen in einem weiteren Schritt mit einem Detektionsantikörper, welcher seinerseits mit einem Fluorochrom versehen ist, markiert werden (z.B. anti-Ratte-IgG). Eine weitere Variante ist die Verwendung eines Streptavidin/Biotin-Systems: Ein mit Biotin markierter Ak wird mit einem Fluorochrom markierten Streptavidin detektiert (diese Möglichkeiten sind zur Übersicht in Abb.3.12 und Abb.3.13 dargestellt). Die zu den Ak spezifischen Isotypkontrollen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Bis zur mikroskopischen Auswertung der Schnitte am Tag der Färbung wurden die Kryostatschnitte bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Im Fluoreszenzmikroskop werden Fluorochrome wie FITC, PE oder APC zur Emission angeregt. Über Spiegel wird das erzeugte Licht durch Filter geschickt, die nur Licht in

- | |
|---|
| <p>A) Rehydration mit PBS (5min) → Normales Mausserum → FITC markierter Ak (z.B. CD11b) → Waschschrift → Aufbewahrung</p> <p>B) Rehydration mit PBS (5min) → Normales Mausserum → FITC markierter Ak (z.B. CD11b) → Waschschrift → Normales Rattenserum → PE markierter Ak (z.B. β_7) → Waschschrift → Normales Hamsterserum → APC markierter Ak (z.B. CD11c) → Waschschrift → Aufbewahrung</p> <p>C) Rehydration mit PBS (5min) → Normales Mausserum → unmarkierter Ak (z.B. CD62P) → Waschschrift → FITC markierter Sekundär-Ak (anti-Ratte FITC) → Waschschrift → Normales Rattenserum → PE markierter Ak (z. B. β_7) → Waschschrift →... → Aufbewahrung</p> <p>D) Rehydration mit PBS (5min) → Normales Mausserum → FITC markierter Ak (z.B. CD11b) → Waschschrift → Normales Hamsterserum → Avidin-Biotin Blockierungssystem → Biotin markierter Ak (z.B. CD11c) → Waschschrift → Streptavidin-Alexa 568 → Waschschrift → Aufbewahrung</p> |
|---|

Abb.3.13: Fließschema der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen

(A-D) Beispielhaft sind vier der Immunfluoreszenzfärbungen, die in den Versuchen durchgeführt wurden, aufgelistet. Möglich waren vielfältigste Kombinationsmöglichkeiten. Die bei dem jeweiligen Versuch verwendete Immunfluoreszenzfärbung wird in den Ergebnissen gesondert beschrieben.

einem bestimmten Wellenlängenbereich durchlassen. So ist es möglich, dass die an die Ak gekoppelten Fluorochrome einzeln angeregt und so einem Antikörper zugeordnet werden können (Ploem and Taube, 1987). Da aber das Fluoreszenzlicht auch von Molekülen emittiert wird, die unter- oder oberhalb der Brennebene liegen, ist es schwierig, die tatsächliche dreidimensionale Anordnung zu erkennen. Dieses Problem wird beim konfokalen Mikroskop umgangen, indem nur die fluoreszierenden Moleküle in einer definierten Ebene visualisiert werden. Um ein komplettes Bild zu erhalten, muss der Lichtstrahl Ebene für Ebene über das Objekt bewegt werden. Aus den dabei aufgenommenen Einzel-punkten wird dann im Rechner ein Bild rekonstruiert (Denk *et al.*, 1990). Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einer Digitalkamera oder mit der Leica Confocal Software aufgenommen und anschließend mit dem Programm Volocity und Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

3.2.5 Analytische Methoden

3.2.5.1 Ermittlung der Wurfgröße

Die Datenerhebung zur Ermittlung der Wurfgröße bei den unterschiedlichen Mausstämmen (3.1.6) wurde über mehrere Jahre durchgeführt, um auf eine möglichst hohe Anzahl (N) zu kommen. Dabei war darauf zu achten, dass die in die Daten eingeflossenen Würfe von Weibchen stammten, die ein Alter von 4-10 Monaten haben, um eine altersbedingte Veränderung auszuschließen (Rugh, 1990). In die Ermittlung der Wurfgröße wurden Männchen, Weibchen sowie die Gesamtzahl aufgenommen.

3.2.5.2 *In situ* Quantifizierung von Leukozytenpopulationen

Für jede Versuchsgruppe und jeden Schwangerschaftstag wurden 3 Mäuse verwendet und pro Maus wurden zwei fmE untersucht. Von diesen wurden serielle Kryostatschnitte mit vergleichbarer Schnitttiefe, -dicke und -ausrichtung hergestellt. Zur Quantifizierung der Zellpopulationen am Fluoreszenzmikroskop wurde ein Gitternetz verwendet. Bei einer 400fachen

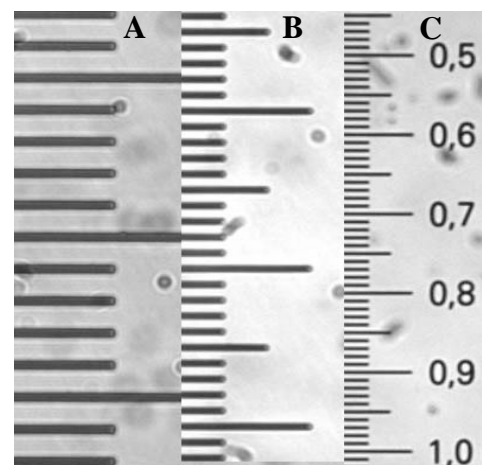


Abb. 3.14: Mikrometer-Skala

Die Größe von Zellen konnte mit der Hilfe einer Mikrometer-Skala bestimmt werden. (A-C) Ein kleines Skalenteil hat die Länge von 10µm bei einer (A) 400-, (B) 200- oder (C) 100fachen Vergrößerung.

Vergrößerung betrug die ausgewertete Fläche 0.25 mm^2 . Je 5 dieser Flächen/Gewebeschnitt in definierten Zonen der VZ, cDB oder MG und je 10 Gewebeschnitte/fmE wurden in der Regel ausgezählt. Um ein doppeltes Zählen von Zellen zu vermeiden, musste sich die Schnittebene zweier Gewebeschnitte um mindestens $42\mu\text{m}$ unterscheiden. Die Größe einzelner Zellen wurde mit einer Mikrometer -Skala bestimmt (Abb.3.14).

3.2.5.3 Durchflusszytometrie

3.2.5.3.1 Technische Voraussetzungen

Die Technik der Durchflusszytometrie ermöglicht das Messen von Fluoreszenz- und Lichtbrechungseigenschaften einer Zellpopulation. Zur Detektion werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom vereinzelt durch eine Küvette geführt. Hier trifft der Laserstrahl auf jede einzelne Zelle, dessen Photonen in charakteristischer Weise emittiert werden. Durch die Vorwärtsstreuung (FSC) kann die Größe, durch die Seitwärtsstreuung (SSC) die Granularität ermittelt werden. Über spezifische mit einem Fluorochrom markierte Ak können Aussagen über prozentuelle Anteile Antigen positiver oder negativer Zellen gemacht werden. Außerdem lässt sich der Grad der Expression eines bestimmten Antigens der betrachteten Zellspezies, der sich in der MFI ausdrückt, bestimmen (Ormerod, 2000;Shapiro, 2003).

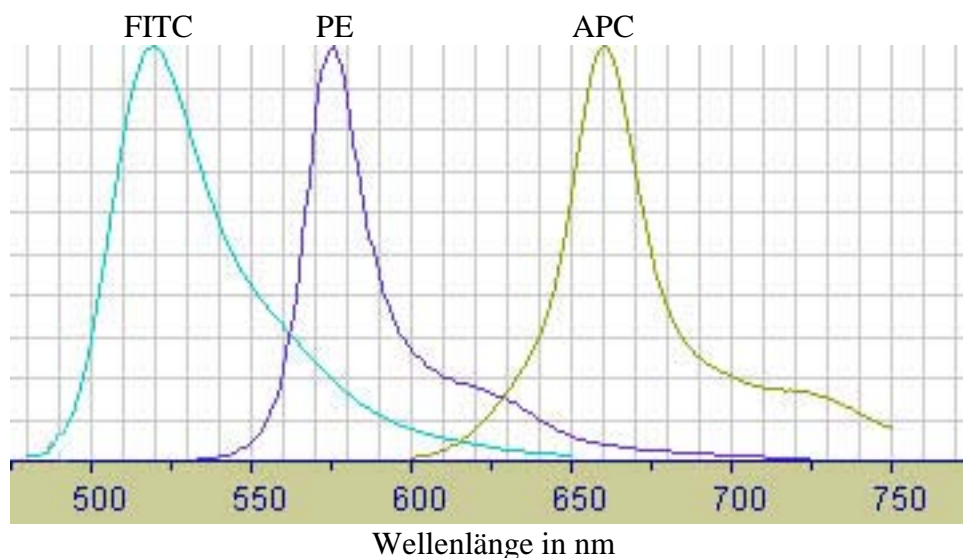


Abb. 3.15: Emissionsspektren von FITC, PE und APC

Die verwendeten Fluorochrome sind durch verschiedene Emissionsspektren gekennzeichnet: FITC hat das Maximum seines Emissionsspektrums bei 520nm, PE bei 575nm und APC bei 663 (Quelle: wwwbdbiosciences.com/spectra)

Zur Verfügung stand ein Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter mit der Bezeichnung Cytomics FC 500 CXP oder von der Firma BD Biosciences das Gerät LSRII. Beispielhaft wird die Funktionsweise des Cytomics FC 500 CXP verwendet. Dieses Gerät ist mit einem Argon-Lasers ($\lambda = 488\text{nm}$) und einem Dioden-Laser ($\lambda = 635\text{nm}$) ausgestattet. Mit dem Argon-Laser lassen sich Fluorochrome wie z.B. FITC, PE, PE-Cy5 und 7AAD anregen. Der Dioden-Laser ist für die Anregung von beispielsweise APC und APC-Cy7 zu verwenden. Das emittierte Fluoreszenzlicht kann durch fünf Filter (FL) detektiert werden. FL1 ist ein sogenannter „Shortpass Filter“, der Wellenlängen unterhalb von 525nm detektiert. Da FITC ein Emissionsmaximum bei 520nm besitzt, kann dieses Fluorochrom im FL1 detektiert werden. Mit einem „Bandpass Filter“ FL2 von 575 lässt sich besonders gut das Emissionsmaximum von PE messen, welches bei 570nm liegt. Der „Bandpass Filter“ FL3 (620nm) lässt sich z.B. Propidiumiodid detektieren und der „Bandpass Filter“ FL4 (675nm) eignet sich zum Messen des Signals vom Fluorochrom APC (Emissionsmaximum: 663nm). Ein sogenannter „Longpass Filter“ FL5 (755nm)

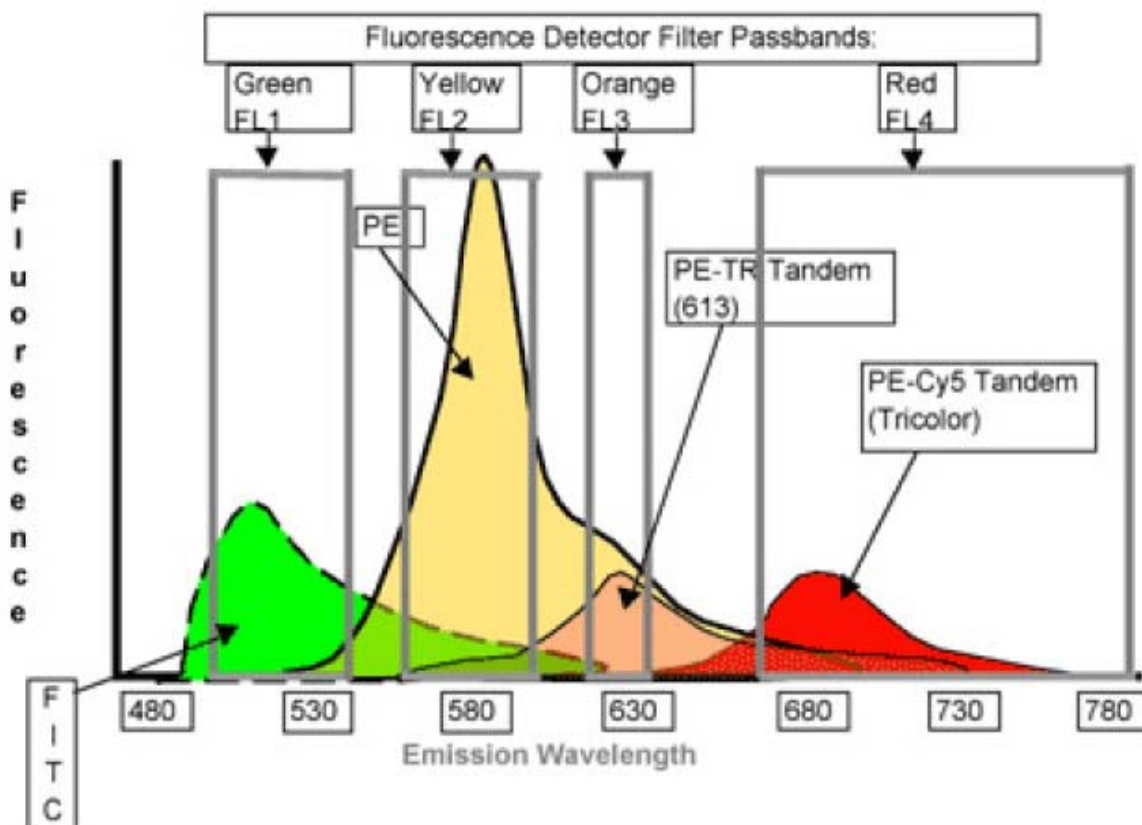


Abb.3.16: Die Emissionsspektren für FITC, PE, PE-Texas red und PE-Cy5

Die Emissionsspektren für gleiche Konzentrationen (mg Ak/ml) an Maus anti-humanem IgG für FITC, PE, PE-Texas red und PE-Cy5 (oder Tricolor) mit einer Anregung von 490nm werden gezeigt. Die grauen Boxen zeigen die Bandbreite der Filter [FL1 (grün, 525nm), FL2 (gelb, 575nm), FL3 (orange, 620) und FL4 (rot, über 660nm)] und begrenzen den Detektionsbereich (Shapiro, 2003).

kann jegliche Wellenlängen über 755nm detektieren, also die Emissionsmaxima von PE-Cy7 und APC-Cy7. Die Emissionsmaxima von FITC, PE und APC sind beispielhaft in der Abb.3.15 dargestellt. Zum Auswählen von Fluorochrom markierten Ak kann die Verwendung dieser Ak auf der empfehlenswerten Internetseite von BD Biosciences (www.bdbiosciences.com/spectra) simuliert werden.

Vor der eigentlichen Messung der einzelnen Proben muss das Durchflusszytometer erst auf die unterschiedlich gelabelten Antikörper kalibriert werden. Dieser rechnerische Prozess, auch Kompensation genannt, ist nötig, da die einzelnen Fluorochrome sich teilweise in ihren Emissionsspektren überlappen (Abb.3.16). Das veranschaulichte Beispiel stimmt nicht exakt mit dem verwendeten Durchflusszytometer überein, erläutert aber die Notwendigkeit der Kompensation. Ein Teil des vom FITC Fluorochrom emittierten Lichts wird im FL2 detektiert und somit als z.B. PE positives Ereignis detektiert. Nach der Kompensation (z.B.: $FL2_{\text{koriert}} = FL2_{\text{gemessen}} - x \% FL1_{\text{gemessen}}$) für die verschiedenen Färbeprotokolle erfolgte die Messung der Proben in einer Geschwindigkeit von 60 μ l/min. Für die Darstellung wurden für gewöhnlich Histogrammplots, Dotplots, Dichteplots oder Konturplots verwendet. Als Kontrollfärbungen wurden Antikörper aus der entsprechenden Spezies und des gleichen Isotyps wie die spezifischen Antikörper durchgeführt.

3.2.5.3.2 Fluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie

Nach der Zelldichtebestimmung wurde die Lösung so verdünnt, dass man je Aliquot für die Fluoreszenzfärbung $1 \times 10^{4-5}$ Zellen zur Verfügung hatte. Nun konnten intrazelluläre Färbungen oder Oberflächenfärbungen durchgeführt werden. Die Antikörper wurden in Konzentrationen wie in Tab.3.1 beschrieben zur Lösung hinzupipettiert. Die einzelnen Schritte für eine Färbung sind unter Abb.3.17 dargestellt. Nach der Färbung wurden die Aliquots für 10min bei 300g und 4°C gewaschen und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer

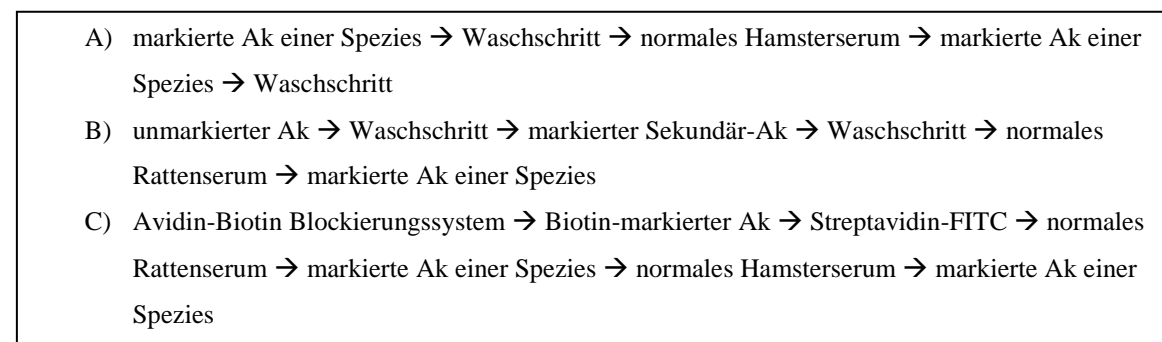


Abb.3.17: Fließschema der durchflusszytometrischen Färbungen

(A-C) Exemplarisch sind drei der durchflusszytometrischen Färbungen, die in den Versuchen durchgeführt wurden, aufgelistet. Möglich waren verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, die der jeweiligen Untersuchungen angepasst wurde.

resuspendiert und in Röhrchen fürs Durchflusszytometer überführt. Anschließend konnte die durchflusszytometrische Datenanalyse durchgeführt werden.

3.2.5.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen

3.2.5.3.3.1 Lebend-Tod Färbung mit 7-AAD

Bei der Lebend-Tod Färbung wird der Anteil sterbenden oder toten Zellen nachgewiesen, die die Versuchsdurchführung nicht überstanden haben. Für diese Messung wurde die organische Verbindung 7AAD verwendet. 7AAD ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit der DNA von Zellen interkaliert (zwischen Cytosin und Guanin). Eine intakte Zellmembran verhindert das schnelle Eindringen von 7AAD, womit es ein sogenannter Avitalfarbstoff ist (Schmid *et al.*, 1992; Wadkins and Jovin, 1991). Hinzu kommt, dass auch Thrombozyten und Erythrozyten angefärbt werden. 7AAD wird vom Licht des Argon-Lasers ($\lambda = 488\text{nm}$) angeregt und emittiert maximal bei 647nm. Es kann daher im verwendeten Durchflusszytometer durch den FL4 gemessen werden.

Kurz vor der Messung wurden zu jeder Probe soviel 7AAD hinzugegeben, dass die Endkonzentration bei $1\mu\text{g/ml}$ lag. Durch die Minimierung des zeitlichen Abstand zwischen 7AAD Zugabe und Messung soll die Diffusion von 7AAD in den Zellkern verhindert werden, was eine noch lebende Zelle als tot markieren könnte. Die Lebend-Tod Färbung wurde in Form von Histogrammplots dargestellt und konnte ausschließen, dass Zellen analysiert wurden, die aufgrund der beschädigten Zellmembran für jegliche Ak positiv sind.

3.2.5.3.3.2 Prozentuale Verteilung der Zellpopulationen

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der CXP Software und lieferte Aussagen über prozentuelle Anteile Antigen positiver bzw. Antigen negativer Zellen. Die prozentualen Verteilungen wurden über Histogrammplots oder Dotplots ermittelt, waren aber von der jeweiligen Fragestellung und den untersuchten Zellen abhängig, weshalb in den Ergebnisteilen dieses dann direkt erklärt wird.

3.2.5.3.3 Relative MFI

Mit Hilfe der Analysesoftware CXP wurde die MFI für die Oberflächenmarker CD11b sowie die β_1 und β_7 Integrine ermittelt. Um an verschiedenen Versuchstagen vergleichbare quantitative Resultate für einen Vergleich der Rezeptordichte dieser Oberflächenmarker zu erhalten, wurde eine Normalisierung der Werte der MFI durchgeführt (Wollenberg *et al.*, 1999). Dazu wurden die Werte der jeweils untersuchten Rezeptoren mit den Werten der MFI vom zugehörigen Kontrollantikörper nach folgender Formel normalisiert:

$$\text{relative MFI (rMFI)} = \frac{(\text{MFI}_{\text{Rezeptor}} - \text{MFI}_{\text{Kontrolle}})}{\text{MFI}_{\text{Kontrolle}}}$$

Durch diese Formel ist die rMFI kleineren tagesbedingten Schwankungen der Geräteeinstellung weitgehend unabhängig, so dass sich größere Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten zuverlässig wiedergeben lassen.

3.2.5.4 Statistik

Die Zusammenfassung der Zellzahlen der einzelnen Testgruppen erfolgte dem Programm Excel. Die statistische Analyse und Berechnung der Mediane der ausgezählten Leukozytenpopulationen und deren prozentuale Veränderung, der prozentualen Verteilung im Durchflusszytometer sowie der Wurfgröße erfolgte mittels GraphPad Prism 4. Nachdem die Varianz der Daten innerhalb einer Versuchsgruppe mit dem Kruskal-Wallis Test ermittelt wurde, erfolgte die Berechnung möglicher Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mit dem ungepaarten Mann-Whitney-U Test, wobei ein p-Wert ab <0.05 als signifikant (*) betrachtet wurde. Dabei wurde der genetische Hintergrund und der verwendete Ak berücksichtigt. Durch den Immunoassay konnte die Konzentration von Flt3L (Mittelwert und Standardabweichung) mit GraphPad Prism 4 berechnet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Zelladhäsionsmoleküle und deren Bedeutung für die Migration von $\alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten während der murinen Schwangerschaft

Die unter Punkt 4.1.2 dargestellten Injektionsstudien wurden von Frau Dr. Fernekorn im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt (Fernekorn, 2005). Die Bestimmung der Zellzahl innerhalb der Testgruppen wurden von Frau Dr. Fernekorn und mir zusammen vorgenommen. Die veröffentlichten Ergebnisse (Fernekorn *et al.*, 2004) sind hier kurz zusammengefasst und sollen für die vorliegende Arbeit in das Promotionsthema einen Einstieg darstellen.

4.1.1 Struktur des Uterus am Tag 9 *p.c.* der murinen Schwangerschaft

Der Zeitpunkt der beginnenden Plazentaentwicklung, der Tag 9 *p.c.* bei murinen Schwangerschaften, ist ein kritischer Zustand, der durch die meisten spontanen Resorptionen gekennzeichnet ist (Croy *et al.*, 1982; Kiger *et al.*, 1985; Clark and Slapsys, 1985). An diesem Schwangerschaftstag ist der Uterus der Maus in definierte Zonen unterteilbar, in die Dezidua capsularis und die Dezidua basalis (DB). Die DB lässt sich weiter in die vaskuläre Zone (VZ), die zentrale DB (zDB) und das Myometrium (Myo) unterteilen (Abb.4.2). Die VZ ist nahe dem Trophoblasten lokalisiert und ist durch stark dilatierte maternale Blutgefäße charakterisierbar. Kompaktes Gewebe, venöse Kanäle und Arterien zeichnet die zDB aus. Daran schließt sich das Myo an. Im Verlauf der Schwangerschaft kennzeichnen starke Umstrukturierungsmaßnahmen die DB, da die Plazenta in den Bereich der DB einwandert und maternales Gewebe im Verlauf der Schwangerschaft ersetzt. Demgegenüber ist die Dezidua capsularis nicht an der Plazentaentwicklung beteiligt.

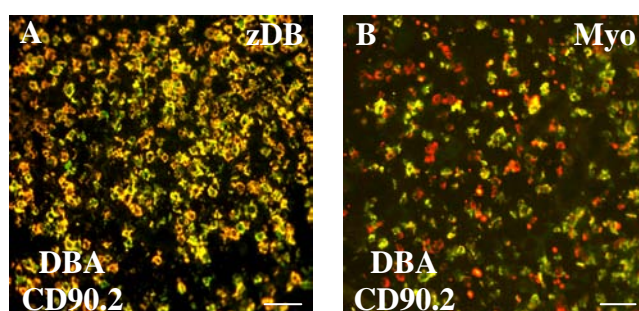


Abb.4.1: CD90.2⁺ DBA⁺ uNK Zellen

(A, B) Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Maus CD90.2 mAb 30-H12 (rot) und DBA (grün) zeigte, dass nahezu alle CD90.2⁺ Zellen innerhalb der zDB (A) und die Mehrheit (60%) dieser Zellen innerhalb des Myo (B) zusätzlich für den uNK Zellen Marker DBA positiv sind (Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt). Maßstabsbalken = 50µm.

Interessanterweise befanden sich definierte maternale Leukozytenpopulationen in bestimmten Bereichen der DB. So waren $CD11b^{med} \alpha_4^+ \beta_7^{lo}$ Zellen vorwiegend in den maternalen Blutgefäßen und dem Gewebe der VZ zu finden. Da diese Zellen weder CD3 noch CD19 exprimierten (nicht gezeigt), ist auszuschließen, dass es sich bei dieser

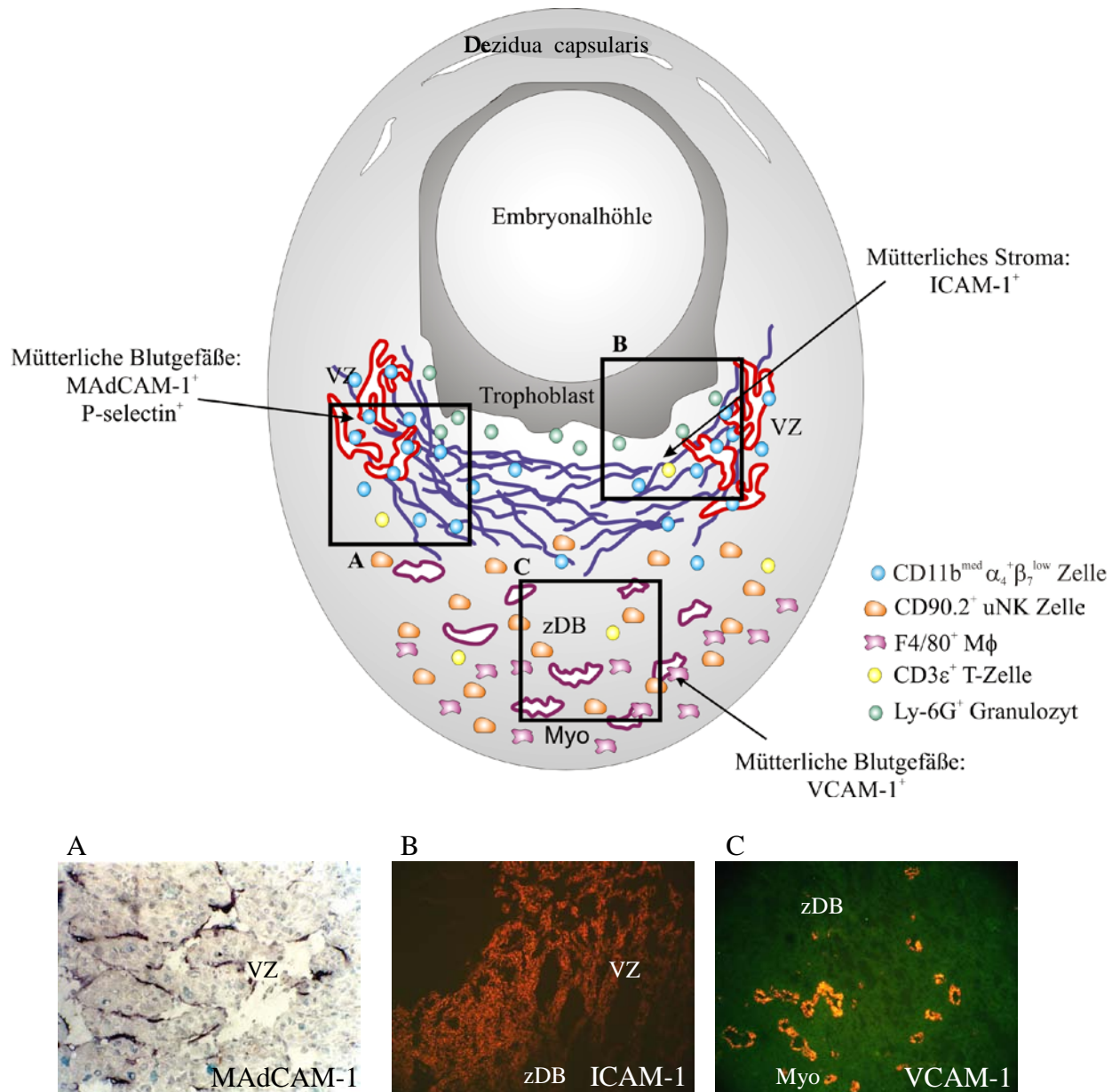


Abb.4.2: Organisation des Uterus der Maus am Tag 9 p.c. der Schwangerschaft und Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen

Organisation des schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 p.c. der Schwangerschaft mit schematischer Darstellung der infiltrierenden Leukozytenpopulationen. Granulozyten waren auf maternalen Blutsinusoide im äußeren Bereich des in die DB einwandernden fetalen Trophoblasten beschränkt, während $CD11b^{med} \alpha_4^+ \beta_7^{lo}$ Zellen in den Blutgefäßen und im Gewebe der VZ die Hauptpopulation waren. Die uNK Zellen waren zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich in der zDB lokalisiert. Makrophagen waren vorwiegend in dem Bereich der zDB und dem angrenzenden Myometrium zu finden. Lymphozyten waren nur in äußerst geringer Zahl im schwangeren Uterus nachweisbar. In der Dezidua capsularis befand sich nur eine geringe Anzahl maternaler Leukozyten. (A-C) Das Endothel der vaskulären Zone war durch eine Expression von MAdCAM-1 (A) und P-Selektin gekennzeichnet. Das Stroma um den Trophoblasten herum zur zDB hin und innerhalb der VZ war durch die Expression von ICAM-1 charakterisiert (B). Die maternalen Gefäße an der Grenze der zDB und des Myo exprimierten VCAM-1. Vergrößerung: 200x.

Leukozytenpopulation um Lymphozyten handelt. Granulozyten (Ly-6G⁺) waren hauptsächlich im Bereich des einwandernden Trophoblasten auffindbar. In der zDB waren uNK Zellen dominierend, die negativ für typische NK Zellmarker CD49b und CD161c waren (nicht gezeigt) aber über CD90.2⁺ als auch über *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) charakterisiert werden konnten (Abb.4.1A, B). In dem Grenzbereich zwischen der zDB und dem Myo befanden sich Makrophagen (M ϕ ; F4/80⁺). Nur vereinzelte T-Zellen (CD3 ϵ ⁺) konnten in der gesamten DB gefunden werden.

Die speziellen Bereiche des schwangeren Uterus waren durch eine hochspezifische Expression von Zelladhäsionsmolekülen, die die Einwanderung von Leukozyten in das uterine Gewebe steuern, charakterisiert (Kruse *et al.*, 1999; Kruse *et al.*, 2002). Die Endothelzellen der VZ exprimierten am Tag 9 *p.c.* der Schwangerschaft das *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1; Abb.4.2A) und P-Selektin (nicht gezeigt). Außerdem exprimierten die Stromazellen in diesem Bereich das *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1; Abb.4.2B), welches zu einem höheren Maß von den direkt an den Trophoblasten angrenzenden Stromazellen der DB exprimiert wird und ICAM-2 (nicht gezeigt). Die maternalen Gefäße der zDB waren durch die Expression von *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1; Abb.4.2C) charakterisiert, der Ligand für $\alpha_4\beta_1$. Das $\alpha_4\beta_7$ Integrin war zu 30% (syngene Schwangerschaften) bis 70% (allogene Schwangerschaften) auf den CD11b⁺ Zellen innerhalb der VZ zu finden. ICAM-1 ist der Ligand für das *leukocyte function associated molecule-1* (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18), der auf einer Vielzahl von Leukozyten exprimiert wird (Carlos and Harlan, 1994), und das auf M ϕ und monozytäre Zellen exprimierte $\alpha_M\beta_2$ Integrin (Mac-1, CD11b/CD18).

Die hochspezifische Expression von Adhäsionsmolekülen innerhalb abgrenzbarer Bereiche des uterinen Gewebes und die damit verbundene regulierte Einwanderung spezieller Leukozyten in den schwangeren Uterus der Maus während der kritischen Phase der beginnenden Plazentaentwicklung unterstreicht deren Bedeutung.

4.1.2 Inhibierung von MAdCAM-1 und P-Selektin mit den Auswirkungen für die Rekrutierung von $\alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten in die VZ

Die Rolle der in der VZ exprimierten Zelladhäsionsmoleküle MAdCAM-1 und P-Selektin bei der Einwanderung von $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen sollte näher untersucht werden. Dazu wurden Langzeit *in vivo* Inhibitionsstudien durch die Injektion von blockierenden Ak gegen MAdCAM-1 von Tag 8-10 *p.c.* der murinen Schwangerschaft durchgeführt. Parallel

wurden P-Selektin^{-/-} mit oder ohne Injektion von blockierendem anti-MAdCAM-1 mAk untersucht und Zellen mit dem mAk DATK32 *in vivo* depletiert. Syngene C57BL/6J x C57BL/6J und allogene Balb/c x C57BL/6J (unbehandelt oder mit dem anti-humanen CD44 Ak Hermes-1 behandelt) sowie $\beta_7^{-/-}$ x $\beta_7^{-/-}$ Schwangerschaften dienten als Kontrollgruppen. Der Effekt der *in vivo* Inhibition auf die Anzahl CD11b⁺, CD11b⁺ $\alpha_4\beta_7^+$ und CD11b⁻ $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen in der vaskulären Zone wurde am Tag 11 der Schwangerschaft ausgewertet und kann in Tab.4.1 eingesehen werden (Ferne Korn *et al.*, 2004; Ferne Korn *et al.*, 2007).

Tab.4.1: Einfluss der *in vivo* Blockierung und Defizienz von Zelladhäsionsmolekülen auf Leukozytenpopulationen in der VZ

Versuchsgruppe ^a	Anzahl der Zellen/0.25mm ² in der VZ am Tag 11 <i>p.c.</i>		
	CD11b ⁺	CD11b ⁺ β_7^+	CD11b ⁻ β_7^+
Balb/c x C57BL/6J	24 (15.0-34.4)	2.5 (1.0-7.8)	1.3 (0.5-3.0)
Balb/c x C57BL/6J + Hermes-1	23 (19.0-32.0)	2.2 (1.0-5.6)	1.2 (0.2-3.8)
Balb/c x C57BL/6J + Meca367	18* (9.0-26.0)	0.5* (0-1.3)	1.2 (0.2-2.4)
Balb/c x C57BL/6J + DATK32	16* (11.0-25.0)	0.3* (0-0.8)	0.6* (0.1-1.0)
C57BL/6J x C57BL/6J	21 (16.0-25.0)	3.5 (1.0-4.8)	1.6 (0.8-4.0)
C57BL/6J x C57BL/6J + Hermes-1	22 (18.0-27.0)	3.0 (0.8-4.2)	1.4 (0.8-2.2)
P-Selektin ^{-/-} x P-Selektin ^{-/-}	12* (5.0-19.0)	0.3* (0-0.7)	0.8* (0.2-1.5)
P-Selektin ^{-/-} x P-Selektin ^{-/-} + Meca367	10* (5.0-15.0)	0.2* (0-0.6)	0.5* (0-0.8)
$\beta_7^{-/-}$ x $\beta_7^{-/-}$	15* (11.0-23.0)	0* (0-0.0)	0* (0-0.0)

^a Versuchsdurchführung und Datenerhebung siehe 3.2.5.2

* p<0.05

Gegen $\alpha_4\beta_7$ Integrin oder MAdCAM-1 gerichtete mAk blockierten die Einwanderung von CD11b⁺ $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen nahezu komplett. Vergleichbare Auswirkungen wurden bei der Untersuchung von feto/maternalen Einheiten (fmE) P-Selektin defizienter Mäuse sowohl mit als auch ohne die Blockierung von MAdCAM-1 durch den mAk Meca367 beobachtet. Bei diesen Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass die Einwanderung von CD11b⁺ und CD11b⁻ $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen verringert war, wobei die letztere Zellpopulation aber nicht durch eine zusätzliche Blockierung von MAdCAM-1 beeinflusst werden konnte. Als

weiteres Ergebnis waren alle fmE der untersuchten Mäuse, bei denen eine eingeschränkte oder fehlende Rekrutierung von $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen gezeigt werden konnte, durch eine Veränderung der Anzahl und Größe der uNK Zellen, die meist reduziert waren, in der DB gekennzeichnet (Ferne Korn *et al.*, 2004).

Im folgenden sollten Untersuchungen mit zellulären Markern an $\alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten erfolgen, um diese Zellen charakterisieren zu können.

4.2 Gating Strategie bei der durchflusszytometrischen Analyse

Nach vorbereitenden Schritten wurde die Analyse von isolierten Zellen aus den fmE oder aus dem Blut bzw. dem Lk der untersuchten Mäuse mit dem Durchflusszytometer durchgeführt. Die Abb.4.3A zeigt die Verteilung der Gesamtleukozyten im FSC und SSC ohne eine Aufreinigung mit Microbeads. Eine Analyse dieser Gesamtleukozyten mit dem Zellvitalitätsfarbstoff 7AAD ergab, dass um die 20% der untersuchten Zellen für 7AAD positiv sind (Abb.4.3B). Somit handelt es sich dabei um tote Zellen und Zelltrümmer. Um diese Zellen für die Analysen ausschließen zu können, wurden die 7AAD⁺ Zellen *gated* und deren Lage im FSC/SSC ermittelt (Abb.4.3C). Für die Analysen konnte somit ein *Gate* zum Ausschluss der 7AAD⁺ Zellen gesetzt werden, um Fehlanalysen bei der durchflusszytometrischen Messung zu verhindern. Beispielhaft ist das Setzen von *Gates*

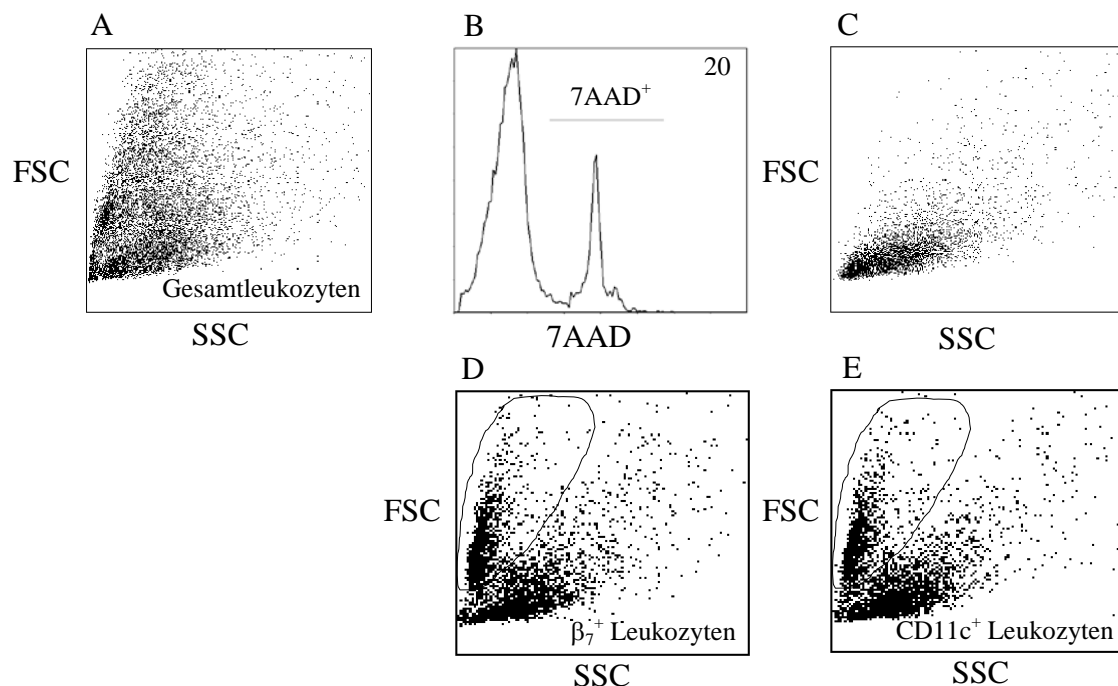


Abb.4.3: Gating Strategie zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

(A, B) Bei einer Gesamtanalyse von isolierten Leukozyten wurde der prozentuale Anteil an 7AAD⁺ Zellen bestimmt. (C) Das *Gaten* der 7AAD⁺ Zellen führte zu deren Lokalisation im FSC/SSC Dotplot. (D, E) Somit konnten ausschließlich 7AAD⁻ β_7^+ oder CD11c⁺ Zellen nach der Aufreinigung mit Microbeads analysiert werden.

bei β_7^+ und $CD11c^+$ Zellsuspensionen nach einer Aufreinigung mit Microbeads im FSC/SSC dargestellt (Abb.4.3D, E). Dabei beinhaltet das gesetzte *Gate* die zu analysierenden Zellen. Sofern nicht anders beschrieben, bezogen sich die analysierten Marker jeweils auf den Bereich der $7AAD^-$ Zellen. Für die jeweils untersuchten Marker konnten die Grenzen zwischen positiven und negativen Bereichen anhand von eingesetzten Isotypkontrollen durchgeführt werden.

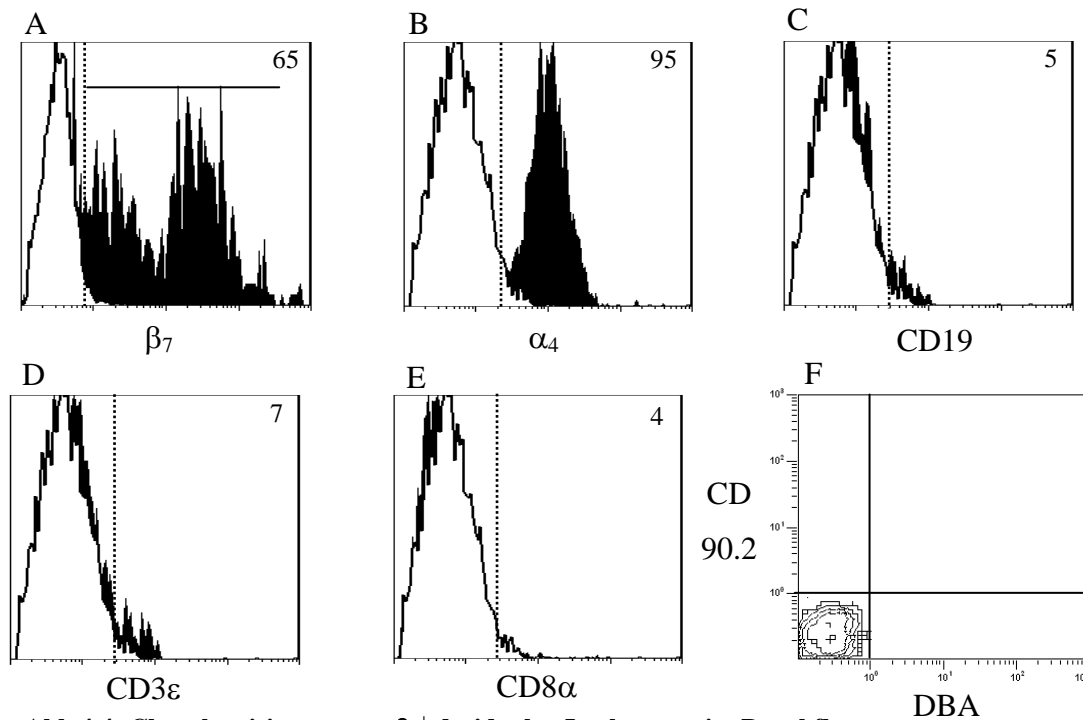


Abb.4.4: Charakterisierung von β_7^+ dezidualen Leukozyten im Durchflusszytometer

(A-F) Nach der Isolierung und dem *Gate*n von β_7^+ Zellen konnten die prozentualen Anteile an Antigen positiven Zellen bestimmt werden. (A) Der Anteil an β_7^+ Zellen erreichte eine Reinheit von 65% und wurde für weitere Untersuchungen *gated*. (B-E) Histogramme zeigen die Expression von α_4 , CD19, CD3 ϵ oder CD8 α auf β_7^+ Zellen. (F) Der Dotplot zeigt, dass β_7^+ Zellen für CD90.2 und DBA negativ sind. Die Ergebnisse sind für mindestens drei unabhängige Versuche repräsentativ:

4.3 Charakterisierung dezidualer β_7^+ Leukozyten

β_7^+ Zellen wurden aus dem Uterus von Tag 9 *p.c.* syngen schwangeren C57BL/6J x C57BL/6J Mäusen isoliert und von anderen Immunzellen durch eine Aufreinigung separiert. Dazu wurden die β_7^+ Zellen mit einem PE-markierten Ratte-anti-Maus β_7^+ mAk (M293) inkubiert und anschließend positiv durch anti-PE Microbeads aus der Zellsuspension selektioniert. Der verwendete mAk M293 erkennt ein spezifisches mit anderen mAk nicht überlappendes Epitop auf dem β_7 Integrin (Kilshaw and Murant, 1991; Andrew *et al.*, 1994) und wurde deshalb für die Isolation von β_7^+ Zellen verwendet.

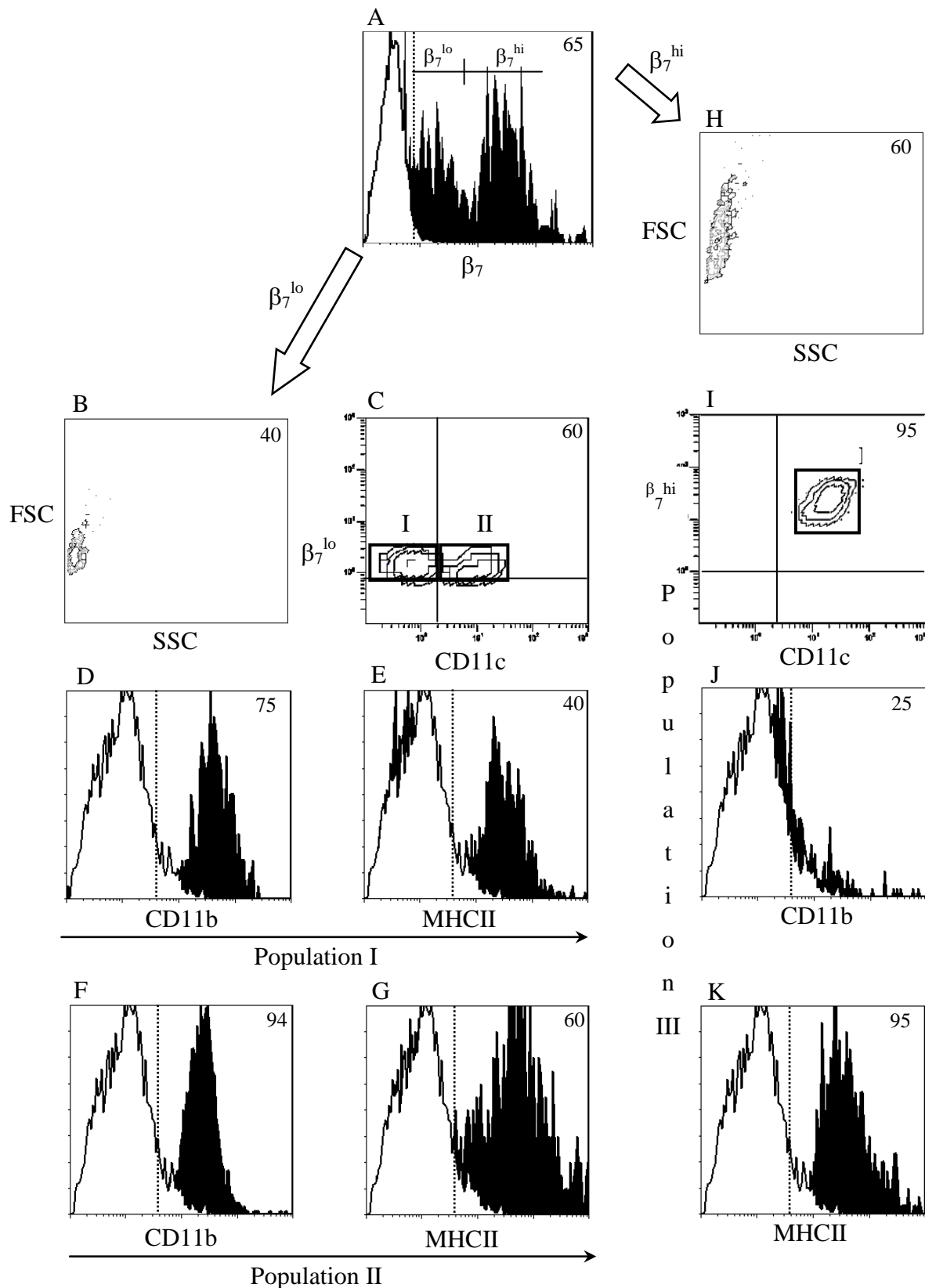


Abb.4.5: Durchflusszytometrische Analyse von β_7^+ Leukozyten aus der Dezidua

(A, B, H) β_7^+ Zellen können in β_7^{lo} und β_7^{hi} exprimierende Zellen unterteilt werden. (C, I) Beide Zellpopulationen wurden separat *gated* und auf ihre CD11c Expression hin untersucht. (D-G, J, K) Die Histogramme zeigen die Expression von CD11b und MHCII auf CD11c⁻ β_7^{lo} Zellen (Population I), CD11c⁺ β_7^{lo} Zellen (Population II) und CD11c⁺ β_7^{hi} Zellen (Population III), wie sie auf den Dotplots C und I *gated* wurden. Die Nummern in den Histogrammen und Dotplots geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die Ergebnisse sind für mindestens drei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von drei Mäusen gemeinsam behandelt wurden.

Das *Gaten* der Zellen erfolgte wie unter 4.2 beschrieben. Wie in Abb.4.4 gezeigt, erreichte die Isolierung von β_7^+ Zellen eine Reinheit von 65% (Abb.4.4A). Diese Zellpopulation wurde durch das *Gaten* außerdem auf die Expression von α_4 , CD19, CD3e, CD8a, CD11c, CD11b und MHCII hin untersucht. Das α_4 Integrin wurde auf mehr als 95% der untersuchten β_7^+ Zellen detektiert (Abb.4.4B). Die β_7^+ Zellen waren überwiegend negativ für typische B-Zell (CD19) und T-Zell (CD3 ϵ) Marker sowie für CD8 α (Abb.4.4C-E). Negativ stellten sich die β_7^+ Zellen auch für DBA und CD90.2 heraus (Abb.4.4F), zwei Marker, die für die Charakterisierung von uNK Zellen verwendet werden (Kruse *et al.*, 2002; Paffaro, Jr. *et al.*, 2003).

Bedeutend war, dass es ein heterogenes Expressionsmuster von β_7 Integrin auf dezidualen Leukozyten gab (Abb.4.5A). 40% der isolierten β_7^+ Zellen zeigten einen β_7^{lo} Phänotyp (Abb.4.5B), während 60% durch eine hohe Expression von β_7 charakterisiert waren (β_7^{hi} ; Abb.4.5H). Die berechneten rMFI für β_7^{lo} Zellen betrug 7.2 ± 2.4 und die rMFI auf β_7^{hi} exprimierenden Zellen lag bei 74.9 ± 8.0 . Die Bewertung der FSC Eigenschaften von beiden β_7 Integrin Populationen ergab, dass β_7^{hi} exprimierende Zellen größer als β_7^{lo} Zellen waren (Abb.4.5H). Die Populationen der β_7^{hi} und β_7^{lo} Zellen wurden dann getrennt auf ihre CD11c, CD11b und MHCII Expression hin untersucht. Im 4-Farben Durchflusszytometer ergab die Analyse, dass mehr als 95% der β_7^{hi} aber nur 60% der β_7^{lo} Subpopulation den DC Marker CD11c exprimierten (Abb.4.5I: Population III, Abb.4.5C: Population II). CD11c⁺ β_7^{hi} Zellen exprimierten einheitlich MHCII (Abb.4.5K). Die Mehrheit dieser Subpopulation war negativ für CD11b (Abb.4.5J). Die β_7^{lo} Zellen konnten in CD11c⁻ (Abb.4.5C: Population I) und CD11c⁺ (Abb.4.5C: Population II) Subpopulationen unterteilt werden. Die Mehrheit der Zellen dieser beiden Subpopulationen zeigte eine hohe Expression an CD11b (Abb.4.5D: CD11c⁻ β_7^{lo} um 75%, Abb.4.5F: CD11c⁺ β_7^{lo} um 94%) und eine niedrige bis mittlere MHCII Expression (Abb.4.5E, G). (Behrends *et al.*, im Reviewprozess)

4.4 Untersuchungen der $CD11c^+$ Leukozyten während der murinen Schwangerschaft am Tag 9 *p.c.*

4.4.1 Charakterisierung dezidualer $CD11c^+$ Leukozyten

Die unter 4.3 beschriebenen Ergebnisse deuten auf die Existenz von verschiedenen Subpopulationen von DC an der feto/maternalen Grenzschicht zum kritischen Zeitpunkt der beginnenden Plazentaentwicklung am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* hin. Um die Subpopulationen im dezidualen Gewebe von Tag 9 *p.c.* schwangeren C57BL/6J x C57BL/6J Mäusen genauer untersuchen zu können, wurden $CD11c^+$ Zellen an diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft aus dem Uterus mit Hilfe von Hamster-anti-Maus $CD11c^+$ Microbeads isoliert und dadurch aufkonzentriert. Die Aufkonzentrierung führte zu einer Reinheit der $CD11c^+$ Zellen von über 90% (Abb.4.6A).

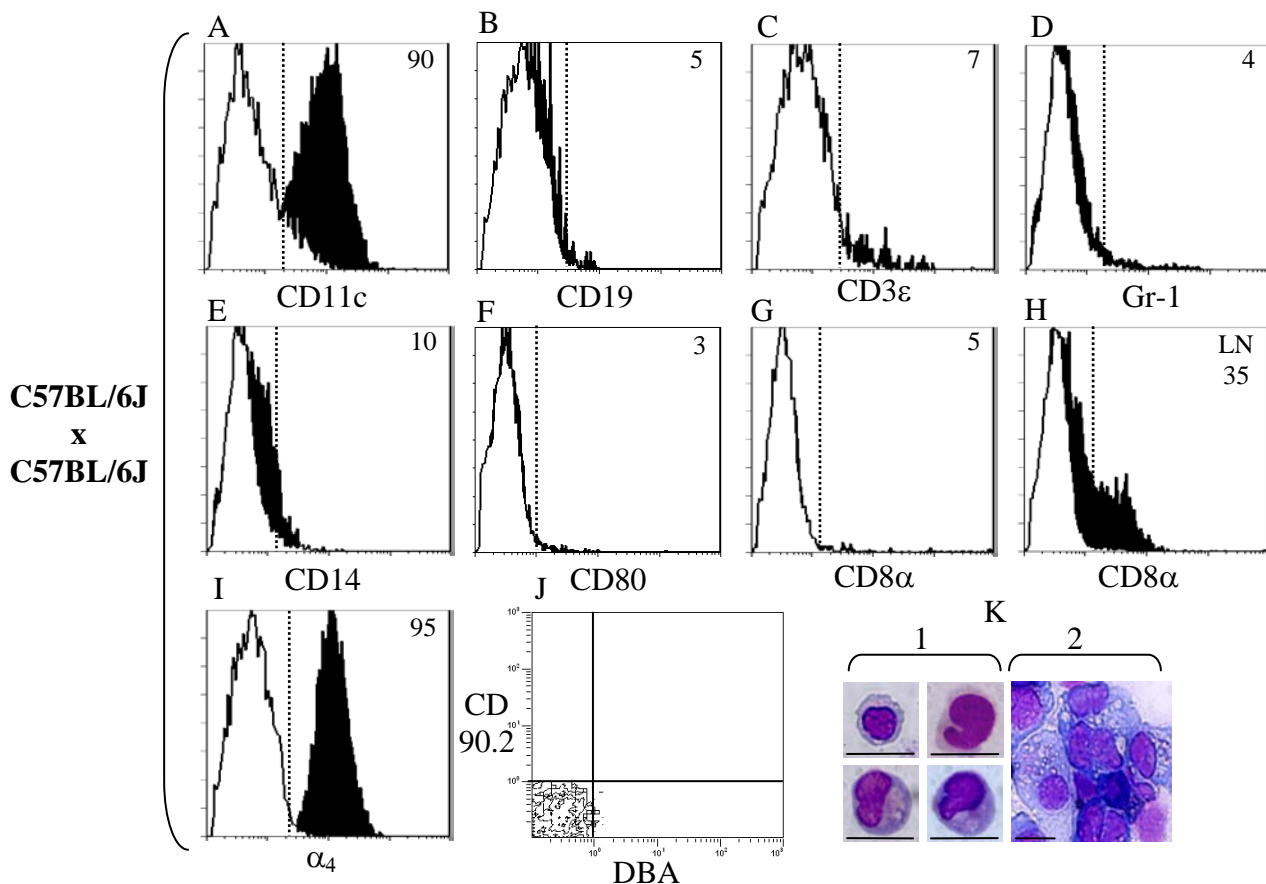


Abb.4.6: Durchflusszytometrische Charakterisierung von dezidualen $CD11c^+$ Zellen

Nach der Isolierung aus fmE von Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen, wurden die $CD11c^+$ Zellen *gated* und zeigten eine Reinheit von über 90% (A). (B-G, I) Histogramme von $CD11c^+$ untersuchten Zellen zeigen eine hohe Expression für α_4 , aber keine für CD19, CD3ε, Gr-1, CD14, CD80 und CD8α. (J) Ein Dotplot zeigt die Expression von CD90.2 und DBA der $CD11c^+$ Zellen. (H) Als eine Positivkontrolle für die Färbung von CD8α wurden isolierte Zellen aus dem iliakalen Lk verwendet. (K) $CD11c^+$ Zellen (K1) unterschieden sich deutlich in ihrer Größe und Form von den $CD11c^-$ Zellen (K2). Die Nummern in den Histogrammen geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die Ergebnisse sind für mindestens drei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von drei Mäusen gemeinsam behandelt wurden. Maßstabsbalken = 10µm.

Das Ergebnis der multiparametrischen Durchflusszytometrie von Oberflächenmakern auf lebenden 7AAD negativen CD11c⁺ DC war, dass CD11c⁺ Zellen sehr niedrige bis keine Expression der Oberflächenmarker CD19, CD3ε, CD90.2, Gr-1, CD205, CD14, CD80, CD90.2, DBA und CD83 zeigten (Abb.4.6B-F, J und nicht gezeigt). Außerdem waren CD11c⁺ Zellen negativ für CD8α (Abb.4.6G), ein typischer Marker, um pDC zu charakterisieren (Shortman and Liu, 2002). Kontrolliert wurde die CD8α Expression bei Zellen, die aus dem iliakalen Lymphknoten (Lk) isoliert wurden, die neben anderen Lk den schwangeren Uterus der Maus drainieren (Hummel *et al.*, 1941). Die aus dem Lk isolierten Zellen exprimierten zu 35% den Oberflächenmarker CD8α (Abb.4.6H). Zu 95% waren dagegen die CD11c⁺ Zellen positiv für das α₄ Integrin (Abb.4.6I). Deutlich unterscheiden ließen sich die CD11c⁺ aufgereinigte Zellen (Abb.4.6K1) von den CD11c⁻ Zellen der Negativfraktion (Abb.4.6K2) in ihrer Größe und auch ihrer Form. CD11c⁺ Zellen hatten eine Größe von etwa 10µm, waren aber von der Form her, wie z.T. ein gelappter monomorpher Kern, unterschiedlich gestaltet. CD11c⁻ Zellen waren heterogen zusammengesetzt, da diese Fraktion aus uNK Zellen, Makrophagen und anderen Zellen zusammengesetzt ist.

Tab.4.2: Charakterisierung von CD11c⁺ Subpopulationen an der feto/maternalen Grenzschicht am Schwangerschaftstag 9 p.c.

Oberflächenmarker ^a	CD11c ⁺ CD11b ^{lo} β ₇ ⁻	CD11c ⁺ CD11b ^{med} β ₇ ^{lo}	CD11c ⁺ CD11b ^{hi} β ₇ ^{hi}
CD11b rMFI ^b	11.2 ± 2.2	32 ± 6.3	0.2 ± 0.1
β ₇ rMFI ^b	0.1 ± 0.04	7.2 ± 2.4	74.9 ± 8.0
β ₁ rMFI ^b	12.9 ± 0.3	17.8 ± 0.7	6.7 ± 0.3
α ₄	+++	+++	+++
α _E	-	-	+++
β ₁	+++	+++	++
MHCII	+	++	+++
CD19	-	-	-
CD3ε	-	-	-
Gr-1	-	-	-
CD14	(+)	(+)	(+)
CD8α	-	-	-
CD45R	(+)	(+)	+
F4/80	(+)	(+)	-
7/4	+	+	-

^a Zahlen repräsentieren die prozentualen Anteile für das untersuchte Antigen:

- = 0-7%; (+) = 8-20%; + = 21-50%; ++ = 51-70%; +++ = > 70%

^b rMFI: Daten geben den Mittelwert und die Standardabweichung (±) an.

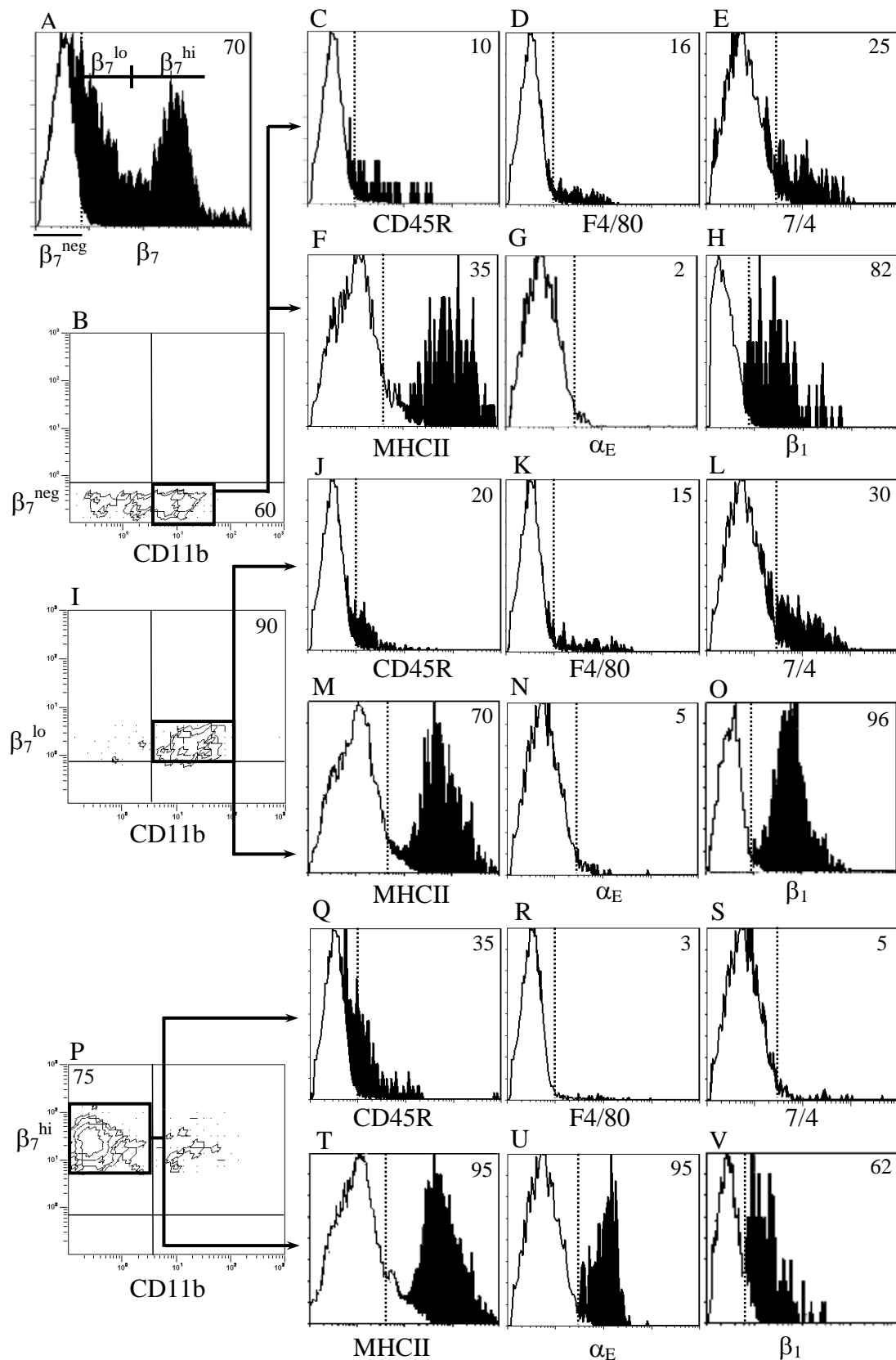


Abb.4.7: Durchflusszytometrische Analyse von dezidualen CD11c⁺ Subpopulationen

Nach der Isolierung aus fmE von Tag 9 *p.c.* syngen (C57BL/6J x C57BL/6J) schwangeren Mäusen, wurden die CD11c⁺ Zellen *gated* und analysiert. (A) CD11c⁺ Zellen können in β_7^- , β_7^{lo} und β_7^{hi} exprimierende Zellen unterteilt werden. (B, I, P) Dotplots zeigen die β_7 und CD11b Expression auf CD11c⁺ Zellen. CD11c⁺CD11b^{lo} β_7^- (B), CD11c⁺CD11b^{med} β_7^{lo} (I) und CD11c⁺CD11b^{hi} β_7^{hi} (P) wurden einzeln *gated*, um die Expression auf diesen CD11c⁺ Subpopulationen auf CD45R (C, J, Q), F4/80 (D, K, R), 7/4 (E, L, S), MHCII (F, M, T), α_E (G, N, U) und β_1 (H, O, V) hin zu untersuchen. Die Nummern in den Histogrammen geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die Ergebnisse sind für mindestens drei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von drei Mäusen gemeinsam behandelt wurden.

CD11c⁺ Zellen konnten in β_7^- , β_7^{lo} und β_7^{hi} exprimierende Zellen unterteilt werden (Abb.4.7A). Die Analyse der β_7 und CD11b Expression auf CD11c⁺ Zellen ergab, dass am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* drei Subpopulationen von CD11c exprimierenden Zellen an der feto/maternalen Grenzschicht vorkommen: CD11c⁺ CD11b^{lo} β_7^- , CD11c⁺ CD11b^{med} β_7^{lo} und CD11c⁺ CD11b^{hi} β_7^{hi} Zellen (Abb.4.7B, I, P). Die rMFI für β_7 und CD11b sowie die untersuchten Zelloberflächenmoleküle sind in der Tab.4.2 dargestellt. CD11b^{lo} β_7^- und CD11c⁺ CD11b^{med} β_7^{lo} Zellen (Abb.4.7B, I) können beide durch ihre niedrige Expression von CD45R und F4/80 charakterisiert werden (Abb.4.7C, D, J, K). Beide CD11c⁺ Subpopulationen exprimieren zu 25-30% schwach den Granulozyten Marker 7/4 (Abb.4.7E, L). Die MHCII Expression unterscheidet sich stark auf den einzelnen Populationen. 35% der CD11c⁺ CD11b^{lo} β_7^- Zellen (Abb.4.7F) und 70% der CD11c⁺ CD11b^{med} β_7^{lo} Zellen (Abb.4.4.7M) exprimieren MHCII. Im Gegensatz dazu waren die CD11c⁺ CD11b^{hi} β_7^{hi} Zellen dadurch charakterisiert, dass sie zu 95% MHCII exprimierten (Abb.4.7T), aber negativ für F4/80 und 7/4 (Abb.4.7R, S) waren. Diese Subpopulation konnte außerdem zu 35% mit dem anti-CD45R mAk RA3-6B2 angefärbt werden (Abb.4.7Q).

Die Untereinheit α_4 Integrin, die auf 95% der isolierten CD11c⁺ Zellen exprimiert wird (Abb.4.6I), kann mit der Untereinheit β_7 das Heterodimer $\alpha_4\beta_7$ oder mit der β_1 Untereinheit das Heterodimer $\alpha_4\beta_1$ bilden. Dem gegenüber kann β_7 mit α_4 ($\alpha_4\beta_7$) oder mit

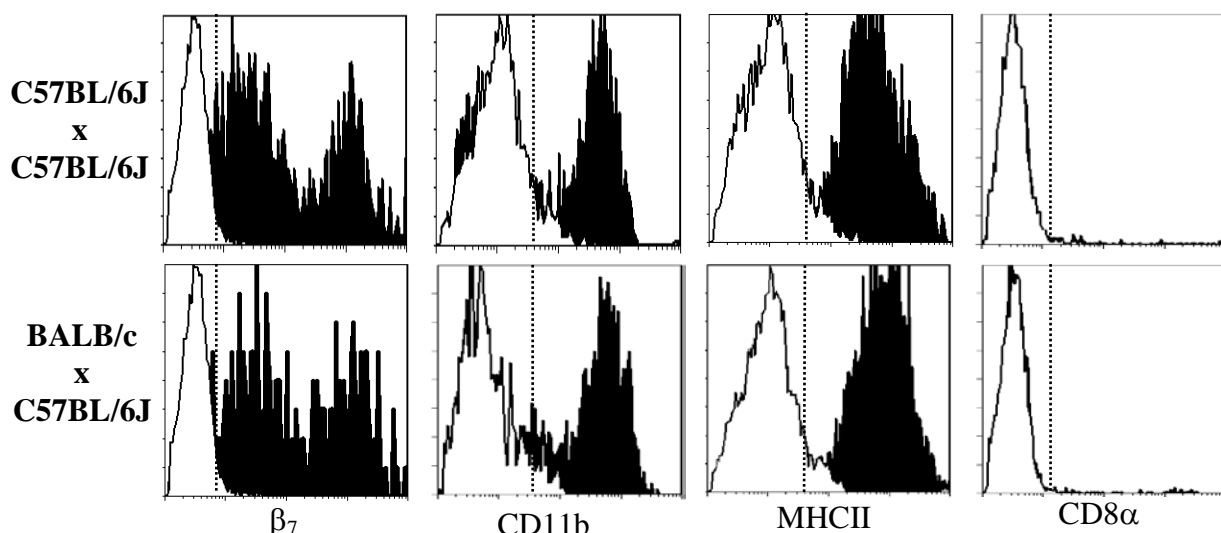


Abb.4.8: Vergleich der Charakterisierung dezidualer CD11c⁺ Zellen zwischen allogenen und syngen Schwangerschaften

Nach der Isolierung aus fmE von Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen, wurden die CD11c⁺ Zellen *gated* und auf die Expression von β_7 , CD11b, MHCII und CD8 α untersucht. Dabei wurde die Höhe der Expression von syngen (C57BL/6J x C57BL/6J) und allogenen (Balb/c x C57BL/6J) Schwangerschaften miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind für mindestens zwei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von zwei (allogenen) bis drei (syngen) Mäusen gemeinsam behandelt wurden.

α_E ($\alpha_E\beta_7$) ein Heterodimer bilden. Es konnte gezeigt werden, dass, in der Gegenwart von α_4 Integrin und gleichzeitig hoher Expression von α_E Integrin, die β_7 Untereinheit vorwiegend mit der α_E Untereinheit assoziiert (Lim *et al.*, 1998). Daher wurde die Expression der α_E und β_1 Untereinheiten auf den murinen $CD11c^+$ DC Subpopulationen untersucht. Wie in Abb.4.7G und N ersichtlich, waren die $CD11c^+$ $CD11b^{lo}$ β_7^- und $CD11c^+$ $CD11b^{med}$ β_7^{lo} Zellen beide für α_E negativ, indessen zeigten 95% der $CD11c^+$ $CD11b^-\beta_7^{hi}$ Zellen eine hohe Expression für α_E (Abb.4.7U). Das β_1 Integrin ist zu einem hohen Prozentsatz (62-96%) auf den meisten DC Subpopulationen vorhanden (Abb.4.7H, O, V und Tab.4.2).

Die erzielten Ergebnisse bei syngenem C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaften konnten auch bei allogenen schwangeren Balb/c x C57BL/6J Mäusen beobachtet werden. Dabei zeigte die Expression von ausgesuchten Marker wie β_7 , CD11b, MHCII und CD8 α zwischen den syngenem und allogenen Schwangerschaften keine signifikanten Unterschiede (Abb.4.8). (Behrends *et al.*, im Reviewprozess)

4.4.2 Verteilung der $CD11c^+$ DC Subpopulationen innerhalb des murinen Uterus am Schwangerschaftstag 9 *p.c.*

Um die räumliche Verteilung der zuvor charakterisierten drei DC Subpopulationen (Abb.4.7) ermitteln zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen innerhalb des dezidualen Gewebes durchgeführt. Ferner sollte überprüft werden, ob die charakterisierten DC mit anderen Immunzellen, wie z.B. uNK Zellen, räumlich miteinander in Kontakt treten. Abb.4.9 zeigt die Organisation des Uterus der Maus am Tag 9 *p.c.* der Schwangerschaft mit schematischer Verteilung der verschiedenen DC Subpopulationen.

Es stellte sich heraus, dass die Mehrzahl der β_7^+ Leukozyten, die am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* innerhalb der feto/maternalen Grenzschicht untersucht wurden, mit uNK Zellen direkt in Kontakt waren (Abb.4.10A). Diese β_7^+ Zellen exprimieren zusätzlich den DC Oberflächenmarker CD11c (Abb.4.10B). Immunfluoreszenzfärbungen mit CD11c, CD11b, F4/80, β_7 , α_4 und α_E zeigten, dass die in der Durchflusszytometrie beschriebenen $CD11c^+$ Subpopulationen (4.4.1) in definierten Bereichen des dezidualen Gewebes vorkommen (Abb.4.9 und Abb.4.11).

Die höchste Anzahl an $CD11c^+$ Zellen wurde an der Grenzschicht zwischen zDB und dem Myo, wie auch in dem Myo selbst, gefunden (19.3 ± 5.4 cells/ 0.25mm^2). Die Mehrheit dieser Zellen (53%, Abb.4.11C) gehören zur $CD11c^+$ $CD11b^-$ Subpopulation und

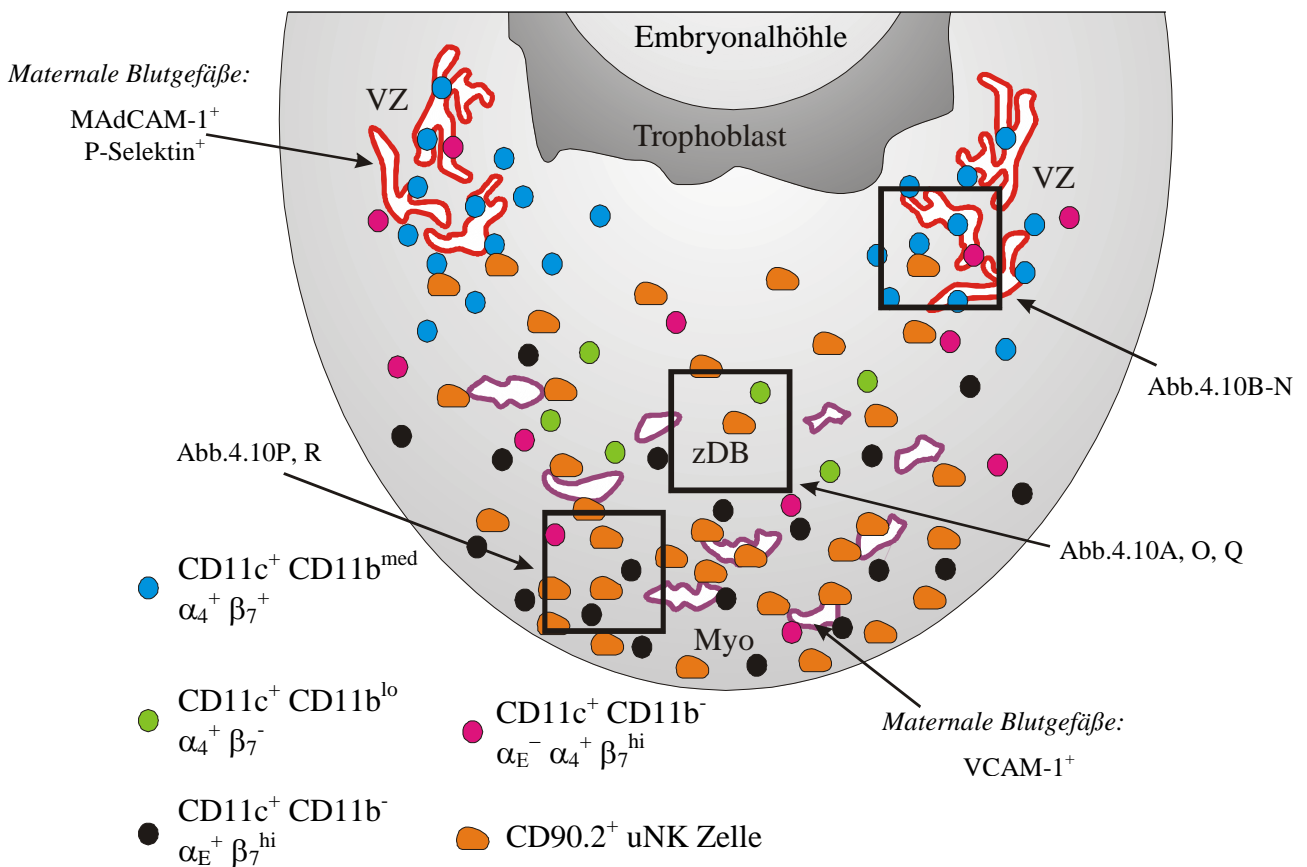


Abb.4.9: Schematische Übersicht des Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus der Maus mit den verschiedenen CD11c⁺ Subpopulationen

Organisation von einem Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus von syngenem C57BL/6J x C57BL/6J Mäusen. Eine schematische Übersicht zeigt die Verteilung der infiltrierenden CD11c⁺ DC Subpopulationen. Die speziellen eingezeichneten Zonen nehmen Bezug auf die Abb.4.10.

exprimieren neben α_4 auch sehr stark das α_E und β_7 Integrin (Abb.4.10Q, R). CD11c⁻ CD11b⁺ $\alpha_4\beta_7^{\text{hi}}$ F4/80⁺ M ϕ sind in diesem Bereich des dezidualen Gewebes auch zu finden (nicht gezeigt). Die Anzahl der CD11c⁺ Zellen innerhalb der zDB (8.1 ± 3.2 cells/0.25mm²) und VZ (7.0 ± 2.1 cells/0.25mm²) ist signifikant niedriger ($p \leq 0.05$) gegenüber der Anzahl im Myo. Die zDB besteht hauptsächlich aus zwei DC Subpopulationen (Abb.4.11B): CD11c⁺ CD11b^{lo} β_7^- (38%, Abb.4.11B; Abb.4.10O, P; ganzer Pfeil) und zu einem geringeren Teil CD11c⁺ CD11b⁻ Zellen (31%, Abb.4.11B; Abb.4.10O, P; rote Zellen). Letztere ist durch die Expression von α_4 , α_E und β_7 gekennzeichnet und ist der Hauptpopulation im Myo phänotypisch ähnlich. Die Hauptpopulation der CD11c⁺ Zellen in der VZ sind positiv für die Oberflächenmarker CD11b, α_4 und β_7 (75%, Abb.4.11A; Abb.4.10E, F, I-L und nicht gezeigt), sind aber negativ für α_E (Abb.4.10G, H). Eine signifikante Anzahl an CD11c⁺ CD11b⁻ $\alpha_4\beta_7^{\text{hi}}$ α_E^- DC sind in allen drei beschriebenen Bereichen der Dezidua (Abb.4.10Q, R: gestrichelte Pfeile) zu finden.

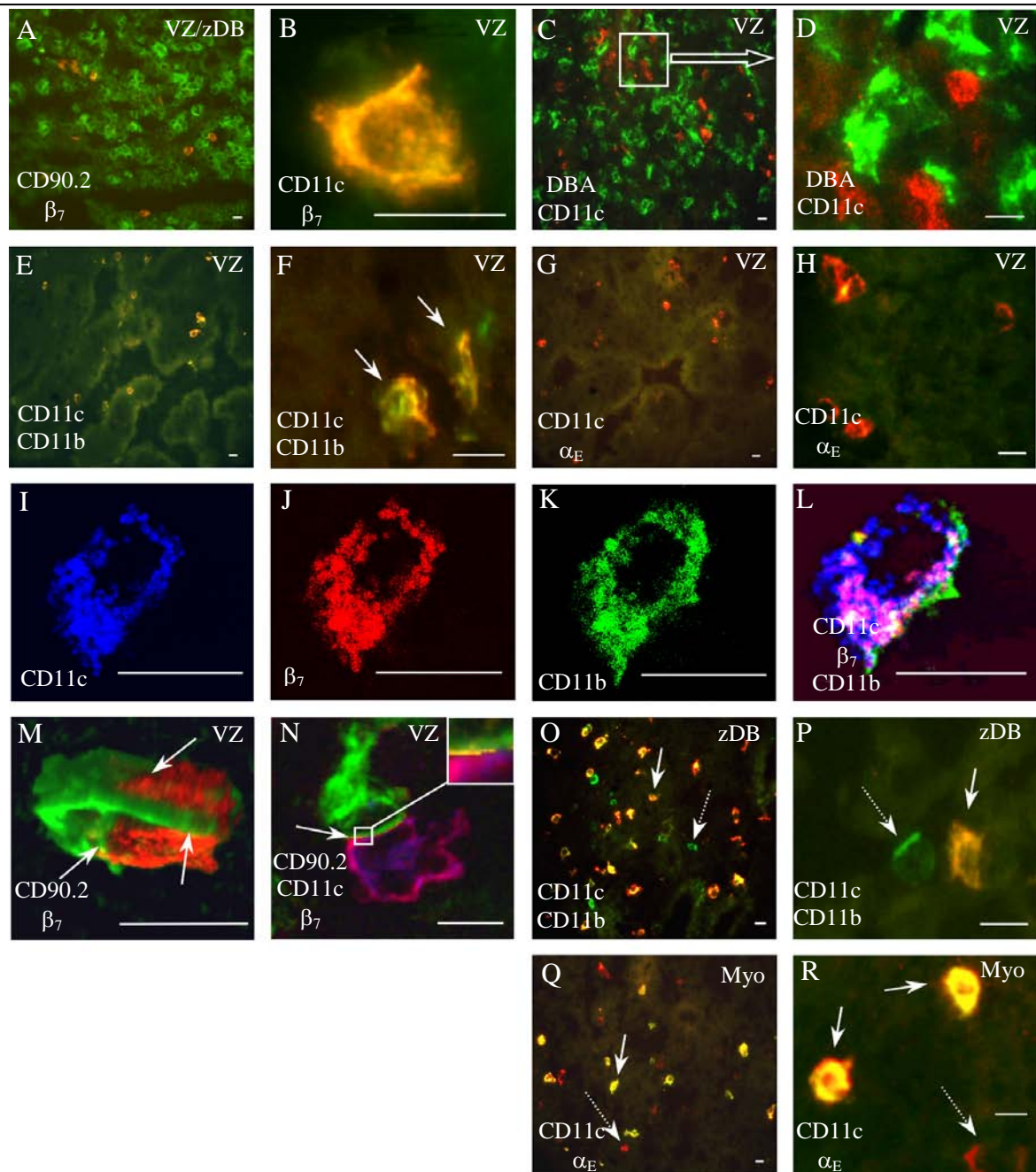


Abb.4.10: Lokalisation der CD11c⁺ Subpopulationen im schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 *p.c.*
 (A) Innerhalb des dezidualen Gewebes des Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus der Maus waren die β_7^+ Zellen mit CD90.2 markierten uNK in direktem Kontakt. (B) Färbungen mit anti-Maus β_7 mAk M293 (rot) und anti-Maus CD11c mAk HL3 (green) zeigten, dass die Mehrheit der β_7^+ Leukozyten zusätzlich den dendritischen Oberflächenmarker CD11c exprimierten (Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt). (C, D) Innerhalb des dezidualen Gewebes standen diese CD11c⁺ Zellen (rot), wie zuvor auch schon die β_7^+ Zellen, in engem Kontakt zu den hier DBA⁺ uNK Zellen (grün), die auch CD90.2⁺ exprimierten (Abb.4.1). (E-H) Diese Abbildungen zeigen, dass CD11c⁺ Zellen in der VZ (rot) zusätzlich mit dem anti-Maus CD11b mAk M1/70 (grün) gefärbt werden konnten (E, F; Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt), diese Zellen aber negativ für den anti-Maus α_E mAb M290 (G, H) waren. (I-L) Immunfluoreszenzfärbungen mit mAk gegen CD11c (APC, blau), β_7 (PE, rot) und CD11b (FITC, grün) bestätigten mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Existenz der CD11c⁺ CD11b⁺ β_7^+ Leukozyten innerhalb der VZ. (M) und (N) zeigten den direkten Kontakt zwischen CD90.2⁺ uNK (M; grün) und β_7^+ Zellen (M; rot) oder zwischen CD90.2⁺ uNK (N; grün) und CD11c⁺ β_7^+ doppelt positive Zellen (N; APC, blau; PE, rot). (O, P) CD11c⁺ CD11b⁺ Zellen in der zDB wurden mit CD11c (rot) und CD11b (grün; Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt: ganzer Pfeil). Einzelne CD11c⁻ CD11b⁺ Zellen (grün: gestrichelter Pfeil) und CD11c⁺ CD11b⁻ Zellen (rot) konnten ebenfalls nachgewiesen werden. (Q, R) CD11c⁺ Zellen (rot) innerhalb des Myo exprimierten sehr stark α_E (grün; Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt: ganzer Pfeil). Im Myo waren auch CD11c⁺ α_E^- Zellen zu finden (rot: gestrichelter Pfeil). Maßstabsbalken = 10 μ m.

An der Grenzschicht zwischen der VZ und zDB, treten die $CD11c^+$ Zellen in engen Kontakt mit den uNK Zellen. Doppel- oder Dreifachfärbungen mit Hilfe der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie unter der Verwendung von mAk gegen β_7 , α_4 , $CD11c$, $CD11b$ und $CD90.2$ in verschiedenen Kombinationen zeigten, dass die $CD11c^+ \alpha_4\beta_7^+$ Zellen direkt mit den uNK interagieren (Abb.4.10M, N). Die Mehrheit dieser Zellen exprimierte zudem den Marker $CD11b$ (nicht gezeigt).

Die $CD11c^+$ Zellen im schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 *p.c.* waren negativ für $CD8\alpha$, $CD80$, $CD83$ und $CD205$. Bis zu 40% der Zellen exprimierten $B220$, $CD68$ und $CD86$, wobei es zwischen den einzelnen Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede gab (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hauptpopulation an Zellen innerhalb der VZ am Tag 9 *p.c.* des schwangeren Uterus der Maus $CD11c^+ CD11b^+ \alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten sind (Abb.4.11A und Abb.4.10L), die mit den uNK Zellen an der Grenze zwischen VZ und zDB in engem räumlichen Kontakt stehen und sich gegenseitig zu beeinflussen scheinen (Abb.4.10M, N). Innerhalb der zDB stellen die $CD11c^+ CD11b^{lo} \beta_7^-$ Zellen die Hauptpopulation dar. Die Mehrheit der $CD11c^+$ Zellen innerhalb des Myo exprimiert zusätzlich $\alpha_E\beta_7$, aber ist $CD11b$ negativ. (Behrends *et al.*, im Reviewprozess)

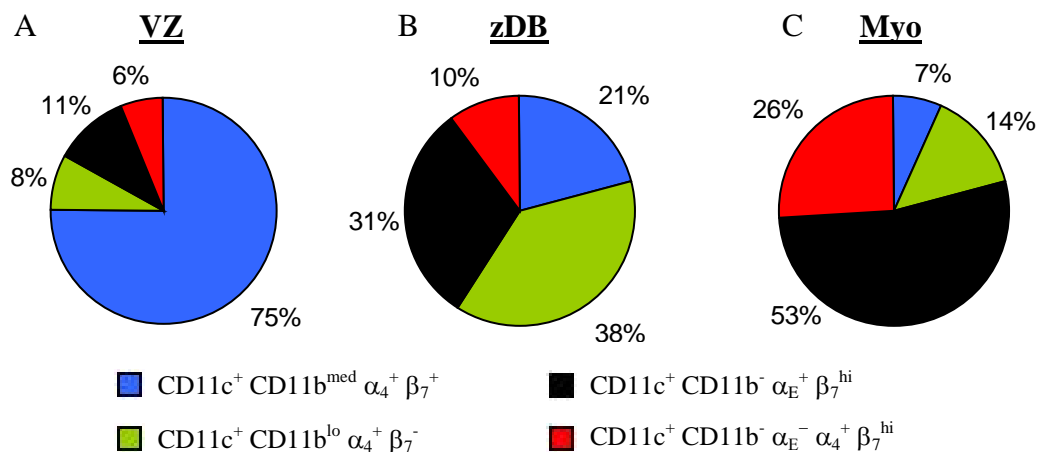


Abb.4.11: Prozentuale Verteilung der $CD11c^+$ Subpopulationen innerhalb definierter Bereiche des Tag 9 *p.c.* schwangeren murinen Uterus

Am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* wurden verschiedene Teilbereiche der DB (VZ, zDB und Myo) auf die Anzahl von verschiedenen $CD11c^+$ Subpopulationen hin untersucht. Es ließen sich vier DC Subpopulationen definieren: $CD11c^+ CD11b^{med} \alpha_4^+ \beta_7^+$ (■), $CD11c^+ CD11b^{lo} \alpha_4^+ \beta_7^-$ (■), $CD11c^+ CD11b^- \alpha_E^- \beta_7^{hi}$ (■) $CD11c^+ CD11b^- \alpha_E^- \alpha_4^+ \beta_7^{hi}$ (■). Angegeben sind die prozentualen Häufigkeiten der vorkommenden Subpopulationen innerhalb der drei verschiedenen Zonen der DB.

4.4.3 Zytokinmessungen bei CD11c⁺ und CD11c⁻ Zellen

Die vorangegangenen Versuche lassen Vermutungen zu, dass CD11c⁺ DC einen Einfluss auf uNK haben. Neben der räumlichen Nähe dieser beiden Zelltypen, ihrem direkten Zell-Zell-Kontakt (Abb.4.10M, N), sollte untersucht werden, welche Zytokine die CD11c⁺ Zellen sezernieren könnten, die einen Einfluss auf die uNK Zellen und ihre Proliferation nehmen. Da in verschiedenen Publikationen der Einfluss von DC produziertem IL-12 und IL-15 auf die Reifung und Proliferation von NK Zellen (Ferlazzo *et al.*, 2004; Munz *et al.*, 2005) sowie der Einfluss von IL-15 auf uNK Zellen (Ashkar *et al.*, 2003) beschrieben wurde, sollten diese Zytokine für die Analyse der aus den fmE von Tag 9 *p.c.* schwangeren C57BL/6J Mäusen isolierten DC verwendet werden.

Die mit Microbeads aufgereinigten CD11c⁺ Zellen sowie die CD11c⁻ Zellen (Negativfraktion) wurden wie unter 3.2.1.8 beschrieben für die intrazelluläre Färbung stimuliert. Anschließend wurde zuerst eine Oberflächenfärbung gegen CD11c gefolgt von der intrazellulären Färbung gegen mIL-12 und mIL-15 durchgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass 64% der CD11c⁺ Zellen gegenüber 30% der CD11c⁻ Zellen zur IL-12 Sezernierung fähig waren (Abb.4.12A). Die Ausschüttung von IL-15 konnte bei der Hälfte der CD11c⁺ Zellen gegenüber 28% bei den CD11c⁻ Zellen nachgewiesen werden (Abb.4.12B).

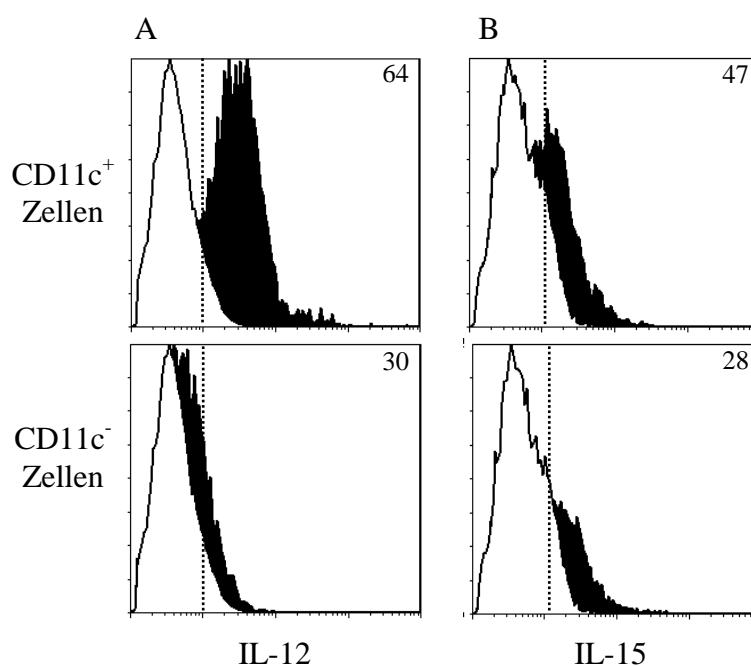


Abb.4.12: Intrazelluläre Färbung von dezidualen Leukozyten

Nach der Isolierung wurden die CD11c⁺ und CD11c⁻ Zellen im FSC/SSC Dotplot *gated* und auf IL-12 (A) sowie IL-15 (B) hin untersucht. Die Nummern in den Histogrammen geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die Ergebnisse sind für zwei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von zwei Mäusen gemeinsam behandelt wurden.

4.4.4 Die Anzahl der CD11c⁺ DC im schwangeren Uterus der Maus verändert sich im weiteren Verlauf der Schwangerschaft

In weiteren Untersuchungen sollte das Migrationsverhalten der CD11c⁺ $\alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten im Gewebe des schwangeren Uterus der Maus analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Schwangerschaftstage 9, 11 und 14 *p.c.* von syngeneten C57BL/6J x C57BL/6J Mäusen und allogenen Balb/c x C57BL/6J auf CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ, zDB und des Myo hin untersucht (Abb.4.13A-C). Die Anzahl der CD11c⁺ Zellen innerhalb dieser Zonen wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Hamster-anti-Maus CD11c mAk HL3 bestimmt.

Es konnte beobachtet werden, dass an allen drei untersuchten Schwangerschaftstagen die Anzahl der CD11c⁺ Zellen in der VZ niedriger als in der zDB und die Anzahl innerhalb der zDB unter der im Myo liegt.

In der VZ reduzierte sich zudem die Anzahl der CD11c⁺ Zellen im Verlauf der Schwangerschaft vom Tag 9 *p.c.* von 7.0 ± 2.1 , über Tag 11 *p.c.* von 4.6 ± 1.2 bis zum Tag 14 *p.c.* auf 1.6 ± 0.8 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² (Abb.4.13A). Innerhalb der zDB konnte keine signifikante Abnahme der Anzahl von CD11c⁺ Zellen vom Tag 9 *p.c.* (8.1 ± 3.2 Zellen/0.25mm²) auf den Tag 11 *p.c.* (7.2 ± 2.6 Zellen/0.25mm²) festgestellt werden (Abb.4.13B). Die Anzahl der CD11c⁺ Zellen innerhalb der zDB reduzierte sich aber vom Schwangerschaftstag 11 zum Tag 14 *p.c.* auf 3.6 ± 1.5 CD11c⁺ Zellen/0.25mm². Im Unterschied zur VZ und zDB erhöhte sich am Tag 9 *p.c.* im Vergleich zum Tag 11 *p.c.* die Anzahl der CD11c⁺ Zellen im Myo signifikant von 19.3 ± 5.4 auf 29.2 ± 8.9 Zellen/0.25mm² (Abb.4.13C). Vom Tag 11 auf den Tag 14 *p.c.* der Schwangerschaft

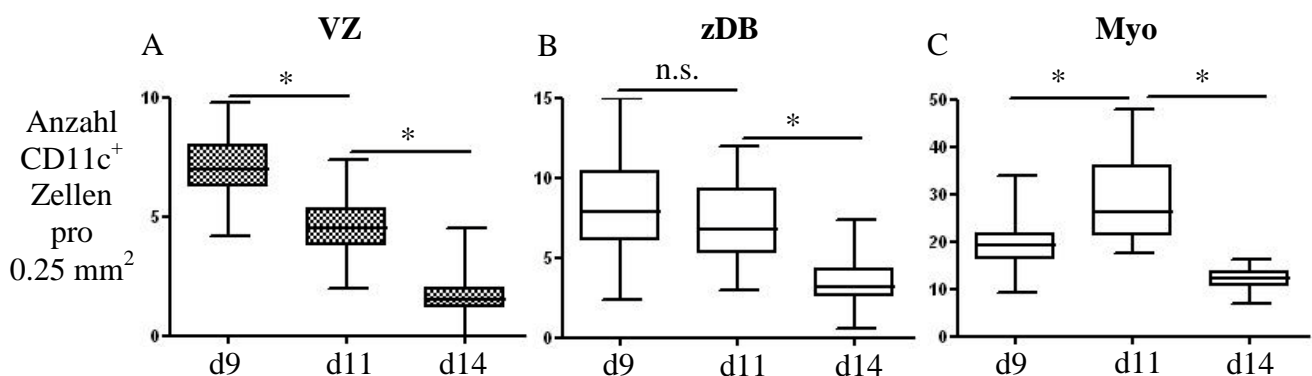


Abb.4.13: Anzahl von CD11c⁺ Zellen in der VZ, der zDB und dem Myo am Tag 9, 11 und 14 *p.c.* der murinen Schwangerschaft

(A-C) Die Anzahl von CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ (A), der zDB (B) und dem Myo (C) von syngeneten C57BL/6J x C57BL/6J Tag 9, 11 und 14 *p.c.* schwangeren Mäusen wurde innerhalb der jeweiligen untersuchten Zone miteinander verglichen. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Kontrollen sind mit * gekennzeichnet ($p < 0.05$).

halbierte sich die Anzahl der CD11c⁺ Zellen im Myo von 29.2 ± 8.9 Zellen/0.25mm² auf 12.0 ± 2.2 Zellen/0.25mm².

Wurde die Anzahl von CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ zwischen syngenen (C57BL/6J x C57BL/6J) und allogenen (Balb/c x C57BL/6J) Schwangerschaften an den Tagen 9, 11 und 14 *p.c.* verglichen, konnte am Tag 9 *p.c.* bei allogenen Schwangerschaften mehr CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von fmE als bei syngenen Schwangerschaften (7.6 ± 1.3 vs. 7.0 ± 2.1 Zellen/0.25mm²) ausgezählt werden (Abb.4.14). Interessanterweise gab es an den Schwangerschaftstagen 11 und 14 *p.c.* bei den allogenen Schwangerschaften weniger CD11c⁺ Zellen als bei syngenen Schwangerschaften. Am Tag 11 *p.c.* gab es bei allogenen Schwangerschaften nur noch 4.0 ± 0.7 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² gegenüber 4.6 ± 1.2 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² bei syngenen Schwangerschaften und am Tag 14 *p.c.* waren es 0.9 ± 0.4 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² (allogen) im Gegensatz zu 1.6 ± 0.8 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² (syngen).

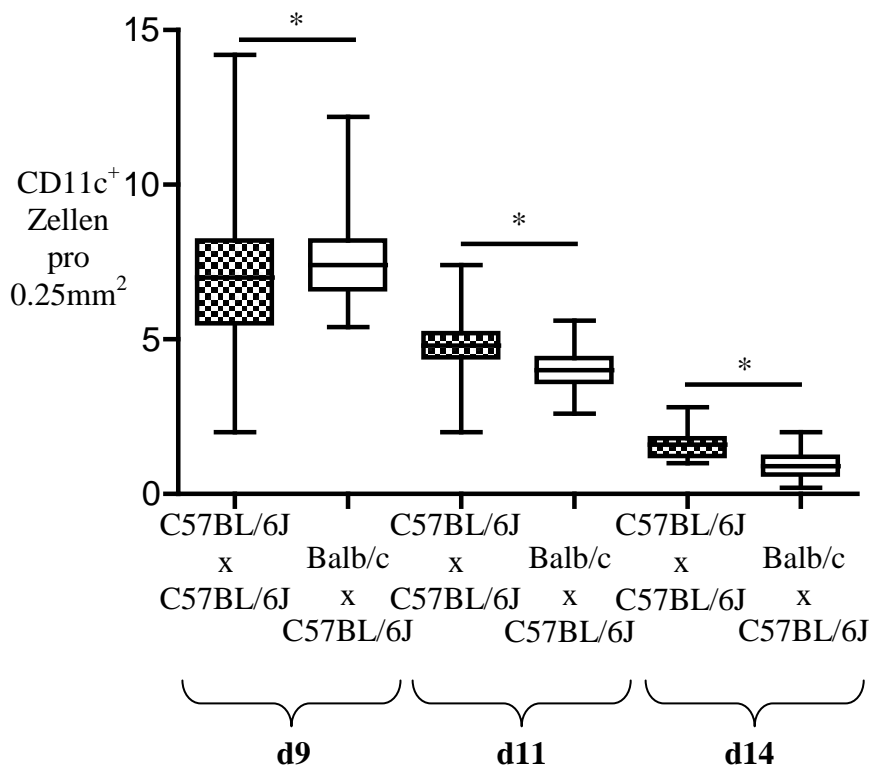


Abb.4.14: Anzahl von CD11c⁺ Zellen in der VZ am Tag 9, 11 und 14 *p.c.* von syngenen und allogenen Schwangerschaften

Die Anzahl von CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von syngenen C57BL/6J x C57BL/6J und allogenen Balb/c x C57BL/6J Tag 9, 11 und 14 *p.c.* schwangeren Mäusen wurden innerhalb eines Schwangerschaftstages miteinander verglichen. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Kontrollen sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet.

4.5 Die Expression von Chemokinrezeptoren auf Leukozyten im schwangeren murinen Uterus

4.5.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf DC

An der Extravasation und Migration von Zellen innerhalb von Geweben sind neben Adhäsionsmolekülen vor allem auch Chemokine und auf den Zellen exprimierte Chemokinrezeptoren beteiligt (Gonzalo *et al.*, 1999; von Andrian and Mackay, 2000; von Andrian and Mempel, 2003). Da im schwangeren Uterus der Maus als auch bei humanen Schwangerschaften eine Expression der Chemokine MIP-1 α und RANTES beschrieben worden sind (Wood *et al.*, 1997; Drake *et al.*, 2001), die eine Zuwanderung von Monozyten, uNK Zellen und T-Zellen bewirken, wurden die CD11c⁺ Zellen auf die Expression des Chemokinrezeptors für diese Liganden untersucht.

Um die Expression von Chemokinrezeptoren auf DC in der VZ des schwangeren Uterus der Maus zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen und durchflusszytometrische Messungen an fmE von Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen durchgeführt. Mit dem mAk MC68, der murines CCR5 detektiert und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Mack zur Verfügung gestellt wurde (Mack *et al.*, 2001), konnten CCR5⁺ Zellen innerhalb der VZ nachgewiesen werden (Abb.4.15A), die vorwiegend für den Oberflächenmarker CD11c positiv waren (Abb.4.15B; Pfeile).

Durchflusszytometrische Analysen von isolierten Zellen aus fmE von Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen zeigten, dass 48% der isolierten Gesamtzellen den Chemokinrezeptor CCR5 exprimierten (Abb.4.15C, D). Um den prozentualen Anteil von CCR5 exprimierenden Zellen an der CD11c⁺ Population bestimmen zu können, wurden CD11c⁺ Zellen über Hamster-anti-Maus CD11c Micobeads aufkonzentriert und im FSC/SSC *gated* (Abb.4.15E). Die Reinheit der CD11c⁺ Zellen lag bei über 90% (nicht gezeigt). Die CD11c⁺ 7AAD⁻ Zellen wurden dann auf den Marker CCR5 hin untersucht und es zeigte sich, dass um 89% aller CD11c⁺ Zellen CCR5 exprimieren (Abb.4.15F). CCR5 konnte auf allen DC Subpopulationen nachgewiesen werden (50-90%; Abb.4.15G). Um die Spezifität des mAk MC68 einer internen Kontrolle zu unterziehen, wurden CD11c⁺ Zellen aus fmE desselben Schwangerschaftstages von CCR5 defizienten Mäusen mit diesem Ak inkubiert. Es war keine Kreuzreaktivität des mAk MC68 festzustellen und dementsprechend waren die CD11c⁺ Zellen aus den CCR5^{-/-} Mäusen für den Marker CCR5 negativ (Abb.4.15J, K).

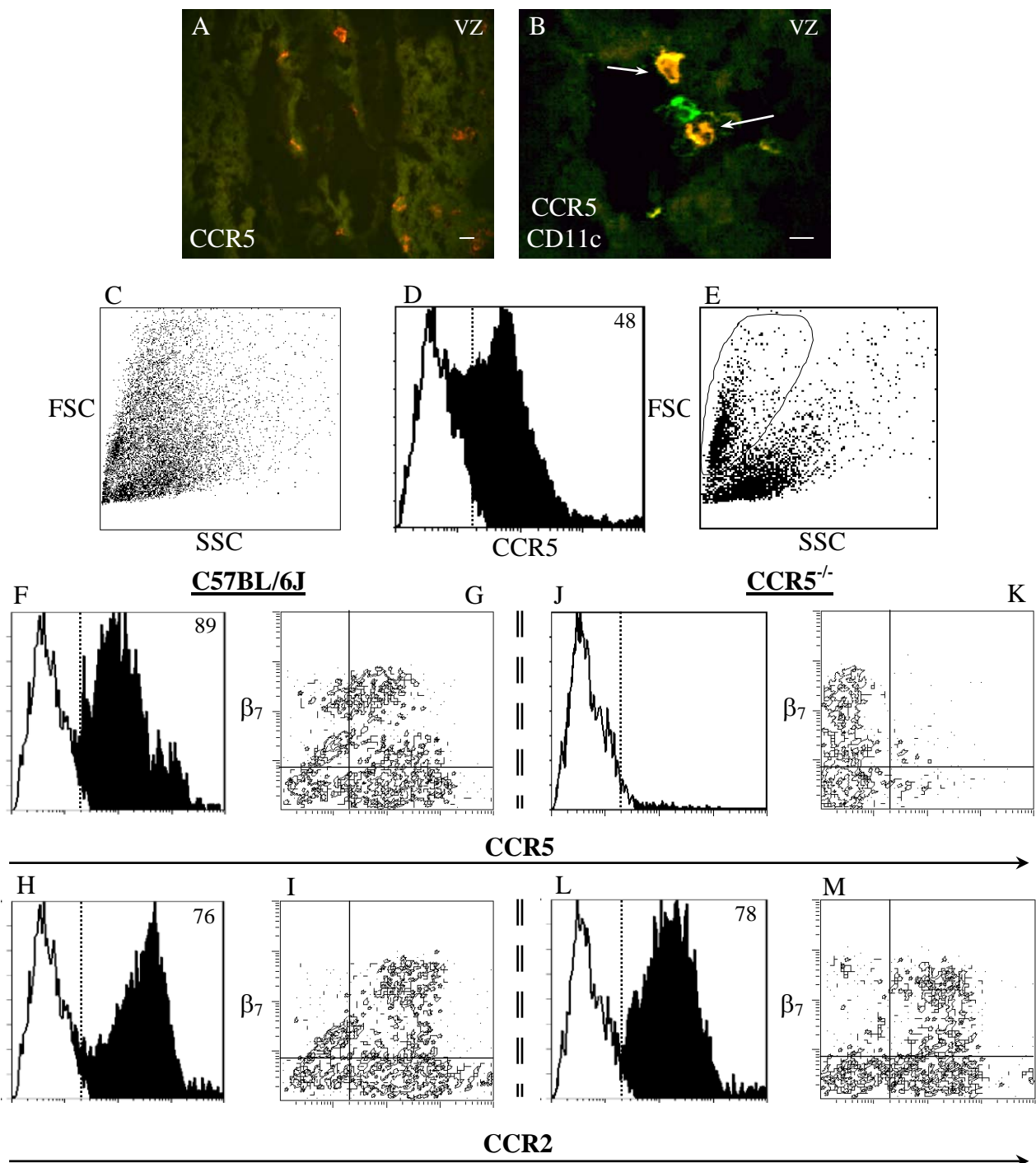


Abb.4.15: Chemokinrezeptoren auf DC

(A) CCR5⁺ Zellen (PE, rot) konnten innerhalb der VZ von syngenen C57BL/6J Tag 9 p.c. Schwangerschaften nachgewiesen werden. (B) CCR5⁺ Zellen (FITC, grün) waren überwiegend für den Oberflächenmarker CD11c (PE, rot) positiv (B; Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt; Pfeile). (C, D) Bei einer Gesamtanalyse von isolierten Leukozyten wurde der prozentuale Anteil an CCR5⁺ Zellen bestimmt. (E-M) Durch das *Gaten* von mit Hamster-anti-Maus CD11c Microbeads aufgereinigten CD11c⁺ Zellen aus syngenen C57BL/6J und CCR5^{-/-} Tag 9 p.c. Schwangerschaften konnten diese Zellen auf ihre Expression von CCR5 und CCR2 hin untersucht werden. Die Nummern in den Histogrammen geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die Ergebnisse sind für mindestens drei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von drei Mäusen gemeinsam behandelt wurden. Maßstabsbalken = 10µm.

Zusätzlich wurden die CD11c⁺ Zellen auf den Chemokinrezeptor CCR2 hin untersucht, der vorwiegend auf Monozyten oder DC gefunden wird (Vanbervliet *et al.*, 2002). Zu diesem Zweck wurde ein von Herrn Prof. Dr. M. Mack zur Verfügung gestellter Ratte-anti-Maus mAk MC21 verwendet (Mack *et al.*, 2001). 76% der analysierten CD11c⁺ Zellen waren für CCR2 positiv (Abb.4.15H, I). Einen signifikanten Unterschied der CCR2 Expression zwischen CD11c⁺ Zellen aus C57BL/6J Mäusen und CCR5 defizienten Mäusen gab es nicht (Abb.4.15L, M).

4.5.2 Die Beteiligung des Chemokinrezeptors CCR5 bei der Einwanderung von CD11c⁺ DC in den schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 p.c.

Um die Bedeutung von CCR5 an der Extravasation von DC zu untersuchen, sollten die Auswirkungen auf die Gesamtpopulation der CD11c⁺ Zellen bei einer Blockade des Chemokinrezeptors CCR5 mit dem injizierten mAk MC68 oder bei CCR5 defizienten Mäusen untersucht werden.

Für diese Versuche wurden CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von syngen CCR5^{-/-} x CCR5^{-/-} Schwangerschaften gezählt und mit der Anzahl von syngen Kontrollschwangerschaften (C57BL/6J x C57BL/6J) verglichen (Abb.4.16A-C). Immunfluoreszenzfärbungen ergaben eine inhibierte Einwanderung von CD11c⁺ Zellen in die VZ bei CCR5 defizienten Mäusen. Es ließ sich eine Reduzierung um 41% von 7.0 ± 2.1 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² bei C57BL/6J Mäusen gegenüber 4.1 ± 1.7 CD11c⁺ Zellen/0.25mm² bei CCR5^{-/-} Mäusen berechnen.

Desweiteren wurden *in vivo* Blockierungsstudien gegen CCR5 durchgeführt. Hierfür wurde der den Chemokinrezeptor CCR5 blockierende Ratte-anti-Maus mAk MC68 am Tag 7 p.c. syngen C57BL/6J x C57BL/6J schwangeren Mäusen *i.p.* injiziert. Am Schwangerschaftstag 9 p.c. wurden die fmE entnommen und nach Immunfluoreszenzfärbungen wurden die CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ ausgewertet (Abb.4.16A, D). Als Kontrolle dienten Mäuse, die statt der Injektion des mAk MC68 eine IgG_{2b} Isotypkontrolle verabreicht bekommen hatten. Immunfluoreszenzfärbungen ergaben eine stark inhibierte Einwanderung von CD11c⁺ Zellen in die VZ innerhalb fmE von Mäusen, die mit dem blockierenden mAk MC68 injiziert worden waren. Es ließ sich eine Abnahme der CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ um 88% von 6.8 ± 2.5 Zellen/0.25mm² bei C57BL/6J Mäusen, die mit der Isotypkontrolle behandelt wurden, gegenüber 0.8 ± 0.4

Zellen/ 0.25mm^2 bei C57BL/6J Mäusen, die mit dem Ak MC68 behandelt wurden, berechnen.

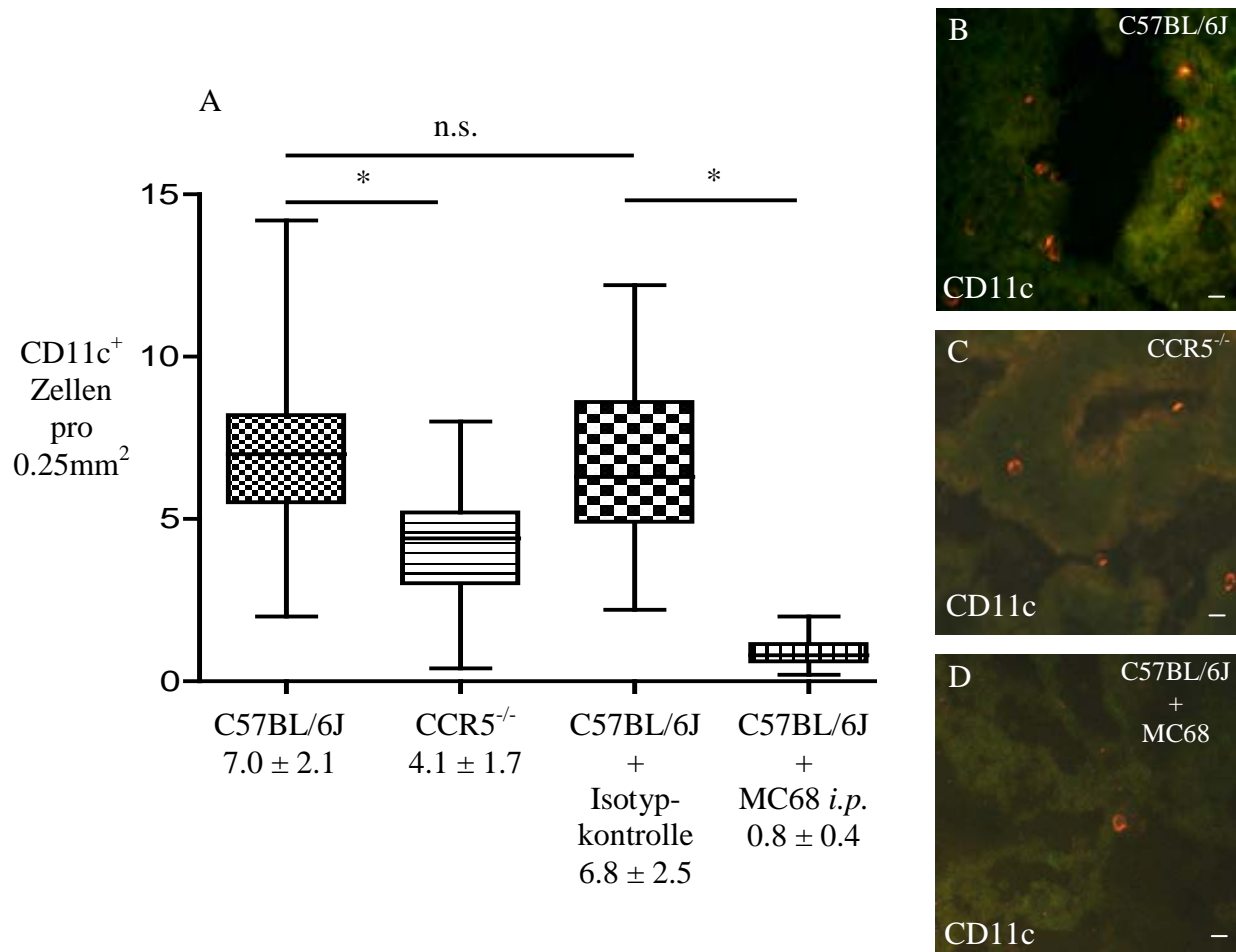


Abb.4.16: Reduzierte Einwanderung von CD11c⁺ Zellen in die VZ am Tag 9 *p.c.* der Schwangerschaft (A) Die Anzahl von CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von syngenen C57BL/6J x C57BL/6J Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen wurde mit der Anzahl der entsprechend syngener Schwangerschaften von CCR5^{-/-} Mäusen verglichen. Zusätzlich wurden fmE syngener C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaften, die entweder mit dem CCR5 blockierenden Ak MC68 oder mit einer Isotypkontrolle (Ratte IgG2b) *i.p.* injiziert wurden, auf die Anzahl CD11c exprimierender Zellen hin untersucht. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Kontrollen sind mit * gekennzeichnet ($p < 0.05$). (B-D) Kryostatschnitte des Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus von C57BL/6J (B), CCR5^{-/-} (C) und MC68 behandelten C57BL/6J (D) Mäusen wurden zur Darstellung der DC (rot) mit PE markiertem CD11c Ak gefärbt. Maßstabsbalken = 10 μm .

4.5.3 Die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 auf uNK Zellen innerhalb des schwangeren Uterus der Maus am Tag 9 *p.c.*

Da in dem Bereich zwischen VZ und zDB auch CCR5 Zellen detektiert werden konnten, die nicht für CD11c positiv waren (Abb.4.15B), sollten weitere Färbungen von Kryostatschnitten klären, um welche Leukozytenpopulation es sich bei diesen CCR5⁺ Zellen handelt.

Immunfluoreszenzfärbungen konnten zeigen, dass ein großer Anteil der $CD90.2^+$ uNK Zellen positiv für CCR5 war ($48 \pm 11\%$; Abb.4.18A). Doch diese hohe prozentuale Anzahl an spezifischen $CCR5^+$ $CD90.2^+$ uNK Zellen konnte nur in dem Grenzbereich zwischen zDB und VZ beobachtet werden. Interessanterweise reduzierte sich der Anteil an $CCR5^+$ uNK Zellen in Richtung zDB (Abb.4.17). Nur noch ca. 1% der uNK Zellen exprimierten im Myo zusätzlich den Chemokinrezeptor CCR5.

Fluoreszenzfärbungen mit PE markiertem $CD90.2$ Ak wurden bei C57BL/6J, CCR5 defizienten und anti-CCR5 mAk MC68 behandelten Mäusen, deren fmE am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* untersucht wurden, durchgeführt. Die im Bereich der Grenzschicht zwischen zDB und VZ untersuchten fmE zeigten, dass auch die Anzahl der uNK durch das Fehlen von CCR5 bzw. die Blockade von CCR5 in diesem Bereich beeinflusst waren (Abb.4.18B-E). Die Anzahl der gezählten uNK Zellen in dem Grenzbereich der zDB und der VZ reduzierte sich bei untersuchten fmE von $CCR5^{-/-}$ Mäusen um 75% und bei MC68 behandelten Mäusen um über 88%. Untersuchungen innerhalb des Myo ergaben, dass in dieser Zone die Anzahl der $CD90.2^+$ uNK Zellen bei $CCR5^{-/-}$ oder C57BL/6J x C57BL6J Mäusen, die mit dem mAk MC68 injiziert worden waren, nicht signifikant von syngenem C57BL/6J Kontrollschwangerschaften abwichen (nicht gezeigt).

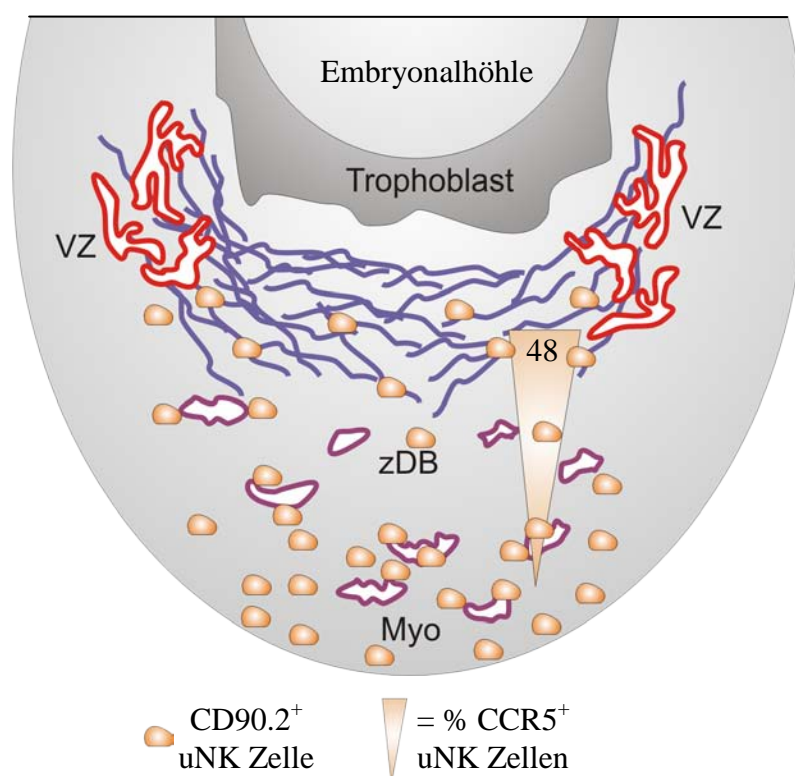


Abb.4.17: Schematische Übersicht des Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus der Maus mit der Lage der uNK Zellen

Organisation von einem Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus von syngenem C57BL/6J x C57BL/6J Mäusen. Eine schematische Übersicht zeigt die Verteilung der $CD90.2^+$ uNK Zellen und dabei die prozentuale Verteilung des Chemokinrezeptors CCR5 auf den uNK Zellen.

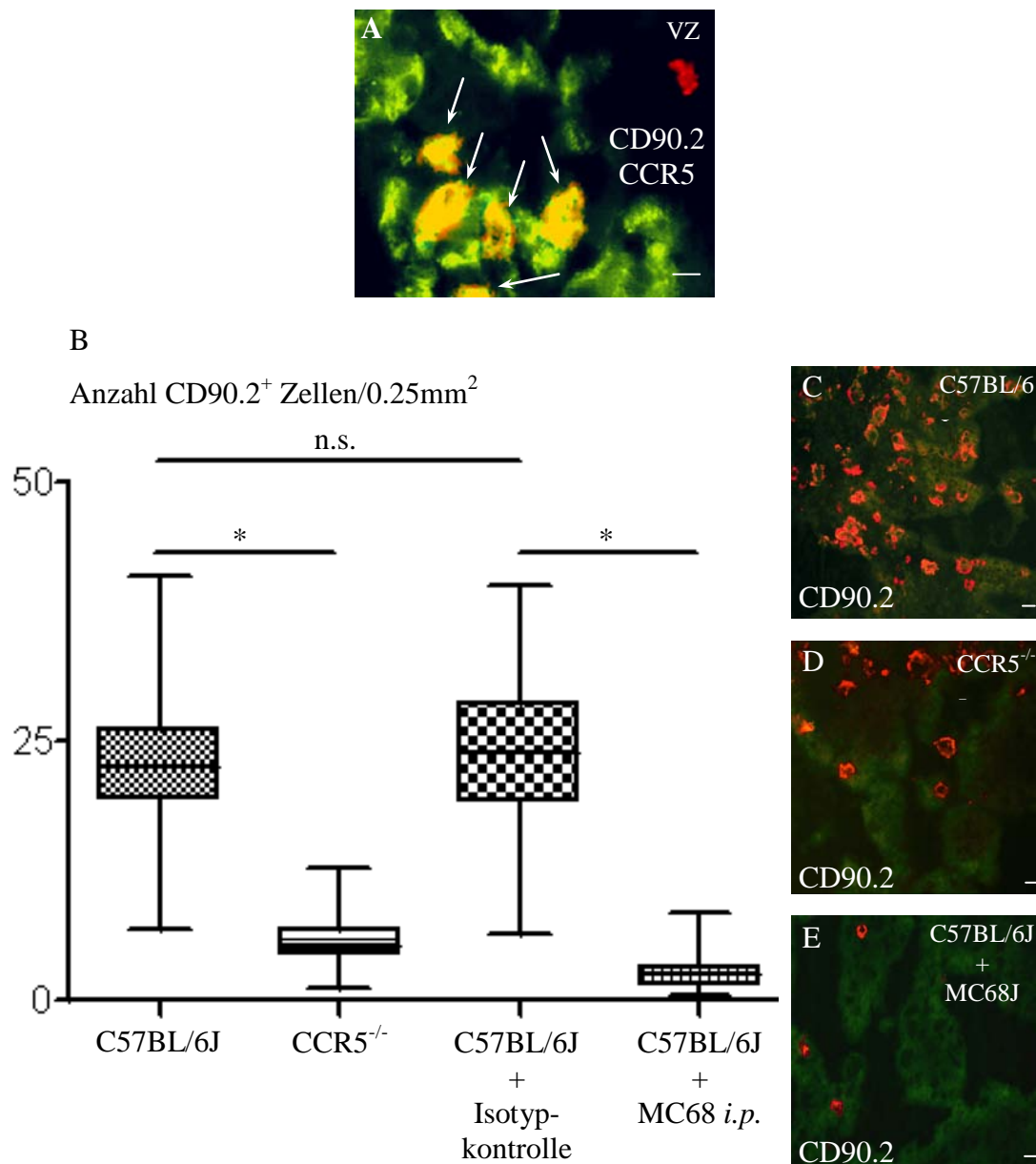


Abb.4.18: Reduzierte Anzahl von CD90.2⁺ uNK Zellen in die VZ am Tag 9 *p.c.* der Schwangerschaft

Am Tag 9 *p.c.* syngener C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaften konnten (A) CCR5⁺ Zellen (PE, rot) nachgewiesen werden, die für CD90.2 (FITC, grün) positiv waren (Doppelfärbung wird durch gelbe Färbung angezeigt; Pfeile). (B) Die Anzahl von CD90.2⁺ uNK Zellen innerhalb der VZ syngener C57BL/6J Schwangerschaften wurde mit der Anzahl der entsprechenden syngenen Schwangerschaften von CCR5^{-/-} Mäusen verglichen. Zusätzlich wurden fmE syngener C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaften, die entweder mit dem CCR5 blockierenden mAk MC68 oder mit einer Isotypkontrolle (Ratte IgG2b) injiziert wurden, auf die Anzahl CD90.2 exprimierender uNK Zellen hin untersucht. (C-D) Visualisiert wurden die dargestellten Ergebnisse durch Färbungen mit CD90.2 (PE, rot). Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Kontrollen sind mit * gekennzeichnet ($p < 0.05$). Kryostatschnitte des Tag 9 *p.c.* schwangeren Uterus von MC68 behandelten C57BL/6J und von C57BL/6J Mäusen wurden zur Darstellung der uNKZellen (rot) mit PE markiertem CD90.2 Ak gefärbt. Maßstabsbalken = 10 μ m.

4.5.4 CCR5⁺ und CCR7⁺ Zellen an den Tagen 8, 9, 11, 14 p.c. der murinen Schwangerschaft

Der Chemokinrezeptor CCR5 wurde in der vorliegenden Arbeit auf CD11c⁺ Zellen und uNK Zellen gefunden (4.5.1 und 4.5.3). Da Chemokinrezeptoren das Migrationsverhalten von Leukozyten beeinflussen, wurde der Chemokinrezeptor CCR7, welcher für die Migration von DC zum Lk beteiligt ist (Ohl *et al.*, 2004; Coates *et al.*, 2004), für Untersuchungen an CD11c⁺ Zellen innerhalb muriner fmE zusätzlich ausgewählt.

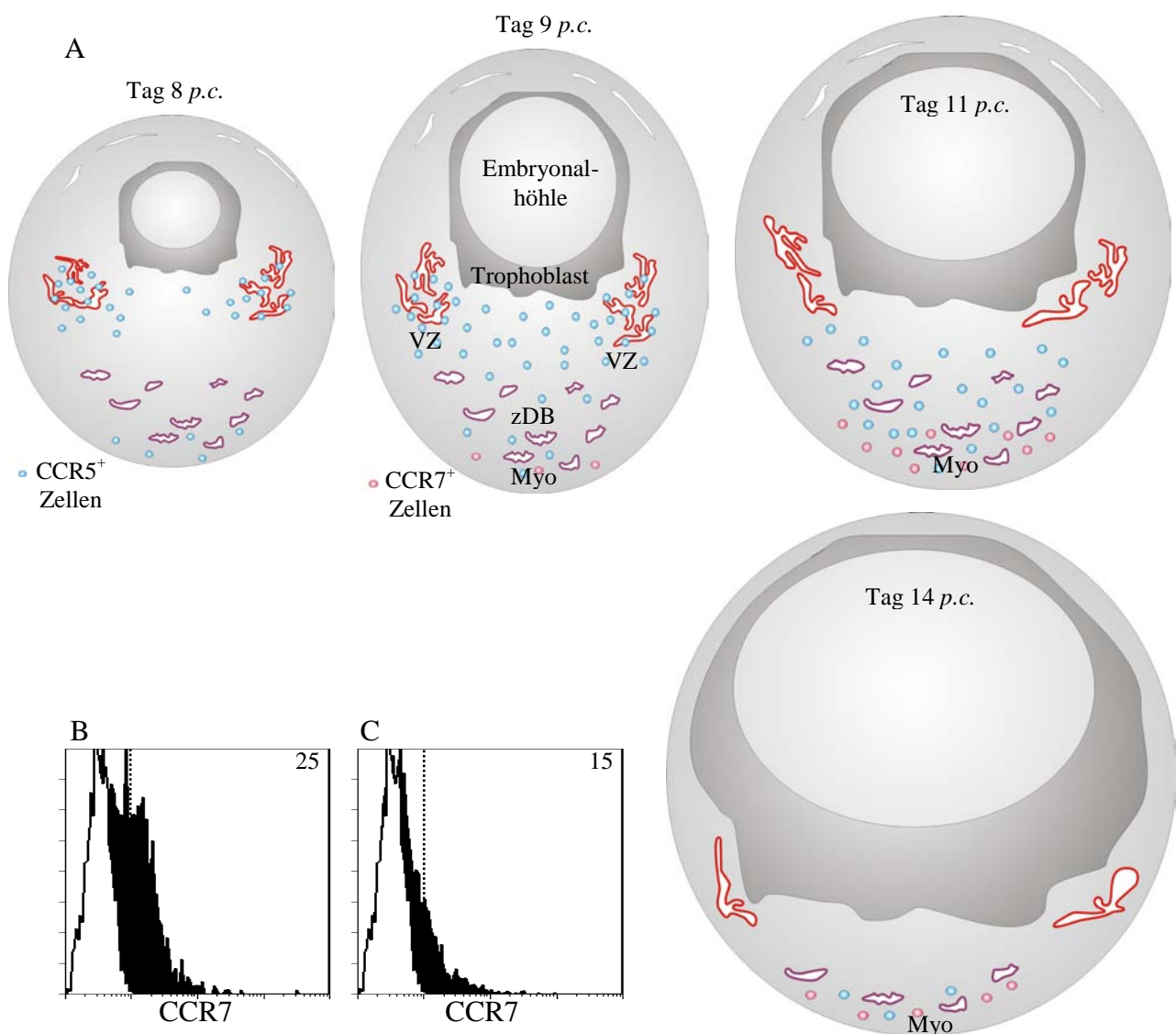


Abb.4.19: Lage der CCR5⁺ CD11c⁺ und CCR7⁺ CD11c⁺ Leukozyten am Tag 8, 9, 11, 14 p.c. und die Expression von CCR7 auf CD11c⁺ Zellen

(A) Dargestellt ist die Organisation des Uterus der Maus am Tag 8, 9, 11 und 14 p.c. der Schwangerschaft mit schematischer Darstellung der Lage der CCR5⁺ CD11c⁺ und CCR7⁺ CD11c⁺. (B) CD11c⁺ Zellen wurden mit Microbeads vom Tag 9 p.c. der Schwangerschaft von syngenem C57BL/6J Mäusen aus fmE isoliert und auf die Expression von CCR7 hin untersucht. (C) CD11c⁺ Zellen aus dem Lk wurden *gated* und auf die Expression von CCR7 analysiert. Die Nummern in den Histogrammen geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die Ergebnisse sind für zwei unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von zwei Mäusen gemeinsam behandelt wurden.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen an den Schwangerschaftstagen 9 und 11 *p.c.* konnte ermittelt werden, dass die CCR7⁺ Zellen im Bereich des Myo zusätzlich CD11c exprimieren (nicht gezeigt). Zudem konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, dass CCR7 zu 25% auf CD11c⁺ Zellen, die aus dem schwangeren Uterus am Tag 9 *p.c.* isoliert worden waren, exprimiert wurde (Abb.4.19B). Im Gegensatz dazu exprimierten die CD11c⁺ Zellen aus den iliakalen Lk nur zu 15% diesen Chemokinrezeptor (Abb.4.19C).

Durch Immunfluoreszenzfärbungen von fmE konnten syngene C57BL/6J x C57BL/6J und allogene Balb/c x C57BL/6J Schwangerschaften am Tag 8, 9, 11 und 14 *p.c.* auf die Vorhandensein von CCR5⁺ CD11c⁺ und CCR7⁺ CD11c⁺ DC untersucht werden (Abb.4.19A). Am Tag 8 *p.c.* der Schwangerschaft waren CCR5⁺ CD11c⁺ DC hauptsächlich im Bereich der VZ zu finden, z.T. aber auch in der Nähe des Myo. Einen Tag später erstreckte sich der Bereich der CCR5⁺ CD11c⁺ DC von der VZ in die zDB hinein und auch im Bereich des Myo zur zDB hin waren vermehrt CCR5⁺ CD11c⁺ DC zu finden. An diesem Schwangerschaftstag 9 *p.c.* konnten im Gegensatz zum Tag 8 *p.c.* CCR7⁺ CD11c⁺ DC im Bereich des Myo nachgewiesen werden. Im Vergleich nahm zum Schwangerschaftstag 11 *p.c.* die Anzahl dieser Zellen im Myo zu. CCR5⁺ CD11c⁺ DC wurden an diesem untersuchten Schwangerschaftstag vorwiegend in der zDB lokalisiert. Am Tag 14 *p.c.* der murinen Schwangerschaft konnte innerhalb der fmE nur noch sehr wenige CCR5⁺ CD11c⁺ und CCR7⁺ CD11c⁺ DC beobachtet werden. Detektiert werden konnten diese beiden Zellpopulationen nur noch in dem Myo. Bei allogenen Schwangerschaften war die Lage der beiden Zellpopulationen mit denen bei syngenem Schwangerschaften ähnlich. Der Unterschied zwischen syngenem und allogenen Schwangerschaften bestand darin, dass bei allogenen schwangeren fmE die beschriebene Lokalisation der CCR5⁺ CD11c⁺ und CCR7⁺ CD11c⁺ DC jeweils um ½ bis 1 Tag früher auftrat.

4.5.5 Reduzierte Wurfgröße bei CCR5^{-/-} Mäusen

Eine erfolgreiche Schwangerschaft ist mit dem Vorhandensein von verschiedenen Leukozytenpopulationen assoziiert. Dabei wird den DC und uNK Zellen eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der murinen Schwangerschaft zugeschrieben (Croy *et al.*, 1985; Blois *et al.*, 2004; Blois *et al.*, 2007).

Daher wurden die Wurfgrößen (weibliche und männliche Nachkommen) von C57BL/6J Mäusen mit denen von CCR5^{-/-}, ICAM-1^{-/-} und β_7 ^{-/-} Mäusen, die einen C57BL/6J Hintergrund haben, verglichen (Abb.4.20). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Nachkommen beim Vergleich von β_7 ^{-/-} sowie ICAM-1^{-/-} Mäusen zu C57BL/6J Mäusen nachgewiesen werden. Dagegen wurde eine signifikante Abnahme der Wurfgröße bei CCR5^{-/-} Mäusen (4.8 ± 1.9) im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen (7.4 ± 3.1) beobachtet werden, was die Bedeutsamkeit des Chemokinrezeptors bei der Leukozytenextravasation und deren Tragweite bei einer erfolgreichen Schwangerschaft unterstreicht. Innerhalb einer Versuchsgruppe (Mausstamm) war der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen nicht signifikant höher bzw. niedriger, weshalb für die Analyse die gesamte Wurfgröße zwischen den einzelnen Mausstämmen verglichen werden konnte.

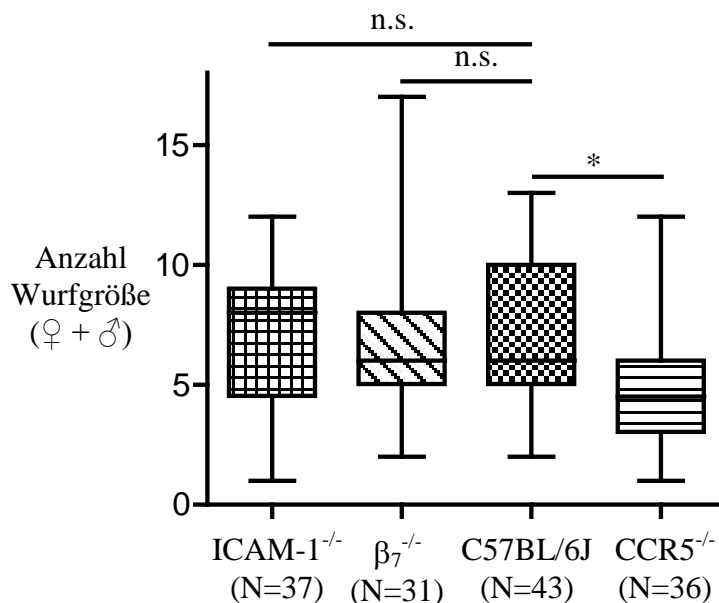


Abb.4.20: Wurfgröße C57BL/6J und Knock-out-Mäuse

Die Wurfgröße von C57BL/6J Mäusen wurde mit der Anzahl männlicher und weiblicher Nachkommen von ICAM-1^{-/-}, β_7 ^{-/-} und CCR5^{-/-}, die einen C57BL/6J Hintergrund besitzen, verglichen. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Kontrollen sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet.

4.6 Auswirkungen von Flt3L auf CD11c⁺ DC im schwangeren Uterus der Maus

4.6.1 Anteil der CD11c⁺ DC bei Flt3L behandelten und unbehandelten C57BL/6 Mäusen am Schwangerschaftstag 9 p.c.

Syngen schwangeren C57BL6/J Mäusen wurden Flt3L sezernierende Flt3L-B16F10 Zellen und zur Kontrolle B16F10 Zellen am Tag 1 p.c. der Schwangerschaft s.c. injiziert, um CD11c⁺ Zellen *in vivo* zu vermehren und ihre Einwanderung in den schwangeren Uterus der Maus zu untersuchen.

Die Flt3L-B16F10 Zellen wurden von Mach et al. über ihre Fähigkeit zur Bildung von DC in der Hämatopoiese beschrieben (Mach *et al.*, 2000). Um die Höhe der Flt3L-Sekretion von den am Schwangerschaftstag 1 p.c. injizierten Flt3L-B16F10 Zellen zu ermitteln, sollte die Konzentration von murinem Flt3L im Serum von unbehandelten und mit Flt3L-B16F10 Zellen s.c. injizierten schwangeren C57BL/6J Mäusen bestimmt werden. Am

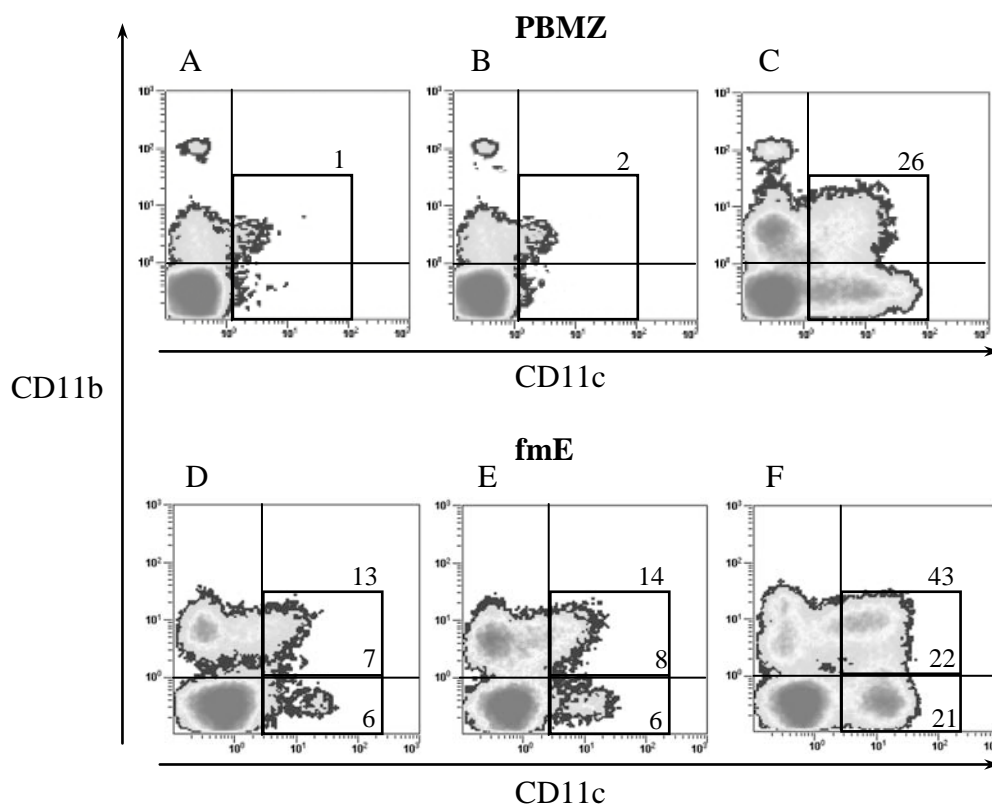
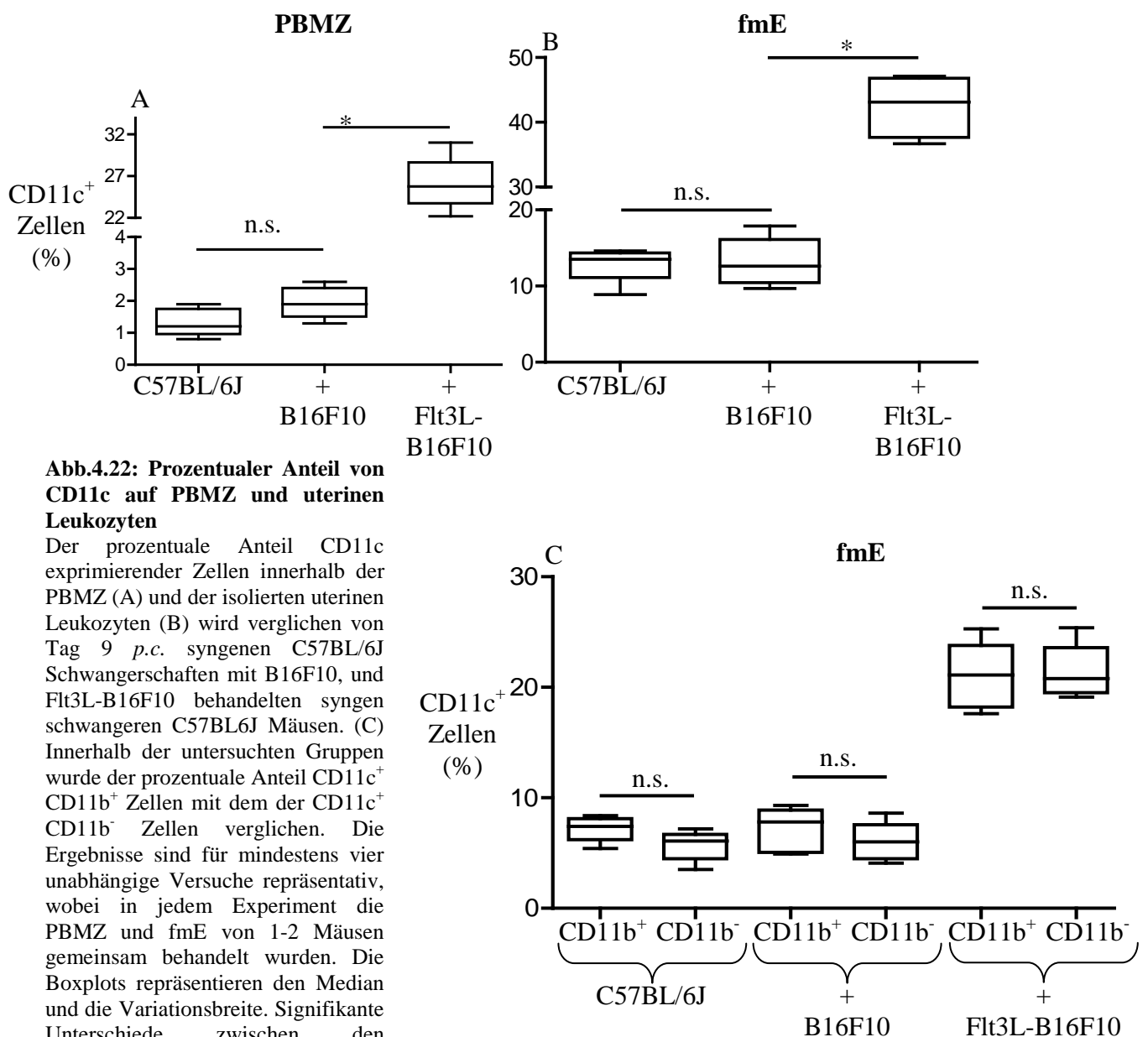


Abb.4.21: Dichteplots von DC aus PBMZ und fmE

Nach der Isolierung aus PBMZ oder fmE von Tag 9 p.c. syngen schwangeren C57BL/6J x C57BL/6J Mäusen, die unbehandelt (A, D), mit B16F10 Zellen (B, E) oder Flt3L-B16F10 behandelt (C, F) waren, wurden die 7AAD⁻ Leukozyten *gated* und auf die Expression von CD11c (x-Achse) sowie CD11b (y-Achse) hin untersucht. Die Nummern in den Dichteplots geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die gezeigten Ergebnisse sind für jeweils einen aus vier unabhängigen Versuchen repräsentativ, wobei in jedem Experiment die PBMZ oder fmE von 1-2 Mäusen gemeinsam behandelt wurden. Die Datenauswertung in Bezug auf die CD11c⁺ Zellen erfolgt in Abb.4.22 und 4.23.

Schwangerschaftstag 9 *p.c.* wurden zu diesem Zweck nicht nur die fmE, sondern auch Blut zur Gewinnung von Serum, den Mäusen entnommen (N=3). Zusätzlich sollten Zellkulturüberstände von Flt3L-B16F10 Zellen untersucht werden, um die innerhalb von 48h gebildete Menge an Flt3L durch 1×10^7 Zellen ermitteln zu können (N=15). Im ELISA konnte die Flt3L-Konzentration bei unbehandelten Mäusen von ca. 0.4ng/ml gemessen werden, wohingegen mit Flt3L-B16F10 behandelte Mäuse am Tag 9 *p.c.* der Schwangerschaft eine Konzentration in Höhe von 1.1 μ g/ml zeigten. Die innerhalb von Zellkulturüberständen gemessene Menge an Flt3L von den Flt3L-B16F10 Zellen lag bei etwa 0.2 μ g/ml Medium (N=15).

Die aus dem Blut und den fmE isolierten Leukozyten von Tag 9 *p.c.* schwangeren C57BL/6J Mäusen sowie von mit B16F10 oder Flt3L-B16F10 injizierten Tag 9 *p.c.*



schwangeren C57BL/6J Mäusen wurden durchflusszytometrisch auf die Anzahl von DC hin untersucht und für die Darstellung mit GraphPad Prism 4 ausgewertet. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in dem prozentualen Anteil von CD11c⁺ Zellen (Abb.4.21 und Abb.4.22). Bei den PBMZ erhöhte sich der Anteil der CD11c⁺ Zellen bei Flt3L-B16F10 behandelten Mäusen gegenüber den mit den B16F10 Zellen behandelten syngen schwangeren Mäusen sehr stark von 2% auf 26% (Abb.4.21.B, C und Abb.4.22A). Bei den B16F10 behandelten schwangeren Mäusen war nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der CD11c⁺ Zellen gegenüber unbehandelten schwangeren C57BL/6J Mäusen zu erkennen (Abb.4.21.A, B und Abb.4.22A). Innerhalb der aus den fmE isolierten Leukozyten war die Population der CD11c⁺ Zellen, wie bei den PBMZ, erhöht (Abb.4.21E, F und Abb.4.22B). Interessanterweise war aber der Anstieg des prozentualen Anteils der dezidualen DC von 14% auf 43% nicht so stark wie der, der bei den PBMZ beobachtet wurde. Bei den B16F10 behandelten Mäusen war kein Unterschied zu den unbehandelten C57BL/6 Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen zu erkennen (Abb.4.21D, E und Abb.4.22B).

Da unter 4.4.1 die DC in verschiedene Populationen unterteilt wurden, sollte die Auswirkung der DC Expansion auf die CD11c⁺ CD11b⁺ bzw. CD11c⁺ CD11b⁻ Subpopulationen bei den aus fmE isolierten Leukozyten überprüft werden. Verglichen

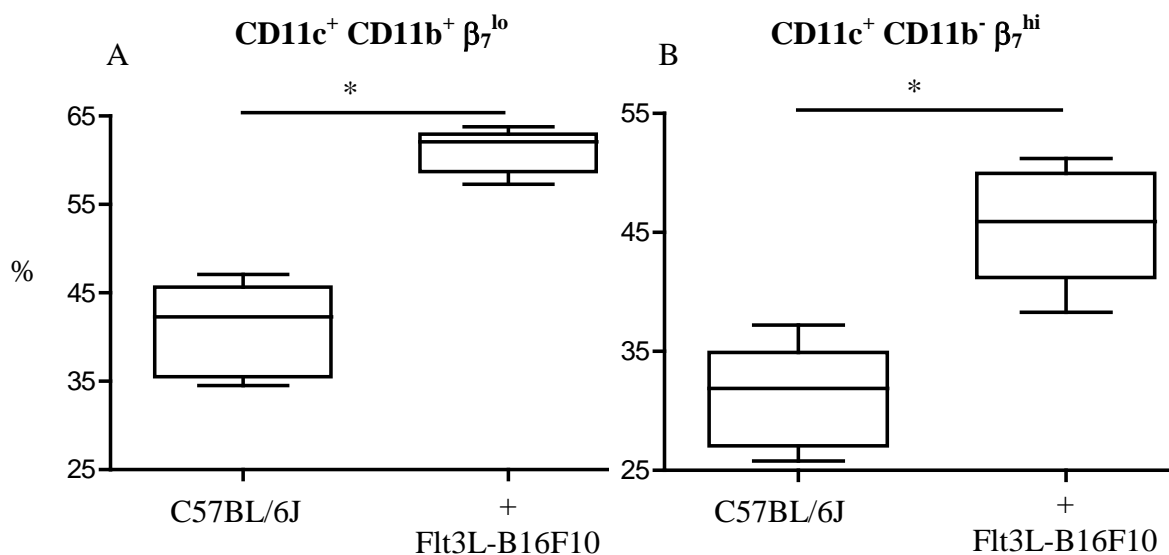


Abb.4.23: Prozentualer Anteil von β₇ Integrin auf uterinen DC

Gated wurden die unter Abb.4.21 dargestellten CD11c⁺ CD11b⁺ und CD11c⁺ CD11b⁻ DC von Tag 9 *p.c.* fmE syngener C57BL/6J Schwangerschaften unbehandelter (Abb.4.21D) und Flt3L-B16F10 behandelter Mäuse (Abb.4.21F) und auf ihre Expression von β₇ Integrin hin analysiert. Der prozentuale Anteil der β₇^{lo} Zellen innerhalb der CD11c⁺ CD11b⁺ DC (A) sowie der prozentuale Anteil der β₇^{hi} Zellen innerhalb der CD11c⁺ CD11b⁻ DC (A) wurde von unbehandelten und Flt3L-B16F10 Zellen injizierten Mäusen verglichen. Die Ergebnisse sind für mindestens vier unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von 1-2 Mäusen gemeinsam behandelt wurden. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen sind mit * (*p*<0.05) gekennzeichnet.

wurde das Verhältnis der beiden $CD11c^+ CD11b^+$ und $CD11c^+ CD11b^-$ Subpopulationen an DC bei schwangeren unbehandelten, mit B16F10 Zellen und mit Flt3L-B16F10 Zellen behandelten schwangeren C57BL/6J Mäusen. Trotz der Flt3L Expansion der $CD11c^+$ Zellen blieb das Verhältnis der beiden DC Subpopulationen ($CD11c^+ CD11b^+$ und $CD11c^+ CD11b^-$ DC) innerhalb der Testgruppen konstant (Abb.4.21D-F und Abb.4.22C). Da die Ergebnisse von unbehandelten und mit B16F10 Zellen behandelten Mäusen nicht signifikant voneinander abwichen, wurde bei den weiteren Untersuchungen auf die Injektion der B16F10 Zellen verzichtet.

Zur weiteren Analyse der DC sollte neben den Markern CD11c und CD11b auch die Expression des β_7 Integrins auf uterinen DC am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* untersucht werden. Hierzu wurden $CD11c^+ CD11b^+$ und $CD11c^+ CD11b^-$ DC *gated* (Abb.4.21D und F). Der prozentuale Anteil an β_7^{lo} wurde für die $CD11c^+ CD11b^+$ DC, der Anteil an β_7^{hi} Zellen für die $CD11c^+ CD11b^+$ DC ermittelt. Der prozentuale Anteil wurde zwischen unbehandelten syngenen Tag 9 *p.c.* C57BL/6J Schwangerschaften (Abb.21D) und mit Flt3L-B16F10 behandelten Zellen Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen (Abb.21F) verglichen. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 4 ausgewertet. Dadurch konnte festgestellt werden, dass die Zahl sowohl der $CD11c^+ CD11b^+ \beta_7^{lo}$ als auch der $CD11c^+ CD11b^- \beta_7^{hi}$ Subpopulationen bei Flt3L-B16F10 behandelten Mäusen signifikant gegenüber Kontrollschwangerschaften erhöht war (Abb.4.23). Während der prozentuale Anteil von $CD11c^+ CD11b^+ \beta_7^{lo}$ Zellen bei unbehandelten Mäusen bei 42% lag, erhöhte er sich innerhalb der fmE von Flt3L-B16F10

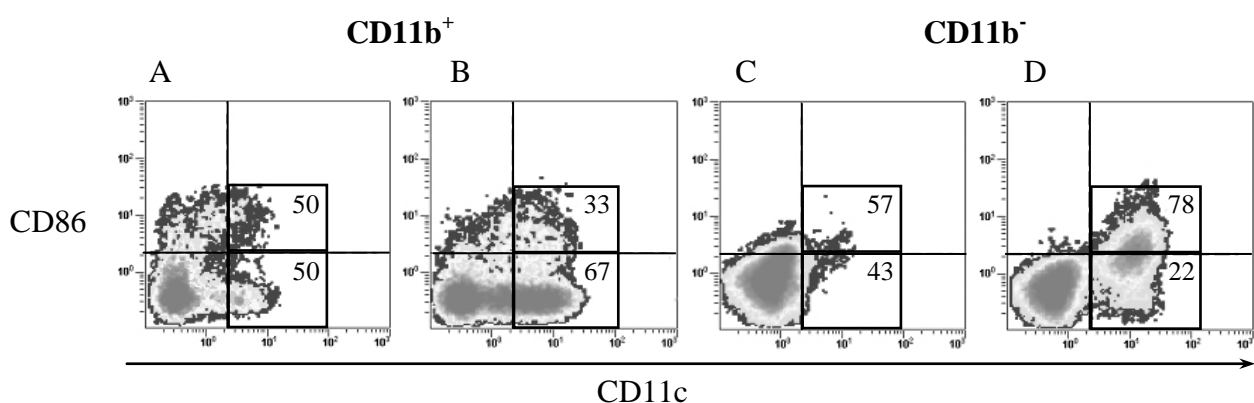


Abb.4.24: Expression von CD86 auf $CD11b^+$ und $CD11b^-$ DC

Nach der Isolierung der Leukozyten von Tag 9 *p.c.* fmE syngener C57BL/6J Schwangerschaften unbehandelter und Flt3L-B16F10 behandelter Mäuse wurden die 7AAD⁻ Zellen auf die Expression von $CD11b^+$ und $CD11b^-$ hin *gated*. Anschließend wurden in einem Dichteplot CD11c Färbungen (x-Achse) in Kombination mit CD86 Färbungen (y-Achse) von unbehandelten (A, C) und mit Flt3L-B16F10 behandelten (B, D) Mäusen in Abhängigkeit zu $CD11b^+$ (A, B) und $CD11b^-$ Zellen (C, D) dargestellt. Die Nummern in den Dichteplots geben die prozentuale Anzahl an positiven Zellen an. Die gezeigten Dichteplots sind für jeweils einen aus vier unabhängigen Versuchen repräsentativ. Die Datenauswertung in Bezug auf die CD86 Expression auf $CD11c^+ CD11b^+$ und $CD11c^+ CD11b^-$ Zellen ist in Abb.4.25 dargelegt.

behandelten Mäusen auf 62% (Abb.4.23A). Der Anteil der $CD11c^+ CD11b^- \beta_7^{hi}$ Zellen erhöhte sich auch in Folge der Flt3L Sezernierung der injizierten Flt3L-B16F10 Zellen von 32% auf 46% (Abb.4.23B).

Nach den vorherigen untersuchten Markern wurde zusätzlich die Expression von CD86 auf den $CD11c^+ CD11b^+$ und $CD11c^+ CD11b^-$ DC bei unbehandelten und Flt3L behandelten schwangeren C57BL/6J Mäusen untersucht. CD86 ist als kostimulatorischer Marker auf APZ bekannt (Greenfield *et al.*, 1998) und kann Aufschluss über den Reifungs- und Aktivierungszustand der isolierten uterinen DC bei unbehandelten und Flt3L-B16F10 behandelten Mäusen geben. Hierzu wurden zunächst die aus den fmE isolierten Leukozyten auf ihre Expression von CD11b hin untersucht. $CD11b^+$ und $CD11b^-$ Zellen wurden *gated* und in einem Dichteplot dargestellt (Abb.4.24). Anschließend konnte der prozentuale Anteil der CD86 Expression auf $CD11c^+ CD11b^+$ (Abb.4.24A und B) bzw. auf $CD11c^+ CD11b^-$ Zellen (Abb.4.24C und D) bei unbehandelten und mit Flt3L-B16F10 behandelten Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen bestimmt werden. Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten war erkennbar, dass $CD11c^+ CD11b^+$ und $CD11c^+ CD11b^-$ DC zu einem unterschiedlichen Prozentsatz den Oberflächenmarker CD86 exprimieren (Abb.4.24 und Abb.4.25). 50% der $CD11c^+ CD11b^+$ DC aus fmE unbehandelter C57BL/6J Mäuse sind zusätzlich positiv für CD86 (Abb.4.24A und Abb.4.25A). Der prozentuale Anteil dieser Population reduziert sich im Vergleich zu den Kontrollschwangerschaften bei Flt3L-B16F10 behandelten

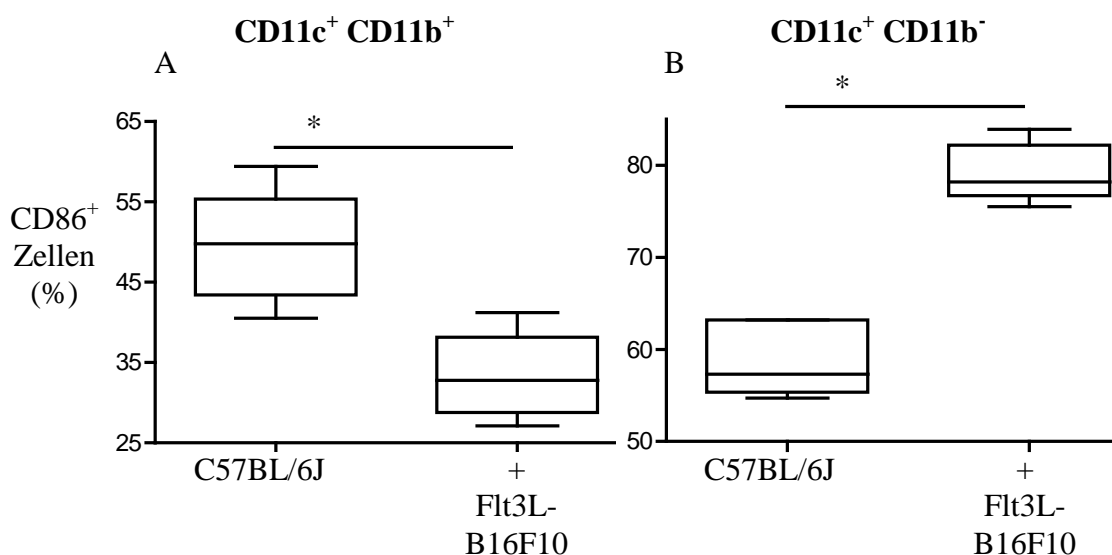


Abb.4.25: Prozentualer Anteil CD86⁺ uteriner DC Populationen

Der prozentuale Anteil CD86 exprimierender $CD11c^+ CD11b^+$ (A) und $CD11c^+ CD11b^-$ DC (B) von Tag 9 *p.c.* fmE syngener C57BL/6J Schwangerschaften unbehandelter und Flt3L-B16F10 behandelter Mäuse ist dargestellt. Die Ergebnisse sind für mindestens vier unabhängige Versuche repräsentativ, wobei in jedem Experiment die fmE von 1-2 Mäusen gemeinsam behandelt wurden. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet.

Mäuse auf 33% (Abb.4.24B und Abb.4.25A). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steigt der Anteil der CD86⁺ Zellen innerhalb der CD11c⁺ CD11b⁻ DC von 57% bei unbehandelten Mäusen auf 78% bei Flt3L-B16F10 behandelten syngenem Schwangerschaften (Abb.4.24C, D und Abb.4.25B).

4.6.2 Immunhistologische Analyse der dezidualen CD11c⁺ DC bei Flt3L-B16F10 behandelten Tag 9 p.c. schwangeren C57BL/6 Mäusen

Die mit GraphPad Prism 4 ausgewerteten durchflusszytometrischen Analysen unter 4.6.1 stellen ein Gesamtbild von dem prozentualen Anteil der DC am Schwangerschaftstag 9 p.c. dar. Um die Auswirkungen der Behandlung der Mäuse mit Flt3L-B16F10 Zellen lokal zu untersuchen, sollte die Anzahl der CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von diesen Mäusen mit denen unbehandelter C67BL/6J Mäuse verglichen werden. Kryostatschnitte der fmE wurden mit dem anti-CD11c mAk HL3 inkubiert und die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von Flt3L-B16F10 behandelten schwangeren Mäusen beträgt 22.1 ± 4.7 Zellen/0.25mm² im Vergleich zu der Anzahl innerhalb der VZ von fmE unbehandelter C57BL/6J Mäusen, die bei 7.0 ± 2.1 Zellen/0.25mm² lag (Abb.4.24). Somit war eine Erhöhung um das über 3fache an CD11c⁺ Zellen innerhalb dieses definierten Bereiches gegeben.

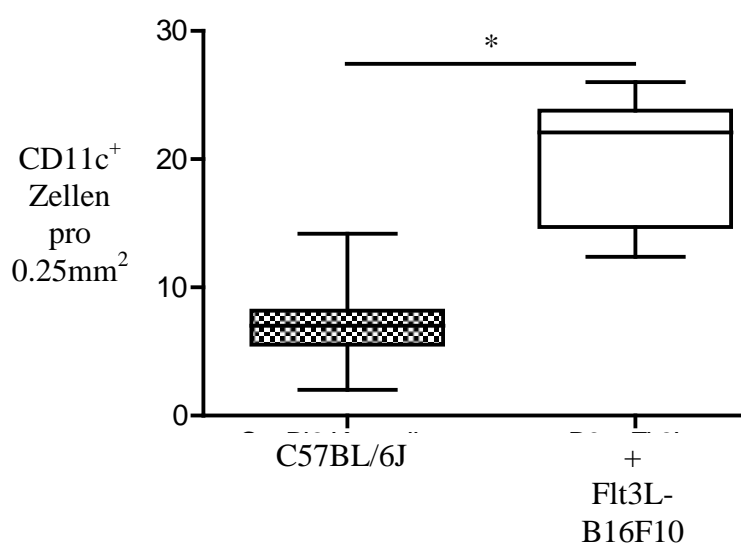


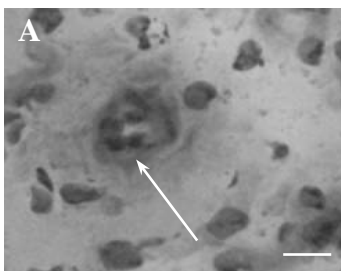
Abb.4.24: Anzahl von CD11c⁺ Zellen in der VZ am Tag 9 p.c. der Schwangerschaft

Die Anzahl von CD11c⁺ Zellen innerhalb der VZ von syngenem C57BL/6J x C57BL/6J Tag 9 p.c. schwangeren Mäusen wurden von unbehandelten und Flt3L-B16F10 behandelten Mäusen miteinander verglichen. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Kontrollen sind mit * (p<0.05) gekennzeichnet.

4.6.3 Histologische Veränderungen der DB bei Flt3L-B16F10 behandelten Tag 9 *p.c.* schwangeren C57BL/6 Mäusen

FmE von Mäusen mit einer erhöhten Rekrutierung von Leukozyten durch die Behandlung mit Flt3L-B16F10 Zellen zeigten zudem histologische Veränderungen. Von den beiden Versuchsgruppen (C57BL/6J und C57BL/6J + Flt3L-B16F10 Zellen) wurden Diff-Quick-Färbungen von Kryostatschnitten des Tag 9 schwangeren Uterus angefertigt. Danach wurde die Muskulatur maternaler Blutgefäße innerhalb der Dezidua untersucht. Es wurde eine verdickte Muskulatur der maternalen Blutgefäße im Myo bei Mäusen, die mit Flt3L-B16F10 Zellen behandelt wurden, beobachtet (Abb.4.25A, Pfeil). Entsprechende syngene Kontrollen zeigten diese Verdickung der Muskulatur dezidualer Blutgefäße nicht (Abb.4.25B, Pfeil).

C57BL/6J + Flt3L-B16F10



C57BL/6J

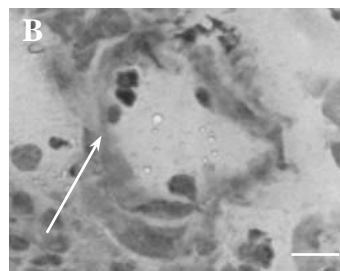


Abb.4.25: Histologische Veränderung bei Flt3L-B16F10 behandelten C57BL/6J Mäusen
Dargestellt sind Ausschnitte des mit Diff-Quick gefärbten Gewebes der MG. Verglichen wurden die fmE von Flt3L-B16F10 behandelten C57BL/6J Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen mit syngenen Kontrollmäusen. Maßstabsbalken = 20µm.

4.6.4 Erhöhte Anzahl von CD11c⁺ DC innerhalb der iliakalen Lk bei Flt3L-B16F10 behandelten C57BL/6 Mäusen

Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass es während der murinen Schwangerschaft Veränderungen innerhalb der den Uterus drainierenden Lk gibt, weshalb dort eine Vermittlung der unterdrückten Immunantwort gegenüber dem Fetus vermutet wird (Ansell *et al.*, 1978; Aluvihare *et al.*, 2004). Daher sollte näher untersucht werden, welchen Einfluss Flt3L-B16F10 behandelte syngene C57BL/6J Tag 9 *p.c.* schwangere Mäuse auf die Population der DC im iliakalen Lk haben.

Die Auswertung der durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe von GraphPad Prism 4 von isolierten Zellen aus iliakalen Lk lieferten ergab, dass sich der Anteil beim Vergleich der CD11c⁺ CD11b⁺ Subpopulation innerhalb der Lk bei Flt3L-B16F10 Zellen behandelten C57/BL6J Mäusen gegenüber Kontrollen von 1% auf 7% erhöhte (Abb.4.26 und Abb.4.27C, D). Der Anteil der CD11c⁺ CD11b⁻ Zellen bei Flt3L-B16F10 behandelten

Mäusen gegenüber den mit den B16F10 Zellen behandelten syngen schwangeren Mäusen stieg um mehr als das 10fache von 2% auf 25% an (Abb.4.26 und Abb.4.27A, B).

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Lk gegenüber den Kontrollschwangerschaften stark vergrößert waren (Abb.4.27B, D).

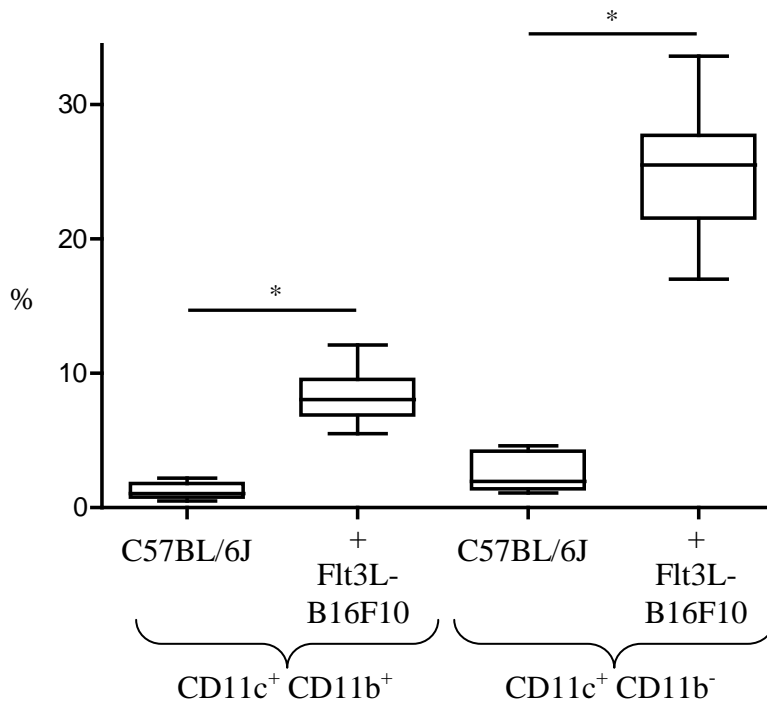


Abb.4.26: Prozentualer Anteil CD11c⁺ und CD11c⁺CD11b⁺ DC
Dargestellt ist der prozentuale Anteil an CD11c⁺ CD11b⁺ und CD11c⁺ CD11b⁻ DC von iliakalen Lk von Tag 9 *p.c.* syngen C57BL/6J Schwangerschaften unbehälter und Flt3L-B16F10 behälter Mäuse. Die Ergebnisse sind für mindestens zehn unabhängige Versuche repräsentativ. Die Boxplots repräsentieren den Median und die Variationsbreite. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet.

C57BL/6J, Tag 9 *p.c.* C57BL/6J, Tag 9 *p.c.*
+
Flt3L-B16F10

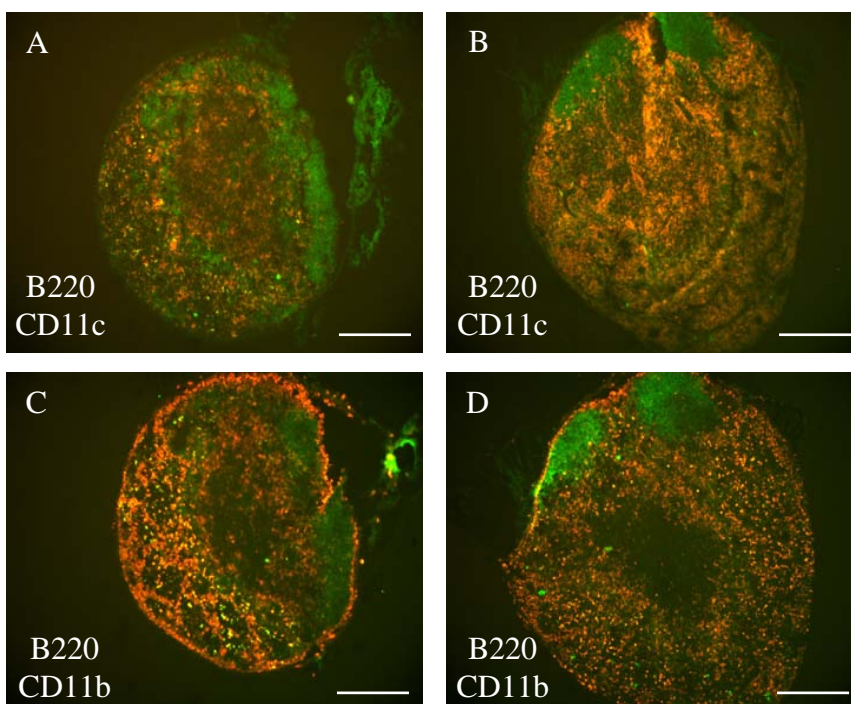


Abb.4.27: Iliakaler Lk (lumbarer Lk) bei unbehälterten und Flt3L-B16F10 behälterten Mäusen

(A-D) Der lumbare Lk, zu den iliakalen Lk gehörend, wurde am Tag 9 *p.c.* der C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaft mit dem von schwangeren Mäusen, die mit Flt3L-B16F10 Zellen behälter wurden, des gleichen Schwangerschaftstages verglichen. (A, B) CD11c⁺ Zellen wurden mit einem PE markierten Ak (rot) und B220⁺ Zellen mit einem FITC markierten Ak (grün) detektiert. (C, D) CD11b⁺ Zellen wurden mit einem PE markierten Ak (rot) und B220⁺ Zellen mit einem FITC markierten Ak (grün) detektiert. Maßstabsbalken = 0.5mm.

4.6.5 Auswirkungen einer erhöhten Anzahl an DC im Uterus der Maus für den Schwangerschaftsverlauf

Da im Verlauf der Untersuchungen bei Tag 9 *p.c.* schwangeren Mäusen beobachtet wurde, dass die fmE von Flt3L-B16F10 behandelten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J x C57BL/6J Kontrollen oftmals reduziert und stärker durchblutet waren (nicht gezeigt), sollten die *in vivo* Auswirkungen der erhöhten DC Zahlen im Uterus der Maus für die Schwangerschaft näher untersucht werden.

Hierzu wurde die Wurfgröße (männlich und weiblich zusammengefasst) von C57BL/6J x C57BL/6J (N=40), von C57BL/6J x C57BL/6J + B16F10 Zellen (N=15) und C57BL/6J x C57BL/6J + Flt3L-B16F10 Zellen (N=15) schwangeren Mäusen miteinander verglichen (Abb.4.28). Von 40 C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaften, die am Tag 1 *p.c.* positiv für einen vaginalen Plug waren (3.2.3.2), gab es 28 erfolgte Würfe am Tag 20-21 *p.c.* Dies entsprach einer Erfolgsquote von 70%. Bei der Untersuchung der 15 auf einen vaginalen Plug hin untersuchten und positiv getesteten Mäuse, die am Tag 1 *p.c.* mit den B16F10 Zellen behandelt worden waren, wurde keine signifikante Reduzierung der Wurfgröße am Tag 20-21 *p.c.* beobachtet. Dabei fiel die Erfolgsquote mit 60% etwas geringer aus als bei den unbehandelten C57BL/6J Mäusen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte bei Mäusen, die für einen vaginalen Plug positiv getestet worden waren und am Tag 1 *p.c.* mit den Flt3L-B16F10 Zellen behandelt wurden, keine erfolgreichen Würfe festgestellt werden. Die in der Abb.4.28 dargestellte Anzahl der Wurfgröße für mit Flt3L-B16F10 Zellen behandelte Mäuse zeigt die Anzahl von intrauterinen und nicht mehr vitalen Nachkommen. Die Erhebungen wurden dabei am Tag 21-22 *p.c.* durchgeführt, also 1-2 Tage nach dem vom Mausstamm abhängigen, durchschnittlichen Geburtstermines (Theiler, 1989; Cross *et al.*, 1994).

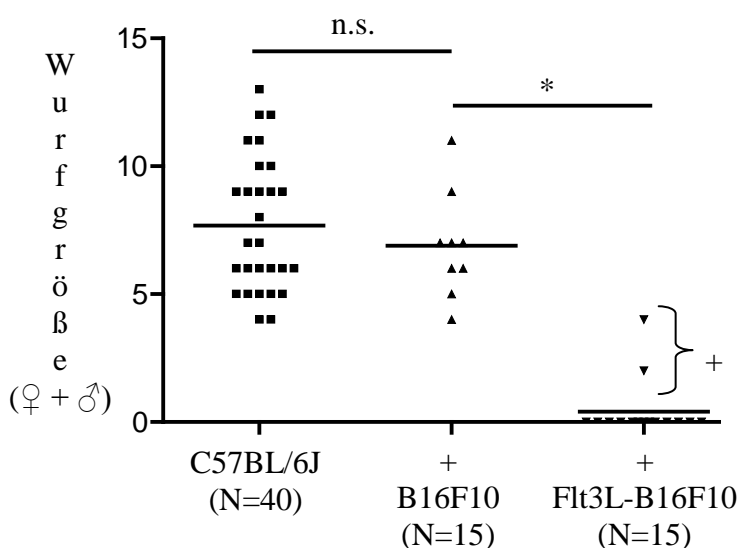


Abb.4.28: Wurfgröße Flt3L-B16F10 behandelte Mäuse

Die Wurfgröße von C57BL/6J Mäusen wurde mit der Anzahl männlicher und weiblicher Nachkommen von C57BL/6J Mäusen, die mit der Zelllinie B16F10 oder Flt3L-B16F10 am Tag 1 *p.c.* nach einem positiven Befund eines vaginalen Plugs behandelt wurden, verglichen. In die Untersuchung bei Flt3L-B16F10 behandelten Mäusen, wurde die Anzahl der Mäuse verwendet, die am Tag 1 *p.c.* für einen vaginalen Plug positiv waren. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen sind mit * ($p < 0.05$) gekennzeichnet. [+ = Diese Daten stammen von intrauterinen Nachkommen, die am Tag 21-22 *p.c.* erhoben wurden.]

5 Diskussion

Während der humanen und murinen Schwangerschaft finden im schwangeren Uterus sehr dynamische Umbauprozesse statt. Dadurch wird die Schwangerschaft als ein multifaktorieller Prozess betrachtet, bei der die Invasion des Trophoblasten in die maternale Dezidua zusammen mit der Versorgung des Fötus in Einklang gebracht wird. An den Umstrukturierungsprozessen des Gewebes und den immunregulierenden Funktionen sind verschiedene Leukozytenpopulationen beteiligt (Hunt *et al.*, 1984; King and Loke, 1991; Arck *et al.*, 1997; Croy *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1999; Kammerer *et al.*, 2000; Viganò *et al.*, 2003). Für die Extravasation von Leukozyten in die Dezidua basalis des schwangeren Uterus sowie die Migration innerhalb des schwangeren Uterus werden vaskuläre Adhäsionsmoleküle und Zytokine, darunter im Besonderen auch die Chemokine, verantwortlich gemacht (Red-Horse *et al.*, 2001; Drake *et al.*, 2002; Fernekorn *et al.*, 2004; Bertoja *et al.*, 2005). Die Regulierung der Leukozytenextravasation in die Dezidua basalis hat eine große Bedeutung für eine erfolgreiche Schwangerschaft. Eine übermäßige Rekrutierung von beispielsweise alloreaktiven Lymphozyten könnte eine Abstoßungsreaktion hervorrufen (Cox and Ford, 1984).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der exprimierten, vaskulären Zelladhäsionsmoleküle sowie die Bedeutung von Chemokinrezeptoren auf die Leukozytenpopulationen zu untersuchen. Dabei sollten auch die einwandernden Leukozyten phänotypisch charakterisiert werden. Hauptaspekte der Untersuchungen konzentrierten sich auf den kritischen Zeitpunkt der beginnenden Plazentaentwicklung am Tag 9 *p.c.* der murinen Schwangerschaft (Croy *et al.*, 1982; Kiger *et al.*, 1985; Clark *et al.*, 1987).

Der schwangere Uterus der Maus lässt sich am Tag 9 *p.c.* in definierte Zonen unterteilen, in die Dezidua capsularis und die Dezidua basalis. Die Dezidua basalis lässt sich weiter in die vaskuläre Zone, die zentrale Dezidua basalis und das Myometrium unterteilen. Die vaskuläre Zone ist nahe dem Trophoblasten lokalisiert und ist durch stark dilatierte maternale Blutgefäße charakterisiert. Venöse Kanäle und Spiralarterien zeichnen die zentrale Dezidua basalis aus. Daran schließt sich das Myometrium an. Im Verlauf der Schwangerschaft kennzeichnen starke Umstrukturierungsmaßnahmen die Dezidua basalis, da die Plazenta in den Bereich der Dezidua basalis einwandert und maternales Gewebe im

Verlauf der Schwangerschaft ersetzt. Demgegenüber ist die Dezidua capsularis nicht an der Plazentaentwicklung beteiligt.

Innerhalb der Dezidua basalis und dem Myometrium existieren spezialisierte Leukozyten-Subpopulationen, die miteinander in enger Beziehung stehen und immunregulierende Funktionen ausüben, aber auch an der Tolerierung des semiallogenen Fetus beteiligt sind (Hunt *et al.*, 1984; Croy *et al.*, 1997; King, 2000; Croy *et al.*, 2002; Kammerer, 2005; Miranda *et al.*, 2006). An der E-Selektin⁺ Grenzschicht von Trophoblast und Dezidua basalis wurden überwiegend Granulozyten gefunden (Kruse *et al.*, 1999). Diese Zellen besitzen durch den erhöhten Progesteron-/Östrogenspiegel während der Schwangerschaft eine höhere Lebensdauer und phagozytieren die Zellreste, die durch den enzymatischen Abbau des dezidualen Gewebes während der Invasion des Trophoblasten entstehen (Parr *et al.*, 1990; Molloy *et al.*, 2003).

Die Gefäße der zentralen Dezidua basalis exprimieren VCAM-1, um die herum CD90.2⁺ DBA⁺ uterine NK (uNK) Zellen lokalisiert sind. Es wird diskutiert, dass Vorläufer dieser Zellen unter hormonellem Einfluß aus primären und sekundären lymphatischen Organen kurz nach der Implantation der Blastozyste in den schwangeren Uterus einwandern. Dort reifen und proliferieren die uNK Zellen bis zur Mitte der Schwangerschaft im Mikromilieu der Dezidua basalis und erreichen eine maximale Akkumulation. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nimmt dagegen ihre Zahl deutlich ab (Chantakru *et al.*, 2002).

Die maternalen Blutgefäße der vaskulären Zone exprimieren eine ungewöhnliche Kombination von vaskulärem P-Selektin und MAdCAM-1 (Kruse *et al.*, 1999). In diesen Gefäßen und im Gewebe der vaskulären Zone kommen zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten, Monozyten und wenige Granulozyten vor. Die Rolle der vaskulären Zelladhäsionsmoleküle P-Selektin und MAdCAM-1 bei der Extravasation der $\alpha_4\beta_7$ ⁺ Zellen konnte durch *in vivo* Inhibitionsversuche mit mAk gegen MAdCAM-1, P-Selektin sowie gegen $\alpha_4\beta_7$ Integrin und Experimenten mit β_7 Integrin und P-Selektin defizienten Mäusen gezeigt werden. Der Effekt der *in vivo* Inhibition auf die Anzahl $\alpha_4\beta_7$ ⁺ Zellen in der vaskulären Zone wurde am Tag 11 *p.c.* der Schwangerschaft ausgewertet. Die mAk gegen $\alpha_4\beta_7$ Integrin oder MAdCAM-1 blockierten die Extravasation von CD11b⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ Zellen nahezu komplett. Eine vergleichbare Blockierung dieser Zellen konnte bei den Untersuchungen an feto/maternalen Einheiten von P-Selektin^{-/-} Mäusen, die mit dem mAk gegen MAdCAM-1

behandelt wurden, beobachtet werden. Bei der Extravasation von Leukozyten, die in aufeinanderfolgenden Schritten abläuft, erfolgt der initiale Kontakt über Selektine und die rollende Adhäsion über α_4 Integrine, während eine aktivierungsabhängige Adhäsion vorwiegend über β_2 Integrine vermittelt wird, die ihren Kontakt über ICAM-1 und -2 herstellen (Butcher *et al.*, 1999; von Andrian and Mackay, 2000). Liganden der α_4 Integrine sind vaskuläres MAdCAM-1 ($\alpha_4\beta_7$ Integrin) bzw. VCAM-1 ($\alpha_4\beta_1$ und aktiviertes $\alpha_4\beta_7$ Integrin). Bei diesen Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass die Extravasation von $CD11b^- \alpha_4\beta_7^+$ Zellen nicht durch die Blockierung von MAdCAM-1 beeinflusst werden konnte (Ferne Korn *et al.*, 2004; Ferne Korn *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die $CD11b^- \alpha_4\beta_7^+$ Leukozyten an VCAM-1 binden, das ab Schwangerschaftstag 10 *p.c.* schwach in der vaskulären Zone exprimiert wird, dabei aber eine höhere Aktivierung als das $\alpha_4\beta_1$ Integrin benötigen (Berlin *et al.*, 1993) und daher nicht von der Blockierung betroffen ist. Die Extravasation der Granulozyten und Monozyten erfolgt hauptsächlich über P-Selektin (Ferne Korn *et al.*, 2007).

Die hochspezifische Expression von Adhäsionsmolekülen erlauben spezialisierten Leukozytenpopulationen wie uNK Zellen, Zellen der Monozyten/M ϕ -Linie und $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten in den Uterus einzuwandern, wo sie die Entwicklung und die Invasion des Trophoblasten unterstützen und die lokale Immunreaktionen regulieren (Croy *et al.*, 2003; Lidstrom *et al.*, 2003; Piccinni, 2003; Ferne Korn *et al.*, 2004; Ferne Korn *et al.*, 2007; Fest *et al.*, 2007).

Die Inhibition der Rekrutierung der $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten resultierte überraschenderweise in einer stark reduzierten Entwicklung der uNK Zellen und in histologischen Veränderungen im maternalen Gewebe. Deswegen sollte eine Charakterisierung der ungewöhnlichen $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen mit Hilfe mAk in der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen aus feto/maternalen Einheiten über den anti- β_7 mAk M293 isoliert. Untersuchungen an β_7 Integrin⁺ Leukozyten konnten zeigen, dass diese Zellen hohe Level an CD11c exprimieren, weshalb eine zusätzliche Isolierung über anti-CD11c *Microbeads* erfolgte. CD11c stellt einen typischen Oberflächenmarker für DC bei der Maus dar (Metlay *et al.*, 1990; Huleatt and Lefrancois, 1995). DC wurden kürzlich im dezidualen Gewebe von Mäusen an verschiedenen Schwangerschaftstagen und in der Dezidua im ersten Drittel der humanen

Schwangerschaft beschrieben (Gardner and Moffett, 2003; Blois *et al.*, 2004b; Kammerer, 2005; Zarnani *et al.*, 2007). Doch es wurde zuvor noch nicht die Expression des β_7 Integrins auf DC Subpopulationen, die mit hochspezifischen *Homing* Mechanismen im schwangeren Uterus der Maus assoziiert sind, gezeigt. Daher sollte eine detailliertere Charakterisierung über die Oberflächenmarker durchgeführt werden, um den Phänotyp der β_7 Integrin⁺ und CD11c⁺ Leukozyten bestimmen zu können. Durchflusszytometrische Untersuchungen von isolierten β_7 Integrin⁺ oder CD11c⁺ dezidualen Leukozyten machten deutlich, dass die DC aufgrund ihrer Eigenschaften hinsichtlich der Expression von β_7 Integrin und CD11b in drei Subpopulationen eingeteilt werden können: CD11c⁺ CD11b^{med} β_7^{lo} , CD11c⁺ CD11b⁻ β_7^{hi} und CD11c⁺ CD11b^{lo} β_7^- DC. Alle Subpopulationen exprimierten das α_4 Integrin, waren aber für kostimulatorische Moleküle wie CD80 oder CD83 negativ. Ebenso konnten keine CD8 α Zellen nachgewiesen werden und die Expression von CD45R war mäßig bis gering.

In die Extravasation und/oder Migration von Leukozyten in die Gewebe sind vor allem die β_7 ($\alpha_4\beta_7$ und $\alpha_E\beta_7$) und β_1 ($\alpha_4\beta_1$) Integrine involviert (Kilshaw and Murrant, 1991; Hamann *et al.*, 1994; Butcher and Picker, 1996). Daher wurde die Expression von β_1 und α_E Integrin Untereinheiten auf den dezidualen DC Subpopulationen der Maus am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* untersucht. Klar abgrenzbare Subpopulationen von DC ähnlichen Zellen an der feto/maternalen Grenzschicht ließen sich durch die unterschiedliche Expression an $\alpha_4\beta_7$ und $\alpha_E\beta_7$ definieren, wobei das β_1 Integrin allgemein auf den DC Populationen zu finden war. Darüber hinaus befanden sich die verschiedenen DC Subpopulationen in unterschiedlichen Mikrodomänen innerhalb des Gewebes der Dezidua basalis am Tag 9 *p.c.* der Schwangerschaft. Verschiedene Bereiche mit je vorwiegend einer dominierenden Subpopulation an DC, die über die unterschiedliche Expression der Integrine definiert werden konnten, lassen verschiedene Funktionen der jeweiligen Population vermuten, wie es auch innerhalb der Lunge von Mäusen an α_E^+ DC gegenüber α_E^- DC gezeigt werden konnte (Sung *et al.*, 2006). CD11c⁺ CD11b^{med} DC, die das $\alpha_4\beta_7$ aber nicht das α_E Integrin exprimieren, sind vorwiegend in den Gefäßen und dem Gewebe der vaskulären Zone zu finden und repräsentieren dort die Hauptpopulation. In diesem Bereich sind auch CD11c⁺ CD11b⁻ $\alpha_4\beta_7^+$ DC zu finden, aber in einer viel geringeren Anzahl.

Die zentrale Dezidua basalis besteht vorwiegend aus zwei DC Subpopulationen: CD11c⁺ CD11b^{lo} β_7^- und in einem etwas geringem Anteil CD11c⁺ CD11b⁻ Zellen, welche der

dominierenden Zellpopulation im Myometrium phänotypisch ähnlich ist. Die letztere ist durch die Expression von α_4 Integrin und hohe Expressionslevel von α_E und β_7 Integrin charakterisierbar. Es wird angenommen, dass in der Anwesenheit von α_4 Integrin bei gleichzeitig hoher Expression von α_E Integrin die β_7 Untereinheit vorzugsweise mit der α_E Untereinheit assoziiert um das Heterodimer $\alpha_E\beta_7$ Integrin zu bilden (Lim *et al.*, 1998). Beide Mikrodomänen (zentrale Dezidua basalis und Myometrium) enthalten über die genannten Populationen hinaus auch eine geringere Anzahl an $CD11c^+ CD11b^- \alpha_E^- \beta_7^+$ DC. Das Heterodimer $\alpha_E\beta_7$ Integrin exprimierende DC wurden bisher nicht im dezidualen Gewebe gefunden, sondern hauptsächlich in epitheliale Gewebe oder deren drainierenden Lymphknoten (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006). Darüber hinaus gibt es auch keinen Hinweis darauf, dass das Heterodimer $\alpha_E\beta_7$ Integrin in die Extravasation von Leukozyten involviert ist. Möglich ist, dass $CD11c^+ CD11b^- \alpha_4\beta_7^{hi} \alpha_E^-$ DC, die zu einem geringeren Anteil in der vaskulären Zone zu finden sind, über vaskuläres P-Selektin und noch nicht nachgewiesene Adhäsionsmoleküle rekrutiert werden (Ferne Korn *et al.*, 2004; Ferne Korn *et al.*, 2007). Anschließend könnten diese Zellen dann über die zentrale Dezidua basalis zum DC und M ϕ reichen Myometrium migrieren. Die Expression von $\alpha_E\beta_7$ Integrin ist abhängig vom TGF β (Kilshaw and Murant, 1990; Austrup *et al.*, 1995), dass in hohen Konzentrationen im murinen dezidualen Gewebe nachgewiesen wurde (Cheng *et al.*, 1993). Es ist denkbar, dass diese Zellen $\alpha_E\beta_7$ Integrin als Folge ihrer Migration von der vaskulären Zone zum Myometrium hochregulieren. Die Funktion der $\alpha_E\beta_7^{hi}$ DC an der feto/maternalen Grenzschicht bleibt aber weiterhin offen. In anderen Geweben können die $\alpha_E\beta_7^+$ DC über spezifische Oberflächenmarker und ihre Lokalisation charakterisiert werden, worüber diesen eine spezielle Funktion zugeschrieben wird (Turnbull *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006). Die $\alpha_E\beta_7^+$ DC besitzen vielleicht eine ortsspezifische Funktion innerhalb der feto/maternalen Grenzschicht. Ergebnisse von entzündetem Lungengewebe deuten darauf hin, dass die Hauptfunktion von $\alpha_E\beta_7^+$ DC in der Antigenaufnahme und dem Transport zu den drainierenden Lymphknoten besteht, wohingegen $CD11b^+$ DC mit Leukozyten interagieren, die in das Gewebe eingewandert sind (Sung *et al.*, 2006). Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass $\alpha_4\beta_7^{hi}$ oder $\alpha_E\beta_7^+$ deziduale $CD11b^-$ DC als mobile Zellen fungieren, während $CD11b^+ \alpha_4\beta_7^+$ oder $CD11b^+ \beta_7^-$ DC in der Dezidua basalis verbleiben und lokale Immunreaktionen regulieren.

Zu den zuvor erwähnten Beobachtungen, die bei der Blockierung der Extravasation von $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten innerhalb der feto/maternalen Grenzschicht gemacht wurden, konnten außerdem morphologische Veränderungen der maternalen Dezidua festgestellt werden, die sich im Vergleich zu den jeweiligen feto/maternalen Einheiten von Kontrollen in einer hypozellulären Dezidua, einer gestörten Ausbildung des Myometriums und in einer Beeinträchtigung bei der neuen Ausrichtung maternaler Blutgefäße manifestierte (Ferne Korn *et al.*, 2004). Interessanterweise interagieren die $CD11c^+ CD11b^{med} \alpha_4\beta_7^{lo} \alpha_E^-$ DC im Bereich des dezidualen Stromas zwischen der vaskulären Zone und der zentralen Dezidua basalis mit uNK Zellen. Durch Untersuchungen am konfokalen Mikroskop mit unterschiedlich kombinierten Färbungen gegen β_7 , α_4 , CD11c, CD11b und CD90.2 konnte ein direkter Kontakt dieser DC mit uNK im schwangeren Uterus der Maus gezeigt werden. Mehreren Arbeitsgruppen zufolge wird den DC durch Zell-Zell-Kontakte und über Zytokine eine große Bedeutung für die Entwicklung und die funktionellen Eigenschaften der NK Zellen zugesprochen (Piccioli *et al.*, 2002; Gerosa *et al.*, 2002; Walzer *et al.*, 2005). In der humanen Schwangerschaft wurden ebenfalls direkte Kontakte zwischen DC und uNK Zellen beschrieben (Kammerer *et al.*, 2003). $CD209^+$ deziduale antigenpräsentierenden Zellen wurden *in situ* untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen einen sehr engen Kontakt zu *neural cell adhesion molecule-1* (NCAM-1)⁺ $CD16^- ICAM-3^+$ uNK Zellen haben. Unterstrichen wird die Bedeutung der DC für die Entwicklung der uNK Zellen durch *in vivo* Langzeit Inhibitionsstudien (Ferne Korn *et al.*, 2004). Durch die Gabe von blockierenden mAk führte eine reduzierte bzw. fehlende Extravasation von $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen innerhalb der feto/maternalen Grenzschicht zu einer starken Reduzierung der Größe und Anzahl von uNK Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die aus den feto/maternalen Einheiten isolierten $CD11c^+$ Zellen bei einer intrazellulärer Färbung in der Lage waren, neben dem für DC typischen Zytokin IL-12 (Banchereau *et al.*, 2000) auch IL-15 zu sezernieren. DC produziertes IL-15 spielt bei verschiedenen Immunreaktionen eine bedeutende Rolle (Mattei *et al.*, 2001; Ohteki *et al.*, 2006) und wird auch speziell für die Stimulation von NK Zellen verantwortlich gemacht (Ferlazzo *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2007). Somit könnten die $CD11c^+ CD11b^+ \alpha_4\beta_7^+$ DC die Quelle für eine IL-15 abhängige Proliferation (Ye *et al.*, 1996) von uNK sein. Zusätzlich konnte die mRNA des IL-15R α in humanen uNK Zellen nachgewiesen werden und Proliferationsassays zeigten eine IL-15 abhängige Proliferation dieser Zellen (Verma *et al.*, 2000). Zudem waren IL-15^{-/-} Mäuse durch ein Fehlen von uNK Zellen in der Dezidua gekennzeichnet (Ashkar *et al.*, 2003). Uterine NK Zellen stellen die

Hauptproduzenten des dezidualen $\text{INF}\gamma$ dar, das zur Gefäßerweiterung und für die Angiogenese bedeutend ist (Ashkar and Croy, 1999; Wang *et al.*, 2000; Herington and Bany, 2007). Eine stark verminderte Anzahl an uNK Zellen, wie sie in feto/maternalen Einheiten mit gehemmter Rekrutierung von $\alpha_4\beta_7^+$ DC nachgewiesen wurde, hat eine verminderte Sekretion von $\text{INF}\gamma$ zur Folge (Karsten *et al.*, manuscript in preparation). Dieses führt zu histologischen Veränderungen, wie sie von Fernekorn *et al.* beschrieben wurden (Fernekorn *et al.*, 2004).

Nachdem eine Beteiligung von P-Selektin und MAdCAM-1 an der Extravasation von $\text{CD11c}^+ \alpha_4\beta_7^+$ Zellen in der vaskulären Zone nachgewiesen werden konnte, sollte auch das Migrationsverhalten dieser Zellen im Gewebe des schwangeren Uterus der Maus untersucht werden. An der Extravasation und Migration von Zellen innerhalb von Geweben sind neben Adhäsionsmolekülen vor allem auch Chemokine und auf den Zellen exprimierte Chemokinrezeptoren beteiligt (Gonzalo *et al.*, 1999; von Andrian and Mackay, 2000; von Andrian and Mempel, 2003). Da im schwangeren Uterus der Maus als auch bei humanen Schwangerschaften eine Expression der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und RANTES beschrieben worden sind (Wood *et al.*, 1997; Drake *et al.*, 2001), die eine Zuwanderung von Monozyten, uNK Zellen und T-Zellen bewirken, wurden die CD11c^+ Zellen auf die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 für diese Liganden untersucht. CCR2, ein typischer Marker für *immature* DC (iDC), M ϕ sowie Monozyten (Mack *et al.*, 2001; Luster, 2002; Vicari *et al.*, 2004), wurde zu 80% von den CD11c^+ Zellen exprimiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass 90% der CD11c^+ Zellen den Chemokinrezeptor CCR5 exprimieren, der sowohl auf T-Zellen als auch auf DC beschrieben wird (Mack *et al.*, 2001; McColl, 2002). Um Einblicke in die Bedeutung von CCR5 an der Extravasation und Migration der CD11c^+ Zellen zu erhalten, wurden Experimente mit $\text{CCR5}^{-/-}$ Mäusen als auch *in vivo* Langzeit Inhibitionsstudien mit dem blockierenden anti-CCR5 mAk MC68 durchgeführt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Mack, Universität Regensburg). Die Anzahl der den schwangeren Uterus infiltrierenden CD11c^+ Zellen war bei $\text{CCR5}^{-/-}$ Mäusen deutlich geringer ist als bei Kontrollmäusen (C57BL/6J x C57BL/6J). Besonders stark war die Reduzierung der CD11c^+ Zellpopulation bei der Injektion des gegen CCR5 gerichteten blockierenden mAk MC68. Die Ergebnisse deuten auf eine besondere Rolle von CCR5 an der Rekrutierung der CD11c^+ DC in den schwangeren Uterus der Maus hin. Auch bei humanen Schwangerschaften gibt es Hinweise auf eine Bedeutung von CCR5 für die

Extravasation von Leukozyten an der feto/maternalen Grenzschicht (Drake *et al.*, 2001). Zudem konnte die Relevanz von CCR5 bei der Rekrutierung unreifer DC in das Lungengewebe und an Entzündungen, die durch Bakterien induziert sind, belegt werden (Stumbles *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte die Wichtigkeit von CCR5 für die Funktion von DC innerhalb der Submandibulardrüse von *non obese diabetic* (NOD) Mäusen gezeigt werden. Ein Fehlen von CCR5 auf den DC förderte ein pro-inflammatorisches Milieu (Wildenberg *et al.*, 2008).

DC werden als Vermittler der feto/maternalen Toleranz diskutiert. Sie besitzen die Möglichkeit, einerseits eine Immunantwort über T Zellen und andererseits über Toleranzvermittlung eine Suppression der Immunantwort zu induzieren (Jonuleit *et al.*, 2001; Steinman and Nussenzweig, 2002; Aluvihare *et al.*, 2005). Dabei spielt das IL-10 eine entscheidende Rolle, dass die Entwicklung von iDC in reife DC durch eine Inhibierung der Expression von CD83 verhindert. Mit IL-10 kultivierte DC induzierten zudem eine Anergie bei T Zellen (Steinbrink *et al.*, 1997). Eine Anergie bei T Zellen konnte auch durch eine geringe Expression von MHCII Molekülen auf DC hervorgerufen werden und könnte darüber die fetale Akzeptanz fördern (Lutz and Schuler, 2002). Es wird auch diskutiert, dass IL-10 produzierende DC zur Generierung von regulatorischen T Zellen beitragen, die wiederum im schwangeren Uterus Immunantworten supprimieren. Somit könnten die DC eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Toleranz gegenüber dem fetalen Gewebe einnehmen (Rutella *et al.*, 2006). Das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), welches den Abbau von Tryptophan vermittelt und somit eine Abstoßungsreaktion des murinen Fetus durch aktivierte T-Zellen verhindert (Daley-Yates *et al.*, 1988; Munn *et al.*, 1998), nimmt auch eine besondere Rolle im schwangeren Uterus ein. DC sind durch IFN γ induziert in der Lage IDO zu sezernieren (Fallarino *et al.*, 2002). Die Bedeutung der DC für eine erfolgreiche Schwangerschaft konnte besonders anhand des CBA-J x DBA-2J Abortmodells unterstrichen werden. Bei einem adoptiven Transfer von DC, die aus dem Knochenmark von CBA-J Mäusen generiert wurden, sank die Abortrate auf 2.2% verglichen mit 23.8% bei CBA-J x DBA-2J Mäusen, die keinen adoptiven Transfer erhielten (Blois *et al.*, 2004a).

Für die Migration der DC über Lymphgefäße in die drainierenden Lymphknoten wird der Chemokinrezeptor CCR7 benötigt (Banchereau and Steinman, 1998; Lutz and Schuler, 2002). Dabei geht eine Hochregulation von CCR7 mit einer Herunterregulation von CCR5

einher (Vecchi *et al.*, 1999; Jeannin *et al.*, 2003). Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen sollten die CD11c⁺ DC daher auf ihre Expression von CCR5 und CCR7 hin in der Dezidua basalis untersucht werden. CCR5⁺ CD11c⁺ und CCR7⁺ CD11c⁺ Zellen innerhalb des schwangeren Uterus der Maus an den Tagen 8, 9, 11 und 14 *p.c.* waren an den verschiedenen Tagen unterschiedlich lokalisierbar. CCR5⁺ CD11c⁺ Zellen wandern zwischen Tag 8 und 11 *p.c.* der Schwangerschaft über die maternalen Gefäße der vaskulären Zone in den schwangeren Uterus ein. Von der vaskulären Zone erfolgt dann eine Migration dieser Zellen über die zentrale Dezidua basalis in das Myometrium. Am Tag 11 *p.c.* der Schwangerschaft ist die Extravasation dieser Zellen aber stark verringert und lässt in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft fast vollständig nach. Am Tag 14 *p.c.* der Schwangerschaft können kaum noch CCR5⁺ CD11c⁺ Zellen nachgewiesen werden. Stattdessen können am Tag 9 *p.c.* einige CCR7⁺ CD11c⁺ Zellen innerhalb des Myometrium detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass CCR7 bei iDC hochreguliert wird, nachdem sie apoptotische Zellen über ihren iC3b Rezeptor (CD11c) aufgenommen hatten (Verbovetski *et al.*, 2002). Diese Zellen waren am Tag 11 *p.c.* vermehrt und ausschließlich in der Region des Myometriums zu finden. Am Tag 14 *p.c.* der Schwangerschaft konnten auch die CCR7⁺ CD11c⁺ Zellen kaum noch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Chemokinrezeptoren für die einzelnen Leukozytenpopulationen (Olson and Ley, 2002; Luster, 2002).

Interessanterweise exprimierten neben den CD11c⁺ Zellen auch uNK Zellen CCR5, aber vorwiegend in der Nähe des Trophoblasten (über 40%). Die Injektion mit dem anti-CCR5 mAk MC68 führte zu einer Reduzierung von uNK Zellen. Die Anzahl der gezählten uNK Zellen in dem Grenzbereich der zentralen Dezidua basalis und der vaskulären Zone verringerte sich bei untersuchten feto/maternalen Einheiten von CCR5^{-/-} Mäusen um 75% und bei MC68 behandelten Mäusen um über 88%. Es ist nicht bekannt, ob sich eine Blockade von CCR5 direkt auf die uNK Zellen auswirkt oder ob es die Reduktion der CD11c⁺ Zellen innerhalb der vaskulären Zone verursacht. Im Gegensatz zu den beobachteten Auswirkungen bei einer Injektion des gegen den Chemokinrezeptoren CCR5 gerichteten mAk MC68 und den Ergebnissen bei CCR5^{-/-} Mäusen stehen die Untersuchungen von Chantakru *et al.* (Chantakru *et al.*, 2001). Die Autoren postulieren eine von CCR2, CCR5 und MIP-1 α unabhängige Migration, Verteilung und Aktivierung von uNK Zellen. Dass der Chemokinrezeptor CCR5 aber sehr wohl Auswirkungen auf

eine erfolgreiche Schwangerschaft haben kann, zeigte die signifikant reduzierte Wurfgröße von CCR5^{-/-} Mäusen gegenüber Kontrollmäusen.

Es wird diskutiert, dass DC eine Toleranz induzierende Funktion während der murinen Schwangerschaft ausüben (Lutz and Schuler, 2002; Blois *et al.*, 2007). Daher sollte eine *in vivo* Expansion von DC, durch den hämatopoetischen Wachstumsfaktor *Fms-like-Tyrosinkinase-3-Ligand* (Flt3L) bei Mäusen herbeigeführt (Miller *et al.*, 2003), vorgenommen und deren Auswirkungen auf die Extravasation von CD11c⁺ Zellen in den schwangeren Uterus untersucht werden. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Injektion von murinem Flt3L zu einer Erhöhung der CD11c⁺ CD11b⁺ als auch CD11c⁺ CD11b⁻ DC führt (Maraskovsky *et al.*, 1996).

Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit murinen B16F10 Melanomzellen, die mit einer für murines Flt3L kodierenden cDNA transfiziert wurden (Mach *et al.*, 2000), durchgeführt. Diese als Flt3L-B16F10 bezeichneten Zellen sezernierten kontinuierlich murines rekombinantes Flt3L (1 x 10⁷ Zellen ca. 0.2µg/ml innerhalb von 48h) und wurden den Mäusen am Tag 1 *p.c.* der Schwangerschaft *s.c.* injiziert. Die Entwicklung eines Tumors von etwa 2cm Durchmesser konnte im Bereich der Injektionsstelle am Schwangerschaftstag 9 *p.c.* gemessen werden. Diese Ausbreitung der Flt3L-B16F10 Zellen ist auf deren geringe Immunogenität zurückzuführen (Fidler and Nicolson, 1976), was wiederum eine wichtige Voraussetzung für den Vergleich zwischen Kontrollmäusen und mit Flt3L-B16F10 Zellen injizierten Mäusen ist. Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung von DC aufgrund von Flt3L und nicht durch die Injektion von Melanomzellen erreicht wurde, sollte zur Kontrolle auch die nicht transfizierte Zelllinie B16F10 injiziert wurde.

Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse von Tag 9 *p.c.* feto/maternalen Einheiten konnte gezeigt werden, dass die DC Subpopulationen CD11c⁺ CD11b⁺ und CD11c⁺ CD11b⁻ der mit Flt3L-B16F10-Zellen behandelten Mäusen gegenüber Kontrollmäusen erhöht sind. Dabei war deutlich zu erkennen, dass innerhalb des schwangeren Uterus eine etwa 3-4fache Erhöhung der DC detektiert werden konnte. Diese Erhöhung wurde auch beim Vergleich der Anzahl von CD11c⁺ Zellen innerhalb der vaskulären Zone immunhistologisch bestätigt. Bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes war der Anteil der DC durch die Flt3L Behandlung um das etwa 14fache erhöht. Die Höhe der Expansion von CD11c⁺ CD11b⁺ und CD11c⁺ CD11b⁻ DC Subpopulationen durch die Flt3L Behandlung war nahezu identisch, wie es auch Mach *et al.* beschrieben

haben (Mach *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu formulierten O’Keeffe *et al.* durch die Gabe von rekombinantem Flt3L eine erhöhte Anzahl lymphoider DC (O’keeffe *et al.*, 2002).

Um die DC Populationen näher zu untersuchen, wurde wie zuvor schon bei der Charakterisierung der CD11c⁺ Zellen die Expression des β_7 Integrins auf Flt3L generierten DC mit denen aus unbehandelten Mäusen verglichen, wobei sowohl eine Erhöhung der CD11c⁺ CD11b⁺ β_7^{lo} DC als auch der CD11c⁺ CD11b⁻ β_7^{hi} DC gemessen wurden. Zusätzlich wurde auf CD11c⁺ CD11b⁺ DC und CD11c⁺ CD11b⁻ DC die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 untersucht. Dabei konnte im Vergleich von Flt3L behandelten Mäusen zu Kontrollmäusen festgestellt werden, dass der Anteil an CD11c⁺ CD11b⁺ CD86⁺ Zellen im Zuge der DC Expansion sinkt und der Anteil der CD11c⁺ CD11b⁻ CD86⁺ Zellen erhöht ist. Eine Erhöhung von CD86 nach der Flt3L Behandlung konnte auch von Mach *et al.* gezeigt werden (Mach *et al.*, 2000). Flt3L kann die Entwicklung von aktivierten DC im murinen Modell induzieren (Shurin *et al.*, 1997), zudem wird eine höhere Expression von Integrinen auch mit einer erhöhten Aktivierung in Verbindung gebracht (Laudanna *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2002). Die Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen wie CD86 erfolgt im Zuge der Reifung von DC, weshalb es sich bei dem erhöhten Anteil von CD11c⁺ CD11b⁻ CD86⁺ Zellen um aktivierte DC handeln könnte.

Dieses würde auch die Ergebnisse der Wurfgrößen bei Flt3L behandelten Mäusen gegenüber unbehandelten Mäusen erklären. Von 40 C57BL/6J x C57BL/6J Schwangerschaften, die am Tag 1 *p.c.* positiv für einen vaginalen Plug getestet wurden, gab es 28 erfolgte Würfe am Tag 20-21 *p.c.*, was einer Erfolgsquote von 70% entspricht. Andere Quellen sprechen von einer möglichen Erfolgsquote von bis zu 92% (Rugh, 1990). Bei der Untersuchung von mit Flt3L-B16F10 Zellen behandelten Mäusen wurde dagegen festgestellt, dass es zu keinem erfolgreichen Wurf gekommen war. Somit scheint Flt3L die Entwicklung von aktivierten DC im murinen Modell und eine Immunantwort gegenüber fetalem Gewebe zu induzieren (Shurin *et al.*, 1997). Zudem könnte eine erhöhte Rekrutierung von DC in den schwangeren Uterus und die damit verbundene Sekretion von Zytokinen auch die Funktion der uNK Zellen beeinflussen, die normalerweise IFN γ zur Modifikation der Gefäße sezernieren (Ashkar *et al.*, 2000). Eine Verdickung der Blutgefäße zeigt, dass diese Umstrukturierung der Gefäße ausblieb, wie auch experimentell von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Xie *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass DC über hochspezifische Extravasationsmechanismen in den schwangeren Uterus der Maus einwandern und dort eine zentrale Rolle spielen. Verschiedene DC Subpopulationen konnten in unterschiedlichen Bereichen der Dezidua basalis lokalisiert werden. Dabei scheinen vorwiegend innerhalb der vaskulären Zone anzutreffende myeloide $CD11c^+ \beta_7^+$ DC eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von uNK Zellen einzunehmen. Die Rolle der in dem Myometrium lokalisierten lymphoiden $CD11c^+ \beta_7^+$ DC ist dagegen unklar. Störungen der feto/maternalen Akzeptanz konnten durch eine Flt3L induzierte Erhöhung an $CD11c^+$ DC beobachtet werden. Eingehendere Untersuchungen der Zytokinexpression von den jeweiligen DC Subpopulationen könnten neue Beiträge und ein besseres Verständnis für die Mechanismen liefern, die der Akzeptanz der feto/maternalen Toleranz dienen.

6 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und die Entwicklung des semiallogenen Fetus stellt ein immunologisches Phänomen dar. Obwohl väterliche Antigene auf dem fetalen Gewebe exponiert sind, kommt es aufgrund von multifunktionellen Toleranzmechanismen zu keinen Abstoßungsreaktionen. Es wird angenommen, dass die selektive Infiltration des schwangeren Uterus mit bestimmten Leukozyten, wie z.B. auch dendritischen Zellen (DC), eine wesentliche Rolle spielt.

Das maternale Gewebe ist zum kritischen Zeitpunkt der beginnenden murinen Plazentaentwicklung am Schwangerschaftstag 9 *post coitum* durch Mikrodomänen gekennzeichnet, die ein charakteristisches Expressionsmuster vaskulärer Adhäsionsmoleküle zeigen. Die lokalisierte Expression von MAdCAM-1 und P-Selektin auf den maternalen Gefäßen der vaskulären Zone spielt eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten. Durchflusszytometrische Analysen der aus dem Uterus isolierten $\alpha_4\beta_7$ Integrin⁺ Leukozyten ergab, dass die Mehrheit dieser Zellen als DC charakterisiert werden konnten. Anhand einer unterschiedlichen Expression von CD11b, $\alpha_4\beta_7$ und $\alpha_E\beta_7$ Integrin konnten drei Subpopulationen unterschieden werden, die zudem in unterschiedlichen Mikrodomänen innerhalb der Dezidua basalis lokalisiert sind. CD11c⁺ CD11b^{med} $\alpha_4\beta_7^{\text{lo}}$ α_E^- Zellen bilden die Mehrheit der DC innerhalb der vaskulären Zone, wohingegen CD11c⁺ CD11b⁻ $\alpha_E^+\beta_7^{\text{hi}}$ DC vorwiegend im Myometrium und dem Bereich der zentralen Dezidua basalis anzutreffen sind. Die Population der CD11c⁺ CD11b^{lo} β_7^- DC ist hauptsächlich in der zentralen Dezidua basalis zu finden. Die unterschiedliche Expression der $\alpha_4\beta_7$ und $\alpha_E\beta_7$ Integrine zusammen mit der spezifischen Verteilung der DC lässt eine funktionelle Vielfalt dieser Zellen an der feto/maternalen Grenzschicht vermuten. *In vivo* Langzeit Inhibitionsstudien gegen ausgewählte vaskuläre Adressine führte zu einer verminderten Einwanderung von $\alpha_4\beta_7^+$ DC in den schwangeren Uterus der Maus. Die feto/maternalen Einheiten mit einer verminderten Anzahl an $\alpha_4\beta_7^+$ DC waren durch eine reduzierte Anzahl und Größe uteriner NK Zellen, durch verdickte maternale Blutgefäße und durch eine Hypozellularität des dezidualen Gewebes gekennzeichnet. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die CD11c⁺ CD11b^{med} $\alpha_4\beta_7^+$ α_E^- DC innerhalb der Dezidua basalis an der Grenze zwischen vaskulärer Zone und zentraler Dezidua basalis mit uterinen NK Zellen interagieren. Innerhalb der Population CD11c⁺ DC konnte intrazelluläres IL-15 nachgewiesen werden. IL-15 bewirkt die Proliferation von uterinen NK Zellen, wodurch die DC einen Einfluss

auf die Entwicklung der uterinen NK Zellen nehmen könnten. Neben Adhäsionsmolekülen sind vor allem Chemokinrezeptoren wie CCR5, CCR2 und CCR7, die auf Subpopulationen dezidualer CD11c⁺ Zellen exprimiert werden, an der Extravasation bzw. Migration dieser Zellen in den schwangeren Uterus der Maus beteiligt. Langzeit *in vivo* Inhibitionsstudien mit dem mAk MC68 gegen den Chemokinrezeptor CCR5 und Experimente mit CCR5 defizienten Mäusen konnten vor allem die Rolle dieses Chemokinrezeptors für die Rekrutierung der DC in den schwangeren Uterus unterstreichen. Eine *in vivo* Expansion von DC durch die Gabe von Flt3L sezernierenden Flt3L-B16F10 Zellen führte zu einer dramatischen Erhöhung CD11c⁺ Zellen im schwangeren Uterus. Diese Zellen zeigten zudem einen aktivierten Phänotyp. Im Gegensatz zu unbehandelten Mäusen waren Schwangerschaften von Tieren, denen Flt3L sezernierende Flt3L-B16F10 Zellen injiziert wurden, durch erhöhte Abortraten gekennzeichnet. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung dendritischer Zellen an der feto/maternalen Grenzschicht. Eine unkontrollierte Einwanderung, erhöhte Anzahl sowie ein aktivierter Phänotyp dieser Zellen könnte eine Rolle bei pathologisch verlaufenden Schwangerschaften spielen.

7 Literaturverzeichnis

- Aluvihare,V.R., Kallikourdis,M., Betz,A.G., 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5, 266-271.
- Aluvihare,V.R., Kallikourdis,M., Betz,A.G., 2005. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J. Mol. Med.* 83, 88-96.
- Andrew,D.P., Berlin,C., Honda,S., Yoshino,T., Hamann,A., Holzmann,B., Kilshaw,P.J., Butcher,E.C., 1994. Distinct but overlapping epitopes are involved in alpha 4 beta 7-mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal addressin-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation. *J. Immunol.* 153, 3847-3861.
- Ansell,J.D., McDougall,C.M., Speedy,G., Inchley,C.J., 1978. Changes in lymphocyte accumulation and proliferation in the lymph nodes draining the pregnant uterus. *Clin. Exp. Immunol.* 31, 397-407.
- Aplin,A.E., Howe,A., Alahari,S.K., Juliano,R.L., 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50, 197-263.
- Arck,P.C., Ferrick,D.A., Steele-Norwood,D., Croitoru,K., Clark,D.A., 1997. Murine T cell determination of pregnancy outcome: I. Effects of strain, alphabeta T cell receptor, gammadelta T cell receptor, and gammadelta T cell subsets. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37, 492-502.
- Arck,P.C., Ferrick,D.A., Steele-Norwood,D., Egan,P.J., Croitoru,K., Carding,S.R., Dietl,J., Clark,D.A., 1999. Murine T cell determination of pregnancy outcome. *Cell Immunol.* 196, 71-79.
- Ashkar,A.A., Black,G.P., Wei,Q., He,H., Liang,L., Head,J.R., Croy,B.A., 2003. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J. Immunol.* 171, 2937-2944.
- Ashkar,A.A., Croy,B.A., 1999. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol. Reprod.* 61, 493-502.
- Ashkar,A.A., Di Santo,J.P., Croy,B.A., 2000. 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, 259-270.
- Austrup,F., Rebstock,S., Kilshaw,P.J., Hamann,A., 1995. Transforming growth factor-beta 1-induced expression of the mucosa-related integrin alpha E on lymphocytes is not associated with mucosa-specific homing. *Eur. J. Immunol.* 25, 1487-1491.
- Avrameas,S., Guilbert,B., 1971. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur. J. Immunol.* 1, 394-396.
- Bacon,K., Baggiolini,M., Broxmeyer,H., Horuk,R., Lindley,I., Mantovani,A., Maysushima,K., Murphy,P., Nomiyama,H., Oppenheim,J., Rot,A., Schall,T., Tsang,M., Thorpe,R., Van,D.J., Wadhwa,M., Yoshie,O., Zlotnik,A., Zoon,K., 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, 1067-1068.

- Baggiolini,M., Dewald,B., Moser,B., 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97-179.
- Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., Palucka,K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.
- Banchereau,J., Steinman,R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Behrends,J., Karsten,C.M., Butcher,E.C., Wilke,S., Röpke,A., Kruse,A., 2008. Identification of alpha4beta7- and alphaEbeta7-integrin expressing subsets of decidual dendritic-like cells within distinct microdomains of the pregnant mouse uterus. Im Reviewprozess.
- Behrendtsen,O., Alexander,C.M., Werb,Z., 1992. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114, 447-456.
- Berlin,C., Bargatze,R.F., Campbell,J.J., von Andrian,U.H., Szabo,M.C., Hasslen,S.R., Nelson,R.D., Berg,E.L., Erlandsen,S.L., Butcher,E.C., 1995. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80, 413-422.
- Berlin,C., Berg,E.L., Briskin,M.J., Andrew,D.P., Kilshaw,P.J., Holzmann,B., Weissman,I.L., Hamann,A., Butcher,E.C., 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-195.
- Bertoja,A.Z., Zenclussen,M.L., Casalis,P.A., Sollwedel,A., Schumacher,A., Woiciechowsky,C., Volk,H.D., Zenclussen,A.C., 2005. Anti-P- and E-selectin therapy prevents abortion in the CBA/J x DBA/2J combination by blocking the migration of Th1 lymphocytes into the foetal-maternal interface. *Cell Immunol.* 238, 97-102.
- Bevilacqua,M.P., 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 767-804.
- Bevilacqua,M.P., Stengelin,S., Gimbrone,M.A., Jr., Seed,B., 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243, 1160-1165.
- Bhakdi,S., Hugo,F., Trantum-Jensen,J., 1990. Functions and relevance of the terminal complement sequence. *Blut* 60, 309-318.
- Bitter-Suermann,D., Burger,R., 1990. C3 deficiencies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 153, 223-233.
- Bjorck,P., 2001. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98, 3520-3526.
- Blanpain,C., Vanderwinden,J.M., Cihak,J., Wittamer,V., Le,P.E., Issafras,H., Stangassinger,M., Vassart,G., Marullo,S., Schlindorff,D., Parmentier,M., Mack,M., 2002. Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell* 13, 723-737.

- Blois,S., ba Soto,C.D., Olmos,S., Chuluyan,E., Gentile,T., Arck,P.C., Margni,R.A., 2004a. Therapy with dendritic cells influences the spontaneous resorption rate in the CBA/J x DBA/2J mouse model. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51, 40-48.
- Blois,S.M., ba Soto,C.D., Tometten,M., Klapp,B.F., Margni,R.A., Arck,P.C., 2004b. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol. Reprod.* 70, 1018-1023.
- Blois,S.M., Kammerer,U., Alba,S.C., Tometten,M.C., Shaikly,V., Barrientos,G., Jurd,R., Rukavina,D., Thomson,A.W., Klapp,B.F., Fernandez,N., Arck,P.C., 2007. Dendritic Cells: Key to Fetal Tolerance? *Biol. Reprod.*
- Borrego,F., Ulbrecht,M., Weiss,E.H., Coligan,J.E., Brooks,A.G., 1998. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* 187, 813-818.
- Brandon,J.M., 1995. Macrophage distribution in decidual tissue from early implantation to the periparturient period in mice as defined by the macrophage differentiation antigens F4/80, macrosialin and the type 3 complement receptor. *J. Reprod. Fertil.* 103, 9-16.
- Brzoza,K.L., Rockel,A.B., Hiltbold,E.M., 2004. Cytoplasmic entry of *Listeria monocytogenes* enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. *J. Immunol.* 173, 2641-2651.
- Butcher,E.C., Picker,L.J., 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.
- Butcher,E.C., Williams,M., Youngman,K., Rott,L., Briskin,M., 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv. Immunol.* 72, 209-253.
- Carlin,J.M., Borden,E.C., Sondel,P.M., Byrne,G.I., 1989. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J. Leukoc. Biol.* 45, 29-34.
- Carlos,T.M., Harlan,J.M., 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.
- Carosella,E.D., Moreau,P., Aractingi,S., Rouas-Freiss,N., 2001. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol.* 22, 553-555.
- Caux,C., 1998. Pathways of development of human dendritic cells. *Eur. J. Dermatol.* 8, 375-384.
- Caux,C., Vanbervliet,B., Massacrier,C., zutter-Dambuyant,C., de Saint-Vis,B., Jacquet,C., Yoneda,K., Imamura,S., Schmitt,D., Banchereau,J., 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* 184, 695-706.
- Cavanagh,L.L., von Andrian,U.H., 2002. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 80, 448-462.
- Chantakru,S., Kuziel,W.A., Maeda,N., Croy,B.A., 2001. A study on the density and distribution of uterine Natural Killer cells at mid pregnancy in mice genetically-ablated for CCR2, CCR 5 and the CCR5 receptor ligand, MIP-1 alpha. *J. Reprod. Immunol.* 49, 33-47.

- Chantakru,S., Miller,C., Roach,L.E., Kuziel,W.A., Maeda,N., Wang,W.C., Evans,S.S., Croy,B.A., 2002. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J. Immunol.* 168, 22-28.
- Cheng,H.L., Schneider,S.L., Kane,C.M., Gollnick,S.O., Grande,C., Thompson,D., Pietrzak,E., Tomasi,T.B., 1993. TGF-beta 2 gene and protein expression in maternal and fetal tissues at various stages of murine development. *J. Reprod. Immunol.* 25, 133-148.
- Choi,A.M., Jacoby,D.B., 1992. Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *FEBS Lett.* 309, 327-329.
- Clark,D.A., Chaouat,G., Guenet,J.L., Kiger,N., 1987. Local active suppression and successful vaccination against spontaneous abortion in CBA/J mice. *J. Reprod. Immunol.* 10, 79-85.
- Clark,D.A., Slapsys,R.M., 1985. Immunoregulatory mechanisms in the uterus and survival of the fetus. *Contrib. Gynecol. Obstet.* 14, 44-53.
- Coates,P.T., Colvin,B.L., Ranganathan,A., Duncan,F.J., Lan,Y.Y., Shufesky,W.J., Zahorchak,A.F., Morelli,A.E., Thomson,A.W., 2004. CCR and CC chemokine expression in relation to Flt3 ligand-induced renal dendritic cell mobilization. *Kidney Int.* 66, 1907-1917.
- Coumans,B., Thellin,O., Zorzi,W., Melot,F., Bougoussa,M., Melen,L., Zorzi,D., Hennen,G., Igout,A., Heinen,E., 1999. Lymphoid cell apoptosis induced by trophoblastic cells: a model of active foeto-placental tolerance. *J. Immunol. Methods* 224, 185-196.
- Cox,J., Ford,W.L., 1984. Lymphocyte traffic in pregnant or oestrogen stimulated rats. *J. Reprod. Immunol.* 6, 167-176.
- Cross,J.C., Hemberger,M., Lu,Y., Nozaki,T., Whiteley,K., Masutani,M., Adamson,S.L., 2002. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell Endocrinol.* 187, 207-212.
- Cross,J.C., Werb,Z., Fisher,S.J., 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266, 1508-1518.
- Croy,B.A., Chantakru,S., Esadeg,S., Ashkar,A.A., Wei,Q., 2002. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *J. Reprod. Immunol.* 57, 151-168.
- Croy,B.A., Gambel,P., Rossant,J., Wegmann,T.G., 1985. Characterization of murine decidual natural killer (NK) cells and their relevance to the success of pregnancy. *Cell Immunol.* 93, 315-326.
- Croy,B.A., He,H., Esadeg,S., Wei,Q., McCartney,D., Zhang,J., Borzychowski,A., Ashkar,A.A., Black,G.P., Evans,S.S., Chantakru,S., van den,H.M., Paffaro,V.A., Jr., Yamada,A.T., 2003. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction.* 126, 149-160.
- Croy,B.A., McBey,B.A., Villeneuve,L.A., Kusakabe,K., Kiso,Y., van den,H.M., 1997. Characterization of the cells that migrate from metrial glands of the pregnant mouse uterus during explant culture. *J. Reprod. Immunol.* 32, 241-263.

- Croy,B.A., Rossant,J., Clark,D.A., 1982. Histological and immunological studies of post implantation death of *Mus caroli* embryos in the *Mus musculus* uterus. *J. Reprod. Immunol.* 4, 277-293.
- Curtsinger,J.M., Johnson,C.M., Mescher,M.F., 2003. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J. Immunol.* 171, 5165-5171.
- Daley-Yates,P.T., Powell,A.P., Smith,L.L., 1988. Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 96, 222-232.
- Damsky,C., Sutherland,A., Fisher,S., 1993. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *FASEB J.* 7, 1320-1329.
- Damsky,C.H., Librach,C., Lim,K.H., Fitzgerald,M.L., McMaster,M.T., Janatpour,M., Zhou,Y., Logan,S.K., Fisher,S.J., 1994. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120, 3657-3666.
- De,M., Choudhuri,R., Wood,G.W., 1991. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J. Leukoc. Biol.* 50, 252-262.
- Delgado,S.R., McBey,B.A., Yamashiro,S., Fujita,J., Kiso,Y., Croy,B.A., 1996. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J. Leukoc. Biol.* 59, 262-269.
- Denk,W., Strickler,J.H., Webb,W.W., 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.
- Dieu,M.C., Vanbervliet,B., Vicari,A., Bridon,J.M., Oldham,E., it-Yahia,S., Briere,F., Zlotnik,A., Lebecque,S., Caux,C., 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188, 373-386.
- DiSanto,J.P., Muller,W., Guy-Grand,D., Fischer,A., Rajewsky,K., 1995. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 377-381.
- Drake,P.M., Gunn,M.D., Charo,I.F., Tsou,C.L., Zhou,Y., Huang,L., Fisher,S.J., 2001. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *J. Exp. Med.* 193, 1199-1212.
- Drake,P.M., Red-Horse,K., Fisher,S.J., 2002. Chemokine expression and function at the human maternal-fetal interface. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 3, 159-165.
- Engvall,E., Jonsson,K., Perlmann,P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta* 251, 427-434.
- Etzioni,A., Doerschuk,C.M., Harlan,J.M., 1999. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* 94, 3281-3288.

- Fallarino,F., Grohmann,U., Vacca,C., Bianchi,R., Orabona,C., Spreca,A., Fioretti,M.C., Puccetti,P., 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death. Differ.* 9, 1069-1077.
- Fearon,D.T., Carter,R.H., 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 127-149.
- Ferlazzo,G., Pack,M., Thomas,D., Paludan,C., Schmid,D., Strowig,T., Bougras,G., Muller,W.A., Moretta,L., Munz,C., 2004. 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, 16606-16611.
- Ferneborn,U., 2005. Funktionelle Bedeutung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen im schwangeren Uterus der Maus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. *Dissertationsschrift, Lübeck.*
- Ferneborn,U., Butcher,E.C., Behrends,J., Hartz,S., Kruse,A., 2004. 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, 3423-3433.
- Ferneborn,U., Butcher,E.C., Behrends,J., Karsten,C.M., Robke,A., Schulze,T.J., Kirchner,H., Kruse,A., 2007. Selectin platelet plays a critical role in granulocyte access to the pregnant mouse uterus under physiological and pathological conditions. *Biol. Reprod.* 76, 645-653.
- Fest,S., Aldo,P.B., Abrahams,V.M., Visintin,I., Alvero,A., Chen,R., Chavez,S.L., Romero,R., Mor,G., 2007. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57, 55-66.
- Fidler,I.J., Nicolson,G.L., 1976. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1199-1202.
- Fischer,M.B., Ma,M., Goerg,S., Zhou,X., Xia,J., Finco,O., Han,S., Kelsoe,G., Howard,R.G., Rothstein,T.L., Kremmer,E., Rosen,F.S., Carroll,M.C., 1996. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J. Immunol.* 157, 549-556.
- Flores-Romo,L., 2001. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* 102, 255-262.
- Frank,M.M., Fries,L.F., 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326.
- Frenette,P.S., Wagner,D.D., 1996. Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *N. Engl. J. Med.* 335, 43-45.
- Fujii,T., Hayakawa,I., 1983. A histological and electron-microscopic study of the cell types involved in rejection of skin allografts in ammocoetes. *Cell Tissue Res.* 231, 301-312.
- Gardner,L., Moffett,A., 2003. Dendritic cells in the human decidua. *Biol. Reprod.* 69, 1438-1446.

- Gardner,R.L., Davies,T.J., 1993. Lack of coupling between onset of giant transformation and genome endoreduplication in the mural trophectoderm of the mouse blastocyst. *J. Exp. Zool.* 265, 54-60.
- Gerosa,F., Baldani-Guerra,B., Nisii,C., Marchesini,V., Carra,G., Trinchieri,G., 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, 327-333.
- Gonzalo,J.A., Pan,Y., Lloyd,C.M., Jia,G.Q., Yu,G., Dussault,B., Powers,C.A., Proudfoot,A.E., Coyle,A.J., Gearing,D., Gutierrez-Ramos,J.C., 1999. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J. Immunol.* 163, 403-411.
- Greenfield,E.A., Nguyen,K.A., Kuchroo,V.K., 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev. Immunol.* 18, 389-418.
- Greenwood,J.D., Minhas,K., Di Santo,J.P., Makita,M., Kiso,Y., Croy,B.A., 2000. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta* 21, 693-702.
- Guimond,M.J., Wang,B., Croy,B.A., 1998. 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, 217-223.
- Hafezi-Moghadam,A., Ley,K., 1999. Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 939-948.
- Hamann,A., Andrew,D.P., Jablonski-Westrich,D., Holzmann,B., Butcher,E.C., 1994. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J. Immunol.* 152, 3282-3293.
- Herington,J.L., Bany,B.M., 2007. Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization. *Biol. Reprod.* 76, 579-588.
- Heyborne,K.D., Cranfill,R.L., Carding,S.R., Born,W.K., O'Brien,R.L., 1992. Characterization of gamma delta T lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.* 149, 2872-2878.
- Hiby,S.E., Walker,J.J., O'shaughnessy,K.M., Redman,C.W., Carrington,M., Trowsdale,J., Moffett,A., 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* 200, 957-965.
- Hildemann,W.H., Johnson,I.S., Jokiel,P.L., 1979. Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges. *Science* 204, 420-422.
- Huleatt,J.W., Lefrancois,L., 1995. Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. *J. Immunol.* 154, 5684-5693.
- Hummel,K., Richardson,F.L., Fekete,E., 1941. *Biology of the laboratory mouse.* Jackson Laboratory (2nd ed). Dover Publications, Inc. New York 105-166.
- Hunt,J.S., 1989. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.* 16, 1-17.

- Hunt,J.S., Manning,L.S., Mitchell,D., Selanders,J.R., Wood,G.W., 1985. Localization and characterization of macrophages in murine uterus. *J. Leukoc. Biol.* 38, 255-265.
- Hunt,J.S., Manning,L.S., Wood,G.W., 1984. Macrophages in murine uterus are immunosuppressive. *Cell Immunol.* 85, 499-510.
- Hunt,J.S., Vassmer,D., Ferguson,T.A., Miller,L., 1997. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J. Immunol.* 158, 4122-4128.
- Hynes,R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Inaba,K., Inaba,M., Naito,M., Steinman,R.M., 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178, 479-488.
- Jalkanen,S.T., Bargatze,R.F., Herron,L.R., Butcher,E.C., 1986. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur. J. Immunol.* 16, 1195-1202.
- Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., Shlomchik,M., 2002. *Immunologie*, 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jeannin,P., Magistrelli,G., Herbault,N., Goetsch,L., Godefroy,S., Charbonnier,P., Gonzalez,A., Delneste,Y., 2003. Outer membrane protein A renders dendritic cells and macrophages responsive to CCL21 and triggers dendritic cell migration to secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 33, 326-333.
- Jerzak,M., Bischof,P., 2002. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 100, 138-142.
- Jerzak,M., Kasprzycka,M., Wierbicki,P., Kotarski,J., Gorski,A., 1998. Apoptosis of T cells in the first trimester human decidua. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40, 130-135.
- Johansson-Lindbom,B., Svensson,M., Pabst,O., Palmqvist,C., Marquez,G., Forster,R., Agace,W.W., 2005. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J. Exp. Med.* 202, 1063-1073.
- Johnstone,A.P., Thorpe,R., 1996. *Immunochimistry in practice*. 3. Auflage, Blackwell Science, Oxford UK.
- Jonuleit,H., Schmitt,E., Steinbrink,K., Enk,A.H., 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 22, 394-400.
- Kamimura,S., Eguchi,K., Yonezawa,M., Sekiba,K., 1991. Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med. Okayama* 45, 135-139.
- Kammerer,U., 2005. Antigen-presenting cells in the decidua. *Chem. Immunol. Allergy* 89, 96-104.

- Kammerer,U., Eggert,A.O., Kapp,M., McLellan,A.D., Geijtenbeek,T.B., Dietl,J., Van,K.Y., Kampgen,E., 2003. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am. J. Pathol.* 162, 887-896.
- Kammerer,U., Schoppet,M., McLellan,A.D., Kapp,M., Huppertz,H.I., Kampgen,E., Dietl,J., 2000. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 157, 159-169.
- Karsten,C.M., Behrends,J., Wagner,A., Fuchs,F., Figge,J., Kruse,A. Dendritic cells within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells via the production of IL-12 and IL-15. Manuscript in preparation.
- Karsunky,H., Merad,M., Cozzio,A., Weissman,I.L., Manz,M.G., 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198, 305-313.
- Kauma,S.W., Huff,T.F., Hayes,N., Nilkaeo,A., 1999. Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 2188-2194.
- Kehrl,J.H., 2006. Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol. Res.* 34, 211-227.
- Kiger,N., Chaouat,G., Kolb,J.P., Wegmann,T.G., Guenet,J.L., 1985b. Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. Preimmunization of females with allogeneic cells. *J. Immunol.* 134, 2966-2970.
- Kilshaw,P.J., Murant,S.J., 1990. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* 20, 2201-2207.
- Kilshaw,P.J., Murant,S.J., 1991. Expression and regulation of beta 7(beta p) integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system. *Eur. J. Immunol.* 21, 2591-2597.
- King,A., 2000. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum. Reprod. Update.* 6, 28-36.
- King,A., Loke,Y.W., 1991. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol. Today* 12, 432-435.
- Koopman,L.A., Kopcow,H.D., Rybalov,B., Boyson,J.E., Orange,J.S., Schatz,F., Masch,R., Lockwood,C.J., Schachter,A.D., Park,P.J., Strominger,J.L., 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.* 198, 1201-1212.
- Kruse,A., 2000. Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und Expression von vaskulären Differenzierungsantigenen im schwangeren Uterus der Maus. *Med. Habil. Schr.* , Lübeck.
- Kruse,A., Hallmann,R., Butcher,E.C., 1999a. Specialized patterns of vascular differentiation antigens in the pregnant mouse uterus and the placenta. *Biol. Reprod.* 61, 1393-1401.
- Kruse,A., Martens,N., Fernekorn,U., Hallmann,R., Butcher,E.C., 2002. Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. *Biol. Reprod.* 66, 333-345.

- Kruse,A., Merchant,M.J., Hallmann,R., Butcher,E.C., 1999b. Evidence of specialized leukocyte-vascular homing interactions at the maternal/fetal interface. *Eur. J. Immunol.* 29, 1116-1126.
- Kunkel,S.L., Spengler,M., May,M.A., Spengler,R., Larrick,J., Remick,D., 1988. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 263, 5380-5384.
- Kusakabe,K., Okada,T., Sasaki,F., Kiso,Y., 1999. Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 1093-1100.
- Kuziel,W.A., Dawson,T.C., Quinones,M., Garavito,E., Chenuaux,G., Ahuja,S.S., Reddick,R.L., Maeda,N., 2003. CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherosclerosis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis* 167, 25-32.
- Lala,P.K., Scodras,J.M., Graham,C.H., Lysiak,J.J., Parhar,R.S., 1990. Activation of maternal killer cells in the pregnant uterus with chronic indomethacin therapy, IL-2 therapy, or a combination therapy is associated with embryonic demise. *Cell Immunol.* 127, 368-381.
- Laudanna,C., Kim,J.Y., Constantin,G., Butcher,E., 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.* 186, 37-46.
- Lee,G.K., Park,H.J., Macleod,M., Chandler,P., Munn,D.H., Mellor,A.L., 2002. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107, 452-460.
- Lenardo,M., Chan,K.M., Hornung,F., McFarland,H., Siegel,R., Wang,J., Zheng,L., 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 221-253.
- Lian,Z.X., Okada,T., He,X.S., Kita,H., Liu,Y.J., Ansari,A.A., Kikuchi,K., Ikehara,S., Gershwin,M.E., 2003. Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J. Immunol.* 170, 2323-2330.
- Librach,C.L., Werb,Z., Fitzgerald,M.L., Chiu,K., Corwin,N.M., Esteves,R.A., Grobelny,D., Galardy,R., Damsky,C.H., Fisher,S.J., 1991. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J. Cell Biol.* 113, 437-449.
- Lidstrom,C., Matthiesen,L., Berg,G., Sharma,S., Ernerudh,J., Ekerfelt,C., 2003. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50, 444-452.
- Lim,S.P., Leung,E., Krissansen,G.W., 1998. The beta7 integrin gene (*Itgb-7*) promoter is responsive to TGF-beta1: defining control regions. *Immunogenetics* 48, 184-195.
- Lipscomb,M.F., Masten,B.J., 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82, 97-130.
- Loke,Y.W., King,A., 2000. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? *Biochem. Soc. Trans.* 28, 196-198.
- Lucas,M., Schachterle,W., Oberle,K., Aichele,P., Diefenbach,A., 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 26, 503-517.

- Luo,B.H., Carman,C.V., Springer,T.A., 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619-647.
- Luster,A.D., 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 129-135.
- Lutz,M.B., Schuler,G., 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23, 445-449.
- Lutz,M.B., Suri,R.M., Niimi,M., Ogilvie,A.L., Kukutsch,N.A., Rossner,S., Schuler,G., Austyn,J.M., 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* 30, 1813-1822.
- Lyman,S.D., James,L., Vanden,B.T., de,V.P., Brasel,K., Gliniak,B., Hollingsworth,L.T., Picha,K.S., McKenna,H.J., Splett,R.R., ., 1993. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75, 1157-1167.
- Mach,N., Gillessen,S., Wilson,S.B., Sheehan,C., Mihm,M., Dranoff,G., 2000a. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 60, 3239-3246.
- Mack,M., Cihak,J., Simonis,C., Luckow,B., Proudfoot,A.E., Plachy,J., Bruhl,H., Frink,M., Anders,H.J., Vielhauer,V., Pfirstinger,J., Stangassinger,M., Schlondorff,D., 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166, 4697-4704.
- Maldonado-Lopez,R., De,S.T., Michel,P., Godfroid,J., Pajak,B., Heirman,C., Thielemans,K., Leo,O., Urbain,J., Moser,M., 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587-592.
- Maloy,K.J., Salaun,L., Cahill,R., Dougan,G., Saunders,N.J., Powrie,F., 2003. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197, 111-119.
- Mantovani,A., 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* 20, 254-257.
- Maraskovsky,E., Brasel,K., Teepe,M., Roux,E.R., Lyman,S.D., Shortman,K., McKenna,H.J., 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184, 1953-1962.
- Mattei,F., Schiavoni,G., Belardelli,F., Tough,D.F., 2001. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol.* 167, 1179-1187.
- Mayadas,T.N., Johnson,R.C., Rayburn,H., Hynes,R.O., Wagner,D.D., 1993. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74, 541-554.
- McColl,S.R., 2002. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol. Cell Biol.* 80, 489-496.

- McDermott,M.R., Brais,P.L., PLoettsche,G.C., Evelegh,M.J., Goldsmith,C.H., 1987. Expression of immunity to intravaginal herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract and associated lymph nodes. *Arch. Virol.* 93, 51-68.
- McEver,R.P., 1997. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj. J.* 14, 585-591.
- McMaster,M.T., Newton,R.C., Dey,S.K., Andrews,G.K., 1992. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J. Immunol.* 148, 1699-1705.
- Medawar,P.B., 1953. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7, 320-338.
- Metlay,J.P., Witmer-Pack,M.D., Agger,R., Crowley,M.T., Lawless,D., Steinman,R.M., 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171, 1753-1771.
- Miller,G., Pillarisetty,V.G., Shah,A.B., Lahrs,S., DeMatteo,R.P., 2003. Murine Flt3 ligand expands distinct dendritic cells with both tolerogenic and immunogenic properties. *J. Immunol.* 170, 3554-3564.
- Mincheva-Nilsson,L., 2003. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 120.
- Miranda,S., Litwin,S., Barrientos,G., Szereday,L., Chuluyan,E., Bartho,J.S., Arck,P.C., Blois,S.M., 2006. Dendritic cells therapy confers a protective microenvironment in murine pregnancy. *Scand. J. Immunol.* 64, 493-499.
- Misumi,Y., Misumi,Y., Miki,K., Takatsuki,A., Tamura,G., Ikehara,Y., 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 11398-11403.
- Miyake,K., Medina,K., Ishihara,K., Kimoto,M., Auerbach,R., Kincade,P.W., 1991. A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. *J. Cell Biol.* 114, 557-565.
- Moffett-King,A., 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 656-663.
- Mohr,F., 1862. *Lehrbuch der chemisch-analytischen Titrimethode.* Braunschweig, Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn.
- Molloy,E.J., O'Neill,A.J., Grantham,J.J., Sheridan-Pereira,M., Fitzpatrick,J.M., Webb,D.W., Watson,R.W., 2003. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood* 102, 2653-2659.
- Muller,W.A., Weigl,S.A., Deng,X., Phillips,D.M., 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 449-460.
- Munn,D.H., Zhou,M., Attwood,J.T., Bondarev,I., Conway,S.J., Marshall,B., Brown,C., Mellor,A.L., 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191-1193.

- Muntener,M., Hsu,Y.C., 1977. Development of trophoblast and placenta of the mouse. A reinvestigation with regard to the in vitro culture of mouse trophoblast and placenta. *Acta Anat. (Basel)* 98, 241-252.
- Munz,C., Dao,T., Ferlazzo,G., de Cos,M.A., Goodman,K., Young,J.W., 2005. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood* 105, 266-273.
- Murphy,P.M., Baggiolini,M., Charo,I.F., Hebert,C.A., Horuk,R., Matsushima,K., Miller,L.H., Oppenheim,J.J., Power,C.A., 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145-176.
- Murphy,S.P., Fast,L.D., Hanna,N.N., Sharma,S., 2005. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *J. Immunol.* 175, 4084-4090.
- Nagata,S., Suda,T., 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* 16, 39-43.
- Nelson,P.J., Krensky,A.M., 1998. Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 265-270.
- Norwitz,E.R., Schust,D.J., Fisher,S.J., 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 345, 1400-1408.
- O'keeffe,M., Hochrein,H., Vremec,D., Pooley,J., Evans,R., Woulfe,S., Shortman,K., 2002. Effects of administration of progenipoyetin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. *Blood* 99, 2122-2130.
- Ohl,L., Mohaupt,M., Czeloth,N., Hintzen,G., Kiafard,Z., Zwirner,J., Blankenstein,T., Henning,G., Forster,R., 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 21, 279-288.
- Ohteki,T., Tada,H., Ishida,K., Sato,T., Maki,C., Yamada,T., Hamuro,J., Koyasu,S., 2006. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J. Exp. Med.* 203, 2329-2338.
- Olson,T.S., Ley,K., 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 283, R7-28.
- Ormerod,M.G., 2000. *Flow Cytometry: A Practical Approach*, 3rd Edition. Oxford University Press (Practical Approach Series).
- Oshima,R.G., Howe,W.E., Klier,F.G., Adamson,E.D., Shevinsky,L.H., 1983. Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos. *Dev. Biol.* 99, 447-455.
- Paffaro,V.A., Jr., Bizinotto,M.C., Joazeiro,P.P., Yamada,A.T., 2003. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* 24, 479-488.
- Palucka,K.A., Taquet,N., Sanchez-Chapuis,F., Gluckman,J.C., 1998. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. Immunol.* 160, 4587-4595.

- Parr,E.L., Young,L.H., Parr,M.B., Young,J.D., 1990. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.* 145, 2365-2372.
- Patel,K.D., Cuvelier,S.L., Wiehler,S., 2002. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin. Immunol.* 14, 73-81.
- Piccinni,M.P., 2003. Role of immune cells in pregnancy. *Autoimmunity* 36, 1-4.
- Piccioli,D., Sbrana,S., Melandri,E., Valiante,N.M., 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 195, 335-341.
- Ploem,J.S., Taube,H.J., 1987. *Introduction to Fluorescence Microscopy.* Oxford University Press.
- Pollard,J.W., Bartocci,A., Arceci,R., Orlofsky,A., Ladner,M.B., Stanley,E.R., 1987. Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. *Nature* 330, 484-486.
- Pulendran,B., Banchereau,J., Maraskovsky,E., Maliszewski,C., 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 22, 41-47.
- Pulendran,B., Smith,J.L., Caspary,G., Brasel,K., Pettit,D., Maraskovsky,E., Maliszewski,C.R., 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1036-1041.
- Red-Horse,K., Drake,P.M., Gunn,M.D., Fisher,S.J., 2001. Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *Am. J. Pathol.* 159, 2199-2213.
- Reeves,J.P.R., Reeves,P.A., 2001. *Care and Handling of Laboratory animals*, Chapter 1, Unit 1.4. *Current protocols in immunology.*
- Robertson,S.A., Roberts,C.T., Farr,K.L., Dunn,A.R., Seamark,R.F., 1999. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol. Reprod.* 60, 251-261.
- Robinson,C.M., Shirey,K.A., Carlin,J.M., 2003. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 413-421.
- Rollins,B.J., Yoshimura,T., Leonard,E.J., Pober,J.S., 1990. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* 136, 1229-1233.
- Romani,N., Gruner,S., Brang,D., Kampgen,E., Lenz,A., Trockenbacher,B., Konwalinka,G., Fritsch,P.O., Steinman,R.M., Schuler,G., 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83-93.
- Rooney,I.A., Oglesby,T.J., Atkinson,J.P., 1993. Complement in human reproduction: activation and control. *Immunol. Res.* 12, 276-294.

- Rouas-Freiss,N., Goncalves,R.M., Menier,C., Dausset,J., Carosella,E.D., 1997. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 11520-11525.
- Rugh,R., 1990. *The Mouse - Its Reproduction and Development*. Oxford Science Publications.
- Rutella,S., Danese,S., Leone,G., 2006. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.
- Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Shimizu,J., Yamazaki,S., Sakihama,T., Itoh,M., Kuniyasu,Y., Nomura,T., Toda,M., Takahashi,T., 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182, 18-32.
- Schmid,I., Krall,W.J., Uittenbogaart,C.H., Braun,J., Giorgi,J.V., 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13, 204-208.
- Schmidt,C.S., Mescher,M.F., 2002. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J. Immunol.* 168, 5521-5529.
- Schrocksadel,H., Baier-Bitterlich,G., Dapunt,O., Wachter,H., Fuchs,D., 1996. Decreased plasma tryptophan in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 88, 47-50.
- Schuurhuis,D.H., Fu,N., Ossendorp,F., Melief,C.J., 2006. Ins and outs of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140, 53-72.
- Segerer,S., Cui,Y., Eitner,F., Goodpaster,T., Hudkins,K.L., Mack,M., Cartron,J.P., Colin,Y., Schlondorff,D., Alpers,C.E., 2001. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am. J. Kidney Dis.* 37, 518-531.
- Segerer,S., Cui,Y., Hudkins,K.L., Goodpaster,T., Eitner,F., Mack,M., Schlondorff,D., Alpers,C.E., 2000. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2231-2242.
- Setiadi,H., Disdier,M., Green,S.A., Canfield,W.M., McEver,R.P., 1995. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J. Biol. Chem.* 270, 26818-26826.
- Shapiro,H.M., 2003. *Practical Flow Cytometry*, 4th Edition. Wiley Liss.
- Shortman,K., Liu,Y.J., 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151-161.
- Shu,F., Holzmann,B., Seibold,F., Erle,D., Kearney,J.F., 2002. Activated alpha4 integrins are preferentially expressed on immature thymocytes and activated T cells. *Dev. Immunol.* 9, 73-84.
- Shurin,M.R., Pandharipande,P.P., Zorina,T.D., Haluszczak,C., Subbotin,V.M., Hunter,O., Brumfield,A., Storkus,W.J., Maraskovsky,E., Lotze,M.T., 1997. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol.* 179, 174-184.

- Slavik,J.M., Hutchcroft,J.E., Bierer,B.E., 1999. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol. Res.* 19, 1-24.
- Smith,S.C., Leung,T.N., To,K.F., Baker,P.N., 2000. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 697-699.
- Springer,T.A., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- Springer,T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Springer,T.A., 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol* 57, 827-872.
- Standiford,T.J., Kunkel,S.L., Kasahara,K., Milia,M.J., Rolfe,M.W., Strieter,R.M., 1991. Interleukin-8 gene expression from human alveolar macrophages: the role of adherence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5, 579-585.
- Steinbrink,K., Wolfl,M., Jonuleit,H., Knop,J., Enk,A.H., 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159, 4772-4780.
- Steinman,R.M., Nussenzweig,M.C., 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 351-358.
- Stephens,S.A., Brownlie,J., Charleston,B., Howard,C.J., 2003. Differences in cytokine synthesis by the sub-populations of dendritic cells from afferent lymph. *Immunology* 110, 48-57.
- Streeter,P.R., Berg,E.L., Rouse,B.T., Bargatze,R.F., Butcher,E.C., 1988. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331, 41-46.
- Stumbles,P.A., Strickland,D.H., Pimm,C.L., Proksch,S.F., Marsh,A.M., McWilliam,A.S., Bosco,A., Tobagus,I., Thomas,J.A., Napoli,S., Proudfoot,A.E., Wells,T.N., Holt,P.G., 2001. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J. Immunol.* 167, 228-234.
- Sung,S.S., Fu,S.M., Rose,C.E., Jr., Gaskin,F., Ju,S.T., Beaty,S.R., 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J. Immunol.* 176, 2161-2172.
- Sutherland,A.E., Calarco,P.G., Damsky,C.H., 1993. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119, 1175-1186.
- Theiler,K., 1989. *The House Mouse Atlas of Embryonic Development* 2. Aufl. Springer Verlag, New York USA.
- Tibbetts,T.A., Conneely,O.M., O'Malley,B.W., 1999. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol. Reprod.* 60, 1158-1165.
- Traver,D., Akashi,K., Manz,M., Merad,M., Miyamoto,T., Engleman,E.G., Weissman,I.L., 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.

- Turnbull,E.L., Yrlid,U., Jenkins,C.D., Macpherson,G.G., 2005. Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation in vivo. *J. Immunol.* 174, 1374-1384.
- Uckan,D., Steele,A., Cherry, Wang,B.Y., Chamizo,W., Koutsonikolis,A., Gilbert-Barness,E., Good,R.A., 1997. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 655-662.
- van Furth,R., 1989. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol.* 79, 125-150.
- Vanbervliet,B., Homey,B., Durand,I., Massacrier,C., it-Yahia,S., de,B.O., Vicari,A., Caux,C., 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur. J. Immunol.* 32, 231-242.
- Vecchi,A., Massimiliano,L., Ramponi,S., Luini,W., Bernasconi,S., Bonecchi,R., Allavena,P., Parmentier,M., Mantovani,A., Sozzani,S., 1999. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 66, 489-494.
- Verbovetski,I., Bychkov,H., Trahtemberg,U., Shapira,I., Hareuveni,M., Ben-Tal,O., Kutikov,I., Gill,O., Mevorach,D., 2002. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J. Exp. Med.* 196, 1553-1561.
- Verma,S., Hiby,S.E., Loke,Y.W., King,A., 2000. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol. Reprod.* 62, 959-968.
- Vicari,A.P., Vanbervliet,B., Massacrier,C., Chiodoni,C., Vaure,C., it-Yahia,S., Dercamp,C., Matsos,F., Reynard,O., Taverne,C., Merle,P., Colombo,M.P., O'Garra,A., Trinchieri,G., Caux,C., 2004. In vivo manipulation of dendritic cell migration and activation to elicit antitumour immunity. *Novartis. Found. Symp.* 256, 241-254.
- Vigano,P., Mangioni,S., Pompei,F., Chiodo,I., 2003. Maternal-conceptus cross talk--a review. *Placenta* 24 Suppl B, S56-S61.
- von Andrian,U.H., Mackay,C.R., 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343, 1020-1034.
- von Andrian,U.H., Mempel,T.R., 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 867-878.
- Vremec,D., Shortman,K., 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* 159, 565-573.
- Wadkins,R.M., Jovin,T.M., 1991. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry* 30, 9469-9478.
- Wagner,N., Lohler,J., Kunkel,E.J., Ley,K., Leung,E., Krissansen,G., Rajewsky,K., Muller,W., 1996. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382, 366-370.

- Walsh,F.S., Doherty,P., 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 425-456.
- Walzer,T., Dalod,M., Vivier,E., Zitvogel,L., 2005. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 5 Suppl 1, S49-S59.
- Wang,C., Umesaki,N., Nakamura,H., Tanaka,T., Nakatani,K., Sakaguchi,I., Ogita,S., Kaneda,K., 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tissue Res.* 300, 285-293.
- Weller,A., Isenmann,S., Vestweber,D., 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 267, 15176-15183.
- Wildenberg,M.E., van Helden-Meeuwsen,C.G., van de Merwe,J.P., Moreno,C., Drexhage,H.A., Versnel,M.A., 2008. Lack of CCR5 on dendritic cells promotes a proinflammatory environment in submandibular glands of the NOD mouse. *J. Leukoc. Biol.*
- Wollenberg,A., Wen,S., Bieber,T., 1999. Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* 37, 147-155.
- Wood,G.W., Hausmann,E., Choudhuri,R., 1997. Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 62-69.
- Wood,G.W., Hausmann,E.H., Kanakaraj,K., 1999. Expression and regulation of chemokine genes in the mouse uterus during pregnancy. *Cytokine* 11, 1038-1045.
- Wu,L., Li,C.L., Shortman,K., 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* 184, 903-911.
- Xie,X., Kang,Z., Anderson,L.N., He,H., Lu,B., Anne,C.B., 2005. Analysis of the contributions of L-selectin and CXCR3 in mediating leukocyte homing to pregnant mouse uterus. *Am. J. Reprod. Immunol.* 53, 1-12.
- Xu,C., Mao,D., Holers,V.M., Palanca,B., Cheng,A.M., Molina,H., 2000. A critical role for murine complement regulator crry in fetomaternal tolerance. *Science* 287, 498-501.
- Xu,H., Gonzalo,J.A., St,P.Y., Williams,I.R., Kupper,T.S., Cotran,R.S., Springer,T.A., Gutierrez-Ramos,J.C., 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180, 95-109.
- Ye,W., Zheng,L.M., Young,J.D., Liu,C.C., 1996. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J. Exp. Med.* 184, 2405-2410.
- Zarnani,A.H., Moazzeni,S.M., Shokri,F., Salehnia,M., Jeddi-Tehrani,M., 2007. Kinetics of murine decidual dendritic cells. *Reproduction.* 133, 275-283.
- Zlotnik,A., Yoshie,O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12, 121-127.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7 Tandemkonjugat
APZ	Antigen präsentierende Zellen
ATCC	American Type Culture Collection
Ak	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
CAMs	<i>cell adhesion molecules</i>
Cy	Cyanin
zDB	zentrale DB
DB	Decidua basalis
DBA	<i>Dolichos biflorus agglutinin</i>
DC	dendritische Zelle(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzelle(n)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-Selektin	Endothel-Selektin
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FL	Filter
Flt3L	Fms-like-Tyrosinkinase-3-Ligand
Flt3L-B16F10	Flt3L-transfizierte B16F10 Melanomzellen
fmE	feto/maternale Einheit(en)
FSC	<i>forward scatter</i>
GM-CSF	<i>granulocyte- macrophage colony stimulating factor</i>
HEV	<i>high endothelial venules</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
hi	hohe Expressionsdichte eines Antigens
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
iDC	<i>immature DC</i>
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase

IgG	Immunglobulin
IgSf	Immunglobulin-Superfamilie
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
<i>i.p.</i>	intraperitonial
IU	<i>international units</i>
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
LFA-1	<i>leukocyte function associated molecule-1</i>
Lk	Lymphknoten
l_0	geringe Expressionsdichte eines Antigens
LPAM-1	<i>lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic cell separator</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
med	mittlere Expressionsdichte eines Antigens
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Metrial Gland
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>
Myo	Myometrium
M ϕ	Makrophage
n.d.	nicht definiert
n.s.	nicht signifikant
NK Zelle	natürliche Killerzelle
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i>
P-Selektin	Plättchen-Selektin
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i>
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-myristat-Azetat

RT	Raumtemperatur
<i>s.c.</i>	subkutan
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{reg} Zellen	regulatorische T Zellen
uNK Zelle	uterine natürliche Killerzelle
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VZ	vaskuläre Zone

8.2 Publikationen, Kongressbeiträge und Auszeichnungen

Publikationen

Ferne Korn,U., Butcher,E.C., **Behrends,J.**, Hartz,S., Kruse,A., 2004. 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, 3423-3433.

Krause,S., **Behrends,J.**, Borowski,A., Lohrmann,J., Lang,S., Myrtek,D., Lorenzen,T., Virchow,J.C., Luttmann,W., Friedrich,K., 2006. Blockade of interleukin-13-mediated cell activation by a novel inhibitory antibody to human IL-13 receptor alpha1. *Mol. Immunol.* 43, 1799-1807.

Ferne Korn,U., Butcher,E.C., **Behrends,J.**, Karsten,C.M., Robke,A., Schulze,T.J., Kirchner,H., Kruse,A., 2007. Selectin platelet plays a critical role in granulocyte access to the pregnant mouse uterus under physiological and pathological conditions. *Biol. Reprod.* 76, 645-653.

Behrends,J., Karsten,C.M., Butcher,E.C., Wilke,S., Röbbke,A., Kruse,A., 2008. Identification of alpha4beta7- and alphaEbeta7-integrin expressing subsets of decidual dendritic-like cells within distinct microdomains of the pregnant mouse uterus. Im Reviewprozess.

Behrends,J., Horn,K., Karsten,C.M., Braun,A., Röbbke,A., Mack,M., Kruse,A. Chemokine Receptor CCR5 mediates leukocyte recruitment to the pregnant mouse uterus. Manuskript in Vorbereitung.

Behrends,J., Rissiek,B., Karsten,C.M., Röbbke,A., Kruse,A. Flt3-L increases dendritic-like cells in the blood flow and in the pregnant mouse uterus, resulting in increased abortion rate. Manuskript in Vorbereitung.

Karsten, C.M., **Behrends, J.**, Wagner, A., Fuchs, F., Figge, J., Kruse, A. Dendritic cells within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells via the production of IL-12 and IL-15. Manuskript in Vorbereitung.

Kongressbeiträge

Fernekm, U., Butcher, E.C., **Behrends, J.**, Hartz, S., Kruse, A. Deletion or inhibition of vascular homing receptors impairs leukocyte trafficking to the murine maternal/fetal interface and affects differentiation of uterine NK cells. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin 2003.

Fernekm, U., Hartz, S., **Behrends, J.**, Butcher, E.C., Kruse, A. Die Deletion oder Inhibition vaskulärer Homing-Rezeptoren beeinflusst die Leukozytenextravasation und Differenzierung uteriner NK-Zellen im schwangeren Uterus der Maus. Norddeutsche Immunologentagung, Borstel 2003.

Fernekm, U., Butcher, E.C., Schulze, T., Hartz, S., **Behrends, J.**, Kruse, A. Upregulation of specialized vascular addressins in the pregnant mouse uterus might be involved in spontaneous abortion at the post-implantation stage. 35. Joint Annual Meeting of the Dutch and German Society of Immunology, Maastricht 2004.

Behrends, J., Fernekm, U., Schulze, T., Koritke, P., Kruse, A. Unusual $\alpha 4\beta 7+ / CD11b+$ cells in the pregnant mouse uterus display characteristics of myeloid dendritic cells. 35. Joint Annual Meeting of the Dutch and German Society of Immunology, Maastricht 2004.

Krause, S., **Behrends, J.**, Lohrmann, J., Lang, S., Suofu, Y., Knoll, M., Myrtek, D., Virchow, J.C., Luttmann, W., Friedrich, K. Novel Antagonistic antibodies to the human interleukin-13 receptor α -1 chain inhibit IL-13-induced cellular responses. STS Meeting 2004: Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes, Weimar 2004.

Behrends, J., Butcher, E.C., Röbbke, A., Karsten, C.M., Kruse, A. Dendritic-like $\alpha 4\beta 7+$ cells in the pregnant mouse uterus interact with uterine NK cells. 36. Joint Annual Meeting of the Scandinavian and German Society of Immunology, Kiel 2005.

Behrends,J., Horn,K., Mack,M., ButcherE.C., Karsten,C.M., Röbbke,A., Kruse,A. Involvement of CCR5 in the recruitment of CD11c+ leukocytes to the pregnant mouse uterus. 16th European Congress of Immunology and 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris 2006.

Karsten,C.M., **Behrends,J.**, Röbbke,A., Kruse,A. Impaired murine uterine NK cell function in implantation sites of mice lacking alpha4beta7+/CD11c+ leukocytes. 16th European Congress of Immunology and 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris 2006.

Karsten,C.M., **Behrends,J.**, Röbbke,A., Fuchs,F., Wagner,A., Kruse,A. Impaired uterine NK cell function in implantation sites of mice lacking alpha4beta7+/CD11c+ leukocytes. 5th European Congress of Reproductive Immunology, Berlin 2007.

Auszeichnung

Auszeichnung mit einem Grant für die Teilnahme am “16th European Congress of Immunology and 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris 2006.

8.3 Danksagung

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Frau PD Dr. Andrea Kruse für das Überlassen des Themas und die Betreuung der Dissertation richten. Sie stand neuen Gedankengängen aufgeschlossen gegenüber und hat mich durch ihre Begeisterung immer wieder inspiriert. Zudem danke ich ihr für den möglich gemachten Aufenthalt in Stanford im Labor von Herrn Dr. Eugene C. Butcher. 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.

Für eine hilfreiche Unterstützung bei meiner Arbeit möchte ich Sylvia Hartz und insbesondere Astrid Rübke meinen Dank ausdrücken, mit der eine Zusammenarbeit immer sehr viel Spaß gemacht hat. Für die ständige Bereitschaft anregende Diskussionen zu führen und sich auszutauschen spreche ich all meinen Kollegen in Lübeck meinen Dank aus. Zu nennen wären diesbezüglich im Besonderen die „alten Hasen“ Uta Fernekorn, Torsten Schulze, Doreen Finke, Katharina Randers, Robert Hörster und Ulrich Lindner sowie auch die jungen Kollegen Alexander Unmack, Christian Karsten und Pamela Lazar-Karsten, die alle für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Ich sage Danke für eine schöne, gemeinsame Zeit. Zudem danke ich den Bachelor und Masterstudenten für eine gute kooperative Zusammenarbeit, es hat Spaß gemacht.

An dieser Stelle möchte ich allen Freunden danken, die immer ein offenes Ohr für Sorgen und Nöte hatten und mir moralische Unterstützung gegeben haben.

Ein besonderes Dankeschön richte ich an meine Freundin Suse Kyling für ihre Geduld und Rückhalt, den sie mir während der Promotionszeit entgegengebracht hat. Auch ihrer Familie sei für ihre Unterstützung gedankt.

Einen großen, herzlichen Dank schulde ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern Johann und Karola Behrends sowie meiner Oma, die durch das Vertrauen in meine Person zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

8.4 Lebenslauf

Name: Jochen Behrends
 Wohnort: Brumhagen 4d, 21244 Buchholz
 Geburtsdatum/-ort: 24.10.1975 / Norden
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig



1988-1995 Ulrichsgymnasium Norden
 1995-1996 Wehrdienst
 1996-03/2003 Diplomstudiengang Biologie an der C.v.O. Universität Oldenburg;
 Diplomarbeit: *Funktionelle Expression und Untersuchung des humanen IL-13 Rezeptors in murinen Lymphozyten*; Gesamtnote: 1,6
 04/2003-05/2008 Anfertigung der Dissertationsarbeit am Institut für Systemische Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck (bis 03/2006 als Projekt des Graduiertenkollegs 288, C5)

Auslandserfahrung

2000-2001 Auslandsstudium an der Coventry University; Abschlussnote:
 „Bachelor of Science with Honours Lower Second Class in Biological Sciences“
 04-06/2005 Forschungsaufenthalt an der Stanford University, CA, USA

Wissenschaftliche Kurse

- Strahlenschutzkurs am Zentrum für Strahlenschutz und Radioökologie der Universität Hannover mit der Bezeichnung: S0, Grundkurs, Umgang mit radioaktiven Stoffen
- Fortbildungsveranstaltung der Universität zu Lübeck für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit nach § 15 Gentechnik-sicherheitsverordnung
- Training and individual use on the Leica SP2 AOBS confocal microscope at the Cell Sciences Imaging Facility (Stanford School of Medicine, Stanford, CA, USA)
- Wissenschaftlicher Grundkurs: Durchflusszytometrie der Firma Beckman Coulter

8.5 Erklärung

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

Lübeck, den 13. Mai 2008