

# **Untersuchungen an der fetomaternalen Grenzfläche der Plazenta**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Katharina Förster  
geboren am 12.09.1978 in Karl-Marx-Stadt**

**2005**

**Erster Gutachter: PD Dr. med. habil. U.R. Markert**

**Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Med. J. Norgauer**

**Dritter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. U. Koldovsky**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**Jena, den 06.06.2006**

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AAS</b>	Antibiotische Antimykotische Lösung
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Ag</b>	Antigen
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
<b>bp</b>	Basenpaare (Maßeinheit der Länge eines DNA Doppelstranges)
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>bspw.</b>	beispielsweise
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ca.</b>	zirka
<b>CBA/JxDBA/2</b>	abortogenes Mausmodell
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation (System zur Bezeichnung von Differenzierungsantigenen)
<b>CD00+</b>	Zellen, die das Differenzierungsantigen CD00 an der Oberfläche exprimieren z.B. CD4+, CD4 positive Zellen
<b>CD00-</b>	Zellen, die das Differenzierungsantigen CD00 nicht an der Oberfläche exprimieren
<b>CD40L</b>	CD40 Ligand
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>Cy-5</b>	Farbstoff für Rotfluoreszenz bei der FACS-Analyse
<b>d</b>	Dies (lateinisch: Tag)
<b>Da</b>	Dalton
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>et al.</b>	und andere
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflußzytometer)

<b>Fas-L</b>	Fas-Ligand, entspricht CD95
<b>Fgl2</b>	Prothrombinase (bezeichnet nach dem Genlokus der für das Protein kodiert)
<b>Fgl2+</b>	Immunhistochemisch gefärbtes Gewebe, welches Fgl2 exprimiert
<b>Fgl2-</b>	Immunhistochemisch gefärbtes Gewebe, welches Fgl2 nicht exprimiert
<b>Fgl2+/+</b>	homozygot, beide Gene für Fgl2 intakt
<b>Fgl2+/-</b>	heterozygot für Fgl2 Gen, intaktes und inaktiviertes Gen
<b>Fgl2-/-</b>	homozygot für Fgl2, beide Gene inaktiviert
<b>FITC</b>	Fluoreszein (Fluoreszeinisothiocyanat)
<b>FKS</b>	fetales Kälberserum
<b>FL I, II, III</b>	Meßkanäle des Durchflußzytometers für emittierte Fluoreszenz
<b>FSC</b>	forward scatter (Vorwärtsstreulicht), Meßparameter des FACS
<b>g</b>	Gramm
<b>Gd</b>	Gestationstag
<b>h</b>	hora (lateinisch: Stunde)
<b>hCG</b>	humanes Choriongonadotropin
<b>HBSS</b>	Hanks Balanced Salt Solution (Hanks balancierte Salzlösung)
<b>HLA</b>	Hauptleukozytenantigen
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>ICAM</b>	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF</b>	Interferon
<b>k</b>	kilo (x10 <sup>3</sup> )
<b>l</b>	Liter
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>µ</b>	mikro (x 10 <sup>-6</sup> )

<b>m</b>	milli ( $\times 10^{-3}$ )
<b>M</b>	molar
<b>MACS</b>	Magnetaktivierter Zellseparator
<b>mAK</b>	monoklonale(r) Antikörper
<b>MB</b>	maternales Blut
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
<b>μ</b>	mikro ( $\times 10^{-6}$ )
<b>MilliQ Wasser</b>	mikrofiltergefiltertes Wasser
<b>min</b>	Minute(n)
<b>m<sup>2</sup></b>	Quadratmeter
<b>mRNA</b>	messengerRNA
<b>n</b>	Anzahl
<b>N3, N10</b>	3. Generation, 10. Generation
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NB</b>	Nabelschnurblut (fetales Blut)
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killer Zellen
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>Ox-2</b>	Oberflächenantigen CD200
<b>P</b>	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
<b>PBL</b>	Lymphozyten im peripheren Blut
<b>PBS</b>	Phosphat Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
<b>pc</b>	post conceptionem (nach der Empfängnis)
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>Pellet</b>	Bodensatz; hier: durch Zentrifugation sedimentierte Zellen
<b>PG</b>	Plazenta gespült
<b>PnG</b>	Plazenta nicht gespült
<b>Rb</b>	Rabbit (Kaninchen)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RPE</b>	R-Phytoerythrin

<b>rpm</b>	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Standardabweichung
<b>s.</b>	siehe
<b>S.</b>	Seite
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>sek</b>	Sekunde(n)
<b>sog.</b>	sogenannte(r)
<b>SSC</b>	sideward scatter (Seitwärtsstreulicht), Meßparameter des FACS
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TCR</b>	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor (transformierender Wachstumsfaktor)
<b>Th</b>	T-Helferzelle
<b>TLR4</b>	Toll-Like-Rezeptor 4
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>VB</b>	villöses Blut
<b>VEGF</b>	Wachstumsfaktor für vaskuläres Endothel
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>vs.</b>	versus
<b>xg</b>	x-fache Erd (9,81 m/s <sup>2</sup> )
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>z.T.</b>	zum Teil

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
1. Einleitung .....	3
1.1. Allgemeines .....	3
1.2. Das Immunsystem .....	3
1.3. Die Plazenta .....	6
1.4. Die Rolle von Fgl2 während der Schwangerschaft.....	14
2. Ziel der Arbeit .....	17
3. Material .....	19
3.1. Untersuchungen an der reifen Plazenta des Menschen.....	19
3.1.1. Geräte.....	19
3.1.2. Material.....	20
3.1.2.1. Verbrauchsmaterialien .....	20
3.1.2.2. Reagenzien.....	21
3.1.2.3. Selbstangesetzte Lösungen.....	21
3.1.2.4. Antikörper und Nachweisreagenzien.....	23
3.2. Studien am Mausmodell zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft.....	24
3.2.1. Immunhistochemische Färbung von Mausuteri.....	24
3.2.2. Genotypisierung.....	25
4. Methoden.....	28
4.1. Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Plazenta des Menschen.....	28
4.1.1. Auswahl der Plazenten für die Perfusion .....	28
4.1.2. Perfusion der Plazenta.....	28
4.1.3. Gewebdisaggregation .....	30
4.1.4. Lymphozytenisolation .....	30
4.1.5. Färbung der Lymphozyten für die Analyse im Durchflußzytometer .....	31
4.1.6. Durchflußzytometrie.....	33
4.2. Untersuchungen der Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft am Mausmodell.....	35
4.2.1. Immunhistochemische Darstellung von Fgl2-Protein in einem abortogenen Mausmodell.....	35
4.2.2. Genotypisierung von Embryonen in Fgl2+/- heterozygot gekreuzten Mäusen .....	37
5. Resultate.....	42
5.1. Ergebnisse der Untersuchungen an der Plazenta des Menschen.....	42
5.1.1. Analyse der T-Lymphozyten .....	42
5.1.2. Analyse der B-Lymphozyten .....	44
5.1.3. Analyse der natürlichen Killerzellen .....	45
5.1.4. Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern auf isolierten Lymphozyten .....	46
5.1.5. Analyse der CD14 positiven Monozyten .....	52

5.2. Ergebnisse der Studien zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft im Mausmodell .....	53
5.2.1. Immunhistochemische Analyse der Fgl2 Expression .....	53
5.2.2. Ergebnisse der Genotypisierung an Fgl2+/- heterozygot gekreuzten Mäusen .....	58
6. Diskussion .....	62
6.1. Kritische Betrachtung der Analyse der Lymphozyten in Blut und Plazenta .....	62
6.1.2. Diskussion der Ergebnisse für maternales und fetales Blut .....	63
6.1.3. Kritische Betrachtung der Resultate für villöses Blut und Plazentagewebe .....	66
6.1.3.1. Betrachtung der T-Zellpopulationen .....	66
6.1.3.2. Diskussion der Ergebnisse für natürliche Killerzellen .....	69
6.1.3.3. Diskussion der Resultate für B-Zellen .....	70
6.1.3.4. Kritische Betrachtung der Ergebnisse für Monozyten .....	72
6.1.3.5. Diskussion der Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD95, CD54 .....	72
6.1.4. Ausführungen zu Techniken und Methoden .....	75
6.1.5. Zusammenfassung zu den durchflußzytometrischen Untersuchungen an der Plazenta des Menschen .....	77
6.1.6. Zukunftsorientierte Anwendungen .....	78
6.2. Studien zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft am Mausmodell .....	80
6.2.1. Kritische Betrachtung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung .....	80
6.2.2. Diskussion der Ergebnisse der Genotypisierung .....	81
6.2.3. Diskussion zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft .....	82
7. Schlußfolgerungen .....	89
7.1. Schlußfolgerungen zu den Untersuchungen an der Plazenta des Menschen .....	89
7.2. Schlußfolgerungen zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft .....	90
Literaturverzeichnis .....	91
Verzeichnis der Abbildungen .....	104
Verzeichnis der Tabellen .....	105
Anhang .....	106
Danksagung .....	106
Lebenslauf .....	107
Publikationsliste .....	108
Ehrenwörtliche Erklärung .....	109



## Zusammenfassung

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Immunologie der Plazenta anhand von zwei Modellen, zum einen mit der Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Plazenta des Menschen, zum anderen mit der Expression von Fgl2 and der fetomaternalen Grenzfläche im Mausmodell.

### 1.) Lymphoztenpopulationen in der menschlichen Plazenta

Aus immunhistochemischen Färbungen ist die Verteilung zahlreicher Immunzell-Subpopulationen in der Dezidua und Plazenta bekannt. Die Isolierung dieser Zellen aus dem Gewebe ermöglicht die Analyse ihrer prozentualen Verhältnisse sowie ihren Einsatz in Zellkulturen.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode weiterentwickelt werden, mit deren Hilfe Plazentagewebe möglichst weitgehend von Blut gereinigt werden sollte. Diese Reinigung sollte durchflußzytometrisch geprüft werden. Außerdem sollten die Anteile zahlreicher Lymphozyten-Subpopulationen sowie ihres Aktivierungszustandes zum Zeitpunkt der Geburt gemessen werden.

Zu diesem Zweck wurden zehn Plazenten nach normal verlaufenden Schwangerschaften untersucht. Intervillöses Blut wurde mit Hilfe eines selbstkonstruierten Perfusionssystems aus der Plazenta ausgespült.

Lymphozyten wurden mittels mechanischer und enzymatischer Gewebslösung ebenso wie aus dem Blut über einen Dichtegradienten isoliert. Folgende fünf Kompartimente wurden untersucht: Gespültes und ungespültes Plazentagewebe, villöses Blut, peripheres mütterliches Venenblut, Nabelschnurblut. Die folgenden Oberflächenmoleküle wurden im Durchflußzytometer bestimmt: a) Subpopulationen: CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD45, CD56, CD138 und b) Aktivierungs- und funktionelle Marker: CD25, CD54, CD69, CD95, CD154.

Der relative Anteil der CD4+ und CD16+ Zellen im intervillösen Blut war signifikant niedriger als im peripheren Blut der Mutter und im gespülten Plazentagewebe. CD8+ waren signifikant höher in peripherem Blut vertreten. Die Verhältnisse von CD4:CD8 und CD16:CD8 sowie der Anteil von B-Zellen, Plasmazellen und CD69+ Zellen waren in der Dezidua am höchsten, dies weist auf eine T-Zellaktivierung innerhalb der Dezidua hin. Die hohe Expression des Adhäsionsmoleküls CD54 im intervillösen Blut deutet auf eine Rolle bei der Einnistung dieser Zellen in die Plazenta hin. Die CD95-Expression war im maternalen Blut am höchsten, im Nabelschnurblut am niedrigsten. Mit Hilfe der

Perfusionsmethode ist es möglich, Deziduagewebe effektiv von Blut zu reinigen. Die Zellen im villösen Blut unterscheiden sich von denen im Plazentagewebe, maternalen Blut und Nabelschnurblut. Die Methode ermöglicht die Isolation lebender Lymphozyten in großer Zahl aus verschiedenen Kompartimenten der Plazenta, welche für weitere Analysen zur Verfügung stehen.

## **2.) Untersuchungen zur Rolle der Fgl2-Prothrombinase bei immunogenen Aborten im Mausmodell**

Fgl2-Prothrombinase ist ein fibrinartiges Protein, welches mit der viralen Hepatitis, Spontanaborten und der Transplantatabstoßung assoziiert ist. Es wird vermutet, daß es über Immunzellen aktiviert wird und über die Bildung von Mikrothromben der Mediator von Abstoßungen sein könnte. Andererseits werden ihm auch schwangerschaftsunterstützende immunregulatorische Eigenschaften beigemessen.

In dem abortogenen CBA/JxDBA/2 Mausmodell, das jedoch in keimfreier Umgebung niedrige Abortraten aufweist, wurden täglich zwischen Gestationstag 5 und 13 Uteri immunhistochemisch gefärbt, um die Kinetik und Lokalisation der Fgl2-Expression in diesem Modell zu beschreiben. Eine Expression von Fgl2 war ab dem Tag der Einnistung sowohl an der fetomaternalen Grenzfläche als auch in embryonalen Geweben nachweisbar und zeigte im Verlauf der Schwangerschaft eine zunehmende Ausdifferenzierung. Die Kinetik und Lokalisation der Expression von Fgl2 Protein in maternalen und embryonalen Geweben in einer Gruppe von CBA/JxDBA/2 gepaarten Mäusen mit niedriger Abortraten indiziert, daß Fgl2 eine physiologische Rolle sowohl in der Früh- als auch in der Spätschwangerschaft spielen kann.

Des Weiteren wurden in einem Fgl2-Knockout Mausmodell Embryonen aus Fgl2+/-x Fgl2+/- Kreuzungen genotypisiert. In N10 Generationen der Mäuse (n = 100 Embryos) konnte ein selektiver Verlust von Embryonen vor Tag 10,5 für Fgl2+/- von ca. 21% für Fgl2-/- ca. 58% festgestellt werden. Das Ergebnis einer vorhergehenden Studie in der N3 Generation wurde somit in der N10 Generation reproduziert. Es kann festgestellt werden, daß der okkulte Schwangerschaftsverlust von Fgl2-/- und Fgl2+/- in Fgl2+/- heterozygoten Paarungen von Mäusen mit der Deletion des Fgl2-Gens in Verbindung gebracht werden kann. Sowohl die Abwesenheit als auch ein vermehrtes Vorkommen von Fgl2 scheinen in der Plazenta kritisch zu sein. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist noch unklar.

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeines

In den letzten Jahrzehnten ist es zu einem enormen Zuwachs an Wissen um die Immunologie der Fortpflanzung gekommen. Die Weiterentwicklung der Forschung in der Molekularbiologie und Techniken unter Zuhilfenahme von monoklonalen Antikörpern haben dazu beigetragen, die komplexe Natur der immunologischen Prozesse, welche Befruchtung, Implantation, intrauterine Toleranz, Wachstum und Entwicklung des Embryos umfassen näher zu charakterisieren. Diese Forschungsergebnisse haben zu neuen Einsichten in die Möglichkeiten zur Geburtenkontrolle, der Therapie der primären Unfruchtbarkeit und des habituellen Abortes, sowie in die Transplantations- und Tumorthherapie geführt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Immunologie der Plazenta anhand von zwei Modellen, zum einen mit der Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Plazenta des Menschen, zum anderen mit der Rolle von Fgl2 and der fetomaternalen Grenzfläche im Mausmodell.

## 1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Organismus gegen potentiell schädigende Einflüsse zu schützen. Diese können sowohl von außen eindringen (Mikroorganismen oder ihre Toxine) oder in manchen Fällen im Körper selbst entstehen (bösartige Zellen, Autotoxine). Die Antwort des Körpers auf Schadstoffe wird als Immunreaktion bezeichnet. Sie führt dazu, daß potentiell schädigende Stoffe unschädlich gemacht werden. Dabei werden spezifische und unspezifische Mechanismen unterschieden. Die unspezifische Abwehr besteht aus dem Monozyten-Makrophagen-System. Die spezifische Abwehr dagegen setzt sich aus dem lymphatischen System und dem Komplementsystem zusammen. Hauptakteure des lymphatischen Systems sind die Lymphozyten. Sie kommen sowohl im Blut als auch in den verschiedenen Organen des Körpers vor. Im Wesentlichen können nach Herkunft und

immunologischer Funktion zwei Arten von Lymphozyten unterschieden werden: B-Lymphozyten und T-Lymphozyten.

B-Lymphozyten: Ihr Name verweist auf die Bursa fabricii (bei Vögeln) bzw. Bursa-äquivalente Organe (bei Säugern) (Kayser et al. 1998). In dieses Organ wandern immunologisch noch nicht kompetente Lymphozyten aus dem Knochenmark ein und werden dort zu immunologisch kompetenten B-Lymphozyten geprägt. Die nun immunkompetenten Zellen gelangen über den Blutkreislauf zu lymphatischen Organen, wo sie verweilen. Sie sind überwiegend ortsständig (Kayser et al. 1998).

T-Lymphozyten: Diese Lymphozyten sind Thymus-abhängig. Sie werden in diesem Organ zur immunologischen Kompetenz geprägt. Im Blut überwiegen sie gegenüber den B-Lymphozyten bei weitem. Sie sind in ständiger Bewegung und wechseln ihren Aufenthaltsort innerhalb der lymphatischen Organe des Körpers (Kayser et al. 1998).

Die Lebensdauer der Zellen innerhalb beider Populationen ist recht unterschiedlich. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten können lang- und kurzlebig sein. Bei etwa 10% der Zellen beträgt die Lebensdauer 12 d und bei 90% ca. 500 d. Sie liegt außerdem bei T-Lymphozyten durchschnittlich etwas höher. Der Ersatz untergegangener Zellen erfolgt durch Zellteilung von bereits geprägten Lymphozyten (Kayser et al. 1998).

Gemeinsamkeiten: B- und T-Lymphozyten haben einige Gemeinsamkeiten, vor allem das Vorkommen von charakteristischen Rezeptoren an der Zelloberfläche. Mit diesen sind sie in der Lage hochspezifische dreidimensionale Kombinationen und Anordnungen von Atomen (antigene Determinanten, Epitope) in körperfremden Stoffen zu erkennen und zu binden. Andere Oberflächenantigene sind in die Signalverarbeitung der Zelle involviert (Kayser et al. 1998). Die Oberflächenantigene werden im sogenannten „Cluster of Differentiation“ (CD) unterschieden. Das Erkennen eines Antigens löst bei beiden Arten von Lymphozyten eine Immunantwort aus. Dies zeigt sich als erstes in der Umwandlung zu Immunoblasten. Diese Immunoblasten teilen sich mehrmals. Dadurch nimmt die Zahl der Zellen zu, die in der Lage sind mit der

antigenen Determinante zu reagieren, welche die Reaktion ausgelöst hat (klonale Vermehrung). Über weitere Entwicklungsstufen entstehen schließlich die jeweiligen Endzellen (Kayser et al. 1998).

Unterschiede: Zwischen den Endzellen bestehen gravierende Unterschiede. Die Endzellen der B-Reihe sind Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren und sezernieren. Die Bindung der Antikörper an Antigene bewirkt eine Kaskade möglicher weiterer Reaktionen, die die Vernichtung des Schadstoffes zur Folge haben. Diese Immunität wird als humorale Immunität bezeichnet. Spezifische B-Zell-Oberflächenantigene sind CD19, CD20 und CD138. CD19 und CD20 werden nur auf B-Zellen und einem Teil ihrer Vorstufen exprimiert. CD138 kommt nur auf Plasmazellen vor (Kayser et al. 1998).

Die T-Zellen verhalten sich anders. Sie bleiben mit Antigenen, die sie an spezifischen Rezeptoren ihrer Oberfläche gebunden haben, verknüpft. Sie wandeln sich in sensibilisierte T-Lymphozyten um und sezernieren Botenstoffe (Interleukine), die andere Immunzellen anlocken und aktivieren. Dies wird als zelluläre Immunität bezeichnet. Die T-Zellen wandern dann an den Ort der Abwehr. T-Zellen besitzen einen speziellen nach ihnen benannten Rezeptor den T-Zell-Rezeptor (TCR) der im Cluster of Differentiation als CD3 bezeichnet ist. Des weiteren unterscheidet man CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische Lymphozyten (Kayser et al. 1998).

Für die Intensität der Immunantwort spielt eine Rolle, wie das Antigen den Lymphozyten angeboten wird. Möglich sind eine direkte Wirkung von Antigenen und eine indirekte. Bei der indirekten spielen die Makrophagen eine große Rolle, die nach der Phagozytose die Antigene in hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche den Lymphozyten präsentieren. So wirken sie vor allem auf B-Zellen, die sich nach dem Kontakt in Plasmazellen differenzieren. Diese Umwandlung wird dann durch verschiedene Unterklassen der T-Lymphozyten reguliert, die als zytotoxische und regulatorische Zellen agieren.

Ein weiterer Zelltyp der Immunabwehr sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie exprimieren CD16 und CD56 als charakteristische

Oberflächenantigene und besitzen die Fähigkeit z.B. viral infizierte Zellen abzutöten (Kayser et al. 1998).

Jeder Immunzelltyp aber auch die anderen Körperzellen besitzen spezifische für den jeweiligen Zelltyp charakteristische Oberflächenrezeptoren bzw. –antigene. Es gibt jedoch auch Oberflächenantigene, die nicht spezifisch für eine Zellart, jedoch spezifisch für den Aktivierungsstatus der Zelle sind. Mit Hilfe von synthetisierten Antikörpern, die spezifisch an diese Antigene binden, können diese Zellen analysiert werden. Hierbei ist es zum Beispiel möglich, diese spezifischen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und so den Anteil einer bestimmten Zellart in einer Zellsuspension im Durchflußzytometer zu bestimmen. Eine andere Möglichkeit ist die immunhistochemische Darstellung der Zellen im Gewebe durch Markierung mit einem spezifischen Antikörper. Die Durchflußzytometrie bietet den Vorteil, daß lebende Zellen verwendet werden können, die danach noch für weitere z.B. funktionelle Analysen zur Verfügung stehen. Die Immunhistochemie ist von Vorteil, wenn die genaue Lokalisation der Zellen im Gewebe von Interesse ist.

### **1.3. Die Plazenta**

Eine Schwangerschaft betrifft den gesamten Organismus der Frau, es kommt in allen Geweben und Organen zu Anpassungserscheinungen. Im Vordergrund stehen die Vorgänge in den Geschlechtsorganen. Am Anfang der Schwangerschaft steht die Befruchtung. Sie findet in der Tuba Uterina statt. Dort verweilt der Keim 2-3 Tage, dann erreicht er das Uteruslumen (Knörr et al. 1989). Bereits während dieser Zeit teilt sich die befruchtete Eizelle mehrfach und es entsteht ein Zellhaufen, der als Morula bezeichnet wird. Die Morula ist von einer äußeren Hülle der Zona pellucida umgeben. Die Ernährung des Keimes in dieser Phase erfolgt durch Aufnahme von Nährstoffen aus den umgebenden Flüssigkeiten. Gleichzeitig beginnen sich die Furchungszellen zu ordnen und zu differenzieren. Die außen unter der Zona pellucida gelegenen Zellen werden zu Trophoblastzellen, aus denen in der Folgezeit die Plazenta entsteht. Die inneren Zellen bilden den Embryoblast. Bei Ankunft im Uterus löst sich die Zona pellucida auf und erweiterte Interzellularräume konfluieren zu

einer flüssigkeitsgefüllten Höhle, der Blastozoele. So ist etwa am 4. Tag aus der Morula die Blastozyste geworden. Sie produziert bereits Choriongonadotropin ein Hormon, welches der Erhaltung der Schwangerschaft dient. Die Blastozyste nistet sich am 6. Tag in der Uterusschleimhaut ein. Der Ort dieser so genannten Implantation ist meist im oberen Drittel der Hinterwand des Uterus. Eingeleitet wird sie durch den Kontakt zwischen Keim und Oberfläche der Uterusschleimhaut, durch welchen die Trophoblastzellen beginnen durch Verschmelzung unter Auflösung der Zellgrenzen den Synzytiotrophoblasten zu bilden. Verbleibende, sich lebhaft teilende, nicht verschmelzende Zellen werden als Zytotrophoblast bezeichnet (Knörr et al. 1989). Der Synzytiotrophoblast dringt nun mit Fortsätzen in das Oberflächenepithel des Endometriums ein und löst es proteolytisch auf. Dabei verlagert sich der Keim in die Uterusschleimhaut. Der Prozeß ist am 11. Tag mit dem vollständigen Eindringen des Keimes in das Stroma abgeschlossen. Während dessen bilden sich im Synzytiotrophoblasten Einschmelzungsherde, die schnell zu einem System kommunizierender Lakunen konfluieren.

Die verbleibenden Synzytiotrophoblastanteile bilden Trabekel. Durch fortschreitendes Eindringen des Synzytiotrophoblasten in das Endometrium werden etwa am 12. Tag mütterliche Blutgefäße arrodirt. Dadurch entstehen durch Blutungen aus mütterlichen Gefäßen die Lakunen und es werden endometriale Drüsen eröffnet. Aus dem Zytotrophoblasten und Anteilen des inneren Synzytiotrophoblasten entwickeln sich die Chorionplatte und die Chorionzotten. Mit der Implantation beginnen auch Veränderungen am Endometrium. Die Epithelzellen lagern Fett und Glykogen ein, wodurch sie sich vergrößern. Die so veränderten Zellen werden als Dezidualzellen bezeichnet. Insgesamt wird das Endometrium während der Schwangerschaft als Dezidua graviditatis bezeichnet. Sie gliedert sich in die Dezidua basalis am Implantationspol des Keimes, die Dezidua capsularis, die den Keim an der dem Uteruslumen zugewandten Seite bedeckt und die Dezidua parietalis, die den übrigen Teil des Uterus auskleidet. Der fetomaternal Grenzgebiet wird als Durchdringungszone bezeichnet. In diesem Bereich kommt es zu degenerativen Veränderungen. Zwischen ehemaliger Trophoblastschale und Dezidua entsteht

ein stark verzahnter Grenzbereich der den Boden des intervillösen Raums bildet – die Basalplatte. Die reife Plazenta ist scheibenförmig, diskoidal. Sie hat einen Durchmesser von ungefähr 20 cm, ist etwa 3 cm dick und 500 g schwer. Die dem Kind zugewandte Seite wird von Amnionepithel bedeckt und ist glatt. Meist leicht exzentrisch, setzt an der Oberfläche der Plazenta die Nabelschnur an. Die Plazenta gliedert sich in Chorionplatte, Zottenbäume und Basalplatte. Zwischen den Zotten befindet sich der von mütterlichem Blut durchströmte intervillöse Raum. Zotten sind die für Gas- und Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind wichtigsten Strukturen. Sie bestehen aus Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast, Bindegewebe und Gefäßen (Knörr et al. 1989).

Die Lösung der Plazenta erfolgt nach der Geburt des Kindes. Sie findet im fetomaternalen Grenzbereich statt und wird dadurch vorbereitet, daß Dezidualzellen auseinanderrücken und die Anzahl der Kollagenfasern abnimmt. Die gelöste Plazenta weist an ihrer Oberfläche stets auch Dezidualzellen auf. Unmittelbar nach der Plazentaablösung bildet sich im Wundgebiet eine Fibrintapete, die größere Blutungen verhindert. Die geborene Plazenta weist an ihrer Basalfläche netzartige Furchungen auf, die mehr oder weniger deutlich 10-40 leicht vorgewölbte Lobuli abgrenzen, die maternalen Kotyledonen entsprechen. Perfusionsstudien zeigen, daß jedes Läppchen räumlich mit dem Ausbreitungsgebiet eines oder einer Gruppe von Zottenbäumen zusammenfällt.

Die Funktion der Plazenta umfaßt folgende Gebiete:

Gliederung in Strömungseinheiten

Plazentaschranke

Hormonbildung und Induktion von Immuntoleranz

Strömungseinheiten: Mütterliches Blut verläßt die Spiralarterien an der Oberfläche der Basalplatte und tritt in den intervillösen Raum ein. Es verteilt sich dort in den zahlreichen z.T. sehr engen Spalten zwischen den Zotten so, daß eine homogene Durchströmung aller Teile der Plazenta erfolgt. Durch die Anordnung und unterschiedliche Dichte der Zotten werden Strömungsrichtung und -stärke reguliert. Dem Strömungswiderstand, der sich aus der Anordnung



der Zotten ergibt, wird dabei der entscheidende Einfluß angelastet (Knörr et al. 1989).

Plazentaschranke. Sie besteht bei der reifen Plazenta aus Synzytiotrophoblast mit Basalmembran, Zottenbindegewebe und Kapillaren. Als Austauschfläche stehen bei der reifen Plazenta 12- 13 m<sup>2</sup> Zottenoberfläche zur Verfügung. In der Mikrostruktur ergeben sich für die einzelnen Nährstoffe angepaßte Austauschflächen. Grundsätzlich erfolgt der Transport in beide Richtungen. Transportiert werden alle zur Ernährung des Kindes notwendigen Stoffe und Stoffwechselendprodukte aber auch Hormone. Für Blutzellen ist die Plazentaschranke undurchlässig. Im letzten Drittel der Schwangerschaft kommt es jedoch in geringstem Umfang doch zum Übertritt von fetalen Erythrozyten und Leukozyten in den mütterlichen Blutkreislauf.

Die Plazenta produziert außerdem eine Reihe von Hormonen. Das wichtigste ist das humane Choriongonadotropin (hCG). Es sorgt für die Aufrechterhaltung der Dezidua graviditatis, bis der Trophoblast selbst Progesteron bildet. Weitere Proteohormone sind Chorionsomatotropin, Chorionthyrotropin, Chorioncorticotropin sowie uterotopes Plazentahormon (Knörr et al. 1989).

#### Immunologische Aspekte

Die menschliche Plazenta ist ein komplexes Organ, welches unterschiedliche Rollen während der Schwangerschaft vereint.

Die Kontrolle der maternalen Immunantwort gegenüber fetalen Antigenen rückt dabei zunehmend in den Blickpunkt verschiedener Untersuchungen der immunologischen Verhältnisse in der Plazenta.

Wie die immunologischen Faktoren dieses Geschehen beeinflussen bleibt zu klären. Man müßte eigentlich erwarten, daß spätestens mit der direkten Kontaktaufnahme zwischen Konzeptus und Endometrium während der Implantation eine Immunreaktion ausgelöst würde. Der Konzeptus ist gegenüber der Mutter erbungleich, da er zur Hälfte väterliche Erbanlagen besitzt. Aufgrund der genetischen Unterschiede sind Implantation und Plazentation als Semiallo- bzw. haploidentische Transplantation aufzufassen (Knörr et al. 1989).

Dennoch tritt zu keiner Zeit während einer normalen Schwangerschaft ein immunologischer Konflikt auf. Auch mehrfache Schwangerschaften lösen keine Abwehrreaktion aus. Es gibt eine Reihe von Theorien, die einander mit zunehmendem Wissen aus experimentellen Studien abgelöst haben. Diese sind in zusammengefaßter Form in einem Review von D.A. Clark zusammengefaßt (Clark et al. 1999a) und hier wiedergegeben: Medawar hatte den semiallogenen Konzeptus als Allograft beschrieben, der Toleranz durch aktive Suppression und klonale Deletion induziert. Diese Theorie wurde verlassen, als man entdeckte, daß der semiallogene Konzeptus keine Transplantationsimmunität induziert. Eine andere Theorie betrachtete den Konzeptus als Tumor, bzw. den Trophoblasten der den Fetus schützt. Dieser Trophoblastbarriere-Immuntrophismus-Mechanismus wurde von Wegmann propagiert (Wegmann 1987). Diese Theorie wurde verlassen, da sich herausstellte, daß maternale und fetale Lymphozyten diese Barriere überwinden, d.h. die Barriere undicht ist. Die nächste Theorie ging von der Schwangerschaft als Parasit aus. Der Konzeptus nimmt alle Nährstoffe von der Mutter. Wie in anderen Parasit-Wirt-Beziehungen werden durch die Schwangerschaft außerdem stadienabhängige immunologische Einflüsse beobachtet. Aus heutiger Sicht kann keine Theorie das Phänomen Schwangerschaft aus immunologischer Sicht hinreichend erklären. Es existiert jedoch eine Reihe von Fakten, die Hinweise geben, welche Mechanismen in die Erhaltung, aber auch in die (vorzeitige) Beendigung der Schwangerschaft involviert sind.

Die Schutzmechanismen, die den Konzeptus vor der Abstoßung schützen, laufen in erster Linie lokal im embryomaternalen Kontaktbereich ab. Sie führen zu einer örtlich begrenzten Immunregulation. Im Endometrium löst bereits der erste Oberflächenzellkontakt mit dem Trophoblasten Veränderungen aus, die als Antwort auf die Anwesenheit der Blastozyste zu werten sind, also Reaktionen auf das Signal des Konzeptus darstellen. Sie bewirken eine Umstellung der Immunabwehr zur Akzeptanz und Toleranz des genetisch fremden Embryos. Es gilt als sicher, daß die Mutter die Anwesenheit des haploallogenen Konzeptus als nicht selbst erkennt, d.h. der afferente Teil der immunologischen Abwehr funktioniert durchaus. Der efferente Teil – die

eigentliche Abstoßungsreaktion – unterbleibt jedoch (Knörr et al. 1989). Als Hauptgrund auf lokaler Ebene gilt derzeit die Verschiebung des Interleukin-Gleichgewichtes von den pro-inflammatorischen Th1- zu den antiinflammatorischen Th2-Interleukinen. Es ist außerdem bekannt, daß sich die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen im Verlauf der Schwangerschaft ändert (Kruse et al. 2002). Zu Beginn dominieren NK-Zellen in der Dezidua, gegen Ende dominieren T-Zellen. Zu Beginn der Schwangerschaft kommt es zu einer Ansammlung Natürlicher Killerzellen, die anstatt zytotoxische Funktionen auszuüben, immunregulatorisch wirken und durch Produktion von Wachstums- und Angiogenesefaktoren die Trophoblastinvasion begünstigen (Ho et al. 1996). Das später dominierende T-Zell-Profil ist Th2 betont und es ist bekannt, daß eine Verschiebung hin zu Th1 mit Aborten assoziiert ist (Markert et al. 2002). Es gibt die Vermutung, daß die Anzahl maternaler Lymphozyten, die die Plazenta infiltrieren, begrenzt ist. Fas-L der von Trophoblasten exprimiert wird, soll hierbei eine Rolle spielen, indem aktivierte Th1 Lymphozyten spezifisch eliminiert werden (Hunt et al. 1997). Andererseits existiert ein Mausmodell in dem dieser Mechanismus ausgeschaltet ist, wo dennoch erfolgreiche Schwangerschaften ausgetragen werden (Clark et al. 1999a). Ein weiterer, neu entdeckter Mechanismus zum Schutz des Fetus ist ein asymmetrischer Antikörper der immunregulatorische Funktion an der fetomaternalen Grenzfläche ausübt (Canellada et al. 2002).

Der Trophoblast gibt die Signale und bahnt die Mechanismen, die erforderlich sind um die Immunantwort zu beeinflussen. Von entscheidender Bedeutung dürfte dabei eine verminderte oder fehlende Expression seiner MHC-Antigene an der Berührungsfrent sein. Diese Antigene spielen eine Rolle in der Transplantationsimmunologie und ermöglichen es dem menschlichen Organismus körpereigen und körperfremd zu unterscheiden. Der Trophoblast exprimiert keine MHC Antigene der Klasse II. Darüber hinaus führt die Expression von MHC II zum Abort (Athanasakis et al. 1995). Die Expression der Klasse I MHC auf der Trophoblastoberfläche ist vermindert, zeitweilig ganz aufgehoben (Blaschitz et al. 2001), oder aber es wird ein besonderes Klasse I MHC, HLA-G, ein Oberflächenantigen mit geringer alloantigener Wirksamkeit

exprimiert (Le Bouteiller et al. 1999). HLA-G existiert in verschiedenen Formen (zellgebunden und gelöst) und es wird ihm eine schützende Rolle gegenüber dem Fetus zugesprochen. Es wird als fetales Signal zur Regulation der maternalen Immunabwehr verstanden und bietet Schutz gegenüber zytotoxischen Lymphozyten oder Antigen-Antikörper-Komplexen. Durch Synthese oder Induktion lokal wirksamer immunsuppressiver Substanzen oder „maskierter“ Antigene (Mowbray et al. 1997, Jalali et al. 1996) verfügt der Trophoblast überdies über genügende immunsuppressive Aktivität, um direkt die mütterlichen Effektorzellen zu inhibieren und eine Abstoßung zu verhindern (Clark et al. 2003, Gorczynski et al. 2000). Schließlich produziert der Trophoblast Progesteron und andere Hormone in weit höheren lokalen als z.B. systemischen Konzentrationen, die regulatorische Funktionen auf den affarenten Teil des immunologischen Reflexbogens ausüben.

Um die maternalen immunologischen Prozesse auf der Ebene der Plazenta noch besser zu verstehen, ist es erforderlich villöses Blut und Plazentagewebe mit ihren spezifischen Zellpopulationen getrennt voneinander zu untersuchen.

Methoden um villöses Blut zu gewinnen, die bereits beschrieben wurden, waren meist aus verschiedenen Gründen problembehaftet (Moore et al. 1997). Eine der einfacheren Techniken, die Forscher anwandten, bestand daraus, in die maternale Seite der Plazentaoberfläche zu schneiden und das Blut aufzufangen, das aus der Schnittstelle abließ. Diese Methode erwies sich als suboptimal, denn das Blut der Plazenta ist reich an Gerinnungsfaktoren und koaguliert daher sehr schnell, was eine Ausbeute von mehr als ein paar Millilitern schwierig machte. Ein weiterer gravierender Nachteil dieser Methode ist, daß der Einschnitt die Chorionzotten verletzen kann, die genau unter der maternalen Oberfläche liegen. Dies führt zu einer Kontamination des maternalen Blutes mit fetalem Blut. Dies ist ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der gegenüber den maternalen Lymphozyten suppressiv wirkenden Nabelschnurblutlymphozyten. Weiterhin ist eine genaue Messung der löslichen Faktoren, wie zum Beispiel Zytokine oder Immunglobuline, im intervillösen Blut nicht mehr möglich, wenn es zu einem Austausch von maternalem und fetalem

Blut gekommen ist (Papadogiannakis et al. 1985a, Papadogiannakis et al. 1985b, Shohat et al. 1986).

Von Camelo et al. (Camelo Junior et al. 1995) wurde die Verwendung eines scharfen Gegenstandes (Stylet) beschrieben, der benutzt wurde, um die Chorionplatte zu durchstechen und so an das mütterliche Blut im intervillösen Raum zu gelangen. Sie berichteten, daß mehr als 80% der auf diese Weise gewonnenen Proben weniger als 2% fetale rote Blutzellen enthielten, jedoch zu 30% eine starke Hämolyse aufwiesen. Da die Gewinnung von Blut mit dieser Methode nur eine geringe Ausbeute ermöglicht, kann sie nur für Untersuchungen zum Stoffwechsel oder zu physiologischen Untersuchungen herangezogen werden. Sie ist unzureichend, um ausreichend Material für zellulärimmunologische Studien zu erhalten.

In anderen Studien wurde Plazentagewebe in verschiedener Art mechanisch aufgearbeitet, z.B. durch zerdrücken oder zerschneiden, in der Absicht Blut zu gewinnen (Moore et al. 1997). Dieses Vorgehen ist jedoch ungeeignet, um Material für immunologische Untersuchungen zu gewinnen, da maternales und fetales Blut frei vermischt werden. Eine mechanische Technik zur Dispersion von Plazentagewebe, um villöses Blut freizusetzen ist ebenfalls beschrieben (Rasheed et al. 1992). Die dabei erhaltenen mononukleären Zellen waren funktionell aktiv, jedoch war diese Technik dadurch charakterisiert, daß es zu einer markanten Abnahme der zellulären Entwicklungsfähigkeit kam, wenn das Prozedere nach der Geburt um mehr als 15 min verzögert wurde. Weiterhin ist nicht bekannt, inwieweit diese Methode zu einer Vermischung von fetalem und maternalem Blut geführt hat. Die Autoren versuchten, das Problem der Kontamination mit fetalen Zellen durch das Fehlen von Trophoblast- und Amnionepithelzellen zu beseitigen. Das Ausmaß der Kontamination der gewonnenen mononukleären Zellen durch fetale Leukozyten bleibt ungeklärt. Die enzymatische Andauung von Plazentagewebe, um deziduale Immunzellen aus dem Zellverband zu lösen wurde ebenfalls versucht (Ritson und Bulmer 1987). Die Entwicklung von Methodologien für die Isolation von reinem intervillösem Blut ist essentiell für die ganzheitliche Aufdeckung von Immunologie und Pathogenese auf Ebene der Plazenta.

J. Moore et al. (Moore et al. 1997) berichten über eine Perfusionstechnik, die schon für Studien der Plazentaphysiologie verwendet wurde um reines maternales Plazentablut zu gewinnen und die größeren Mengen an funktionell kompetenten mononukleären Zellen liefert. Die Anwendung dieser Methode sollte eine intensivere Charakterisierung der plazentaren Immunverhältnisse sowohl bei einer normalen Schwangerschaft, als auch während infektiöser Prozesse ermöglichen. Sie hatten jedoch nicht die Zellpopulationen im Plazentagewebe untersucht, so daß wir die Methode aufgriffen, um diese Populationen genauer zu charakterisieren.

#### **1.4. Die Rolle von Fgl2 während der Schwangerschaft**

Fgl2-Prothrombinase ist ein fibrinartiges Protein, welches mit der Letalität der viralen Hepatitis, Spontanaborten (Fetal Loss Syndrom) und der Transplantatabstoßung assoziiert ist (Ding et al. 1998, Levy et al. 2000, Clark et al. 1999b, Clark et al. 1999a, Clark et al. 2001b, Knackstedt et al. 2001, Knackstedt et al. 2003, Marsden et al. 2003). Fgl2 agiert als Prothrombinase, da es Fibrinogen in Fibrin spaltet. Dies führt zur Ausbildung von Fibrinthromben, die im Falle der Hepatitis und der Transplantatabstoßung zum Organversagen führen (Marsden et al. 2003, Ding et al. 1997, Ding et al. 1998, Levy et al. 2000, Chan et al. 2002, Gorczynski et al. 2002, Yuwaraj et al. 2001). In der Plazenta ist das Geschehen weitaus komplexer. Sowohl die Abwesenheit als auch ein vermehrtes Vorkommen von Fgl2 sind auf Plazentaebene kritisch (Knackstedt et al. 2003, Gorczynski et al. 2002, Clark et al. 2004). Prothrombinaseaktivität ist nur vorhanden, wenn das Protein mit Phospholipiden vergesellschaftet ist, wie sie typischerweise in Zellmembranen vorkommen (Chan et al. 2002). Die Anwesenheit von Gerinnungsfaktor V ist notwendig für eine maximale Aktivität von Fgl2 (Chan et al. 2002). Die Aktivität der Prothrombinase ist jedoch unabhängig von Faktor Xa (Chan et al. 2002). Zellen, welche Fgl2 exprimieren sind unter anderem Makrophagen, vaskuläre Endothelzellen, fetale Trophoblasten und eine Subpopulation der dezidualen Stromazellen (Ding et al.

1998, Levy et al. 2000, Clark et al. 2001b, Chan et al. 2003, Marsden et al. 2003).

Fgl2 kann des Weiteren als ein lösliches von T-Zellen sezerniertes Protein, genannt Fibroleukin, auftreten, welches keine Prothrombinaseaktivität besitzt (Marazzi et al. 1998). Neuere Untersuchungen lassen eine immunsuppressive Aktivität des löslichen Fgl2 vermuten, mit dendritischen Zellen als möglichem Angriffspunkt (Chan et al. 2003). Obwohl man die Prothrombinase und das lösliche Fibroleukin funktionell unterscheiden kann, werden sie durch das gleiche Fgl2-Gen kodiert. Eine erhöhte Expression von Fgl2-Prothrombinase wurde in Verbindung gebracht mit erhöhten Th1-abhängigen Spontanabortraten in CBA/JxDBA/2 Kreuzungen von Mäusen, als auch in einigen schwangeren Frauen mit wiederkehrenden, anderweitig nicht erklärbaren Fehlgeburten von chromosomal normalen Embryonen (Clark et al. 1998, Clark et al. 2001b, Knackstedt et al. 2001, Knackstedt et al. 2003). Die Fgl2 Expression wird im Uterus von schwangeren Mäusen durch proinflammatorische abortogene Zytokine wie INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gesteigert. Dabei wird durch die Aktivierung von Thrombin die Entzündungsreaktion und Fibrinablagerung gefördert, was wiederum den Blutfluß zu der sich entwickelnden Plazenta stoppt (Clark et al. 2001b). Die Folge hiervon kann im ungünstigsten Fall ein Abort bzw. in der Maus die Resorption des Embryos sein. Die Zytokine werden unter anderem durch potente Abortogene – bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) – stimuliert, welche über den Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) agieren (Clark et al. 2001b). Da die Sensitivität gegenüber zytokininduzierten Aborten abhängig von der endogenen mikrobiellen Flora (einer Quelle für LPS) in der Mauskolonie variieren kann, ist es verlässlicher für diese Untersuchungen das LPS als Trigger der Aborte zu injizieren und die Mäuse in keimfreier Umgebung zu halten (Clark et al. 2004).

Eine Blockade des Fgl2 mit spezifischen neutralisierenden Antikörpern kann im CBA/JxDBA/2 Mausmodell Aborte verhindern, die durch Injektionen von INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induziert wurden (Clark et al. 1998, Clark et al. 2001b). Es wird untersucht ob der neutralisierende Antikörper Aborte durch injiziertes LPS ebenso verhindern kann.

Ein weiterer Ansatz zur Entschlüsselung der Rolle von Fgl2 an der Fetomaternalen Grenzfläche wurde durch die Entwicklung eines Fgl2 Knockout Mausmodells auf die Wege gebracht. Das Modell war ursprünglich zur Erforschung der Rolle von Fgl2 beim Verlauf der viralen Hepatitis und der Transplantatabstoßung erzeugt worden. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Reproduktion der erzeugten Tiere einige Abnormalitäten aufwies. Dies führte zu der Erkenntnis, daß nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die Abwesenheit von Fgl2 an der fetomaternalen Grenzfläche eine herausragende Rolle spielt (Clark et al. 2004).



## 2. Ziel der Arbeit

Ein Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer Perfusionstechnik um Lymphozyten verschiedener Plazentakompartimente genauer untersuchen zu können.

In Anlehnung an vorausgegangene Arbeiten wie z.B. von J.M. Moore et al. wurde zunächst eine Perfusionsvorrichtung entwickelt und gebaut, mit der man durch Perfusion der maternalen Seite villöses Blut aus der Plazenta gewinnen konnte. Weitergehend sollten aber auch gewebständige Lymphozyten aus dem Plazentagewebe, und zwar aus dem vom Blut gereinigten und aus dem nativen, zur Untersuchung genutzt werden. Zum einen, um Vergleichsmöglichkeiten zu anderen Techniken, über die ebenfalls bereits berichtet wurde, zu haben, zum anderen, um mehr Information über mögliche Besonderheiten dieser Populationen zu erhalten. Dafür wurde sowohl perfundierte Plazenta als auch native Plazenta weiterverarbeitet und für die Untersuchung genutzt. Für bessere Vergleichbarkeit und im Hinblick auf Unterscheidung zwischen mütterlichen und kindlichen Lymphozyten wurden auch PBLs von Mutter und Kind untersucht. Bei allen Versuchsreihen sollten die Lymphozyten verschiedener Plazentakompartimente durch FACS-Analyse genauer auf Morphologie, Zustand und Aktivierung untersucht werden. In der Vergangenheit sind in unserem Labor solche Studien an nicht perfundiertem Plazentagewebe durchgeführt worden. Diese könnten möglicherweise durch die Perfusionstechnik nochmals in verfeinerter und damit genauerer Art und Weise ergänzt werden. Diese Arbeit ist im Hinblick darauf als Voruntersuchung aufzufassen, mit der besonders interessante Lymphozytenpopulationen ermittelt werden sollten. Durch die Technik der Gewinnung von villösem Blut mittels Perfusion sollen lebende Zellen in großer Zahl für die Untersuchung nutzbar gemacht werden, welches ein klarer Vorteil gegenüber der immunhistochemischen Darstellung, welche die genaue Lokalisation im Gewebe zeigt, ist. Durch diese Methode könnten die Zellen zwar ebenfalls charakterisiert werden, stünden jedoch später nicht für funktionelle Analysen, z.B. in Zellkulturen, zur Verfügung.

Ziel der Untersuchungen zu Fgl2 war es zum einen, die Expression von Fgl2 an der fetomaternalen Grenzfläche in einem CBA/JxDBA/2 Mausmodell zu beschreiben, welches zu erhöhten Abortraten neigt. Diese erhöhten Abortraten treten in dem Modell unter Streß auf, unter Haltung in keimfreier Umgebung sind die Abortraten nur leicht erhöht. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse entsprechend untergebracht. Das Expressionsmuster sollte Hinweise auf die Kinetik, Lokalisation und auch die Rolle der Fgl2-Expression an der Fetomaternalen Grenzfläche im Verlauf der Schwangerschaft geben.

Die Untersuchungen an dem Fgl2 Knockoutmaus-Modell führten eine im Vorfeld begonnene Studie weiter. Es sollte getestet werden, ob N10 Generationen von Fgl2-Knockout-Mäusen ebenfalls das zuvor an N3 Generationen beobachtete Abortverhalten zeigten, um auszuschließen, daß die Verluste der Embryonen auf Einflüsse durch Inzucht oder den Heterozygoten Hintergrund der N3 Mäuse zurückzuführen sind. Zu diesem Zweck wurden die Embryonen aus Fgl2+/- heterozygoten Kreuzungen von Mäusen der N10 Generation zu verschiedenen Gestationszeitpunkten genotypisiert.

### 3. Material

#### 3.1. Untersuchungen an der reifen Plazenta des Menschen

##### 3.1.1. Geräte

Biological Safety Cabinet SG-400	The Baker Company
Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung Hera Cell	Hereaus
Dampfsterilisator, Typ KSG 112-2	Fabriknummer 7258, Baujahr 1996
Digitalkamera Sony-Cybershot DSC-S75	Sony, Deutschland
Edelstahltablett	Laborbestand
Edelstahlgefäße	Laborbestand
Fluoreszenz-Durchflußzytometer „DAKO-Galaxy“	DakoCytomation GmbH
Glasgefäße	Rasotherm
Laborwaage, OWA Labor	Sartorius GmbH
Laborwaage, Sartorius Basic	Sartorius GmbH
Mikroskop „Axiovert“ 25C	Carl Zeiss Jena GmbH
Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH
Perfusionsanlage (mit Schläuchen, Kanülen, Pumpe)	Laborbestand
Peristaltikpumpe, 3 Kanäle, 6 oder 8 Rollen	Ismatec-Laboratoriumstechnik
Pipetten, Eppendorf Research einstellbar von 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettus Akku	Hirschmann Laborgeräte
Plastikbox	Laborbestand
Schere	Laborbestand
Sieb, handelsübliches	Laborbestand
Sieb, Weite 250 µm, Retsch	Nr.: 342 050 51, Fisher Scientific
Software Partec FloMax Version 2.3c	Partec
Ultraschallbad USR 3	Julabo
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad mit Temperaturregelung	Huber Medigen
Zellzählkammer nach Neubauer „Neubauer-Improved“ Tiefe 0,100mm, 0,0025 mm <sup>2</sup>	
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus
Mikro 22R	Hettich
Rotor 1015	Hettich

Rotor 1016	Hettich
Rotor 1159	Hettich
Laborfuge T	Heraeus
Universal 30F	Hettich
Rotor 1424 A	Hettich

### 3.1.2. Material

#### 3.1.2.1. Verbrauchsmaterialien

Einmalspritze, 20 ml, steril	Nr.: 4606205 V, Braun Melsungen AG
Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml	verschiedene Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 ml	verschiedene Hersteller
FACS-Röhren	Nr.: 55.484, Sarstedt
Laborflaschen mit Gewinde, 500 ml	Nr.: 9072995Jürgens
Monovette, 9ml, Lithium-Heparin beschichtet	Nr.: 02.1065.001, Sarstedt
Monovette, 9ml, Kalium-EDTA beschichtet	Nr.: 02.1066.001, Sarstedt
Monovette Kanüle (0,9x38mm)	Sarstedt
Multiadapter für S-Monovette	Nr.: 14.1205, Sarstedt
Multifly-Set, (0,6x19mm)	Nr.: 85.1638.005, Sarstedt
Objektträger mit Deckgläsern	Artikelnummer 021102, Menzel-Gläser
Parafilm	Sarstedt
Pasteurpipetten 2, 5, 10, 25 ml	Nr.: 6502-6525, Advantage
Pipettenspitzen, weiß, gelb und blau	verschiedene Hersteller
Skalpell präzisa plus, steril	Dahlhausen
Testtubes, 15 ml, steril, Polypropylen	Nr.: 188271, Greiner
Testtubes , 50 ml, steril, Polypropylen	Nr.: 227261, Greiner
Umbilikalvenenkatheter	
Zellkulturflaschen, 250 ml, steril	Nr.: 658170, Greiner
Zellkulturschale 100x20mm, steril	Nr.: 35 3003, Falcon

### 3.1.2.2 Reagenzien

BSA, bovines Serumalbumin	Nr.: A 3803, Sigma
Cleaning Solution	DakoCytomation GmbH
EDTA-Pulver, FW 372,2	Nr.: 6381-92-6, Sigma
Ethanol	Laborbestand
FKS, Foetales Kälberserum	Nr.: 10270-106, Gibco BRL
Ficoll, isoton, Dichte 1,077 g/ml	Biocoll
Formalin	Laborbestand
Formaldehyd	Laborbestand
HBSS	Sigma
humanes Serum	Transfusionsmedizin Jena
Kollagenase	Nr.: C 9891, Sigma
Lymphozytentrennmedium CSM 1077, 500ml	Nr.: J15-004,
Natriumazid	Laborbestand
Natriumchlorid	Laborbestand
PBS, without Natrium, Magnesium, steril	Nr.: BE 17 516 F, Bio Whittaker
PBS 10x, without Natrium, Magnesium, steril	Nr.: BE 17 517 Q, Bio Whittaker
pH-Teststreifen	Nr.: 1628, Whatman
Sheath fluid	DakoCytomation GmbH
Tween	Nr.: P7949, Sigma

### 3.1.2.3. Selbstangesetzte Lösungen

Blocking-Lösung:

70 ml PBA

30 ml Humanes Serum (hitzeinaktiviert bei 56°C, 30 min)

gelagert bei 4°C

Fixativ:

0,05% Formaldehyd in HBSS

Fixierlösung:

50 ml PBS  
50 ml 5%ige Formaldehydlösung  
gelagert bei 4°C

NaCl-Lösung 0,9%:

9g NaCl  
1000 ml Aqua dest.  
Autoklaviert  
gelagert bei RT

PBA:

PBS  
5% FKS (hitzeinaktiviert bei 56°C, 30 min)  
0,1% Natriumazid  
gelagert bei 4°C

PBS unsteril

50ml 10x PBS  
450ml Aqua dest.  
gelagert bei 4°C

PBS/EDTA 50mM:

9,305 g EDTA  
500 ml PBS  
gelagert bei 4°C

Perfusionslösung:

NaCl 0,9%  
40ml 50mM EDTA/PBS  
gelagert bei 4°C

### 3.1.2.4. Antikörper und Nachweisreagenzien

Lieferant Dako, Deutschland

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Marker für die Durchflußzytometrie**

Produkt	Fluorochrom	Art	Katalognummer
Anti-Human-CD3	RPE-Cy5	Monoclonal Mouse	C 7067
Anti-Human-CD3	FITC	Monoclonal Mouse	F0818
Anti-Human-CD4	FITC	Monoclonal Mouse	F 0766
Anti-Human-CD8	FITC	Monoclonal Mouse	F 0765
Anti-Human-CD14	FITC	Monoclonal Mouse	F 0844
Anti-Human-CD16	FITC	Monoclonal Mouse	F 7011
Anti-Human-CD19	RPE	Monoclonal Mouse	R0808
Anti-Human-CD20	RPE-Cy5	Monoclonal Mouse	C 7132
Anti-Human-CD25	RPE	Monoclonal Mouse	R 0811
Anti-Human-CD45	RPE-Cy5	Monoclonal Mouse	C7099
Anti-Human-CD54	FITC	Monoclonal Mouse	F 7143
Anti-Human-CD56	RPE	Monoclonal Mouse	R 7127
Anti-Human-CD69	RPE	Monoclonal Mouse	R 7173
Anti-Human-CD95	RPE	Monoclonal Mouse	R 7154
Anti-Human-CD138	RPE	Monoclonal Mouse	R 7229
Negativkontrolle IgG1	FITC, RPE,	Mouse	X 0956
Triple Colour Reagent	RPE-Cy5		





### 3.2.2. Genotypisierung

#### Puffer und Reagenzien:

Agarose	(Bioshop # AGA 001)
Buffer saturated phenol: pH 8,0, Lagerung bei 4°C	(Invitrogen Cat. 15513-047)
Chloroform	(ACP UN 1888)
Distill H <sub>2</sub> O RNA free	(Invitrogen, 10997-015)
Ethanol, Lagerung bei -20°C	(Commercial Alcohol Inc. 500 ml, USP+432516)
Ethidium Bromid	(Bioshop #ETB 444)
Glacial Acetic Acid	(EM Science B 10001-8)
Isopropanol, Lagerung bei -20°C	(Sigma I-9516)
Loading Puffer	(MBI #R0411)
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	(Invitrogen 18038-042)
Tris-HCl 1M	(Sigma T-3038)
Sodiumchloride 5M solution	(Sigma S-5150)
0,5M ADTA pH 8,0	(GibcoBRL, Kat.-Nr. 15575038)
10XPCR Puffer	(Invitrogen y02028)
50mM MgCl <sub>2</sub>	(Invitrogen y02016)
100mM dNTP	(Invitrogen 10297-018)
10mM dNTP	(Invitrogen 18427-013)
Primer:	
K01: 22 mer mit T <sub>m</sub> =73,3°C	
5'TGC TCA AAG AAG TGC GGA CCC T 3'	
K02: 21 mer mit T <sub>m</sub> =72,2°C	
5'CAC CTA CCC GGC TGT GAT TGC 3'	
LacZ in NLS-19 mer mit T <sub>m</sub> =70,4°C	
5'CCC ATG CTC CCC ACT TTG C 3'	

- 1M TRIS 0,5 l, pH 8,0 (Bioshop # Tris 001, MW 121,14)  
 60,57 g Tris + 400 ml MilliQ Wasser,  
 einstellen des pH auf 8,0  
 auffüllen auf 500 ml
- 0,5 M EDTA 0,5l, pH 8,0 (Bioshop# EDTA 001, MW 372.24)  
 93,06g + 400ml MilliQ Wasser,  
 pH einstellen auf 8,0 auffüllen auf 500ml
- 20% SDS 0,5l (Bioshop # SDS 001)  
 100g SDS mit MilliQ wasser auf 500ml auffüllen
- 5M NaCl 0,5l (Bioshop # NaCl 001, MW 58,44)  
 146,1g NaCl mit MilliQ Wasser auf 500ml auffüllen
- Proteinase K (Sigma P-2308),  
 100mg/Flasche, füge 10 ml MilliQ Wasser zu,  
 verdünne auf 10mg/ml, Aliquotiere in Eppendortubes zu  
 je 0,5 ml, Lagerung bei -20°C

Lysis-Puffer Nr.1:

- 10mM Tris pH 8.0
- 1mM EDTA pH 8.0
- 25mM NaCl

Aktivierter Lysis-Puffer Nr.1: 20µl Proteinase K in 1ml LysisPuffer (10mg/ml)

## Lysis-Puffer Nr.2:

Grössere Menge (500ml) wurde vorbereitet, in 25ml Falsons aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für 500 ml:

	1M Tris, pH
50ml	8,0
5ml	0,5M EDTA
5ml	20%iges SDS
20ml	5M NaCl
440ml	Aqua dest.

Aktivierter Lysis-Puffer Nr.2: 20µl Proteinase K in 1ml Lysis-Puffer Nr.2

## 50X TAE Puffer:

242g	TRIS
	Glacial Acetic
57,1 ml	Acid
100 ml	0,5M EDTA
auf 1l	mit MilliQ
auffüllen	Wasser

## 1X TAE Puffer:

20 ml 50X TAE + 980ml MilliQ Wasser

## **4. Methoden**

### **4.1. Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Plazenta des Menschen**

#### **4.1.1. Auswahl der Plazenten für die Perfusion**

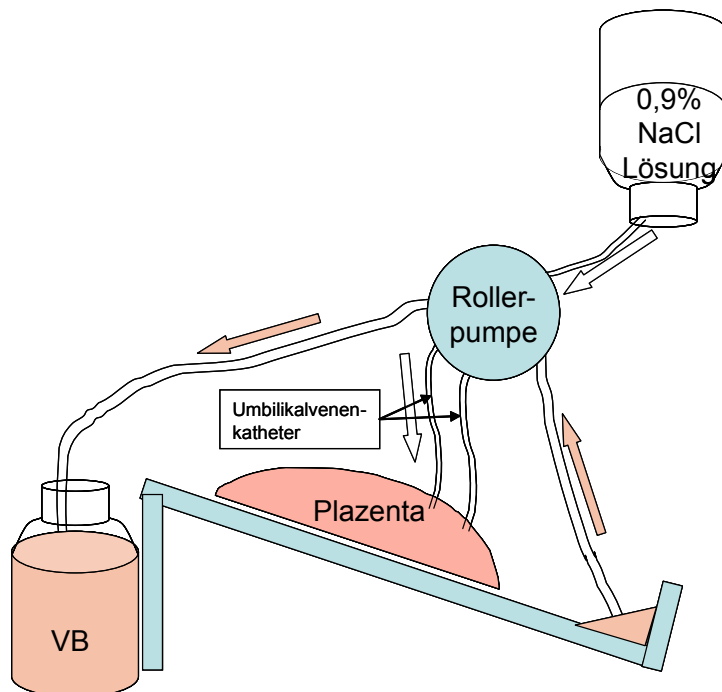
Diese Studie wurde an der Universitätsfrauenklinik (UFK) der Friedrich - Schiller – Universität (FSU) Jena in der Abteilung für Geburtshilfe durchgeführt. Die Plazenten stammen von Frauen, die im Kreissaal der UFK der FSU entbunden hatten. Vorzugsweise wurden Plazenten nach Spontangeburt oder nach Sectio Cesarea auf Wunsch der werdenden Mütter, in jedem Fall von Einlingen verwendet. Es wurde weiterhin darauf geachtet, daß ein unkomplizierter Schwangerschaftsverlauf vorgelegen hatte. Nur solche Plazenten wurden in die Studie eingeschlossen, die nach einer Routineuntersuchung durch die Hebammen im Kreissaal makroskopisch intakt erschienen. Die für die Untersuchung verwendeten Puffer und Reagenzien waren handelsübliche Präparationen oder wurden in eigener Arbeit angesetzt. Die Plazenten wurden nach dieser Untersuchung unsteril in einer Plastikbox mit 50 ml PBS/50 mM EDTA versetzt um die Gerinnung des Blutes zu stoppen. Sodann erfolgte der Transport ins Labor. Die Plazenten wurden innerhalb einer Stunde nach der Geburt bearbeitet.

Zusätzlich wurden jeweils eine Probe peripheres Venenblut (9ml) und Nabelschnurblut (9ml) zur Untersuchung gewonnen.

#### **4.1.2. Perfusion der Plazenta**

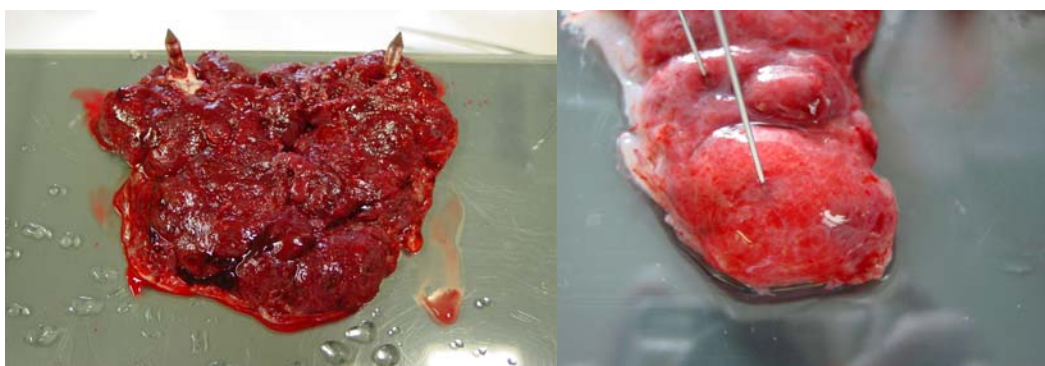
Die Plazenta wurde auf einem Stahltablett nochmals ausgiebig mit PBS/EDTA gespült, um ausgetretenes Blut zu entfernen. Anschließend wurde die Oberfläche der maternalen Seite auf Beschädigungen der einzelnen Lobi untersucht. Auf Basis dieser Untersuchung wurde der am wenigsten affizierte Lobus schließlich für die Perfusion ausgewählt und freipräpariert. Er wurde dann mit der maternalen Seite zu oberst mittels der Eihäute in den oberen Teil der Perfusionsvorrichtung eingespannt, (Abbildungen 1 und 2) um das villöse Blut

auszuschwemmen, wurden nun zwei Umbilikalvenenkatheter in die Oberfläche eingestochen, nicht zu tief um die Chorionzotten nicht zu verletzen. Durch eine Peristaltikpumpe, die eine Flußrate 7-8 ml pro Minute erzeugte, wurden insgesamt zwei Liter sterilisierte 0,9%ige Kochsalzlösung über die Katheter ins Gewebe geleitet. Ausgeschwemmtes intervillöses Blut vermischt mit Kochsalzlösung sammelte sich an der Unterkante der Apparatur und wurde über einen Sauger, der ebenfalls an die Pumpe angeschlossen war in eine Flasche überführt. Daraus erfolgte im Anschluß die Lymphozytenseparation.



**Abbildung 1**  
**Schematische**  
**Darstellung der**  
**Perfusionsanlage**

Die dicken Pfeile im Bild verdeutlichen die Strömungsrichtung in den Schläuchen, weiß für Spüllösung, rot für VB.



**Abbildung 2 Plazenta vor und nach der Perfusion**

Im linken Teil des Bildes ist die Plazenta vor der Perfusion gezeigt, wie sie in dem Apparat eingespannt ist, im rechten ist perfundiertes Plazentagewebe gegen Ende des Perfusionsvorganges abgebildet

#### **4.1.3. Gewebsdisaggregation**

Ab diesem Arbeitsschritt wurde alles Weitere an einer sterilen Arbeitsbank mit laminarem Gegenstrom durchgeführt. Vor Verwendung wurden die Arbeitsgeräte im Autoklaven behandelt, oder sterile Einmalprodukte verwendet.

Zur Präparation wurde der gespülte Teil, sowie auch ein weiterer, ungespülter Teil der Plazenta verwendet. Die Gewebeproben wurden zentral entnommen und waren ca. 5x5 cm groß und umfaßten alle Schichten der Plazenta. Für die Lymphozytenisolation wurden die Eihäute abpräpariert und das gesamte verbleibende Gewebe für die Isolation genutzt. Beide Proben wurden in 50 ml PBS suspendiert, mechanisch zerkleinert und mit je 100 µl Kollagenase 5 min bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension zunächst über ein grobmaschiges Sieb abfiltriert und der Gewebebrei aus dem Sieb mit PBS resuspendiert. Anschließend wurde nochmals filtriert. Die so gewonnene Zellsuspension enthielt noch größere Gewebesteile, die nachfolgende Arbeiten mit der Pipette behinderten, deshalb wurde die Suspension nochmals durch ein feineres Sieb gefiltert.

#### **4.1.4. Lymphozytenisolation**

Separation mittels Ficoll

Zur Isolierung der Zellen wurde das Blut zunächst 1:1 mit PBS verdünnt. Die Zellsuspensionen aus Plazentagewebe wurden unverdünnt weiterverarbeitet. Das villöse Blut wurde durch Abzentrifugieren bei 100xg und Verwerfen des Überstandes, sowie nachfolgende Resuspension in PBS aufgearbeitet. In einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) wurden 3 ml Ficoll-Isopaque-Lösung (spezifische Dichte 1,077 g/ml, 10°C) vorgelegt, dann 10 ml der jeweiligen Probe darüber geschichtet und zentrifugiert (20 min, RT, 700xg). Auf Grund der spezifischen Dichte der mononukleären Zellen sammelten sich diese zusammen mit Thrombozyten, als so genannte Interphase, zwischen Plasma bzw. PBS und Ficoll, während Erythrozyten und Granulozyten sich als Pellet am Röhrchenboden absetzten.

Gewinnung der mononukleären Zellen aus der Ficoll-Separation:

Die Interphase wurde vorsichtig abgesaugt und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Durch dreimaliges Zentrifugieren mit absteigenden g-Zahlen (430 xg, 250 xg, 80 xg, jeweils 10 min bei RT) und anschließende Resuspension in PBS wurden die mononukleären Zellen gewaschen und ein großer Teil der Thrombozyten entfernt. Die Ausbeute an mononukleären Blutzellen betrug bei diesem Verfahren 1 bis 2 x 10<sup>6</sup> pro ml Vollblut. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet der mononukleären Zellen in PBS aufgenommen. In der Neubauerkammer wurde die Zahl Zellen und bestimmt und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 2 x 10<sup>6</sup>/ml eingestellt.

#### **4.1.5. Färbung der Lymphozyten für die Analyse im Durchflußzytometer**

Für weitere Untersuchungen zum Aktivierungszustand der mononukleären Zellen und um Aussagen darüber treffen zu können in welchem Verhältnis zueinander sie in der jeweiligen Lösung vorliegen wurden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern der Firma DAKO markiert.

In einem vorbereitenden ersten Arbeitsschritt wurden die Zellen zunächst mit einer Blockinglösung für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Antikörpergemische (in der Tabelle 2 mit Nummern bezeichnet) wurden jeder Probe (NB, MB, VB, PG, PnG) zugegeben. Tabelle 2 veranschaulicht dieses Schema:

**Tabelle 2: Schematische Darstellung des Pipettierschemas in Vorbereitung auf die durchflußzytometrische Analyse**

Kodierung für verwendete FACS-AK		Proben				
		NB	MB	VB	PG	PnG
1 = CD4 CD25	FITC = FL I RPE = FL II	Nb1	Mb1	Vb1	Pg1	Png1
2 = CD16 CD56	FITC = FL I RPE = FL II	Nb2	Mb2	Vb2	Pg2	Png2
3 = CD8 CD69	FITC = FL I RPE = FL II	Nb3	Mb3	Vb3	Pg3	Png3
4 = CD54 CD95 CD3	FITC = FL I RPE = FL II RPE-CY-5 = FL III	Nb4	Mb4	Vb4	Pg4	Png4
5 = CD14 CD138 CD20	FITC = FL I RPE = FL II RPE-CY5 = FL III	Nb5	Mb5	Vb5	Pg5	Png5
6 = CD3 CD19 CD45	FITC = FL I RPE = FL II RPE-Cy5 = FLIII	Nb6	Mb6	Vb6	Pg6	Png6
7 = IgA IgM CD20	FITC = FL I RPE = FL II RPE-CY5 = FL III	Nb7	Mb7	Vb7	Pg7	Png7
8 = Negativkontrolle	FITC/ RPE/ RPE-Cy5	MbNeg	MbNeg	VbNeg	PgNeg	PngNeg

NB kennzeichnet Nabelschnurblut

MB kennzeichnet Maternales Blut

VB kennzeichnet Villöses Blut

PG kennzeichnet Plazenta gespült

PnG kennzeichnet Plazenta nicht gespült

FITC, RPE, RPE-Cy5 kennzeichnen den mit dem Antikörper konjugierten Fluoreszenzfarbstoff

FL I, II, III kennzeichnen die dem Farbstoff entsprechenden Detektoren des FACS

Durch die verwendeten Marker erhielten wir also Informationen zur Aktivierung, Proliferation und Kostimulation von Zellen untereinander und zur Adhäsionskapazität der Zellpopulationen in der Plazenta.



## a) Marker für die Analyse der verschiedenen Lymphozytenpopulationen

anti-CD3	(T-Lymphozyten)
anti-CD4	(T-Helfer-Lymphozyten)
anti-CD8	(zytotoxische T-Lymphozyten)
anti-CD14	(Lipopolysaccharidrezeptor auf Monozyten und Makrophagen)
anti-CD16	(Natürliche Killer Zellen, vor allem im peripheren Blut)
anti-CD19	(B-Lymphozyten, außer Plasmazellen)
anti-CD20	(B-Lymphozyten)
anti-CD45	(Leukozyten außer ortsständige B-Lymphozyten, Plasmazellen, Thrombozyten)
anti-CD56	(Natürliche Killer Zellen, im peripheren Blut und Plazentagewebe)
anti-CD138	(Plasmazellen)

## b) Marker für die Analyse des Aktivierungsstatus:

anti-CD25	(Interleukin-2-Rezeptor, Alpha-Kette, Aktivierungsmarker)
anti-CD54	(Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
anti-CD69	(Früher Aktivierungsmarker)
anti-CD95	(Fas, Apoptosemarker)
anti-CD154	(CD40-Ligand auf T-Zellen)

Dabei wurden auf 50µl Probe jeweils 2,5 µ Antikörperlösung verwendet. Die Proben wurden nach der Färbung 15 min im Dunklen auf Eis inkubiert. Anschließend mit PBA gewaschen und mit 0,05% Formaldehyd in HBSS fixiert. Bis zur Messung wurden die Zellen im Dunklen bei 4°C gelagert. An einem der nächsten drei Tage wurde die Messung im Durchflußzytometer Typ Galaxy der Firma DAKO durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software FloMax der Firma Partec. Nach diesem Schema wurde zehn Plazenten repräsentativ perfundiert und analysiert.

**4.1.6. Durchflußzytometrie**

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht darauf, daß Zellen aus einer Suspension über ein Probenführungssystem vereinzelt werden und dann

hintereinander einen Laserstrahl kreuzen. Das dabei gestreute Licht des eingesetzten Lasers mit unveränderlicher Wellenlänge wird in Richtung des Strahls (Vorwärtsstreulicht, FSC) und im 90° Winkel dazu (Seitwärtsstreulicht, SSC) aufgefangen und als elektronisches Signal an den angeschlossenen Computer weitergeleitet. Das Ausmaß der Streuung ist beim Vorwärtsstreulicht abhängig von der Größe und dem Refraktionsindex des Partikels, beim Seitwärtsstreulicht von seiner Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität). Das hier verwendete DAKO-Galaxy Gerät arbeitet mit einem Argonionenlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt. Zusätzlich zu den Streulichtdetektoren registriert das Gerät Fluoreszenzlichtemissionen jedes Partikels in drei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. Der Detektor „FL I“ registriert Wellenlängen von 525 nm (Grünfluoreszenz). Orange wird vom Detektor „FL II“ im Bereich 590 nm und Wellenlängen von 650 nm im roten Spektralbereich werden vom Detektor „FLIII“ gemessen. Somit werden pro gemessenes Partikel Werte für fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FLI, FLII, FLIII) erfaßt. Jeder den Laserstrahl passierende Partikel liefert somit bei einer bestimmten Geräteeinstellung entsprechend seiner optischen Eigenschaften ein Datenmuster, das ihn als Meßereignis definiert. Über die angeschlossene Computereinheit werden die Geräteeinstellungen kontrolliert, Meßergebnisse erfaßt und gespeichert. Es erlaubt die Darstellung eines Parameters gegen die Zahl der gemessenen Ereignisse in Form eines Histogramms oder die Darstellung verschiedener Parameter gegeneinander. Letztere kann Punktediagramm oder Dichtediagramm erfolgen. Die Lage der Meßereignisse innerhalb dieser Darstellungen wird durch die Einstellungen des Durchflußzytometers bestimmt.

Es lassen sich Untergruppen von Meßereignissen einzeln analysieren, indem innerhalb von Zwei-Parameter-Diagrammen elektronische „Fenster“ (Gates) gesetzt werden. Es können mehrere Fenster gleichzeitig gesetzt und auch logisch miteinander verknüpft werden. Auf diese Weise lassen sich auch die Anzahl bestimmter Meßereignisse und der prozentuale Anteil einer Untergruppe an Meßereignissen an der Gesamtereignismenge, sowie der mittlere Wert eines Parameters für eine Ereignisgruppe, ermitteln. Morphologisch ähnliche

Zellpopulationen stellen sich in einem korrelierten Diagramm, in dem für jede Zelle der FSC- gegen den SSC-Wert aufgetragen wird, als homogene Wolke dar. Bei der durchflußzytometrischen Messung der verschiedenen Populationen nach der Separation und Färbung wurden die Daten der Proben sowohl linear als auch logarithmisch aufgezeichnet.

Im Anschluß an die Messungen erfolgte die computergestützte statistische Auswertung der Daten mittels der Programme SPSS (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Rechenzentrum der FSU-Jena) und Excel der Firma Microsoft. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Der Vergleich der Proben untereinander auf statistische Unterschiede erfolgte mittels T-Test.

## **4.2. Untersuchungen der Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft am Mausmodell**

### **4.2.1. Immunhistochemische Darstellung von Fgl2-Protein in einem abortogenen Mausmodell**

Die Versuche wurden falls nicht anderweitig hervorgehoben selbst durchgeführt, die verwendeten Puffer und Reagenzien wurden in eigener Arbeit hergestellt oder wurden über den Fachhandel bezogen.

#### *Mäuse:*

Die CBA/J und DBA/2 Mäuse wurden in einer keimfreien Umgebung in Räumlichkeiten des Toronto General Hospital (Toronto, Kanada) mit Futter und Wasser ad libidum und einem 12 h Tag /Nacht Zyklus gehalten.

#### *Studien:*

Weibliche CBA/J und männliche DBA/2 Mäuse wurden gepaart und der Morgen an dem der Plug in der Scheide erkennbar war als Gd 0,5 der Schwangerschaft festgelegt. Die schwangeren Weibchen aus Paarungen von CBA/J mit DBA/2 wurden jeweils in Abständen von 1 Tag zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Tag 4,5 bis 13,5 nach der Empfängnis getötet. Die Uteri wurden exzidiert und für 18h in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Danach wurden sie in 70%igen Alkohol überführt und in Paraffin eingebettet sowie geschnitten. Einige

der Schnitte wurden in Hämatoxylin-Eosin oder Masson-Trichromlösung gefärbt um histologische Veränderungen darzustellen, sowie um diejenigen Schnitte mit einer möglichst hohen Anzahl von Embryonen für die Immunhistochemische Färbung zu finden. Die so präparierten Schnitte wurden mir freundlicherweise von Prof. D.A. Clark für die immunhistochemische Färbung zur Verfügung gestellt.

*Immunhistochemie:*

Die Objektträger mit den in Paraffin eingebetteten Proben wurden zunächst für 30 min bei 60°C erwärmt und danach entwachst. Vor der Färbung wurden sie je zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbung wurde mit einem Kit der Firma Signet / Cedarlane Labs (Ontario, Kanada) durchgeführt. Der verwendete Antikörper war ein polyklonaler Rabbit anti-Mouse Fgl2 (Rabbit #6), die Kontrollen entweder Rabbit IgG 1.25 µg/ml oder normales Rabbit Serum 1/10<sup>4</sup>. Die Proben wurden zunächst mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kit-Lösung Nr. 1) 5 min behandelt, dann zweimal mit PBS gewaschen und in heißem Citrat-Puffer in einem Dampfbad für 45 min inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zunächst mit Wasser dann zweimal mit PBS gewaschen. Sodann wurde die Blockinglösung (Kit, Nr. 2) aufgetragen, 20 min inkubiert, gefolgt von dem Antikörper bzw. der Kontrolle. So wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zunächst dreimal ausgiebig mit PBS gewaschen und dann der biotinylierte Anti-Rabbit IgG Antikörper (Nr. 4) aufgetragen, 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde Streptavidin (Nr. 5) aufgetragen und 20 min inkubiert sowie anschließend gewaschen. Als letztes wurde die Färbelösung (1 Tropfen Chromo A auf 1ml Puffer B) aufgetragen und 20 min inkubiert. Vor der Gegenfärbung in Mayers Hämatoxylin wurden die Schnitte in laufendem Wasser gewaschen und danach fixiert.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Mikroskop der Firma Zeiss. Die Fotos wurden mit einer Nikon Coolpix 4500 Digitalkamera aufgenommen und anschließend in der Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop aufbereitet.

#### **4.2.2. Genotypisierung von Embryonen in Fgl2<sup>+/-</sup> heterozygot gekreuzten Mäusen**

Die Versuche wurden falls nicht anderweitig hervorgehoben selbst durchgeführt, die verwendeten Puffer und Reagenzien wurden in eigener Arbeit hergestellt oder wurden über den Fachhandel bezogen.

##### *Mäuse:*

Die Fgl2<sup>+/-</sup> heterozygoten Mäuse wurden in einer keimfreien Umgebung in Räumlichkeiten des Toronto General Hospital (Toronto, Kanada) mit Futter und Wasser ad libidum und einem 12 h Tag /Nacht Zyklus gehalten.

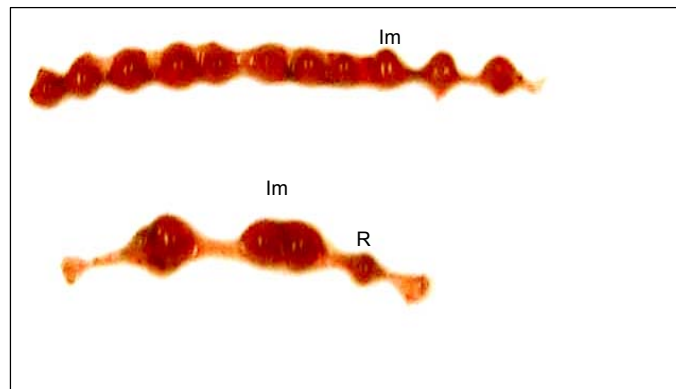
##### *Erzeugung und Rekombination der Fgl2<sup>+/-</sup> Mäuse: N10, N3*

*Fgl2-Knockout-Mäuse:* Die Erzeugung der Knockoutmäuse, wie im Folgenden kurz zusammengefaßt, erfolgte im Vorfeld unserer Untersuchung. Die Tiere wurden mir freundlicherweise von Wei He (Mitglied der Forschergruppe des Multi Organ Transplant Programm der Universität von Toronto, Kanada) zur Verfügung gestellt. Die Standardtechnik der homologen Rekombination wie sie im Detail bei Marsden et al. (Marsden et al. 2003) beschrieben wird, wurde genutzt um das Fgl2 Gen in 129Sv/J Embryonischen Stammzellen zu inaktivieren. Die Kolonien wurden per Analyse von *Bam*HI verdauter DNA mittels MultiplexPCR auf homologe Rekombination gescreent. Multiplex PCR positive Klone wurden in C57Bl/6xC57Bl/6 Blastozysten injiziert und pseudoschwangeren C57Bl/6 Weibchen eingesetzt. Chimäre (129Sv/JxC57Bl/6) Männchen wurden mit Weibchen gepaart um diejenigen mit einer Fgl2 Mutation in der Keimbahn zu identifizieren und die Nachkommen wurden für drei Generationen (N1-N3) miteinander gekreuzt (Inzucht). Heterozygoten (Fgl2<sup>+/-</sup>) aus der N3 Nachkommenschaft wurden dann mit C57Bl/6 rückgekreuzt um die Generationen N4-N10 zu erzeugen. In jeder Generation wurden die Jungtiere mittels MultiplexPCR typisiert um die Genotypen +/+, +/- und -/- für Fgl2 zu bestimmen. Die Heterozygoten wurden für die nächste Rückkreuzung verwendet.

*Versuchsbeschreibung:* Die schwangeren Weibchen aus heterozygoten +/- x +/- Paarungen der N10 Generation von Fgl2 Knockout-Mäusen wurden zu

unterschiedlichen Zeitpunkten von Tag 8,5, 10,5 und 13,5 nach der Empfängnis getötet um festzustellen ob ein Verlust der Schwangerschaft während der Fortpflanzung auftrat. Der Tag nach der Paarung von Männchen und Weibchen, an dem ein sogenannter „Plug“ an der Scheide der Weibchen erkennbar war wurde als Tag 0,5 der Schwangerschaft festgelegt.

Die schwangeren Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet. Dann wurde nach vorsichtiger Eröffnung des Unterbauches der Uterus zu beiden Seiten vollständig dargestellt und die Zahl der Implantationen bzw. auch von Resorptionen dokumentiert. Der Uterus der schwangeren Maus ist in Abb. 3 gezeigt. Er besteht aus zwei Hörnern mit jeweils perlchnurartiger Gestalt. Die „Perlen“ entsprechen den Implantationen. Es wird im unteren Teil der Abbildung ebenfalls veranschaulicht, was in unserer Studie als Resorption gewertet wurde. Makroskopisch stellte sich die Resorption als kleinere „Perle“ von zumeist dunklerer Farbe dar. Mikroskopisch (Dissektionsmikroskop) konnte kein Embryo gefunden werden.



**Abbildung 3 Darstellung von Mausuteri**

Gezeigt sind zwei verschiedene Mausuteri. Der Uterus im oberen Teil der Abbildung entspricht einem normalen Mausuterus mit 11 Implantationen (Im). Der Uterus unten in der Abbildung ist ein Uterus, der eine Resorption im Verlauf zeigt (R). Er enthält des weiteren nur drei normale Implantationen (Im).

Danach wurde der Uterus disseziert, von Fett und Mesenterium befreit und die Dezidua entfernt. Die Embryonen von Tag 8,5 und 10,5 wurden unter dem Dissektionsmikroskop nach einem Protokoll, welches mir freundlicherweise von A.-M. Teichert (Mitarbeiterin des Research Centers, General Hospital,

University of Toronto, Kanada) zur Verfügung gestellt wurde, präpariert. Für die 13,5 Tage alten Embryonen war dies nicht notwendig und so wurden sie auf ähnliche Art makroskopisch in der Arbeitsbank exzidiert. Die gewonnenen Embryonen wurden in sterile eindeutig gekennzeichnete Eppendorftubes überführt und bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

*Genotypisierung:* Die Genotypisierung der Embryonen wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Verteilung der Fgl2-Genotypen der Embryonen zu entschlüsseln. Den Mendelschen Gesetzen zu Folge sollte die Verteilung nach Kreuzung von Fgl2<sup>+/-</sup> heterozygoten Mäusen wie folgt aussehen:

Fgl2<sup>+/+</sup>:Fgl2<sup>+/-</sup>:Fgl2<sup>-/-</sup> wie 1:2:1.

Die Proben wurden je nach Tag unterschiedlich behandelt. Tag 8,5 wurde 6 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 20  $\mu\text{l}$  aktiviertem Lysispuffer Nr.1 zugesetzt. Die Probe wurde sodann mit einem Homogenisator behandelt um das Gewebe zu zerkleinern und anschließend 1 h bei  $50^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Digestion wurde das Enzym durch 3 min Erhitzen auf  $95^{\circ}\text{C}$  deaktiviert um die nachfolgende PCR nicht zu beeinflussen. Die Tag 10,5 Proben wurden mit 700 $\mu\text{l}$  aktivierter Lysispuffer Nr.2 versetzt, homogenisiert und über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die DNA bei vollständiger Digestion mittels Phenol/Chloroform (50:50) Extraktion mit je 350 $\mu\text{l}$  isoliert und mit Isopropanol präzipitiert sowie im Anschluß mit 70%igem und 100%igem Alkohol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 150  $\mu\text{l}$  destilliertem RNA-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  resuspendiert. Für Tag 13,5 wurden die Proben zunächst halbiert, da sich ein Versuch die Proben vollständig zu verarbeiten auf Grund der Größe der Proben als problematisch erwiesen hatte. Sodann wurden sie ähnlich wie Tag 10,5 behandelt, mit dem Unterschied, daß die Resuspension der größeren Menge DNA in 300  $\mu\text{l}$  destilliertem RNA-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  erfolgte.

Die PCR wurde wiederum für 10,5 und 13,5 gleich und für 8,5 mit dem Unterschied, daß 10 $\mu\text{l}$  Probe statt 1 $\mu\text{l}$  verwendet wurden, durchgeführt. Vor der PCR wurden die Proben 5min bei  $55^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Die entsprechende Menge PCR-Reagenzien wurde in ein PCR-Tube pipettiert und mit der jeweiligen

Menge an Probe ergänzt. Im Thermocycler wurde folgendes Programm durchlaufen:

Zunächst wurde die Probe 5 min bei 94°C inkubiert um die DNA vollständig zu denaturieren. Dann wurden 35 Zyklen wie in Tab. 3 verdeutlicht absolviert:

**Tabelle 3: Reaktionsschritte während der Polymerasekettenreaktion**

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1. Denaturieren	94°C	30 s
2. Anneal (Anheften)	59,5°C	30 s
3. Extend (Verlängern)	72°C	30 s

Abschließend wurde für 15 min bei 72°C inkubiert und die Reaktion durch Abkühlung auf 4°C gestoppt. Bis zur Auswertung in der Elektrophorese wurde die DNA bei 4°C gelagert.

Für die Elektrophorese wurden alle Proben nach demselben Protokoll behandelt. Dafür wurde ein 2%iges Gel aus 2,4g Agarose und 120 ml 1x TAE-Puffer erhitzt mit 10µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Horizontale Gelbox mit je zwei 12-Zahnkämmen gegeben. Das Gel wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1xTAE-Puffer bedeckt.

10µl Probe wurde mit je 2µl Loading-Puffer versetzt und jeweils 10µl des Gemisches in eine Kammer des Gels gefüllt. Das Gel wurde nun mit 100-120 Volt für etwa eine Stunde inkubiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine UV-Lampe plaziert und somit zur Auswertung gebracht. Das Resultat wurde außerdem mit einer Polaroid Gelkamera dokumentiert.

Analyse:

Jeder Embryo wurde mit einer Standardprobe verglichen.

Fgl2+/+ (Wildtyp) Maus: 1 Bande, höher, länger 373 bp

Fgl2-/- (homozygote) Maus: 1 Bande, tiefer, kürzer 319 bp

Fgl2+/- (heterozygote) Maus: beide Banden

Negativkontrolle: keine Banden

Positivkontrolle: beide Banden



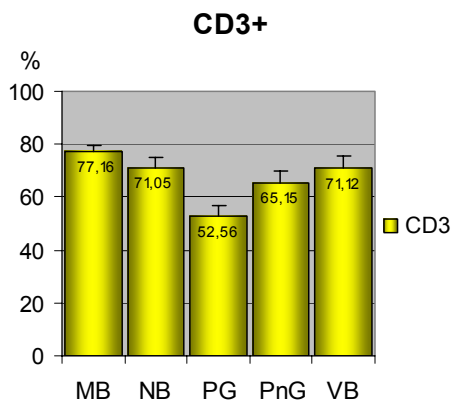
Das Polaroidfoto wurde entsprechend mit Datum, Probennummer und Genotyp beschriftet und ein Report erstellt.

Die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse erfolgte mittels des  $\chi^2$  –Test und Fishers Test. Die Konfidenzintervalle der Resorptionen (Aborte) wurde binominal festgelegt.

## 5. Resultate

### 5.1. Ergebnisse der Untersuchungen an der Plazenta des Menschen

#### 5.1.1. Analyse der T-Lymphozyten



**Tabelle 4: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD3+ T-Lymphozyten mittels T-Test**

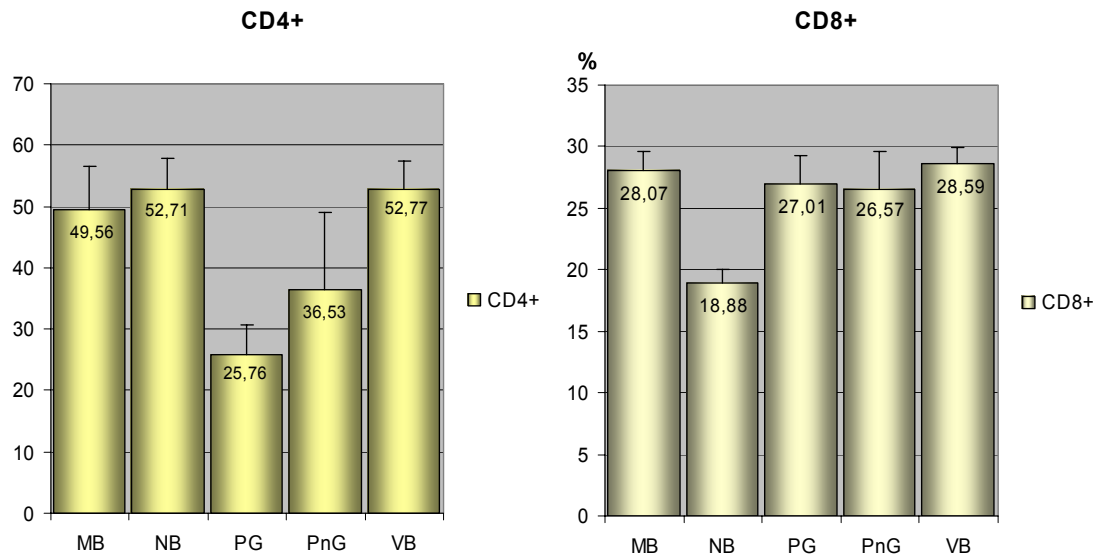
Vergleich	P	$\alpha$
MB-PG	0,006	0,025
NB-PG	0,000	0,017
PG-VB	0,011	0,05
MB-PnG	0,043	0,017
PG-PnG	0,025	0,05

**Abbildung 4 Relativer Anteil von CD3+ Lymphozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD3-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des CD3+-Anteils an allen isolierten Lymphozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $\alpha$  kennzeichnet den Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit, ab dem P Signifikanz erreicht

Die Verteilung der CD3+ als relative Prozentwerte von CD45 ist in Abb. 4 dargestellt. Tabelle 4 zeigt die dazugehörigen signifikanten Unterschiede in mehreren Vergleichen. In nicht gespülter Plazenta war der relative Anteil an T-Zellen signifikant höher als in perfundiertem Gewebe, ebenso verhielt es sich im Vergleich von villösem Blut und gespülter Plazenta. Gleichfalls war der relative Anteil von CD3+ Zellen aus mütterlichem peripherem Blut sowie aus Nabelschnurblut signifikant höher als in gespülter Plazenta. Verglichen zu mütterlichen Blut war der relative Anteil von T-Lymphozyten in nicht gespülter Plazenta signifikant niedriger.



**Abbildung 5 Relativer Anteil von CD4+ und CD8+ Lymphozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD4-Ak bzw. Anti-CD8-Ak markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des CD4+ und CD8+ Anteils an allen isolierten Lymphozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. Das Diagramm links zeigt die Auswertung für CD4, das Diagramm rechts für CD8.

**Tabelle 5: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD4+ und CD8+ Lymphozyten mittels T-Test**

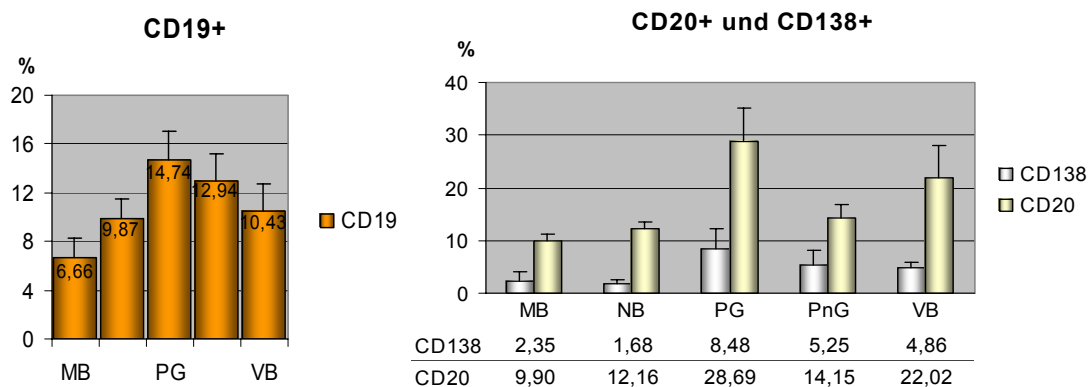
Marker	Vergleichspaar	P-Wert	$\alpha$
CD4+	PG-NB	0,042	0,025
CD4+	PG-VB	0,048	0,05
CD8+	PG-NB	0,011	0,017
CD8+	NB-MB	0,017	0,017
CD8+	NB-VB	0,000	0,017

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $\alpha$  kennzeichnet den Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit, ab dem P Signifikanz erreicht

Die Analyse der CD4+ Zellen (Abb.5 und Tab.5) zeigte signifikante Unterschiede zwischen Nabelschnurblut und villösem Blut zu gespülter Plazenta, wobei der relative Anteil an T-Helferzellen in den beiden ersteren höher war im Vergleich zu letzterem. Bei den CD8+ zytotoxischen Zellen war der relative Anteil in Nabelschnurblut bei den Vergleichen zu gespülter

Plazenta, mütterlichem peripheren Blut und villösem Blut signifikant niedriger. Alle anderen Vergleiche dieser Gruppe zeigten, daß der Anteil an CD8+ Zellen in den Proben MB, VB, PnG und PG etwa gleich verteilt war. Schließlich wurde das Verhältnis der CD4+:CD8+ Lymphozyten zueinander in den Proben ermittelt. Für Mütterliches Blut betrug die CD4+:CD8+ Ratio 1,77, für Nabelschnurblut 2,79 für gespülte Plazenta 0,95 für ungespülte Plazenta 1,38 und für villöses Blut 1,85.

### 5.1.2. Analyse der B-Lymphozyten



**Abbildung 6 Relativer Anteil von CD19+, CD20+ und CD138+ Lymphozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD19-, Anti-CD20- bzw. Anti-CD138-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte der CD19+, CD20+ bzw. CD138+ Anteile an allen isolierten Lymphozyten aus unabhängigen 10 Versuchen mit Standardfehler. Das linke Diagramm zeigt die Auswertung für CD 19, das rechte Diagramm für CD20 und CD138.

Signifikante Unterschiede sind in Tabelle 6 dargestellt:

**Tabelle 6: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD19+ und CD20+ Lymphozyten mittels T-Test**

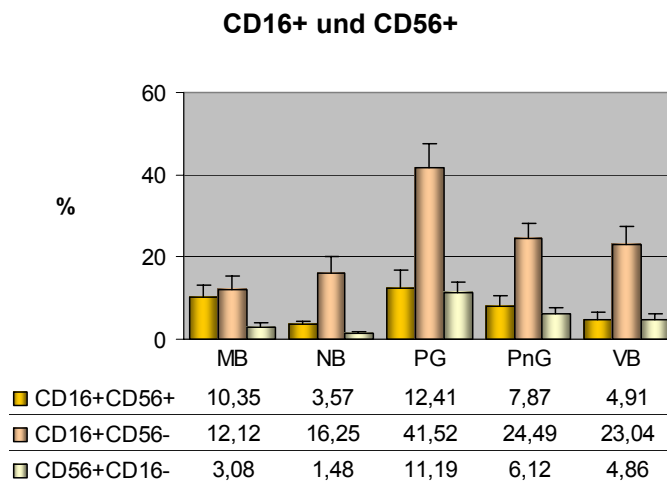
Marker	Vergleichspaar	P-Wert	α
CD19+	MB-PG	0,003	0,017
	MB-PnG	0,017	0,017
CD20+	PG-PnG	0,027	0,05

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit

α kennzeichnet den Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit, ab dem P Signifikanz erreicht

In Abbildung 6 sind die relativen Prozente der B-Zellpopulationen dargestellt. Die Anzahl an CD20+ unterschied sich signifikant zwischen perfundiertem und nicht perfundiertem Plazentagewebe (28,69±6,47 vs. 14,15±2,59 P=0,027 \*P<0,05). Der Vergleich von peripherem mütterlichen Blut und Nabelschnurblut untereinander sowie jeweils zu den verschiedenen präparierten Plazentageweben erreicht keine statistische Signifikanz. Der Marker für unreife B-Zellformen CD19 zeigte signifikante Unterschiede zwischen mütterlichem Blut und perfundierter und nativer Plazenta (6,66 vs. 14,47 P=0,017 \*\*\*P≤0,017). Der Plasmazellmarker CD138 erbrachte tendenzielle Unterschiede im Vergleich von mütterlichem und fetalem Blut zu gespültem Plazentagewebe, in welchem der höchste Anteil an Plasmazellen gefunden wurde.

### 5.1.3. Analyse der natürlichen Killerzellen



**Abbildung 7 Relativer Anteil von CD16+, CD56+ und CD16+CD56+ Lymphozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD16- und Anti-CD56-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des Anteils an allen isolierten Lymphozyten für CD16 und CD56 einfach positive ohne die, die für beide Marker doppelpositiven, sowie die CD16CD56 doppelpositiven aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

**Tabelle 7: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD16+ und CD56+ T-Lymphozyten mittels T-Test**

<b>CD56+</b>	<b>P</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>CD16+</b>	<b>P</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>Vergleichspaare</b>			<b>Vergleichspaare</b>		
NB-PG	0,02	0,025	NB-PG	0,04	0,050
MB-VB	0,02	0,025	PG-VB	0,00	0,017
MB-PG	0,04	0,050	MB-PnG	0,00	0,017
NB-VB	0,04	0,050	MB-PG	0,027	0,025

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit

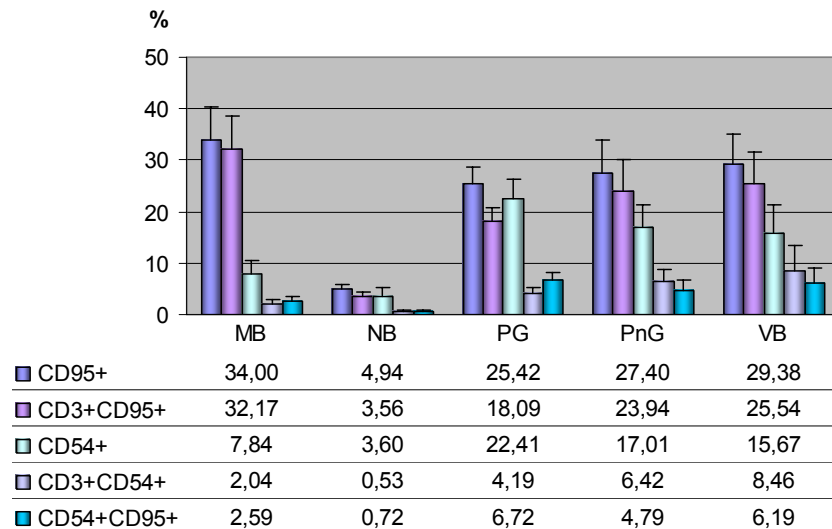
$\alpha$  kennzeichnet den Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit, ab dem P Signifikanz erreicht

Unter den CD16+CD56+ doppeltpositiven Lymphozyten in Abb.7 und Tab.7 konnten keine signifikanten Unterschiede statistisch gesichert werden, obwohl die Mittelwerte in ihren Beträgen sehr stark voneinander abwichen. Im Vergleich der CD16+CD56- hatten die beiden Plazentaprobe einen signifikant größeren relativen Anteil dieser untersuchten Zellpopulation als mütterliches peripheres Blut. Außerdem war der relative Anteil der CD16+CD56- Lymphozyten in gespülter Plazenta signifikant größer als in Nabelschnurblut und in villösem Blut. Unter den CD56+CD16- Zellen waren die relativen Anteile CD56+CD16- Lymphozyten in maternalem und fetalem Blut signifikant geringer als in perfundierter Plazenta und auch signifikant geringer als in villösem Blut.

#### **5.1.4. Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern auf isolierten Lymphozyten**

Bei der Analyse von ICAM-1 und Fas-L, die durch Anti-CD54 bzw. Anti-CD95 Antikörper markiert worden waren, wurden zunächst alle positiven der beiden Gruppen betrachtet (Abb. 8). Unter allen CD95+ war der relative Anteil positiver Zellen im Nabelschnurblut am kleinsten. Dieser Unterschied ließ sich wie in Tabelle 8 dargestellt im Vergleich zu allen anderen Proben statistisch sichern.

**CD3+ CD54+ und CD95+**



**Abbildung 8 Relativer Anteil von CD95+, CD54+ sowie doppelpositiver Paare aus CD3+, CD54+ und CD95+**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD3-, Anti-CD95- und Anti-CD54-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des für den jeweiligen Marker positiven, bzw. für verschiedene Marker doppelpositiven Anteils an allen isolierten Lymphozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

**Tabelle 8: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD95 und CD54, sowie CD3 markierten T-Lymphozyten mittels T-Test**

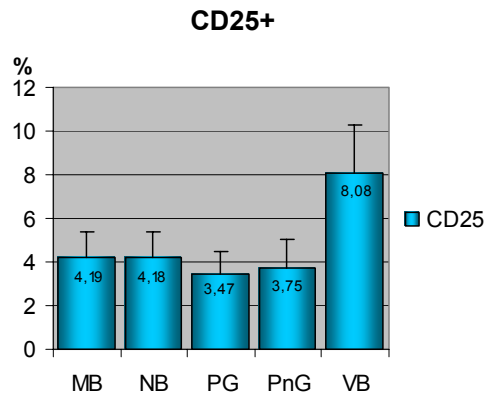
Vergleichspaare	Mittelwerte	P	$\alpha$
<b>CD95+</b>			
NB-PG	4,94 vs. 25,42	0,001	0,013
NB-MB	4,94 vs. 34,00	0,004	0,017
NB-PnG	4,94 vs. 27,40	0,011	0,050
NB-VB	4,94 vs. 29,38	0,005	0,025
<b>CD54+</b>			
MB-PG	7,84 vs. 22,41	0,005	0,017
NB-PG	3,60 vs. 22,41	0,003	0,013
NB-PnG	3,60 vs. 17,01	0,020	0,025
NB-VB	3,60 vs. 15,67	0,030	0,050

<b>CD54+CD95+</b>	Mittelwerte	P	$\alpha$
MB-PG	2,59 vs. 6,72	0,009	0,017
NB-PG	0,72 vs. 6,72	0,006	0,025
<hr/>			
<b>CD3+CD54+</b>			
NB-PG	0,53 vs. 4,19	0,016	0,017
<hr/>			
<b>CD3+CD95+</b>			
NB-PG	3,56 vs. 18,09	0,001	0,013
NB-MB	3,56 vs. 32,17	0,004	0,017
NB-PnG	3,56 vs. 23,94	0,030	0,050
NB-VB	3,56 vs. 25,54	0,010	0,025

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $\alpha$  kennzeichnet das Signifikanzniveau

Bei der Analyse von ICAM-1 und Fas-L, die durch Anti-CD54 bzw. Anti-CD95 Antikörper markiert worden waren, wurden zunächst alle positiven der beiden Gruppen betrachtet. Unter allen CD95+ war der relative Anteil positiver Zellen im Nabelschnurblut am kleinsten. Dieser Unterschied ließ sich wie in Tabelle 8 dargestellt im Vergleich zu allen anderen Proben statistisch sichern. Der Vergleich von CD3+CD95+ doppelpositiven Zellen erbrachte ebenso wie der Vergleich aller CD95+, daß der Anteil dieser Zellpopulation im fetalen Blut am geringsten ist. Für CD54+ verhielt es sich ähnlich. Auch in diesem Fall war der relative Anteil aller für diesen Marker positiven Zellen in Nabelschnurblut am kleinsten. Statistisch gesichert war der Unterschied jedoch nur für den Vergleich von Nabelschnurblut zu jeweils gespülter, zu nicht gespülter Plazenta sowie zu villösem Blut, nicht aber im Vergleich mit mütterlichem Blut. Der Anteil der CD54+ Lymphozyten war jedoch in maternalem Blut signifikant niedriger als in gespülter Plazenta, wo der Wert am höchsten war. Unter den CD54+CD95+ waren in Nabelschnurblut und mütterlichem Blut die relativen Anteile positiver Zellen signifikant geringer als in gespülter Plazenta.

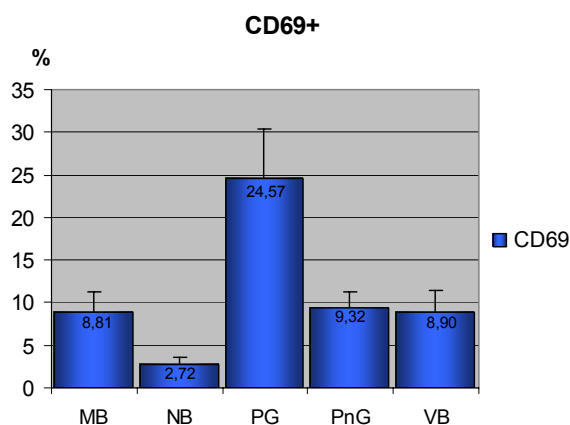




**Abbildung 9 Relativer Anteil von CD25+ Lymphozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD25-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des CD25+-Anteils an allen isolierten Lymphozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler

In der statistischen Auswertung der CD25+ Lymphozyten wurde keine Signifikanz erreicht. Der relative Anteil an für diesen Marker positiven Zellen war in villösem Blut tendenziell höher als in allen anderen Proben, welche sich untereinander kaum unterschieden. CD25 wurde in Kombination mit CD4 gefärbt. CD4+CD25+ Zellen machten hierbei den größten Teil der CD25+ Zellpopulation aus und nur ein an der Nachweisgrenze befindlicher Teil der Zellen war positiv für CD25 und negativ für CD4. Auch in der statistischen Auswertung dieser Untergruppen konnten keine signifikanten Unterschiede herausgestellt werden.



**Abbildung 10 Relativer Anteil von CD69+ Lymphozyten**

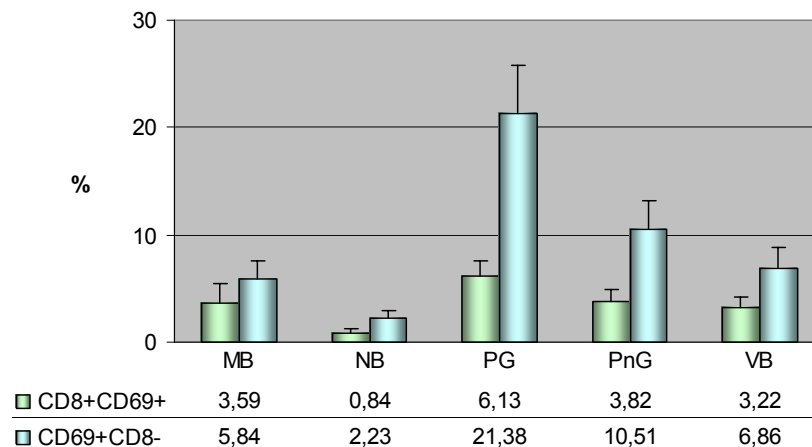
Ficoll®-isolierte mit Anti-CD69-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des CD69+-Anteils an allen isolierten Lymphozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler

**Tabelle 9: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD69+ T-Lymphozyten mittels T-Test**

CD69+Vergleichspaare	P	$\alpha$
MB-PG	0,009	0,017
NB-PG	0,013	0,05
VB-PG	0,009	0,017
PnG-PG	0,021	0,05
MB-NB	0,034	0,017

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $\alpha$  kennzeichnet das Signifikanzniveau

**CD69 einfach und CD8+/CD69+ und doppelpositive Lymphozyten**



**Abbildung 11 Relativer Anteil von CD8+, CD69+ sowie von doppelpositiven Lymphozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD8- Anti- und Anti-CD69-Antikörpern markierte Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte der Anteile CD8+/CD69+ doppelpositiver und CD69 einfach positiver Zellen an allen isolierten Lymphozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

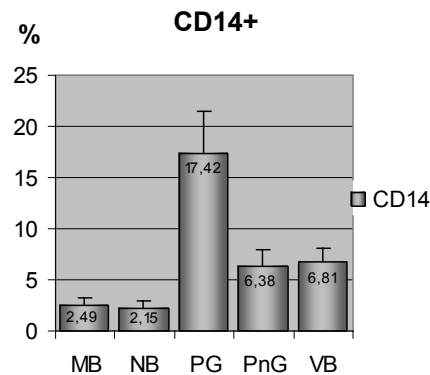
**Tabelle 10: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD8CD69+ und CD8-CD69+ T-Lymphozyten mittels T-Test**

Vergleichspaare	P	$\alpha$
CD8+CD69+		
MB-PG	0,022	0,025
NB-PG	0,029	0,050
PG-VB	0,000	0,017
CD69+CD8-		
MB-PG	0,006	0,017
NB-PG	0,010	0,050
PG-PnG	0,005	0,050
PG-VB	0,008	0,025
MB-PnG	0,034	0,025
NB-PnG	0,047	0,050

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $\alpha$  kennzeichnet das Signifikanzniveau

In der Auswertung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 war der relative Anteil an positiven Zellen in Nabelschnurblut am kleinsten, was aber nur in den Vergleichen mit mütterlichem peripheren Blut und perfundierter Plazenta statistisch signifikant war. Der relative Anteil CD69+ war in perfundierter Plazenta in allen Vergleichen signifikant höher. CD69 wurde in einer gemeinsamen Färbung mit CD8 gemessen und daher konnten in der Auswertung CD8+ Zellen darauf untersucht werden, ob sie CD69 ebenfalls tragen oder nicht. Bei dieser Analyse doppelpositiver Zellen hatte perfundierte Plazenta ebenfalls einen höheren relativen Anteil, was bis auf den Vergleich zwischen den beiden Plazentaprobe in allen Vergleichen statistisch gesichert war. Neben CD8+ Lymphozyten können aber auch CD8- Lymphozyten den Aktivierungsmarker CD69 tragen. Auch bei der Analyse dieser CD69+CD8- Population war der Anteil in Nabelschnurblut signifikant kleiner als in allen anderen Proben und in perfundierter Plazenta war er am höchsten. Außerdem war aber der relative Anteil an CD69+CD8- Zellen in nicht perfundierter Plazenta signifikant höher als in mütterlichem peripherem Blut.

### 5.1.5. Analyse der CD14 positiven Monozyten



**Abbildung 12 Relativer Anteil von CD14+ Monozyten**

Ficoll®-isolierte mit Anti-CD14-Antikörpern markierte Monozyten durchflußzytometrisch analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte des CD14+Anteils an allen isolierten Monozyten aus 10 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler

**Tabelle 11: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von Monozyten mittels T-Test**

CD14+ Vergleichspaare	P	$\alpha$
MB-PG	0,006	0,025
NB-PG	0,004	0,016
PG-VB	0,026	0,050
MB-VB	0,018	0,016

P kennzeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit  
 $\alpha$  kennzeichnet das Signifikanzniveau

Die Population der Monozyten wurde durch Markierung der Zellen mit dem Marker CD14 analysiert. Der relative Anteil an mononukleären Zellen war in gespülter Plazenta am höchsten (Abb12). Außer im Vergleich zwischen den beiden Plazentaprobe n war dies in allen anderen Vergleichen statistisch signifikant (Tab. 11). Einen weiteren signifikanten Unterschied gab es zwischen maternalem Blut und villösem Blut. Hier war der Anteil im intervillösen Blut höher als im peripheren Blut der Mutter.

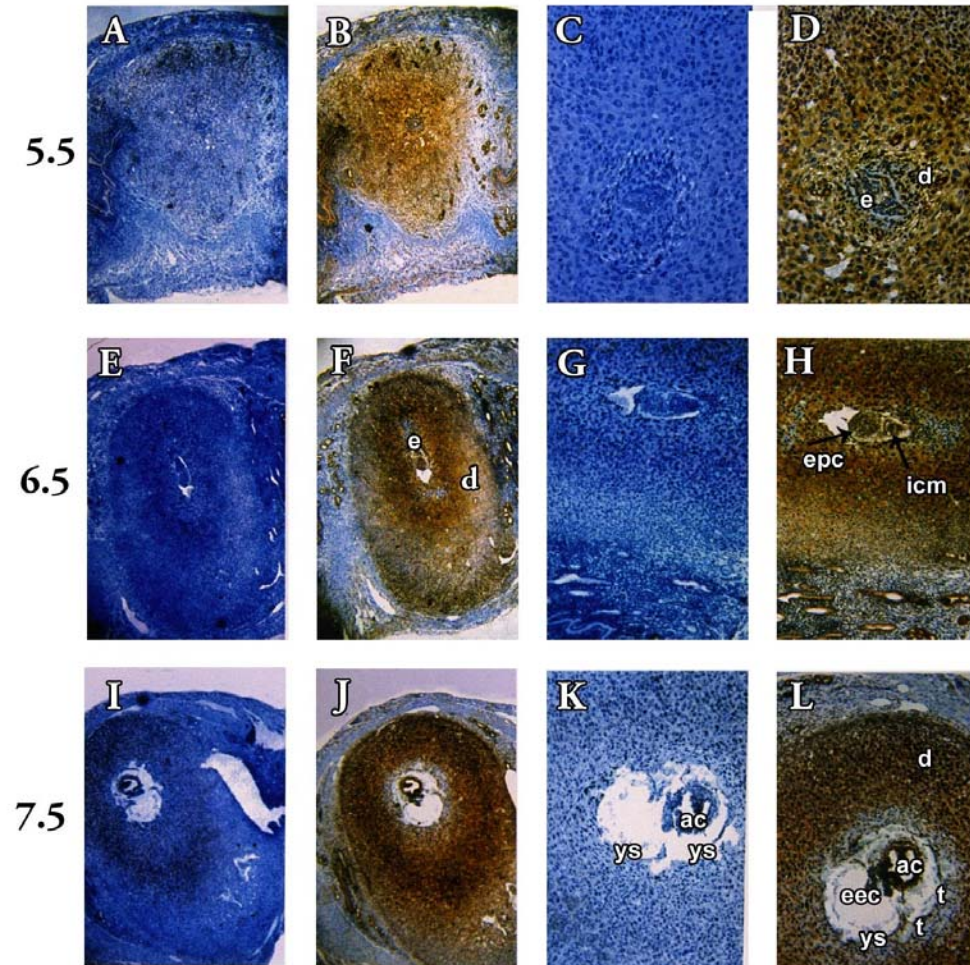
## **5.2. Ergebnisse der Studien zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft im Mausmodell**

### **5.2.1. Immunhistochemische Analyse der Fgl2 Expression**

Die Expression des Fgl2-Proteins in CBA/JxDBA/2 gekreuzten Mäusen wurde durch immunhistochemische Färbung von Uteri der Gestationstage 4,5 bis 13,5 sichtbar gemacht.

Die Einnistung von Embryonen stellte sich frühestens am 5,5 Gestationstag unter dem Mikroskop dar. Abbildung 13 zeigt eine intensive Anfärbung von Fgl2 in dezidualisierendem maternalen Gewebe, welches den Embryo umgibt (13 B und 12 D verglichen zu den Negativkontrollen 13 A und 13 B). Uterines Epithel und glanduläres Epithel (13 B) zeigten ebenfalls Anfärbungen. Eine leichtere Färbung konnte bei von der Implantationsseite abgewandten Stromazellen dargestellt werden.

Ab Tag 6,5 hatte auch der Embryo selbst Färbung für Fgl2 angenommen (Abb. 13 F und 13 H verglichen zu 13 E und 13 G) und ab Tag 7,5 (13 L) war bereits eine differenzierbare Anfärbung verschiedener spezifischer Gewebsschichten in dem sich entwickelnden Embryo nachweisbar. Eine veränderte Anfärbung zeigte sich auch in der Plazentationszone: so färbten sich fetale Trophoblastzellen an, wohingegen eine nicht gefärbte Zone an der materno-fetalen Grenzfläche zu unterscheiden war (Abb. 13 J und 13 L verglichen zu 13 I und 13 K).

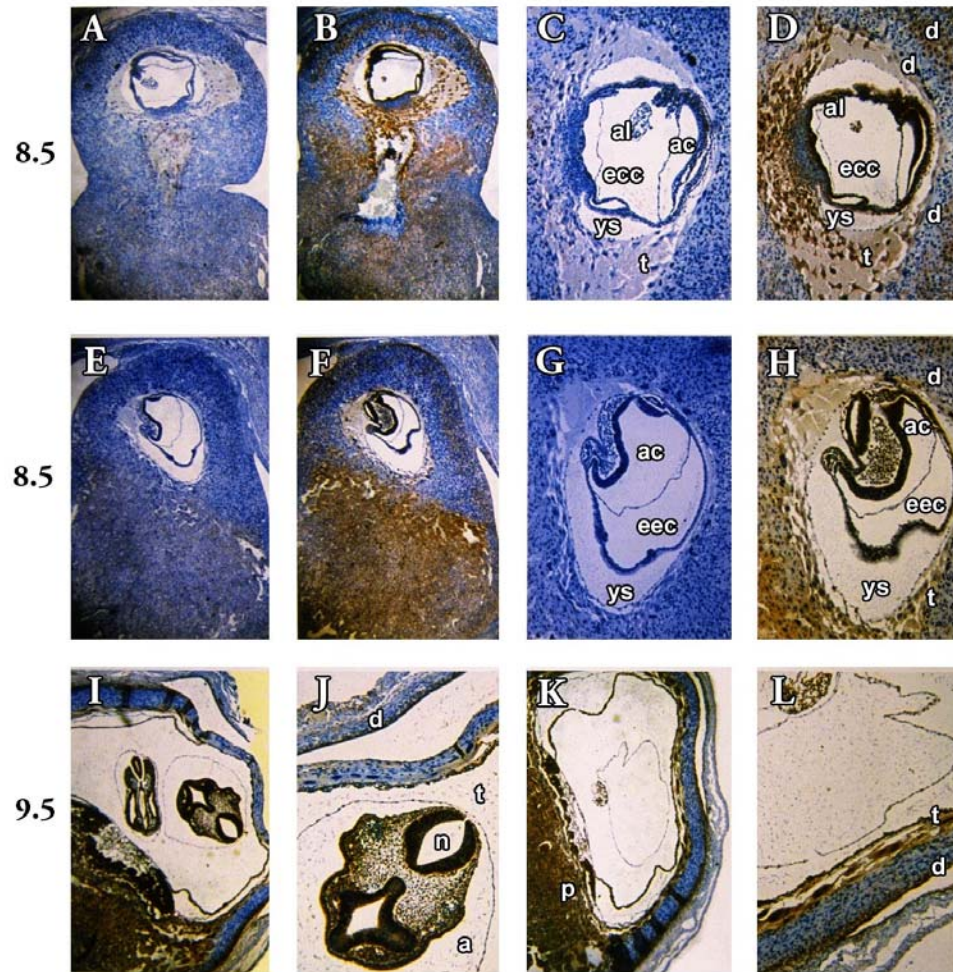


**Abbildung 13 Fgl2 Immunhistochemische Färbung von Uteri von CBA/JxDBA/2 Kreuzungen an den Tagen 5,5; 6,5 und 7,5 pc**

13) A-D, Gestationstag 5,5; A und C repräsentieren die Negativkontrollen. 13) E-H Gestationstag 6,5; E und G sind die Negativkontrollen.

13) I-L ist Gestationstag 7,5; I und K die Negativkontrollen. Die übrigen (B, D, F, H, J, L) sind markiert mit dem Anti-Fgl2-Antikörper. Die Bilder auf der linken Seite (A, B, E, F, I, J) sind 40-fach vergrößert, auf der rechten Seite 100-fach. Beschriftung: **e**, Embryo; **d**, Dezidua; **t**, Trophoblast; **ac**, Amnionhöhle; **eec** Extraembryonales Zölom (Höhle)

Am Tag 8,5 war die Färbung der Dezidua noch deutlicher gegen die der fetalen Trophoblastzellen abgrenzbar und innerhalb des Embryos konnten Fgl2-negative Areale abgegrenzt werden (Abb. 14 A-H). Ein ähnliches Muster zeigte sich für Tag 9,5 pc (Abb. 14 I-L).



**Abbildung 14 Fgl2 Immunhistochemische Färbung an den Tagen 8,5 und 9,5 an Uteri von CBA/JxDBA/2 Schwangerschaften**

14) A-H, Gestationstag 8,5, Negativkontrollen sind A, C, E und G. B, D, F und H sowie I-L sind mit dem Anti-Fgl2-Antikörper gefärbt.

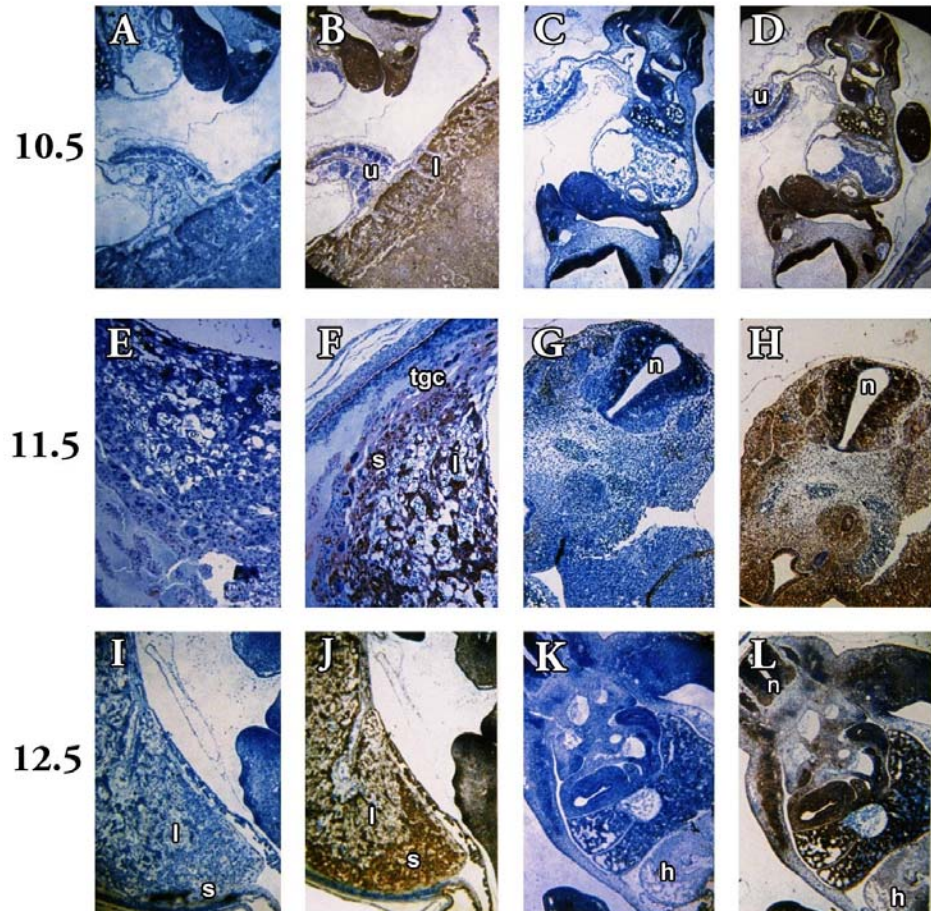
14) I-L zeigen Gestationstag 9,5, Negativkontrollen sind nicht abgebildet.

A, B, E, F, I, K sind mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen, C, D, G, H, J, L mit 100-facher.

Beschriftung: wie in Abbildung 13) ergänzt durch **ys**, Dottersack; **al**, Allantois; **n**, Neuralrohr des Embryo; **p**, Plazenta.

Am Tag 10,5 (Abb. 15 A-D), färbten sich das Plazentalabyrinth und der Spongiotrophoblast, sowie fokal begrenzt auch bestimmte sich entwickelnde

Organe innerhalb des Embryos. Ähnliche Beobachtungen wurden auch am Tag 11,5 (Abb. 15 E-H) und Tag 12,5 (Abb. 15 I-L) gemacht.



**Abbildung 15 Fgl2 Immunhistochemische Färbung an den Tagen 10,5, 11,5 und 12,5 von CBA/JxDBA/2 Schwangerschaften**

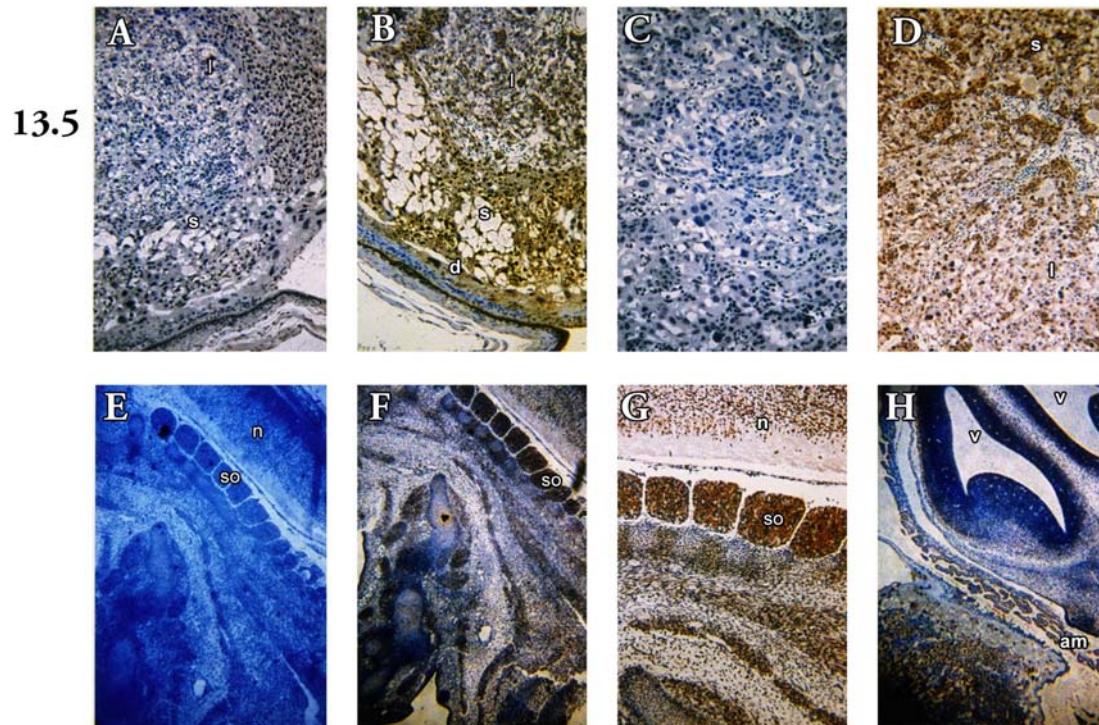
15) A-D stellt Tag 10,5 dar, A und C sind Negativkontrollen, B und D sind mit Anti-Fgl2-Ak markiert. E-H repräsentiert Tag 11,5, F und H sind mit Anti-Fgl2-Ak gefärbt, E und G sind die entsprechenden Negativkontrollen.

15) I-L zeigen Gestationstag 12,5 mit den Negativkontrollen I und K. J und L sind die Anti-Fgl2-Ak markierten Proben.

Beschriftung: **u**, Umbilikalschnur; **l**, Plazentalabyrinth; **tgc**, Zellschicht aus Riesentrophoblasten; **s**, Spongiotrophoblast; **h**, Herz. Alle Abbildungen sind mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen.



Am Gestationstag 13,5 (Fig. 16 A-H), konnte Fgl2 wieder im Plazentalabyrinth und im Spongiotrophoblasten nachgewiesen werden (16 B und 16 D). Innerhalb des Embryos stellten sich verschiedene Areale des sich entwickelnden Nervensystems, der Lungen, der Extremitätenknospen und Somiten (später Wirbel der Wirbelsäule) selektiv positiv gefärbt dar (16 F-H).



**Abbildung 16 Immunhistochemische Färbung von Fgl2 am 13,3 Gestationstag in CBA/JxDBA/2 gekreuzten Mäusen**

16) A-D zeigen Plazenta, A und C sind Negativkontrollen, B und D Anti-Fgl2-Ak markierte Schnitte. Die Ausschnitte A und B sind 40-fach vergrößert, C und D 100-fach.  
 16) E-H zeigen ausgewählte Teile des Embryos. E ist die Negativkontrolle F (40-fache Vergrößerung) und G (100-fach) zeigen Anfärbungen für Fgl2 im Bereich der Somiten und des Neuralrohres. H illustriert die schichtweise Anfärbung von Neuralgewebe mit Anti-Fgl2-Ak mitsamt den sich entwickelnden Ventrikeln.

Beschriftung: n, Neuralrohr; so, Somiten; n, Neuralrohr, am, Amniotische Membranen

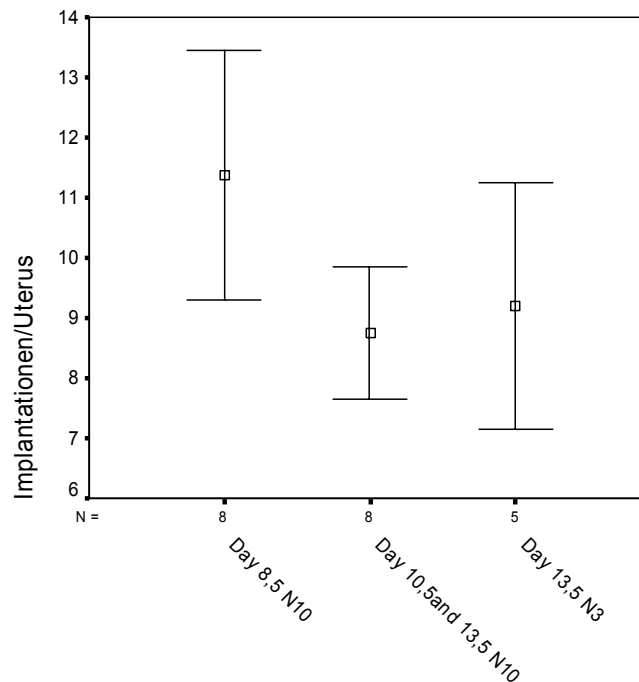
### **5.2.2. Ergebnisse der Genotypisierung an Fgl2+/- heterozygot gekreuzten Mäusen**

Daten einer vorausgegangenen Studie, in der die Embryonen aus Kreuzungen von Fgl2+/-x Fgl2+/- Heterozygoten genotypisiert worden waren, hatten einen Verlust an Fgl2+/- und Fgl2-/- Embryonen zwischen Tag 8,5 und 10,5 pc in N3 Generationen von Fgl2-Knockoutmäusen gezeigt (Clark et al. 2004). Wir wiederholten den Versuch in N10 Generationen der Knockoutmäuse. Nach neun bis zehn Generationen von Rückkreuzungen von gemischtgenetischen (C57Bl/6x129Sv/J) Fgl2+/- Mäusen mit C57Bl/6 sollte die Heterozygotität der Mäuse ausreichend reduziert sein (von einem Mix aus Sv129/J und C57bl/6 hin zu über 99,2% C57bl/6). Dieser Versuch sollte das Überleben verbessern, falls das Absterben der Fgl2-/- und Fgl2+/- Embryonen auf mütterliche T-Zellen zurückzuführen wäre, die eine Abstoßung triggern, weil den Embryonen fremde väterliche Antigene fehlen (durch die Inzucht in der N1-N3 Generation). Außerdem ist auch für die residuale Heterozygotität (129Sv/J Hintergrund der Mäuse) bekannt, daß diese negative Auswirkungen auf die Reproduktion haben kann. In Kreuzungen der N10 Generation sollten diese Einflüsse keine wesentliche Rolle mehr spielen, daher wurde die Studie in dieser Generation wiederholt.

Um den Zeitpunkt des Absterbens der Embryonen genauer einzugrenzen, wurden Kreuzungen der N10 Generation an Tag 8,5; 10,5 und 13,5 untersucht und mit Kreuzungen der N3 Generation an Tag 13,5 verglichen. Der Vergleich mit N3 Generationen diente als Kontrolle, da ähnliche Ergebnisse wie in der bereits durchgeführten Studie erwartet wurden.

Zunächst wurde die Anzahl der Implantationen pro Uterus während der Dissektion bestimmt. Es konnte festgestellt werden, daß die Anzahl der Implantationen nach Tag 8,5 abfiel. Dabei war der Unterschied Zwischen Tag 8,5 und 10, 5 bzw. 13,5 größer als zwischen Tag 10,5 und 13,5, wo es keinen Unterschied gab. Für Tag 13,5 der Kreuzungen der N3 Generation lag die Zahl der Implantationen ebenfalls weit unter der von Tag 8,5 der N10 Generation und

nur leicht oberhalb von Tag 10,5 der N10, wie auch in Abb. 17 und Tabelle 12 dargestellt.



**Abbildung 17 Gestationszeitpunkt des Auftretens der Schwangerschaftsverluste in Fgl2+/-x Fgl2+/- Kreuzungen von Mäusen**

Darstellung des Mittelwertes und Standardfehlers des Mittelwertes der beobachteten Anzahl von Implantationen pro Uterus in der N3 (Tag 13,5) und N10 (Tag 8,5 vs. 10,5 und 13,5) Generation.

**Tabelle 12: Versuchszahlen mit Angabe der Zahl an Versuchstieren und Implantationen**

Versuchsbezeichnung	Anzahl der Versuchstiere	Anzahl der Implantationen	Anzahl an Resorptionen	Anzahl erfolgreich genotypisierter Embryonen
Tag 8,5 N10	8	91	8	66
Tag 10,5 N10	5	45	4	39
Tag 13,5 N10	8	70	5	61
Tag 13,5 N3	5	46	2	44

Nach der Genotypisierung war die Betrachtung der Verteilung der einzelnen Genotypen möglich. Wie in Tabelle 13 ersichtlich, konnte ein selektiver Verlust von Embryonen für Tag 10,5 und 13,5 festgestellt werden. Weil sich die

Ergebnisse der beiden Tage statistisch kaum voneinander unterschieden wurden Tag 10,5 und 13,5 zusammengefaßt, um die Signifikanz zu erhöhen.

**Tabelle 13: Defizit in der Anzahl an Fgl2<sup>-/-</sup> und Fgl2<sup>+/-</sup> Embryos in heterozygoten Fgl2<sup>+/-</sup> Kreuzungen der N10 Generation**

Gestationstag <sup>a</sup>	Genotyp	Beobachtete Anzahl der Embryos	Erwartete Anzahl der Embryos
8,5	+/+	13	13 <sup>b</sup>
	+/-	45	26 <sup>b</sup>
	-/-	8	13 <sup>b</sup>
10,5	+/+	14	14 <sup>b</sup>
	+/-	22	28 <sup>b</sup>
	-/-	3	14 <sup>b</sup>
13,5	+/+	19	19 <sup>b</sup>
	+/-	30	38 <sup>b</sup>
	-/-	12	19 <sup>b</sup>
13,5 + 10,5	+/+	33	33 <sup>b</sup>
	+/-	52	66 <sup>b</sup>
	-/-	15	33 <sup>b</sup>

a) Daten für die einzelnen Gestationstage von Fgl2 heterozygoten (Fgl2<sup>+/-</sup>) Kreuzungen aus der N10 Generation, 10,5 + 13,5 repräsentiert zusammengefaßte Daten der beiden Gestationstage

b) Ausgehend von der Verteilung nach dem Mendelschen Gesetz +/+ : +/- : -/- = 1:2:1 wird +/+ als wahr angenommen und die erwarteten Werte für +/- und -/- berechnet

Aus dem Vergleich in Tabelle 13 geht hervor, daß die beobachtete Anzahl an Fgl2<sup>+/-</sup> Embryonen an den Tagen 10,5 und 13,5 durchschnittlich um 21,2% und die beobachtete Zahl der Fgl2<sup>-/-</sup> Embryonen um 57,7% niedriger war als nach den Mendelschen Gesetzen erwartet. Im Vergleich von beobachtet zu erwartet, waren die beobachteten Werte für die Zusammenfassung von Tag 10,5 und 13,5 signifikant niedriger ( $P < 0,0005$ ;  $\chi^2 = 12,8$ ), für die einzelnen Betrachtungen

tendenziell. Eine geringe Anzahl von Schwangerschaften der N3 Generation wurden ebenfalls untersucht und das Ergebnis ist in Tabelle 14 abgebildet.

**Tabelle 14: Defizit in der Anzahl an Fgl2<sup>-/-</sup> und +/- Embryos in heterozygoten Fgl2<sup>+/-</sup> Kreuzungen der N3 Generation**

Gestationstag <sup>a</sup>	Genotyp	Beobachtete Anzahl der Embryos	Erwartete Anzahl der Embryos
13,5	+/+	16	16 <sup>b</sup>
	+/-	19	32 <sup>b</sup>
	-/-	9	16 <sup>b</sup>

a) Daten für die einzelnen Gestationstage von Fgl2 heterozygoten Kreuzungen aus der N3 Generation

b) Ausgehend von der Verteilung nach dem Mendelschen Gesetz  $+/+ : +/- : -/- = 1:2:1$  wird  $+/+$  als wahr angenommen und die erwarteten Werte für  $+/-$  und  $-/-$  berechnet

Das Experiment mit der N3 Generation (Tabelle 14) zeigt ebenfalls die Verluste für Fgl2<sup>+/-</sup> und Fgl2<sup>-/-</sup> Embryonen gegenüber den nach den Mendelschen Gesetzen erwarteten Werten. Sie betragen 41% für Fgl2<sup>+/-</sup> heterozygote Embryonen und 44% für die Fgl2<sup>-/-</sup> homozygote Embryonen.

Für Tag 8,5 lag der N10 Generation (Tabelle 13) lag das Ergebnis für die beobachtete Anzahl an Fgl2<sup>+/-</sup> Embryonen signifikant über den Erwartungen mit einem Überschuss von 40,6% Fgl2<sup>+/-</sup> Embryonen. Ein Verlust von Fgl2<sup>-/-</sup> von 43,8% konnte zwar festgestellt werden, wurde aber als nicht der wahren Verteilung entsprechend abgelehnt aus Gründen die in der Diskussion näher erläutert sind.

## **6. Diskussion**

### **6.1. Kritische Betrachtung der Analyse der Lymphozyten in Blut und Plazenta**

#### **6.1.1. Einleitung**

Unterschiede in der Verteilung der Immunzellen innerhalb der Plazenta im Vergleich zum peripheren Blut oder Nabelschnurblut und damit in Zusammenhang stehende spezielle Reaktionsmuster und Funktionen werden schon seit langem untersucht. Die Zusammensetzung der Immunzellen scheint den Erfolg bzw. Mißerfolg einer Schwangerschaft maßgeblich zu beeinflussen. Basierend auf Erkenntnissen aus verschiedenen Arbeiten wurden in der Reproduktionsimmunologie mit der Erweiterung des Wissens unterschiedliche Modelle des immunologischen Verhältnisses zwischen Mutter und Fetus geprägt (Clark 2003, Clark 2004, Daya et al. 1985a, Daya et al. 1985b, Daya und Clark 1986, Daya und Clark 1988, Lea et al. 1990, Lea und Clark 1991, Sahoo et al. 2003, Coulam und Roussev 2002, Lim et al. 2000, Vassiliadou und Bulmer 1996, Billington 1992, Bulmer et al. 1987, Chaouat et al. 2001, King et al. 1996a, King et al. 1996b, Loke und King 1997, Loke und King 2000a, Loke und King 2000b, Verma et al. 1997, Bose 1989, Bose et al. 1989, Bose 1991, Bose und Lacson 1995, Bulmer 1992, Lachapelle et al. 1996, Robertson et al. 1994, Tian et al. 1998, Todt et al. 1996, Vinatier und Monnier 1995).

Viele Untersucher betrachteten die Plazenta dabei als Ganzes oder betrachteten die dezidualen Lymphozyten. J.M. Moore et al. (Moore et al. 1997) kritisierten die Analyse von Immunzellen aus der gesamten Plazenta, da es durch diese Technik zu einer Vermischung von maternalen und fetalen Immunzellen komme. Andere Forschergruppen (Papadogiannakis et al. 1985a, Shohat et al. 1986) brachten den Nachweis, daß sich diese beiden Zellgruppen gegenseitigen beeinflussen, vor allem daß fetale Zellen einen immunsuppressiven Effekt auf maternale PBL haben. Daher ist damit zu rechnen, daß die freie Vermischung der maternalen und fetalen Zellen bei verschiedenen Methoden der Analyse der Zellpopulationen in der Plazenta das

Untersuchungsergebnis verfälscht. J.M. Moore et al. stellten eine Perfusionstechnik zur Gewinnung von maternalem Blut aus den villösen Gefäßen der Plazenta vor. In ihrer Untersuchung konnten sie nachweisen, daß es durch die Perfusion möglich ist, reines villöses (maternales) Blut zu gewinnen und damit Untersuchungen an den Lymphozyten durchzuführen (Moore et al. 1997). Die Forschergruppe hatte jedoch nicht die Zusammensetzung der Lymphozyten im perfundierten Gewebe untersucht. So griffen wir die Methode auf, um villöses Blut auf die Zusammensetzung der Lymphozyten zu untersuchen, sowie des Weiteren zum Vergleich auch das gespülte Plazentagewebe, sowie ein ungespülte Gewebeprobe der Plazenta zu untersuchen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, waren die Lymphozytensubpopulationen in den verschiedenen analysierten Proben unterschiedlich verteilt.

#### **6.1.2. Diskussion der Ergebnisse für maternales und fetales Blut**

Maternales und fetales Blut wurden von uns als Vergleichsparameter mitgeführt, da deren Zusammensetzung bereits gut untersucht ist. Im Vergleich unserer Untersuchungsergebnisse mit Referenzwerten aus der Literatur zeigte sich für die untersuchten Lymphozytenpopulationen in maternalem und fetalem Blut eine weitgehende Übereinstimmung mit den Quelldaten.

Für CD3+ lagen die Angaben in der Literatur für nicht schwangere gesunde Frauen bei 74-76% (D'Arena et al. 1998, Santagostino et al. 1999). Für Schwangere war bei Kuhnert (Kuhnert et al. 1998) angegeben, daß die Werte für CD3+ im Vergleich zur Norm leicht erhöht sind. Somit liegt der von uns ermittelte Wert von  $77,16 \pm 2,43\%$  im hochnormalen Bereich. Für die CD4/CD8 Ratio wurde bei Kuhnert beschrieben, daß es keine Abweichungen zwischen Proben von graviden und nicht graviden Frauen gäbe (Kuhnert et al. 1998). Referenzwerte des Verhältnisses von CD4+ zu CD8+ lagen in der Literatur für gesunde Frauen bei 1,35-1,8 (Neubauer et al. 1989, Harris et al. 1992), der von uns ermittelte Wert bei 1,77. Zhao et al. (Zhao et al. 2002) hatten in ihrer Untersuchung von peripherem Blut Schwangerer vor Einsetzen der Wehen eine CD4+:CD8+ Ratio von nahezu 1:1 gefunden. Während die von ihnen bestimmte

CD8+ Menge in etwa der von uns gefundenen entsprach, war CD4+ nur halb so groß und CD3+ war ebenfalls ca. 20% niedriger. Hinsichtlich des Zeitpunktes der Probengewinnung ist die Angabe bei Zhao et al. jedoch unpräzise, so daß nicht klar ist, zu welchem Gestationszeitpunkt das Blut der Mütter untersucht wurde. Insgesamt waren CD4+ und CD8+ Zellen im peripheren Blut Schwangerer im Vergleich zu nicht Schwangeren (CD4+: 40-46,5% CD8+: 22-28,5 (Lin et al. 2001, Santagostino et al. 1999)) leicht erhöht, was auch bei (Mikyas et al. 1997) beschrieben ist.

Für B-Zellen waren die Referenzwerte beim Oberflächenmarker CD19+ in der Literatur mit 8,2-10,7% (Santagostino et al. 1999, Harris et al. 1992) etwas höher als in unserer Untersuchung (6,60%). Allerdings waren die Werte bei Santagostino und bei Harris im Gegensatz zu unseren im peripheren Blut nicht schwangerer Frauen bestimmt worden. Für CD20+ lagen die Angaben für nicht schwangere Frauen bei  $8,7 \pm 3,37\%$  (Bartha et al. 2000), für Frauen post partum bei  $6 \pm 2,22\%$  (Bartha et al. 2000) und damit niedriger als in unserer Studie (9,9%). Eine Untersuchung von Graviden und Nongraviden von (Kuhnert et al. 1998) kam zu dem Ergebnis, daß es zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede gäbe.

Die NK-Zellpopulation untersuchten wir mittels einer Doppelfärbung für die Oberflächenmarker CD16 und CD56. In der Literatur waren die NK Zellen meist als CD16+ und/oder CD56+ abgebildet und die Werte bewegten sich zwischen 10,8-15,5% (D'Arena et al. 1998, Santagostino et al. 1999, Juretic et al. 2000), unsere Werte lagen bei CD16+ 12,35%, CD16+CD56+ 10,35%. (Kuhnert et al. 1998) beschreiben für Schwangere Frauen einen Wert der mit  $19,3 \pm 3,33\%$  höher liegt als der für Nichtschwangere. Kuhnert et al. (Kuhnert et al. 1998) behaupten im Gegensatz dazu, daß die NK Zellen im peripheren Blut niedriger sind als normal, jedoch erreichte der Vergleich keine statistische Signifikanz. Bei allein CD56 positiven Zellen gab es keinen Unterschied zwischen schwanger und nicht schwanger. Die Werte lagen zwischen 3-5,6% (Erbach et al. 1993, Lin et al. 2001) wie auch der von uns ermittelte 3,08%.

Für CD25+ waren die Referenzwerte in der Literatur, die für gesunde nicht schwangere Frauen ermittelt worden waren mit  $8,1 \pm 3,7\%$  (Lin et al. 2001) höher



als der von uns gefundene Wert von 4,19%. Kuhnert et al. (Kuhnert et al. 1998) waren in ihrer Studie bei schwangeren Frauen ebenfalls zu einem niedrigeren Wert im Vergleich zu nicht Schwangeren gekommen. Castilla et al. (Castilla et al. 1989) beschreiben, daß der Anteil von CD16+ im zweiten Trimester abfällt und diese Reduktion bis ins dritte Trimester und Puerperium erhalten bleibt.

Tabelle 15 zeigt die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen im Nabelschnurblut der Neugeborenen im Vergleich zu Referenzwerten aus der Literatur.

**Tabelle 15: Vergleich der Verteilung der Lymphozyten im Nabelschnurblut mit Werten aus der Literatur**

<b>Oberflächenmarker</b>	<b>Referenzwert Literatur</b>	<b>Unsere Studie</b>
CD3+	<b>59-75%</b> (D'Arena et al. 1998, Thilaganathan et al. 1992)	71,05±3,98%
CD4+	<b>28,8±11,5%</b> (CD3+CD4+(Lin et al. 2001)) <b>54%</b> (Thilaganathan et al. 1992)	52,71%
CD8+	<b>12,4-24%</b> (Thilaganathan et al. 1992, Lin et al. 2001, Zhao et al. 2002, Harris et al. 1992)	18,88%
CD4 : CD8 Ratio	<b>2,4-2,57%</b> (Thilaganathan et al. 1992, Zhao et al. 2002, Harris et al. 1992)	2,79%
CD19+	<b>7,3%</b> ; vermehrt im Vgl. zu MB (Motley et al. 1996, Harris et al. 1992)	9,87%
CD20+	NB höher als Erwachsene (D'Arena et al. 1998), höher als MB (Motley et al. 1996)	12,16%
NK CD16+	<b>12,0-23,8%</b> (D'Arena et al. 1998, Kuhnert et al. 1998)	19,82%
CD16+CD56+	<b>4,8%</b> (Juretic et al. 2000)	3,57%
CD56+	<b>0,6±0,5%</b> (Lin et al. 2001)	5,05%
CD25+	<b>2,1±1,7%</b> (Lin et al. 2001), niedriger als Erwachsene (D'Arena et al. 1998)	4,18%

Abweichungen zu unseren Ergebnissen zeigen sich nur für CD4+ wo Lin et al. (Lin et al. 2001) einen weit niedrigeren Wert fanden, während Thilaganathan (Thilaganathan et al. 1992) unser Ergebnis stützt. Alle anderen Angaben zeigten weitestgehend Übereinstimmung. Abweichungen von ein bis zwei Prozent schreiben wir den niedrigen Fallzahlen zu, durch die individuelle Unterschiede bei den Untersuchten Proben eine höhere Gewichtung bekommen.

Die Verteilung der Lymphozyten in den mütterlichen und fetalen Proben zeigt, daß diese Parameter weitestgehend den Referenzwerten in der Literatur entsprechen und somit geeignet sind als Vergleichsparameter für die Plazentaprobe.

### **6.1.3. Kritische Betrachtung der Resultate für villöses Blut und Plazentagewebe**

Villöses Blut sowie die Plazentaprobe waren in der Literatur vergleichsweise weniger gut vergleichbar beschrieben. Die in den beschriebenen Studien verwendeten Methoden der Probengewinnung unterschieden sich zumeist von unserer Methode, sowie in vielen Fällen auch der Gestationszeitpunkt zu dem die Probe gewonnen worden waren. Viele der Studien waren dabei auf die Analyse dezidualer Lymphozyten ausgerichtet. Wir hingegen untersuchten villöses Blut, sowie die gespülte und ungespülte Plazenta auf die Verteilung der Lymphozyten. Es ergaben sich dabei in den verschiedenen Proben unterschiedliche Verteilungsmuster der Lymphozytenpopulationen, wobei sich villöses Blut von den beiden Plazentaprobe aber auch von maternalem und fetalem Blut unterschied.

#### **6.1.3.1. Betrachtung der T-Zellpopulationen**

In der Analyse der CD3+ in villösem Blut kann angenommen werden, daß der in J.M. Moore (Moore et al. 1997) angegebene Wert durchaus mit unseren vergleichbar ist ( $61,29 \pm 10,79\%$  vs.  $71,12 \pm 4,71\%$ ). Die angegebene Streubreite der Werte bei J.M. Moore war in unserer Untersuchung ähnlich und bei nur 10

untersuchten Proben ist diese Abweichung der Mittelwerte voneinander somit erklärbar.

Für den prozentualen Anteil CD3+ Lymphozyten in reifer Plazenta beschrieben Roussev et al. (Roussev et al. 1993), daß in gespülter und nicht gespülter Plazenta die Anteile gleich seien. In unserer Studie findet sich jedoch ein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Proben. Ebenso wie bei uns war auch in ihrer Untersuchung (Roussev et al. 1993) festgestellt worden, daß der Anteil von CD3+ geringer war als in maternalem und fetalem Blut (in unserer Studie für PnG tendenziell und für PG signifikant). Der Unterschied zur Untersuchung von Roussev et al. (Roussev et al. 1993) könnte in der verwendeten Technik bestehen. Bei Roussev et al. (Roussev et al. 1993) war die gespülte Plazenta mit eiskaltem PBS exzessiv gewaschen worden und dann beide Gewebeproben (gespült und nicht gespült) jeweils in einem Mixgerät mechanisch zu zerkleinert und die Zellen mittels Ficoll isoliert worden. Dieses Vorgehen beim Spülen der Plazenta entspricht der Vorbereitung der Plazenta auf die Perfusion in unserer Untersuchung. Die Gleichheit zwischen den gespülten und ungespülten Plazentaprobe ist daher bei Roussev et al. sehr wahrscheinlich.

In unserer Untersuchung war der Anteil CD3+ in den Blutproben (maternal, fetal, villös) mit Werten von 71,05-77,16% ähnlich. In PG (52,56%) und PnG (65,15%) war der Anteil niedriger als im peripheren Blut ersterer signifikant, letzterer tendenziell. Des Weiteren war der Anteil in PG auch signifikant niedriger als PnG. Diesen Sachverhalt führen wir auf darauf zurück, daß im ungespülten Plazentagewebe villöses Blut enthalten ist, in welchen der Anteil an CD3+ Lymphozyten höher ist, wie bereits dargestellt wurde.

Für CD4+ stimmte der von uns gefundene Anteil in villösem Blut nicht mit dem bei J.M. Moore (Moore et al. 1997) beschriebenen überein. Er lag in deren Untersuchung nur bei reichlich der Hälfte von unserem.

Mit der Arbeit von Roussev (Roussev et al. 1993) stimmten wir insofern überein, daß in nicht gespülter Plazenta weniger CD4+ gefunden wurde als in mütterlichem peripheren Blut, jedoch waren in der gespülten Plazenta in

unserer Studie weniger CD4+ als in der nicht gespülten, was im Kontrast zur Untersuchung von Roussev (Roussev et al. 1993) steht.

Der Prozentuale Anteil der CD8+ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten im villösen Blut ist in unserer Studie annähernd gleich dem Ergebnis bei J.M. Moore (Moore et al. 1997).

Als eine Folge daraus ergibt sich für die CD4:CD8 Ratio in unserer Untersuchung ein wesentlich höherer Wert als bei J.M. Moore (1,85 vs.  $1,28 \pm 0,61$ ) (Moore et al. 1997). Der Anteil CD8+ Lymphozyten war in mütterlichem und villösem Blut sowie in den Plazentaprobe gleich, nur im NB war er niedriger.

Ebenso wie für CD3+ und CD4+ hatten Roussev et al. (Roussev et al. 1993) für CD8+ gefunden, daß der Anteil in PnG gleich PG ist. Im Fall von CD8+ deckt sich das mit unserem Ergebnis, allerdings fanden Roussev et al. (Roussev et al. 1993) den Anteil CD8+ höher als in MB und NB, was bei uns nicht der Fall war.

Andere Untersucher hatten vor allem unreife Plazenten untersucht und dabei für CD3+ niedrigere Werte (Anteil an CD3+ an allen Zellen 10-30 % je nach Quelle) gefunden, als wir zum Zeitpunkt der Geburt, z.B.: Loke et al. (King et al. 1996a, Loke und King 2000b, Loke und King 1997) und andere (Arck et al. 2000, Starkey et al. 1988, Haynes et al. 1995, Nagaeva et al. 2002).

Der prozentuale Anteil der CD4+ und CD8+ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten verhielt sich ähnlich wie der der CD3+. In der Literatur waren für diese beiden Oberflächenmarker für die Frühschwangerschaft weitaus niedrigere Werte angegeben als für reife Plazenta (Loke und King 2000a, Loke und King 2000b, Loke et al. 1999, Loke und King 1996, Arck et al. 2000, Tian et al. 1998, Starkey et al. 1988, Haynes et al. 1995, Nagaeva et al. 2002). Zimmermann (Zimmermann 2004) hatte aber darüber hinaus gefunden, daß es in der CD8+ Population eine CD3 negative (CD3-) Fraktion gibt. Da in unserer Untersuchung keine CD8CD3 Doppelfärbung durchgeführt wurde bleibt es offen, ob es auch im villösen Blut eine solche Zellpopulation gibt.

Die CD4:CD8 Ratio war für die untersuchten Plazentakompartimente sehr unterschiedlich mit 0,95 für gespülte Plazenta, 1,37 für nicht gespülte und 1,85

für villöses Blut. Davon ausgehend, daß die meisten Untersucher Plazenta als ganzes untersuchten, ist der Wert von 1,37 vergleichbar dem von Zimmermann Wert von 1,4 für das Verhältnis (Zimmermann 2004) beschriebenen und auch ähnlich niedrig bei anderen Autoren in der Frühschwangerschaft (Loke et al. 1995, Haynes et al. 1995) sowie in der reifen Plazenta (Markert et al. 1997). Die Ratio folgt im Wesentlichen der Verteilung der CD4+. NB bildet dabei die Ausnahme, da hier prozentual weniger CD8+ vorhanden sind und somit die Ratio mit 2,79 den höchsten Wert annimmt.

Eine niedrigere CD4:CD8-Ratio als im Blut Nichtschwangerer scheint Ausführungen von Malinowski (Malinowski et al. 1992) und Markert (Markert et al. 1997) zufolge auch für das periphere Blut Schwangerer zuzutreffen, dies bestätigte sich in unserer Untersuchung nicht. Wir fanden, wie Coulam (Coulam et al. 1983), daß Schwangerschaft den prozentualen Anteil von T-Zellen im peripheren Blut nicht wesentlich beeinflußt.

#### 6.1.3.2. Diskussion der Ergebnisse für natürliche Killerzellen

Zimmermann (Zimmermann 2004) fand in ihrer Untersuchung der reifen Plazenta einen Anteil von ca. 13% CD56+ NK Zellen und 10% für CD16+. Sie führten jedoch keine Doppelfärbung dieser Population durch, wodurch es in ihrer Untersuchung unbestimmt blieb, welchen Teil CD56+CD16+ doppelpositive Zellen ausmachen. Unsere Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle 16 veranschaulicht.

**Tabelle 16: Verteilung der CD16+ und/oder CD56+ Lymphozyten**

<b>Marker</b>	<b>MB</b>	<b>NB</b>	<b>PG</b>	<b>PnG</b>	<b>VB</b>
CD16+CD56- in %	12,12	16,25	41,52	24,49	23,04
CD16+CD56+ in %	10,35	3,57	12,41	7,87	4,91
CD56+CD16- in %	3,08	1,48	11,19	6,12	4,86
NK-Zellen (CD16+ u./o. CD56+) in %	25,55	21,30	65,12	38,48	32,81

Roussev et al. (Roussev et al. 1993) fanden, daß NK-Zell-Marker wie CD16, CD56, und CD57 zeigten, daß dieser Zelltyp in der reifen Plazenta (für PG und PnG gleich) etwa fünfzehnmal höher vertreten war als in maternalem oder

fetalem Blut. Ihre Isolationsmethode war jedoch von unserer verschieden, da sie statt Perfusion eine Waschung mit kaltem PBS vornahmen, des weiteren sind keine Angaben verfügbar, ob CD16 und CD56 einzeln oder als Doppelfärbung bestimmt worden waren. Auch unsere Untersuchung fand einen höheren Anteil CD56 u./o. CD16 positiver in der Plazenta im Vergleich zu MB und NB, jedoch nicht fünfzehnmal Roussev (Roussev et al. 1993) höher sondern nur bis zu viermal.

In der Frühschwangerschaft schien vielen Autoren zufolge die dominierende Zellpopulation in der Plazenta die der NK-Zellen zu sein (CD56+CD3-CD16-) mit Anteilen bis zu 80% (Haynes et al. 1995, Arck et al. 2000, Tian et al. 1998, Ozenci et al. 2001, King et al. 1996a, Nagaeva et al. 2002).

Es wurde jedoch ebenfalls beschrieben, daß die Menge der NK Zellen mit dem Verlauf der Schwangerschaft abfällt. So fand Erbach (Erbach et al. 1993) zum mittleren Gestationsalter in der 18.-24. SSW CD16+ in maternalem Blut und Plazenta gleich verteilt, während das Verhältnis der CD56+ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten in der Plazenta weit höher war als im peripheren Blut (17% vs. 3%). Bei CD56+ Zellen wird außerdem zwischen CD56 „bright“ und CD56 „dim“ unterschieden (Koopman et al. 2003). CD56 „bright“ kommen vor allem in der Plazenta vor während CD56 „dim“ im peripheren Blut dominieren (Koopman et al. 2003). In unserer Untersuchung wurde keine Unterscheidung der beiden Untergruppen von CD56+ durchgeführt.

Es stellt sich dar, daß in unserer Untersuchung der Wert für CD16+(CD56-) Lymphozyten in der Plazenta weitaus höher ist als von Zimmermann (10%) beschrieben (Zimmermann 2004), wo er bei 10% lag. Das Maximum an CD16+ hatte Zimmermann in der Chorionplatte gefunden. Es bleibt anzumerken daß sich in der CD16+ Zellfraktion neben NK Zellen auch andere aktivierte Lymphozyten verbergen können.

### **6.1.3.3. Diskussion der Resultate für B-Zellen**

Die Analyse der B-Zellen im villösen Blut hatten J.M. Moore et al. (Moore et al. 1997), die als Oberflächenmarker einen Anti-CD19-AK verwendeten, im Mittel einen höheren prozentualen Anteil erhoben als unsere Studie (18,36% vs.

10,43%). Der Wert, den wir mittels CD20 ermittelt hatten, lag mit 22,02% wesentlich näher bei dem von J.M. Moore et al. (Moore et al. 1997). Zimmermann (Zimmermann 2004) hatte in der reifen Plazenta einen Anteil von 6-9% CD19+ B-Zellen gefunden, mit einer Anreicherung der Zellen in der maternalen Seite der Plazenta. Im Gegensatz dazu scheint der Anteil der B-Zellen in der Frühschwangerschaft weitaus geringer zu sein mit unter 5% (Mincheva-Nilsson et al. 1994, Nagaeva et al. 2002).

Erbach et al. (Erbach et al. 1993) hatten zum Zeitpunkt der 18.-24. SSW für CD19 und CD20 in Plazenta und peripherem Blut vergleichbare prozentuale Anteile gefunden.

Zimmermann (Zimmermann 2004) hatte für B-Zellen in der Plazenta einen den T-Lymphozyten gegenläufigen Verteilungsmodus der untersuchten Kompartimente beschrieben. Durchschnittlich war der Wert für CD19+ bei ihrer Untersuchung mit 6-9% angegeben.

Des Weiteren untersuchten wir den Marker CD138, welcher auf Plasmazellen, einer reifen B-Zellform, exprimiert wird und nur schwach auf Pre-B-Zellen vertreten ist. Der prozentuale Anteil zeigte erwartungsgemäß im peripheren mütterlichen Blut und im Nabelschnurblut Werte nahe null. Beim Gesunden sind CD138 positive Zellen nicht im peripheren Blut vorhanden. In der Plazenta jedoch waren CD138+ Plasmazellen vertreten. Der höchste Anteil fand sich mit 8,48% in gespülten Plazentagewebe, der niedrigste mit 4,86% im villösen Blut. Der in nicht gespülter Plazenta gefundene Wert korrelierte mit 5,25% am ehesten mit dem im villösen Blut gefundenen. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß B-Zellen in der Plazenta lokal aktiviert werden. Auch Zimmermann hatte einen erhöhten Anteil aktivierter B-Lymphozyten in der Plazenta vermutet, jedoch nicht genauer bestimmt.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß B-Zellen in der Plazenta spezielle, asymmetrische und damit inkomplette, Antikörper mit blockierenden Eigenschaften produzieren können (Jalali et al. 1995, Canellada et al. 2002). Es wird vermutet, daß diese Antikörper immunsuppressive Eigenschaften besitzen (Jalali et al. 1995, Canellada et al. 2002).

#### **6.1.3.4. Kritische Betrachtung der Ergebnisse für Monozyten**

Makrophagen entstehen aus Monozyten, wenn diese aus dem Blut in Gewebe übertreten und sich dort ansiedeln. Monozyten und Makrophagen, welche zumeist über das Oberflächenantigen CD14 bestimmt werden sind in der Dezidua basalis und parietalis während der Schwangerschaft anwesend (Bulmer et al. 1988). Sie sind bereits in der Frühschwangerschaft mit etwa 6%-22% in der Plazenta vertreten (King et al. 1996a, Ozenci et al. 2001, Nagaeva et al. 2002). In reifer ungespülter Plazenta wurden von Vince et al. 18% Makrophagen gefunden (Vince et al. 1990), während Zimmermann 1,6% beschrieben hatte (Zimmermann 2004). Wir hatten in der gespülten Plazenta mit 17,42% einen Wert ähnlich dem von Vince et al. beschriebenen gefunden. In der ungespülten Plazenta und dem villösen Blut lagen die Werte nah beieinander mit 6,38% und 6,81%. Die Vermutung ist daher, daß die Monozyten zum überwiegenden Teil im Plazentagewebe angesiedelt sind.

Es wird vermutet, daß Makrophagen eine herausragende Rolle in der Kontrolle der Trophoblastinvasion spielen (Bulmer 1992). Der Einfluß von HLA-G und sHLA-G auf die immunologischen Vorgänge in der Plazenta, der Gegenstand neuerer Untersuchungen ist, ist ebenfalls eng mit Makrophagen assoziiert. So wird vermutet, daß sHLA-G von aktivierten Makrophagen in der Plazenta produziert wird (Chu et al. 1998). Des Weiteren sollen Makrophagen in der Plazenta eine enge Beziehung zu den Trophoblasten haben, wobei die Expression von MHC Klasse II Molekülen und CD11c eine immunologische Funktion an der fetomaternalen Grenzfläche nahe legen (Bulmer et al. 1988).

Mues et al. haben unterschiedliche Phänotypen von Makrophagen in der reifen Plazenta untersucht und gefunden, daß ein antiinflammatorischer Typ vorherrschend ist (Mues et al. 1989). Ebenso wie Bulmer et al. hatten sie den Makrophagen sogar eine immunsuppressive Funktion zugeschrieben (Mues et al. 1989, Bulmer et al. 1988).

#### **6.1.3.5. Diskussion der Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD95, CD54**

Ein weiteres ausschlaggebendes Charakteristikum der Immunzellen in der Plazenta ist neben der Verteilung der einzelnen Typen der Aktivierungszustand



der Zellen. Wir haben diesen Zustand mit den Markern CD25, CD69, CD54 und CD95 untersucht (Markert et al. 2000). Chaouat hatte postuliert, daß CD95/CD95-Antigen bzw. Fas/Fas-Ligand Interaktionen entscheidend für die Immunregulation der Plazenta sind und somit zum Erfolg der Schwangerschaft beitragen (Chaouat et al. 1999). Sie fanden aber auch, daß sie nicht obligatorisch für den Erfolg der allogeneischen Schwangerschaft sind (Chaouat und Clark 2001). Es wird diskutiert, daß dabei noch andere Mechanismen involviert sind. Fas-Ligand kann die Apoptose bei CD95/Fas positiven Zellen einleiten. Fas-Ligand wurde von Zorzi et al. in der Plazenta unter anderem auf Trophoblasten und fetalen Zellen nachgewiesen (Zorzi et al. 1998). CD95 war in unserer Untersuchung zu nahezu gleichen prozentualen Anteilen in allen Plazentaprobe gefunden worden 25,42-29,38%. Sehr hoch war der Anteil CD95% Zellen im mütterlichen Blut mit 34% gefunden worden. Dies war bereits von Reinhard et al. beschrieben worden (Reinhard et al. 1998). Im fetalen Blut hingegen war CD95 mit knapp 5% nur sehr schwach exprimiert, was auf die funktionelle Unreife dieser Zellen hindeuten könnte.

CD54 bzw. ICAM-1 war in der gespülten Plazenta mit einem prozentualen Anteil von 22,41% positiven Zellen am höchsten, überstieg die Anteile in den beiden anderen Plazentaprobe jedoch nur tendenziell. Wesentlich niedriger waren die Anteile an CD54+ Zellen in den Blutproben. Diese Verteilung deutet ebenfalls auf eine lokale Aktivierung der Lymphozyten in der Plazenta hin. CD54/ICAM-1 ist ein induzierbares Glykoprotein welches für die Adhäsion, Aktivierung und Transmigration von zirkulierenden Leukozyten durch das vaskuläre Endothel verantwortlich ist (Everett et al. 1994). Außerdem wurde ICAM-1 eine Rolle bei der Auslösung von Wehentätigkeit zugeschrieben (Steinborn et al. 1999).

Ein weiteres Indiz für die lokale Aktivierung der Plazentalymphozyten zeigte die Verteilung der CD69 positiven Lymphozyten. Eine im Vergleich zu peripherem Blut hohe Expression von CD69, einem früher Aktivierungsmarker, im ungespülten Plazentagewebe wurde von Abdina-Molina et al. beschrieben (Abadia-Molina et al. 1996). In unserer Studie war CD69 im gespülten Gewebe etwa doppelt so stark vertreten wie im ungespülten. Im villösen Blut verhielt sich der prozentuale Anteil, wie in ungespülter Plazenta und wie im mütterlichen

peripheren Blut. Verschiedene Forschergruppen stellten eine hohe Expression von CD69 im Plazentagewebe bereits in der Frühschwangerschaft fest (Saito et al. 1992, Slukvin et al. 1993). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die lokale Aktivierung von Lymphozyten in der Plazenta.

Der Oberflächenmarker CD25 ist die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors und wird auf aktivierten B- und T-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert. In unserer Untersuchung fanden sich in den beiden Blutproben und den beiden Gewebeproben etwa die gleichen Prozentualen Anteile von ca. 4% CD25+ Zellen. In villösem Blut war der Anteil CD25+ jedoch um das 4fache höher als in den anderen Proben. Matthiesen et al. fanden im peripheren Blut schwangerer Frauen verminderte Expression von CD25+ (Matthiesen et al. 1996). Dies bestätigte sich in unserer Untersuchung, denn der von uns gefundene prozentuale Anteil in Mütterlichem Blut lag auf einem niedrigeren Niveau als normal.

Durch den IL-2-Rezeptor wird die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten reguliert (vor allem bei der Th1-Antwort). Der IL-2-Rezeptor besteht aus 3 Untereinheiten, den  $\alpha$ - (55kDa),  $\beta$ - (75kDa) und  $\gamma$ - (64kDa) Ketten. Die höchste Affinität besitzt der Rezeptor IL-2R bestehend aus allen 3 Ketten. IL-2R $\alpha$  bindet IL-2 nur mit geringer Affinität, ist aber unfähig das Signal allein zu transduzieren. Der Anteil von CD25+ Zellen variiert abhängig von verwendeten Fluochromen und Durchflußzytometern (Perola et al. 2000). Ein Teil der CD25+ Zellen, nämlich die CD4+CD25+ doppelpositiven Zellen werden als regulatorische T-Zellen bezeichnet. Es wird vermutet, daß sie Toleranz induzieren (Field et al. 2001, Han et al. 1995). CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen sind durch die Präsenz von CD152 (Sasaki et al. 2004) und Verminderte Expression von CD28 und CD86 (Zhu et al. 2005) charakterisiert.

In weiteren Quellen war die erhöhte Expression anderer Aktivierungsmarker im Plazentagewebe zu unterschiedlichen Gestationszeitpunkten beschrieben, so z.B. CD38, CD71 und HLA DR (Abadia-Molina et al. 1996, Geiselhart et al. 1995, Slukvin et al. 1993), die auf T-Zellen exprimiert werden.

Insgesamt legt die Analyse der Aktivierungsmarker in der Plazenta nahe, daß die Lymphozyten in der Plazenta und dort besonders stark im Gewebe lokal aktiviert werden. Verantwortlich dafür sind vermutlich lokale Immunmediatoren, die von Zellen der Plazenta z.B. von Trophoblastzellen gebildet werden bzw. auch durch fetale Antigene angeregt werden.

Für Nabelschnurblut war in der Literatur zahlreich die funktionelle und phänotypische Unreife der Lymphozyten ausgeführt, die sich in der Analyse der Aktivierungsmarker in unserer Untersuchung bestätigte (Zola et al. 1996, D'Arena et al. 1998, Harris et al. 1992, Zola et al. 1995).

#### **6.1.4. Ausführungen zu Techniken und Methoden**

Die durchflußzytometrische Analyse von Lymphozyten aus Blut oder Geweben ist eine weitverbreitete und mit einem vertretbaren Arbeitsaufwand verbundene Methode um die Lymphozytenpopulationen genauer zu untersuchen. Die Möglichkeit, mehrere Marker gleichzeitig auf der Zelloberfläche bestimmen zu können, hat in vielen Bereichen der Forschung dazu beigetragen neue Erkenntnisse über Funktion und Aktivierung und Verteilung von Zellen zu erlangen (Mansour et al. 1990). Gleichzeitig ist es möglich die Lymphozyten für funktionelle Analysen zu isolieren und zu kultivieren.

In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise, die den Einfluß der Isolationsmethoden für die Gewinnung der zu untersuchenden Zellen auf das Endergebnis verdeutlichen.

Nagaeva et al. (Nagaeva et al. 2002) als auch De Paoli et al. (De Paoli et al. 1984) haben den Einfluß der Isolationsmethode auf Untersuchungsergebnisse bei Verwendung von Ficoll und Percoll untersucht. Sie zeigten, daß bei Verwendung von Ficoll ein Verlust von CD8+ Zellen auftritt. Percoll scheint keine derartigen Verluste zu verursachen. In unserer Studie wurde Ficoll als Isolationsmedium verwendet, ebenso wie in den meisten anderen zitierten Studien, da es sich um ein seit Jahren international akzeptiertes Standardprodukt ist. Wir gehen daher davon aus, daß ein eventuell durch Ficoll verursachter Fehler ebenfalls in der Literatur vertreten ist, die zur Planung des Experiments herangezogen wurde. Wir können daher davon ausgehen, daß die

Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit denen aus der Literatur gegeben ist. Für die Planung weiterer Experimente in unserem Labor sollte jedoch die Verwendung von Percoll anstelle von Ficoll in Betracht gezogen werden.

Andere Autoren schlagen die Verwendung von Vollblut anstelle isolierter Lymphozyten vor, da sie Verluste in B- und T-Zellpopulationen in isolierten Lymphozyten fanden (Kutvirt et al. 1993, Neubauer et al. 1989, De Paoli et al. 1984, Romeu et al. 1992, Mansour et al. 1990). Da in unserer Untersuchung Gewebe analysiert wurde, war es notwendig Lymphozyten von Gewebszellen und Debris zu isolieren. Es ist in der Literatur beschrieben, daß die Anwesenheit von Zelldebris und toten Zellen im Analysat die durchflußzytometrische Analyse erschweren kann. Deshalb wurden die Lymphozyten zur Vereinheitlichung und Vergleichbarkeit der Proben immer mit Ficoll isoliert. Verluste, falls vorhanden, sollten in allen Proben gleichermaßen vertreten sein und die Vergleichbarkeit sollte somit gegeben sein.

Des weiteren gibt es Hinweise in der Literatur, daß zur Zellisolierung verwendete Enzyme Einfluß auf Oberflächenantigene haben könnten (Ritson und Bulmer 1987). Eine im Vorfeld der Untersuchung durchgeführte Inkubation von peripherem Blut mit dem von uns verwendeten Enzym zur Zellisolierung zeigte keinen Unterschied zwischen nativer Blutprobe und mit Enzym versetzter Blutprobe.

Weitere Angaben in der Literatur weisen darauf hin, daß Untersuchungsergebnisse abhängig sind von verwendeten Antikörpern und Meßgerät.

Die Ausführungen zu den von uns verwendeten Techniken und Methoden zeigt, daß Unterschiede zu anderen zitierten Studien vielfältige Ursachen haben können. Es gab nahezu keine Studie, die exakt die gleichen Enzyme, Isolationsmethoden, Geräte und Antikörper verwendete. Dennoch scheint der Vergleich mit diesen Studien angemessen, da die postulierten Abweichungen durch verschiedene Methoden in der Regel sehr gering ausfielen.

Ein weiterer Unterschied, der beim Vergleich mit Angaben anderer Forscher eine Rolle spielen kann, ist der ethnische Hintergrund der untersuchten

Population. In der Studie von Moore et al. (Moore et al. 1997) waren die Proben von Schwarzafrikanern gewonnen worden. Hall et al. (Hall et al. 2000) wie auch andere Forscher (Motley et al. 1996) fanden, daß genetische Faktoren entscheidenden Einfluß auf Unterschiede in der Verteilung der peripheren Lymphozyten haben. Ob diese Unterschiede ebenfalls auf der Ebene der fetomaternalen Grenzfläche vertreten sind bleibt offen. In unserer Untersuchung war Material von Müttern und Feten mit kaukasischem ethnischen Hintergrund verwendet worden. Dieser Unterschied in der ethnischen Herkunft im Vergleich zu Moore könnte für gefundene Unterschiede zu dieser Studie mitverantwortlich sein. Ein weiterer Grund für Abweichungen unserer Ergebnisse zu denen in der Literatur sind die relativ niedrigen Fallzahlen. Individuelle Unterschiede in den einzelnen Proben erlangen dadurch eine höhere Gewichtung. Sowohl bei uns als auch in der Literatur sind die Fallzahlen meist ähnlich gering.

#### **6.1.5. Zusammenfassung zu den durchflußzytometrischen Untersuchungen an der Plazenta des Menschen**

Bei der Betrachtung der Plazentakompartimente könnte man davon ausgehen, daß sich die nicht gespülte Plazenta aus villösem maternalen Blut und dem geweblichen Teil (gespülte Plazenta) und fetalem Blut zusammensetzt. Anhaltspunkt für diese Feststellung ist die Tatsache, daß Meßwerte der ungespülten Plazenta in den meisten Fällen eine Mittelstellung zwischen villösem Blut und gespülter Plazenta einnehmen. Zwischen villösem Blut und maternalem peripherem Blut gibt es sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede, die auf eine lokale Aktivierung der Lymphozyten an der fetomaternalen Grenzfläche hindeuten. Dieses spezielle lokale Aktivierungsmuster könnte eine Rolle in der Erhaltung der Schwangerschaft und der Integrität der fetomaternalen Grenzfläche spielen.

Die Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen während der Schwangerschaft ist erheblichen Veränderungen unterworfen. Die Literatur beschreibt einen Anstieg der CD3+ T-Lymphozyten und eine Abfall der CD56+ NK-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft (Vargas et al. 1993, Castilla et al. 1989, Kruse et al. 2002). Ähnliche Beobachtungen gelten ebenfalls für das

periphere Blut schwangerer Frauen, wie bei Watanabe (Watanabe et al. 1997) und Kuhnert (Kuhnert et al. 1998) beschrieben. Diese Hinweise zeigen, daß während der Schwangerschaft permanent Anpassungsreaktionen des Immunsystems stattfinden, die nicht nur auf die fetomaternalen Grenzfläche beschränkt sind, sondern den gesamten Organismus der Frau betreffen.

Der CD4:CD8-Ratio wird eine bedeutende Rolle in der Erhaltung der Schwangerschaft zugeschrieben und es gibt Beobachtungen, daß eine Verschiebung des Verhältnisses mit Aborten in Verbindung gebracht werden kann (Lachapelle et al. 1996, Bartha et al. 2000).

Heute gilt als sicher, daß eine ausgeprägte Verschiebung des dezidualen Zellgefüges respektive des Verhältnisses CD3+/CD8+ Zellen zu CD56+ Zellen zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft fatale Folgen bis hin zum Abort haben kann.

Eine genaue Kenntnis der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen in der komplikationslosen Schwangerschaft kann den Weg zur Untersuchung pathologischer Schwangerschaften bereiten.

Mit Hilfe der Perfusionsmethode ist es möglich Deziduagewebe effektiv von Blut zu reinigen. Die Zellen im villösen Blut unterscheiden sich von denen im Plazentagewebe, maternalen Blut und Nabelschnurblut. Die Methode ermöglicht die Isolation lebender Lymphozyten in großer Zahl aus verschiedenen Plazentakompartimenten, welche für weitere Analysen sowohl phänotypischer als auch funktioneller Natur zur Verfügung stehen. Da die Plazenta normalerweise nach der Geburt verworfen wird, ist sie ein ideales Medium für immunologische Untersuchungen ohne das Risiko der direkten Beteiligung von Patientinnen.

#### **6.1.6. Zukunftsorientierte Anwendungen**

Unsere Studie hat auf die Analyse der Lymphozytenpopulationen in der Plazenta abgezielt. Wir verwendeten eine breite Palette von Antikörpern, um diese Zellen zu charakterisieren. Dennoch ist die Analyse nicht komplett und es sollten genauere Untersuchungen von Subpopulationen mit differenzierten

Markern erfolgen. Die Verwendung zusätzlicher Techniken wie MACS könnte dabei behilflich sein.

So hatte Zimmermann (Zimmermann 2004) gefunden, daß es in der CD8+ Population eine CD3- Fraktion gibt. Da in unserer Untersuchung keine CD8/CD3 Doppelfärbung durchgeführt wurde bleibt es offen, ob es auch im villösen Blut eine derartige Zellpopulation gibt und nicht nur im Plazentagewebe. Auch eine differenziertere Analyse der NK-Zellen könnte weitere interessante Aufschlüsse über Aktivierung und Funktion dieser Zellen in der Plazenta bringen.

Ein weiterer gedanklicher Ansatz ist die immunhistochemische Färbung von Geweben für besonders interessante Zellpopulationen, um diese genauer in der Plazenta zu lokalisieren. Vorstellbar ist ebenfalls die Durchführung der Perfusion mit Farbstoff. Dies hätte, wenn der Farbstoff die Gefäßwände respektiert, den Vorteil, daß beschädigte Teile der Plazenta leichter erkennbar würden. Zum anderen könnte man das Gewebe histologisch aufarbeiten um Zellen zu detektieren, die in Fibrin eingeschlossen sind oder an Gefäßwänden haften und somit unter Umständen nicht durch die Perfusion freigesetzt werden.

Zimmermann hatte Plazentagewebe in Schichten unterteilt (Zimmermann 2004). Durch die Anfärbung des mütterlichen Gewebes mittels der Perfusion, könnten diese Schichten noch genauer detektiert werden als makroskopisch strukturell wie es bei Zimmermann beschrieben und durchgeführt worden war.

Nicht zuletzt können die Ergebnisse der Arbeit als Referenzwerte für die Untersuchung pathologischer Plazenten herangezogen werden. Es gibt bereits Hinweise, daß Veränderungen im immunologischen Gefüge der Plazenta eine Rolle in der Entwicklung der Eklampsie, frühzeitiger Wehentätigkeit, geringem Geburtsgewicht, intrauteriner Wachstumsretardierung und anderen Problemen spielen. Mit der von uns verwendeten Methode ließen sich auch Plazenten aus solchen Schwangerschaften untersuchen. Dies wäre ein Schritt auf dem Weg hin zur Entschlüsselung des pathologischen Geschehens im Hintergrund dieser Schwangerschaften. Mit dem Verständnis des Prozesses könnte dann des weiteren auch die Therapie angepaßt werden.

## **6.2. Studien zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft am Mausmodell**

### **6.2.1. Kritische Betrachtung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung**

Wie im Ergebnisteil dargestellt, gab es zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft im CBA/JxDBA/2 Mausmodell unterschiedliche Fgl2 Expressionsmuster. Wir schließen, daß Fgl2 in einer Vielzahl von embryonalen Geweben, eingeschlossen Trophoblasten auftritt. Überdies fanden wir eine auffallende Hochregulation von Fgl2 in der maternalen Dezidua beim Kontakt mit dem Embryo während der frühen Implantationsphase. Eine Abgrenzung der Fgl2+ Dezidua von Fgl2+ Trophoblasten beginnt am Tag 7,5 in dem beobachteten CBA/JxDBA/2 Mausmodell.

Die Kinetik der Expression von Fgl2 Protein in maternalem und embryonalen Geweben in einer Gruppe von CBA/JxDBA/2 gepaarten Mäusen mit niedriger Abortrate, indiziert, daß Fgl2 eine physiologische Rolle sowohl in der Früh- als auch in der Spätschwangerschaft spielen kann.

Fgl2-mRNA-Expression in Trophoblasten und maternaler Dezidua ab dem Gestationstag 8,5 ist für die hohen Spontanabortraten im CBA/JxDBA/2 Modell erforderlich. Der direkte Kontakt zwischen Fgl2+ Trophoblasten und Dezidua ist in die Auslösung der Resorptionen verwickelt (Clark et al. 2001b). Die Abortrate der Mäuse, die in Abb. 13 bis 16 studiert wurden, war nur 6%. Diese niedrige Rate wird der Abwesenheit von „gefahrsignalisierenden“ Stoffen wie z.B. bakteriellem LPS zugeschrieben (Clark et al. 1993). Das Vorhandensein solcher Faktoren kann in Mauskolonien stark variieren (Clark et al. 2003). Die Anwesenheit von LPS stimuliert die lokale Ausschüttung von abortogenen Zytokinen INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , welche gemeinsam mit dem LPS Signal die Expression des Toleranz induzierenden CD200 (Ox-2) herunterregulieren (Clark et al. 2001a). Dieser Vorgang ist obligatorisch dafür, daß Fgl2 den Verlust des



Embryos einleiten kann, wie Experimente nach Injektion von LPS während der Schwangerschaft von Mäusen zeigen (Clark et al. 2001b).

### **6.2.2. Diskussion der Ergebnisse der Genotypisierung**

Unsere Schwangerschaftsverluststudie führt mit kleineren Fallzahlen eine bereits vorausgegangene Untersuchung fort (Clark et al. 2004). Besonders die Ergebnisse der Wurfgrößen und Verluste von Embryonen zu den einzelnen Zeitpunkten in unserer Studie kommt der Verteilung der vorherigen Studie sehr nahe. Abweichungen lassen sich dabei hinreichend durch die deutlich kleineren Fallzahlen und die damit höhere Gewichtung von Ausreißern erklären. In der Untersuchung der N10 Generation fiel die Anzahl der Implantationen von Tag 8,5 hin zu Tag 13,5 in ähnlicher Art und Weise ab wie in der zuvor durchgeführten Untersuchung der N3 Generationen.

Das Hauptinteresse galt aber der Verteilung der Genotypen von Fgl2. Für die Gestationstage 13,5 und 10,5 lag wie erwartet ein Verlust von Fgl2+/- und von Fgl2-/- Embryonen mit ähnlichen Werten wie bereits früher publiziert (Clark et al. 2004) vor. Aus unserem Ergebnis, wie auch aus dem Ergebnis der vorausgegangenen Studie, kann geschlußfolgert werden, daß der Verlust der Embryonen in Kreuzungen von Fgl2+/- Mäusen der N3 und N10 Generation vor Tag 10,5 auftritt. Um dies genauer zu untersuchen wurden Embryonen des Gestationstages 8,5 genotypisiert.

Wir hatten für dieses Gestationsalter (Tag 8,5) eine Verteilung vermutet, die annähernd der Mendelschen Verteilung entspricht, da aufgrund der größeren Anzahl von Implantationen angenommen wurde, daß die Resorption der Embryonen noch nicht stattgefunden hatte. Statt dessen lag der Wert für Fgl2+/- weit über den Erwartungen. Wir führten dies auf eine Kontamination des analysierten embryonalen Materials mit Fgl2+/- maternalen Material, wahrscheinlich während der Dissektion, zurück. Daraus folgte aber, daß auch die Werte für Fgl2+/+ und Fgl2-/- als eventuell fehlerhaft angenommen wurden, da durch Kontamination mit maternalem Material Embryonen aus diesen Gruppen fälschlicherweise der Fgl2+/- Gruppe zugeordnet wurden und somit nicht mehr der wahren Verteilung entsprachen. Eine alternative und eventuell

weniger durch Kontamination beeinflusste Untersuchungsmöglichkeit für diesen und frühere Zeitpunkte stellt möglicherweise die Anfärbung von LacZ, dar. Dies ist ein Teil des eingebauten inaktivierten Fgl2-Genkonstruktes, welcher für Laktose kodiert und somit mittels einer von (Teichert et al. 2000) beschriebenen Methode dargestellt werden kann. Möglicherweise könnte diese Färbung mit der Fgl2 immunhistochemischen Färbung kombiniert, bzw. durch Vergleich benachbarter Schnitte mit jeweils der einen oder anderen Färbung, zu genaueren Ergebnissen führen. Des Weiteren könnten auf diese Art auch die Tage 5,5 bis 10,5 untersucht werden, die dann eventuell zusätzliche Aufschlüsse über den Verlustzeitpunkt und -mechanismus bringen. Ein weiterer Vorteil läge in der Möglichkeit der direkten histologischen Beurteilung der gewonnenen Präparate oder weiteren zusätzlichen Färbungen, die Aufschluß über den Mechanismus des Absterbens der Embryonen geben könnten.

Dennoch kann festgestellt werden, daß der okkulte Schwangerschaftsverlust von Fgl2<sup>-/-</sup> und Fgl2<sup>+/-</sup> in Fgl2<sup>+/-</sup> heterozygoten Paarungen von Mäusen der N3 und N10 Generation mit Fgl2 zusammenhängt. Ein interessanter Umstand ist dabei, daß auch Embryonen betroffen sind, die ein intaktes Fgl2 Allel besitzen (Fgl2<sup>+/-</sup>), wie bereits früher (Clark et al. 2004) festgestellt.

### **6.2.3. Diskussion zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft**

Die plötzlichen Schwangerschaftsverluste von Embryonen, die homo- oder heterozygot das defekte Fgl2-Genkonstrukt tragen, treten zu einer Zeit auf, die mit „okkulten“ Fehlgeburten in der Periimplantationsphase zusammenfällt. Dies muß unterschieden werden von Spontanaborten/Resorptionen wie sie im CBA/JxDBA/2 Mausmodell auftreten (Clark und Croitoru 2001). Diese entstehen durch erhöhte Fgl2 Expression und Herunterregulation von CD200 (Ox-2) Molekül, was zu einer thrombingesteuerten Inflammation führt (Clark et al. 2001a). Im Unterschied dazu werden die Verluste von Fgl2 negativen Embryonen, wie in den Tabellen 13 und 14 gezeigt, einer Abwesenheit von physiologisch exprimiertem Fgl2 zugeschrieben.

Trotz der Tatsache, daß Fgl2 in verschiedenen embryonalen Geweben exprimiert wird, können Fgl2<sup>-/-</sup> Nachkommen bis zur Geburt und darüber hinaus

bis zur sexuellen Reife überleben (Clark et al. 2004) und sich weiter fortpflanzen. Dies weist darauf hin, daß Fgl2 wahrscheinlich nicht essentiell für die Embryogenese ist, jedoch für eine optimale Wurfzahl benötigt wird.

Kürzlich wurde über lösliches Fgl2 (bekannt als Fibroleukin), welchem die Prothrombinaseaktivität fehlt, herausgefunden, daß es ein potenter Immunsuppressor der klassischen T-Zellaktivierung ist (Chan et al. 2003). Es könnte daher vermutet werden, daß „okkulte“ Fehlgeburten, wie im Versuch beobachtet (Fgl2+/-x Fgl2+/-), durch den Verlust der lokalen Immunsuppression von klassischen T-Zellen mit dem  $\alpha\beta$  T-Zellrezeptor verursacht wurden.

Wenn sich diese Hypothese bestätigen würde, gäbe es mit Fibroleukin ein weiteres immunregulatorisches Molekül neben anderen, welches für den Erfolg während dieser Phase der Schwangerschaft relevant ist.

Trotzdem könnten andere immunologische Ereignisse eine sekundäre Rolle bei den Verlusten von Fgl2+/- und Fgl2-/- Embryonen spielen. Inzucht bei Mäusen ist assoziiert mit Infertilität und residuale Heterozygotität verbunden mit der erhöhten Gefahr potentieller Antigen-Immune-Interaktionen wurde dabei als ein unterstützender Faktor angesehen. Es folgt, daß die Präsenz von sowohl Fibroleukin als auch von väterlichen Antigenen möglicherweise erforderlich ist um sicherzustellen, daß eine residuale Immunaktivität gegenüber dem Embryo verschoben wird von tendenziell zerstörend hin zu schützend hilfreich. Neuere Erkenntnisse über implantationsfördernde Zytokine scheinen die These des Immunotrophismus zu unterstützen und geben hiermit eine Basis für weitere Forschungen an dem Fgl2-Knockout-Mausmodell (Chaouat et al. 1997, Ghazeeri und Kutteh 2001).

Ein kritischer Defekt in der Embryogenese von Mäusen, die das defekte Fgl2-Gen tragen, konnte als Grund der Aborte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dazu werden noch weitere Studien nötig sein.

Auch ein Einfluß, der auf einer Interaktion zwischen dem Gesunden und dem „kranken“ Allel in den Fgl2+/- Nachkommen beruht, wird diskutiert. Würde eine derartige Interaktion eine Rolle spielen, so würde man erwarten, daß die Funktion von Fgl2 in Makrophagen beeinträchtigt wäre.

**Tabelle 17: Effekt der Ausschaltung von Gerinnungs- und Angiogenesefaktoren auf das Überleben von Embryonen heterozygoten Kreuzungen +/- x +/-**

Ausgeschalteter Faktor	Anzahl der Nachkommen von entsprechendem Genotyp			Zeitpunkt der Verluste (Gestationstag =Gd)	Referenz
	+/+	+/-	-/-		
Gewebefaktor	30	49*(60)	0* (30)	Gd 10,5→ 11,5	(Carmeliet et al. 1996a)
	19	35 (36)	0* (19)	Gd 10,5 → 11,5	(Bugge et al. 1996)
	58	133 (118)	21*(58)	Gd 10,5 → 11,5	(Toomey et al. 1996)
Faktor VII	normale Mendelsche Verteilung			postnataler Tod	(Rosen et al. 1997)
Faktor V	89	176 (178)	32* (89)	Gd 10,5 → 11,5	(Cui et al. 1996)
Faktor II	223	378*(446)	19* (223)	Gd 8,5	(Xue et al. 1998)
Fibrinogen A $\alpha$	71	157 (142)	81 (71)	31% der -/- schwangeren Weibchen sterben am Gd 10,5 durch Blutungen in das Uteruslumen und Plazentalabyrinth	(Suh et al. 1995)
Fibrinogen F $\gamma$	normale Mendelsche Verteilung			Schwangere -/- Weibchen erleiden Blutungen und Sterben Gd 6,5 → 10,5	(Ploplis et al. 2000, Iwaki et al. 2002)
Thrombinrezeptor	41	110 (82)	24* (41)	Gd 8,5 → 9,5	(Darrow et al. 1996, Connolly et al. 1996)
Thrombomodulin	56	96 (112)	0* (56)	Gd 8,5 → 10,5	(Weiler-Guettler et al. 1996)
Faktor X	77	182 (154)	0* (77)	Gd 11,5 → 12,5	(Dewerchin et al. 2000)

(00) entspricht der erwarteten Anzahl (in Klammern hinter der beobachteten Anzahl) nach den Mendelschen Regeln; für +/- entspricht sie der doppelten Zahl der +/+ Embryonen; für -/- ist die erwartete Anzahl Gleich der Anzahl der +/+ Embryonen  
 \* P < 0.05 Signifikant niedrigere Anzahl an Embryonen als nach den Mendelschen Regeln erwartet

Ein solcher Verlust der Fgl2-Aktivität wurde in Makrophagen von Fgl2+/- heterozygoten Mäusen nicht gefunden, es wurden jedoch nur Makrophagen aus der Leber und dem Peritonealraum getestet (Marsden et al. 2003).

Untersuchungen der Mengen an phenotypisch exprimiertem funktionellen Fgl2 Protein in Trophoblasten von Fgl2<sup>+/-</sup> Mäusen sind noch nicht abgeschlossen. Es ist daher noch nicht bekannt, ob jede Trophoblastzelle eines solchen Embryos 50% der normalen Menge an Fgl2 exprimiert, oder ob es eine Mischung aus normalen und funktionell inaktiven Trophoblasten (aufgrund der Expression des einen oder des anderen Genes) gibt.

Der Einfluß einer großen Anzahl von Deletionen von Gerinnungs- und Angiogenesefaktoren auf den Erfolg bzw. Mißerfolg einer Schwangerschaft wurden bereits in der Literatur beschrieben. Tabelle 17 stellt eine Zusammenfassung ausgewählter Ergebnisse dar.

Wie aus der Tabelle 17 hervorgeht, wurde in vielen Studien ein ähnlicher Zeitpunkt des Verlustes von Embryonen festgestellt, wie in unserer Untersuchung. In Fällen, in denen Hämorrhagien an der fetomaternalen Grenzfläche auftraten, waren die Blutungen am mesometrialen Pol zu sehen.

Ein markanter Unterschied zu den Ergebnissen in Tabelle 17 und den unseren ist, daß die Verluste von <sup>+/-</sup> und/oder <sup>-/-</sup> Embryonen zumeist auf Blutungen zurückzuführen waren, während im Fall von Fgl2 die Verluste der Embryonen nicht mit Blutungen assoziiert sind (Clark et al. 2004).

Aus der Tabelle 17 geht ebenfalls hervor, daß in den meisten Knockout-Mausmodellen die komplette Abwesenheit des Genes (<sup>-/-</sup> Genotypen) im Embryo oder in der Mutter notwendig ist, bevor Aborte auftreten. In diesen Fällen entspricht die Anzahl der <sup>+/-</sup> Embryonen den Erwartungen. Die einzige Ausnahme in den gewählten Beispielen bildet ein Prothrombindefekt, wo neben dem Verlust von <sup>-/-</sup> auch ein Verlust von <sup>+/-</sup> Embryonen auftrat (Xue et al. 1998, Sun et al. 1998). Im Falle von Gewebefaktor trat in einer der zitierten Studien (Carmeliet et al. 1996a) ein Verlust von <sup>+/-</sup> Embryonen auf der in zwei weiteren unabhängigen Studien (Bugge et al. 1996, Toomey et al. 1996) mit größeren Fallzahlen nicht reproduziert werden konnte.

Berichte über VEGF Knockout Mäuse zeigen einen 100%igen Verlust von <sup>+/-</sup> und <sup>-/-</sup> Embryonen, was zu der Annahme führte, daß dieser Faktor eine kritische Rolle in der Schwangerschaft spielt (Carmeliet et al. 1996b, Ferrara et

al. 1996). VEGF spielt eine Rolle in der Angiogenese und trägt somit entscheidend zur Formation der Plazenta während der Frühschwangerschaft bei.

Eine Reihe kritischer Schritte in der Vaskularisation der Plazenta und des Embryos finden zwischen Gestationstag 7,5 und 11,5 statt, und die Hämostase muß sehr sorgfältig reguliert sein, besonders, wenn fetale Trophoblastzellen die mütterlichen Blutgefäße invadieren und arrodieren. Es wäre möglich, daß Fgl2 und andere Faktoren (Faktor II, VEGF) dabei eine Rolle spielen.

Ein großer Teil von Fgl2<sup>-/-</sup> Embryonen überlebt in Fgl2<sup>-/-</sup> Weibchen. Das weist darauf hin, daß es im Unterschied zu Defekten in Gerinnungsfaktoren entweder einen Kompensationsmechanismus gibt, oder daß die Rolle von Fgl2 nicht in der Gerinnung und/oder Angiogenese sondern in der Embryogenese liegt.

In unserer als auch in früheren Studien (Clark et al. 2004) erschien die Anzahl von Fgl2<sup>-/-</sup> Embryonen die bis zum 13,5 Gestationstag überlebten nicht unterschiedlich in Fgl2<sup>-/-</sup> und Fgl2<sup>+/-</sup> Müttern. Dies befürwortet eher, daß für das Absterben zwischen Tag 7,5 und 11,5 ausschließlich der embryonale Genotyp verantwortlich ist. Dies wurde auch schon für andere Gerinnungsfaktoren beschrieben.

Wenn der <sup>-/-</sup> Genotyp bei den meisten Faktoren aus Tabelle 17 zu einem über 80%igen Absterben führt, dann legt der nur teilweise Verlust bei Fgl2<sup>-/-</sup> nahe, daß Fgl2 kein kritischer hämostatischer Faktor ist bzw. daß es einen Kompensationsmechanismus gibt oder Fgl2 eine andere Rolle in der Frühschwangerschaft spielen könnte (z.B. in der Embryogenese).

Wenn jedoch Fgl2 durch Zytokine hochreguliert wird, gibt es ein koagulationsabhängiges Absterben von Embryonen. Dieses findet an der mesomesenterialen Seite statt, wo fetales und maternales Gewebe interagieren (Clark et al. 2001a). Dieses Verhalten ist für das CBA/JxDBA/2 Mausmodell beschrieben. Die Abortraten sind hier bei Ausschaltung aller Störfaktoren etwa 6%. Werden nun z.B. durch LPS proinflammatorische Zytokine hochreguliert, kommt es zu den zuvor beschriebenen Aborten/Resorptionen. Dieses

Experiment führt bei Fgl2<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zur Induktion von Aborten (Clark et al. 2004).

Die systemische Gabe von LPS verursacht Schock und die Hochregulation von Gewebefaktor in Fgl2<sup>-/-</sup> Mäusen (Marsden et al. 2003). Die Aktivierung der Gerinnungskaskade via Gewebefaktor passiert durch Faktor X (Faktor zehn). Sie unterscheidet sich damit von der Aktivierung durch Fgl2, die unabhängig von Faktor X stattfindet (Chan et al. 2002).

Ein Mangel an Gerinnungsfaktor X kann Resorptionen von <sup>-/-</sup> Embryonen hervorrufen, welche aufgrund von Blutungen zwischen Gestationstag 11,5 und 12,5 auftreten (dies legt nahe, daß Faktor X präsent ist und eine wichtige Rolle an der fetomaternalen Grenzfläche spielt, während dieser Zeit der Schwangerschaft). Wenn Fgl2 für die Hämostase während der Plazentationsphase der Schwangerschaft (Gd 9,5 – 21,5) unabdingbar wäre, hätte man eine hohe Spontanabortrate erwartet (und nicht wie beobachtet okkulte Verluste).

Letztlich können sowohl Fgl2<sup>+/-</sup> als auch Fgl2<sup>-/-</sup> Embryonen bis zur Geburt und darüber hinaus überleben. Eine mögliche Erklärung könnte Faktor X sein, der in diesen Fällen kompensatorisch wirken könnte. Dennoch wäre diese Kompensation nicht komplett, da die Abortrate von 15% immer noch höher liegt als die Rate von embryonalen Chromosomenanomalien von 2-6% (Clark et al. 2001b).

Dieses ganze Puzzle läßt letztlich schlußfolgern, daß Defekte in der embryonalen Entwicklung auf eine Rolle von bestimmten Faktoren im Entwicklungsprozeß hinweisen, die von der Hämostase unabhängig sind (Suh et al. 1995, Erlich et al. 1999, Iwaki et al. 2002).

In der Frühphase der Interaktion zwischen Embryo und Mutter kommt es zu einer enzymatischen Andauung von Geweben während der Trophoblastinvasion. Hämostasefaktoren sollen dabei nach Carmeliet et al, und Cui et al (Carmeliet et al. 1996a, Cui et al. 1996) eine Rolle spielen. Fgl2 könnte eine ähnliche Funktion am mesomesenterialen Pol des Embryos ausüben.

Die Frage ob Fgl2 verantwortlich ist für Aborte mit anderweitig unauffälligem Karyotyp kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Unsere Studie zeigt, daß eine Überexpression von Fgl2 mit erhöhten Abortraten einhergeht. Sie zeigt aber auch, daß die verminderte Anwesenheit oder gar das Fehlen von Fgl2 ebenso zu Aborten führen. Die Mechanismen die in beiden Fällen eine Rolle spielen sind noch nicht bis ins Detail geklärt. Weitere Studien werden nötig sein, um diese Interaktionen noch genauer zu beleuchten, die nicht immer der jetzigen Lehrbuchmeinung über die Mechanismen in der Blutgerinnung folgen.



## 7. Schlußfolgerungen

### 7.1. Schlußfolgerungen zu den Untersuchungen an der Plazenta des Menschen

Bei der Betrachtung der Plazentakompartimente kann man davon ausgehen, daß aus einer nicht gespülten Plazenta isolierte Lymphozyten aus villösem maternalen Blut, dem geweblichen Teil (gespülte Plazenta) und fetalem Blut stammen können. Anhaltspunkt für diese Feststellung ist die Tatsache, daß Meßwerte der ungespülten Plazenta in den meisten Fällen eine Mittelstellung zwischen villösem Blut und gespülter Plazenta einnehmen. Zwischen villösem Blut und maternalem peripherem Blut gibt es sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede, die auf eine lokale Aktivierung oder Selektion der Lymphozyten an der fetomaternalen Grenzfläche hindeuten. Dieses spezielle lokale Aktivierungsmuster könnte eine Rolle in der Erhaltung der Schwangerschaft und der Integrität der fetomaternalen Grenzfläche spielen.

Heute gilt als sicher, daß eine ausgeprägte Verschiebung des dezidualen Zellgefüges respektive des Verhältnisses CD3+/CD8+ Zellen zu CD56+ Zellen zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft fatale Folgen bis hin zum Abort haben kann.

Eine genaue Kenntnis der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen der Plazentakompartimente in der komplikationslosen Schwangerschaft kann den Weg zur Untersuchung pathologischer Schwangerschaften bereiten.

Mit Hilfe der Perfusionsmethode ist es möglich Deziduagewebe effektiv von Blut zu reinigen. Die Zellen im villösen Blut unterscheiden sich von denen im Plazentagewebe, maternalen Blut und Nabelschnurblut. Die Methode ermöglicht die Isolation lebender Lymphozyten in großer Zahl aus verschiedenen Plazentakompartimenten, welche für weitere Analysen sowohl phänotypischer als auch funktioneller Natur zur Verfügung stehen. Da die Plazenta normalerweise nach der Geburt verworfen wird, ist sie ein ideales Medium für immunologische Untersuchungen ohne das Risiko der direkten Beteiligung von

Patientinnen. Unsere Untersuchung kann eine Grundlage für weitere Studien der Immunologie der Plazenta in normalen und abnormalen Schwangerschaften bilden.

## **7.2. Schlußfolgerungen zur Rolle von Fgl2 in der Schwangerschaft**

Die plötzlichen Schwangerschaftsverluste von Maus-Embryonen, die homo- oder heterozygot das defekte Fgl2 Genkonstrukt tragen, treten zu einer Zeit auf, die mit „okkulten“ Fehlgeburten in der Periimplantationsphase zusammenfällt. Dies muß unterschieden werden von Spontanaborten/Resorptionen wie sie im CBA/JxDBA/2 Mausmodell auftreten. Diese entstehen durch erhöhte Fgl2 Expression und Herunterregulation von CD200 (Ox-2) Molekül, was zu einer thrombingesteuerten Inflammation führt. Im Unterschied dazu werden die Verluste von Fgl2<sup>+/-</sup> und Fgl2<sup>-/-</sup> Embryonen, einer Deletion und damit gestörten Funktion des Fgl2-Genes und damit verringerter oder fehlender Fgl2 Proteinexpression zugeschrieben.

In der Frühphase der Interaktion zwischen Embryo und Mutter kommt es zu einer enzymatischen Andauung von Geweben während der Trophoblastinvasion. Hämostasefaktoren sollen dabei eine Rolle spielen. Fgl2 könnte eine ähnliche Funktion am mesomesenterialen Pol des Embryos ausüben.

Unsere Studie zeigt, daß eine Überexpression von Fgl2 mit erhöhten Abortraten einhergeht. Sie zeigt aber auch, daß eine verminderte Anwesenheit oder gar das Fehlen von Fgl2 ebenso zu Aborten führen. Die Mechanismen die in beiden Fällen eine Rolle spielen sind noch nicht bis ins Detail geklärt. Weitere Studien werden nötig sein, um diese Interaktionen noch genauer zu beleuchten und mögliche Gemeinsamkeiten des Mausmodells mit den Verhältnissen beim Menschen zu sichern.

## Literaturverzeichnis

- Abadia-Molina AC, Ruiz C, Montes MJ, King A, Loke YW, Olivares EG. 1996. Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. *J Reprod Immunol*, 31 (1-2):109-123.
- Arck PC, Hertwig K, Hagen E, Hildebrandt M, Klapp BF. 2000. Pregnancy as a model of controlled invasion might be attributed to the ratio of CD3/CD8 to CD56. *Am J Reprod Immunol*, 44 (1):1-8.
- Athanassakis I, Aifantis Y, Makrygiannakis A, Koumantakis E, Vassiliadis S. 1995. Placental tissue from human miscarriages expresses class II HLA-DR antigens. *Am J Reprod Immunol*, 34 (5):281-287.
- Bartha JL, Comino-Delgado R, Martinez-Del Fresno P, Ortega MJ, Fernandez-Lorente JR, Cabello JM. 2000. Lymphocyte subpopulations after normal pregnancy and spontaneous abortion in primigravidas. *J Reprod Med*, 45 (7):567-571.
- Billington WD. 1992. The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 6 (3):417-438.
- Blaschitz A, Hutter H, Dohr G. 2001. HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy*, 5 (1):67-69.
- Bose R. 1989. Human embryo associated immunosuppressor factor(s) from pre- and post-implantation stages share some similarities. *Immunol Lett*, 20 (4):261-267.
- Bose R. 1991. Properties of human pre- and post-implantation embryo-associated immunosuppressor factor(s). *Immunol Lett*, 30 (3):325-332.
- Bose R, Lacson AG. 1995. Embryo-associated immunosuppressor factor is produced at the maternal-fetal interface in human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 33 (5):373-380.
- Bose R, Cheng H, Sabbadini E, McCoshen J, MaHadevan MM, Fleetham J. 1989. Purified human early pregnancy factor from preimplantation embryo possesses immunosuppressive properties. *Am J Obstet Gynecol*, 160 (4):954-960.
- Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL. 1996. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (13):6258-6263.
- Bulmer JN. 1992. Immune aspects of pathology of the placental bed contributing to pregnancy pathology. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 6 (3):461-488.

- Bulmer JN, Hollings D, Ritson A. 1987. Immunocytochemical evidence that endometrial stromal granulocytes are granulated lymphocytes. *J Pathol*, 153 (3):281-288.
- Bulmer JN, Pace D, Ritson A. 1988. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev*, 28 (6B):1599-1613.
- Camelo Junior JS, Martinez FE, Jorge SM, de Sala MM. 1995. A new method for sampling maternal blood in the placental intervillous space. *Fetal Diagn Ther*, 10 (5):322-325.
- Canellada A, Farber A, Zenclussen AC, Gentile T, Dokmetjian J, Keil A, Blois S, Miranda S, Berod L, Gutierrez G, Markert UR, Margni RA. 2002. Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells. *Am J Reprod Immunol*, 48 (4):275-282.
- Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D. 1996a. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 383 (6595):73-75.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996b. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380 (6573):435-439.
- Castilla JA, Rueda R, Vargas ML, Gonzalez-Gomez F, Garcia-Olivares E. 1989. Decreased levels of circulating CD4+ T lymphocytes during normal human pregnancy. *J Reprod Immunol*, 15 (2):103-111.
- Chan CW, Chan MW, Liu M, Fung L, Cole EH, Leibowitz JL, Marsden PA, Clark DA, Levy GA. 2002. Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity. *J Immunol*, 168 (10):5170-5177.
- Chan CW, Kay LS, Khadaroo RG, Chan MW, Lakatoo S, Young KJ, Zhang L, Gorczynski RM, Catral M, Rotstein O, Levy GA. 2003. Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol*, 170 (8):4036-4044.
- Chaouat G, Clark DA. 2001. FAS/FAS ligand interaction at the placental interface is not required for the success of allogeneic pregnancy in anti-paternal MHC preimmunized mice. *Am J Reprod Immunol*, 45 (2):108-115.
- Chaouat G, Cayol V, Mairovitz V, Dubanchet S. 1999. Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 42 (1):1-13.

- Chaouat G, Tranchot Diallo J, Volumenie JL, Menu E, Gras G, Delage G, Mognetti B. 1997. Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revisited: a (very) personal tribute to Tom Wegmann. *Am J Reprod Immunol*, 37 (6):427-434.
- Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. 2001. New insights into maternal-fetal interactions at implantation. *Reprod Biomed Online*, 2 (3):198-203.
- Chu W, Fant ME, Geraghty DE, Hunt JS. 1998. Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum Immunol*, 59 (7):435-442.
- Clark DA. 2003. Is there any evidence for immunologically mediated or immunologically modifiable early pregnancy failure? *J Assist Reprod Genet*, 20 (2):63-72.
- Clark DA. 2004. Shall we properly re-examine the status of allogeneic lymphocyte therapy for recurrent early pregnancy failure? *Am J Reprod Immunol*, 51 (1):7-15.
- Clark DA, Croitoru K. 2001. TH1/TH2,3 imbalance due to cytokine-producing NK, gammadelta T and NK-gammadelta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 45 (5):257-265.
- Clark DA, Banwatt D, Chaouat G. 1993. Effect of prostaglandin synthesis inhibitors on spontaneous and endotoxin-induced abortion in mice. *J Reprod Immunol*, 24 (1):29-44.
- Clark DA, Arck PC, Chaouat G. 1999a. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol*, 41 (1):5-22.
- Clark DA, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM. 2001a. Procoagulants in fetus rejection: the role of the OX-2 (CD200) tolerance signal. *Semin Immunol*, 13 (4):255-263.
- Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA. 1998. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *J Immunol*, 160 (2):545-549.
- Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM. 2001b. Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2. *Mol Hum Reprod*, 7 (2):185-194.
- Clark DA, Yu G, Arck PC, Levy GA, Gorczynski RM. 2003. MD-1 is a critical part of the mechanism causing Th1-cytokine-triggered murine fetal loss syndrome. *Am J Reprod Immunol*, 49 (5):297-307.
- Clark DA, Ding JW, Chaouat G, Coulam CB, August C, Levy GA. 1999b. The emerging role of immunoregulation of fibrinogen-related procoagulant Fgl2 in the success

- or spontaneous abortion of early pregnancy in mice and humans. *Am J Reprod Immunol*, 42 (1):37-43.
- Clark DA, Foerster K, Fung L, He W, Lee L, Mendicino M, Markert UR, Gorczynski RM, Marsden PA, Levy GA. 2004. The *fgl2* prothrombinase/fibroblast growth factor gene is required for lipopolysaccharide-triggered abortions and for normal mouse reproduction. *Mol Hum Reprod*, 10 (2):99-108.
- Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Jr., Coughlin SR. 1996. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*, 381 (6582):516-519.
- Coulam CB, Roussev R. 2002. Chemical pregnancies: immunologic and ultrasonographic studies. *Am J Reprod Immunol*, 48 (5):323-328.
- Coulam CB, Silverfield JC, Kazmar RE, Fathman CG. 1983. T-lymphocyte subsets during pregnancy and the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol*, 4 (2):88-90.
- Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL, Ginsburg D. 1996. Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature*, 384 (6604):66-68.
- D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F, Carotenuto M. 1998. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica*, 83 (3):197-203.
- Darrow AL, Fung-Leung WP, Ye RD, Santulli RJ, Cheung WM, Derian CK, Burns CL, Damiano BP, Zhou L, Keenan CM, Peterson PA, Andrade-Gordon P. 1996. Biological consequences of thrombin receptor deficiency in mice. *Thromb Haemost*, 76 (6):860-866.
- Daya S, Clark DA. 1986. Production of immunosuppressor factor(s) by preimplantation human embryos. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 11 (3):98-101.
- Daya S, Clark DA. 1988. Identification of two species of suppressive factor of differing molecular weight released by in vitro fertilized human oocytes. *Fertil Steril*, 49 (2):360-363.
- Daya S, Clark DA, Devlin C, Jarrell J. 1985a. Preliminary characterization of two types of suppressor cells in the human uterus. *Fertil Steril*, 44 (6):778-785.
- Daya S, Clark DA, Devlin C, Jarrell J, Chaput A. 1985b. Suppressor cells in human decidua. *Am J Obstet Gynecol*, 151 (2):267-270.
- De Paoli P, Reitano M, Battistin S, Castiglia C, Santini G. 1984. Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods*, 72 (2):349-353.

- Dewerchin M, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D, Rosen ED. 2000. Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost*, 83 (2):185-190.
- Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Peltekian K, Fung L, Holloway C, Yeger H, Phillips MJ, Levy GA. 1998. Expression of the fgl2 and its protein product (prothrombinase) in tissues during murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection. *Adv Exp Med Biol*, 440:609-618.
- Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekian KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, Yeger H, Phillips MJ, Levy GA. 1997. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol*, 71 (12):9223-9230.
- Erbach GT, Semple JP, Milford E, Goguen J, Osathanondh R, Kurnick JT. 1993. Phenotypic characteristics of lymphocyte populations isolated from middle gestation human placenta. *J Reprod Immunol*, 25 (1):1-13.
- Erlach J, Parry GC, Fearn C, Muller M, Carmeliet P, Luther T, Mackman N. 1999. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (14):8138-8143.
- Everett JP, Shipley GD, Mauck KA, Wagner CR, Morris TE, Hosenpud JD. 1994. Phenotypic variations in resting and activated levels of ICAM-1 expression by cultured human aortic endothelial cells. *Transplantation*, 58 (8):946-950.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380 (6573):439-442.
- Field EH, Matesic D, Rigby S, Fehr T, Rouse T, Gao Q. 2001. CD4+CD25+ regulatory cells in acquired MHC tolerance. *Immunol Rev*, 182:99-112.
- Geiselhart A, Dietl J, Marzusch K, Ruck P, Ruck M, Horny HP, Kaiserling E, Handgretinger R. 1995. Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 33 (4):315-322.
- Ghazeeri GS, Kutteh WH. 2001. Autoimmune factors in reproductive failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 13 (3):287-291.
- Gorczynski RM, Hadidi S, Yu G, Clark DA. 2002. The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am J Reprod Immunol*, 48 (1):18-26.
- Gorczynski RM, Chen Z, Clark DA, Hu J, Yu G, Li X, Tsang W, Hadidi S. 2000. Regulation of gene expression of murine MD-1 regulates subsequent T cell activation and cytokine production. *J Immunol*, 165 (4):1925-1932.

- Hall MA, Ahmadi KR, Norman P, Snieder H, MacGregor AJ, Vaughan RW, Spector TD, Lanchbury JS. 2000. Genetic influence on peripheral blood T lymphocyte levels. *Genes Immun*, 1 (7):423-427.
- Han P, Hodge G, Story C, Xu X. 1995. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol*, 89 (4):733-740.
- Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Olson GB, DeLuca D, Shenker L, Bard J, Boyse EA. 1992. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (21):10006-10010.
- Haynes MK, Flanagan MT, Perussia B, Jackson LG, Smith JB. 1995. Isolation of decidual lymphocytes from chorionic villus samples: phenotypic analysis and growth in vitro. *Am J Reprod Immunol*, 33 (2):190-199.
- Ho HN, Chao KH, Chen CK, Yang YS, Huang SC. 1996. Activation status of T and NK cells in the endometrium throughout menstrual cycle and normal and abnormal early pregnancy. *Hum Immunol*, 49 (2):130-136.
- Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, 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 (9):4122-4128.
- Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Paiva M, Kobayashi T, Ploplis VA, Castellino FJ. 2002. Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during embryonic development in the mouse. *Am J Pathol*, 160 (3):1021-1034.
- Jalali GR, Rezai A, Underwood JL, Mowbray JF, SurrIDGE SH, Allen WR, Matthias S. 1995. An 80-kDa syncytiotrophoblast alloantigen bound to maternal alloantibody in term placenta. *Am J Reprod Immunol*, 33 (3):213-220.
- Jalali GR, Arck P, SurrIDGE S, Markert U, Chaouat G, Clark DA, Underwood JL, Mowbray JF. 1996. Immunosuppressive properties of monoclonal antibodies and human polyclonal alloantibodies to the R80K protein of trophoblast. *Am J Reprod Immunol*, 36 (3):129-134.
- Juretic E, Uzarevic B, Petroveckii M, Juretic A. 2000. Two-color flow cytometric analysis of preterm and term newborn lymphocytes. *Immunobiology*, 202 (5):421-428.
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. 1998. Grundlagen der Immunologie. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie Verstehen-Lernen-Nachschieben. 9. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 43-131.
- King A, Gardner L, Loke YW. 1996a. Human decidual leukocytes do not proliferate in response to either extravillous trophoblast or allogeneic peripheral blood lymphocytes. *J Reprod Immunol*, 30 (1):67-74.



- King A, Burrows T, Loke YW. 1996b. Human uterine natural killer cells. *Nat Immun*, 15 (1):41-52.
- Knackstedt M, Ding JW, Arck PC, Hertwig K, Coulam CB, August C, Lea R, Dudenhausen JW, Gorczynski RM, Levy GA, Clark DA. 2001. Activation of the novel prothrombinase, fgl2, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 46 (3):196-210.
- Knackstedt MK, Zenclussen AC, Hertwig K, Hagen E, Dudenhausen JW, Clark DA, Arck PC. 2003. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *Am J Reprod Immunol*, 49 (4):210-220.
- Knörr K, Knörr-Gärtner H, Lauritzen C, Beller FK, Schuhmann RA. 1989. Physiologie der Reproduktion. In: Hrsg. Geburtshilfe und Gynäkologie Physiologie und Pathologie der Reproduktion. 3. Auflage Aufl. Ulm, Münster, Iowa City (USA): Springer Verlag, 134-168.
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*, 198 (8):1201-1212.
- Kruse A, Martens N, Fernekorn U, Hallmann R, Butcher EC. 2002. Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. *Biol Reprod*, 66 (2):333-345.
- Kuhnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, Halberstadt E. 1998. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 76 (2):147-151.
- Kutvirt SG, Lewis SL, Simon TL. 1993. Lymphocyte phenotypes in infants are altered by separation of blood on density gradients. *Br J Biomed Sci*, 50 (4):321-328.
- Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. 1996. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol*, 156 (10):4027-4034.
- Le Bouteiller P, Solier C, Proll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F. 1999. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update*, 5 (3):223-233.
- Lea RG, Clark DA. 1991. Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 5 (1):25-59.
- Lea RG, Daya S, Clark DA. 1990. Identification of low molecular weight immunosuppressor molecules in human in vitro fertilization supernatants predictive of implantation as a polyamine--possibly spermine. *Fertil Steril*, 53 (5):875-881.

- Levy GA, Liu M, Ding J, Yuwaraj S, Leibowitz J, Marsden PA, Ning Q, Kovalinka A, Phillips MJ. 2000. Molecular and functional analysis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis. *Am J Pathol*, 156 (4):1217-1225.
- Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. 2000. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril*, 73 (1):136-142.
- Lin SJ, Chao HC, Yan DC. 2001. Phenotypic changes of T-lymphocyte subsets induced by interleukin-12 and interleukin-15 in umbilical cord vs. adult peripheral blood mononuclear cells. *Pediatr Allergy Immunol*, 12 (1):21-26.
- Loke YW, King A. 1996. Immunology of human implantation: an evolutionary perspective. *Hum Reprod*, 11 (2):283-286.
- Loke YW, King A. 1997. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today*, 3 (4):153-159.
- Loke YW, King A. 2000a. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 14 (5):827-837.
- Loke YW, King A. 2000b. Immunological aspects of human implantation. *J Reprod Fertil Suppl*, 55:83-90.
- Loke YW, King A, Burrows TD. 1995. Decidua in human implantation. *Hum Reprod*, 10 Suppl 2:14-21.
- Loke YW, Hiby S, King A. 1999. Human leucocyte antigen-G and reproduction. *J Reprod Immunol*, 43 (2):235-242.
- Malinowski A, Szpakowski M, Tchorzewski H, Kowalczyk T, Podciechowski L, Zeman K, Oszukowski P. 1992. [Subpopulations of T lymphocytes and lymphocyte proliferative activity in normal pregnancy]. *Ginekol Pol*, 63 (9):433-438.
- Mansour I, Bourin P, Rouger P, Doinel C. 1990. A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of lymphocyte subsets using flow cytometry. Comparison with density gradient separation. *J Immunol Methods*, 127 (1):61-70.
- Marazzi S, Blum S, Hartmann R, Gundersen D, Schreyer M, Argraves S, von Fliedner V, Pytela R, Ruegg C. 1998. Characterization of human fibroleukin, a fibrinogen-like protein secreted by T lymphocytes. *J Immunol*, 161 (1):138-147.
- Markert UR, Kilic M, Schleussner E, Vogelsang H. 2000. Choriocarcinoma-induced suppression of lymphocyte activity. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 10 (6):323-326.
- Markert UR, Arck PC, Peiker G, Mock BA. 2002. Might wasp venom desensitization induced Th2 to Th1 shift cause pregnancy failure? *Am J Reprod Immunol*, 47 (4):193-195.

- Markert UR, Arck PC, McBey BA, Manuel J, Croy BA, Marshall JS, Chaouat G, Clark DA. 1997. Stress triggered abortions are associated with alterations of granulated cells into the decidua. *Am J Reprod Immunol*, 37 (1):94-100.
- Marsden PA, Ning Q, Fung LS, Luo X, Chen Y, Mendicino M, Ghanekar A, Scott JA, Miller T, Chan CW, Chan MW, He W, Gorczynski RM, Grant DR, Clark DA, Phillips MJ, Levy GA. 2003. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *J Clin Invest*, 112 (1):58-66.
- Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Hakansson L. 1996. Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 35 (2):70-79.
- Mikyas Y, Aziz N, Harawa N, Gorre M, Neagos N, Nogueira M, Wafer D, Dillon M, Boyer PJ, Bryson YJ, Plaeger S. 1997. Immunologic activation during pregnancy: serial measurement of lymphocyte phenotype and serum activation molecules in HIV-infected and uninfected women. *J Reprod Immunol*, 33 (2):157-170.
- Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Yeung MM, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. 1994. Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J Immunol*, 152 (4):2020-2032.
- Moore JM, Nahlen B, Ofulla AV, Caba J, Ayisi J, Oloo A, Misore A, Nahmias AJ, Lal AA, Udhayakumar V. 1997. A simple perfusion technique for isolation of maternal intervillous blood mononuclear cells from human placentae. *J Immunol Methods*, 209 (1):93-104.
- Motley D, Meyer MP, King RA, Naus GJ. 1996. Determination of lymphocyte immunophenotypic values for normal full-term cord blood. *Am J Clin Pathol*, 105 (1):38-43.
- Mowbray J, Jalali R, Chaouat G, Clark DA, Underwood J, Allen WR, Mathias S. 1997. Maternal response to paternal trophoblast antigens. *Am J Reprod Immunol*, 37 (6):421-426.
- Mues B, Langer D, Zwadlo G, Sorg C. 1989. Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta. *Immunology*, 67 (3):303-307.
- Nagaeva O, Bondestam K, Olofsson J, Damber MG, Mincheva-Nilsson L. 2002. An optimized technique for separation of human decidual leukocytes for cellular and molecular analyses. *Am J Reprod Immunol*, 47 (4):203-212.
- Neubauer A, van Lessen A, Huhn D. 1989. [Effect of the method on the results of determining T-cell subpopulations]. *Dtsch Med Wochenschr*, 114 (11):414-416.
- Ozenci CC, Korgun ET, Demir R. 2001. Immunohistochemical detection of CD45+, CD56+, and CD14+ cells in human decidua during early pregnancy. *Early Pregnancy*, 5 (3):164-175.

- Papadogiannakis N, Johnsen SA, Olding LB. 1985a. Strong prostaglandin associated suppression of the proliferation of human maternal lymphocytes by neonatal lymphocytes linked to T versus T cell interactions and differential PGE2 sensitivity. *Clin Exp Immunol*, 61 (1):125-134.
- Papadogiannakis N, Johnsen SA, Olding LB. 1985b. Human fetal/neonatal suppressor activity: relation between OKT phenotypes and sensitivity to prostaglandin E2 in maternal and neonatal lymphocytes. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 9 (4):105-110.
- Perola O, Ripatti A, Pelkonen J. 2000. T-lymphocyte subpopulations do not express identical combinations of interleukin-2 receptor chains in the early phase of their activation and proliferation. *Scand J Immunol*, 52 (2):123-130.
- Ploplis VA, Wilberding J, McLennan L, Liang Z, Cornelissen I, DeFord ME, Rosen ED, Castellino FJ. 2000. A total fibrinogen deficiency is compatible with the development of pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol*, 157 (3):703-708.
- Rasheed FN, Bulmer JN, Morrison L, Jawla MF, Hassan-King M, Riley EM, Greenwood BM. 1992. Isolation of maternal mononuclear cells from placentas for use in in vitro functional assays. *J Immunol Methods*, 146 (2):185-193.
- Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. 1998. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun*, 245 (3):933-938.
- Ritson A, Bulmer JN. 1987. Extraction of leucocytes from human decidua. A comparison of dispersal techniques. *J Immunol Methods*, 104 (1-2):231-236.
- Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. 1994. The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol*, 14 (3-4):239-292.
- Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E. 1992. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods*, 154 (1):7-10.
- Rosen ED, Chan JC, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, Jalbert LR, Albrecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P. 1997. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature*, 390 (6657):290-294.
- Roussev RG, Higgins NG, McIntyre JA. 1993. Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *J Reprod Immunol*, 25 (1):15-29.
- Sahoo S, Rosen PP, Feddersen RM, Viswanatha DS, Clark DA, Chadburn A. 2003. Anaplastic large cell lymphoma arising in a silicone breast implant capsule: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*, 127 (3):e115-118.

- Saito S, Nishikawa K, Morii T, Narita N, Enomoto M, Ichijo M. 1992. Expression of activation antigens CD69, HLA-DR, interleukin-2 receptor-alpha (IL-2R alpha) and IL-2R beta on T cells of human decidua at an early stage of pregnancy. *Immunology*, 75 (4):710-712.
- Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, Girotto M. 1999. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica*, 84 (6):499-504.
- Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. 2004. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*, 10 (5):347-353.
- Shohat B, Hirsch M, Jarden O, Henry J, Levy I, Trainin N. 1986. Cellular immune aspects of the human fetal-maternal relationship. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 11 (4):125-129.
- Slukvin, II, Chernyshov VP, Merkulova AV. 1993. [The expression of activation markers on decidual lymphocytes in the first trimester of pregnancy]. *Biull Eksp Biol Med*, 116 (10):414-416.
- Starkey PM, Sargent IL, Redman CW. 1988. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*, 65 (1):129-134.
- Steinborn A, Sohn C, Heger S, Niederhut A, Hildenbrand R, Kaufmann M. 1999. Labour-associated expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in placental endothelial cells indicates participation of immunological processes in parturition. *Placenta*, 20 (7):567-573.
- Suh TT, Holmback K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, Potter S, Degen JL. 1995. Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev*, 9 (16):2020-2033.
- Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmback K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJ. 1998. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (13):7597-7602.
- Teichert AM, Miller TL, Tai SC, Wang Y, Bei X, Robb GB, Phillips MJ, Marsden PA. 2000. In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278 (4):H1352-1361.
- Thilaganathan B, Mansur CA, Morgan G, Nicolaidis KH. 1992. Fetal T-lymphocyte subpopulations in normal pregnancies. *Fetal Diagn Ther*, 7 (2):53-61.
- Tian X, Zhang L, Wu Y. 1998. [The role of decidua tissue lymphocytes in early pregnancy]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 33 (1):7-9.

- Todt JC, Yang Y, Lei J, Lauria MR, Sorokin Y, Cotton DB, Yelian FD. 1996. Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility. *Am J Reprod Immunol*, 36 (2):65-71.
- Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ, Jr. 1996. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*, 88 (5):1583-1587.
- Vargas ML, Santos JL, Ruiz C, Montes MJ, Aleman P, Garcia-Tortosa C, Garcia-Olivares E. 1993. Comparison of the proportions of leukocytes in early and term human decidua. *Am J Reprod Immunol*, 29 (3):135-140.
- Vassiliadou N, Bulmer JN. 1996. Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biol Reprod*, 55 (5):1017-1022.
- Verma S, King A, Loke YW. 1997. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol*, 27 (4):979-983.
- Vinatier D, Monnier JC. 1995. Pre-eclampsia: physiology and immunological aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 61 (2):85-97.
- Vince GS, Starkey PM, Jackson MC, Sargent IL, Redman CW. 1990. Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J Immunol Methods*, 132 (2):181-189.
- Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N. 1997. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 37 (5):368-377.
- Wegmann TG. 1987. Placental immunotrophism: maternal T cells enhance placental growth and function
- Weiler-Guettler H, Aird WC, Rayburn H, Husain M, Rosenberg RD. 1996. Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos. *Development*, 122 (7):2271-2281.
- Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, Shim K, Zheng X, Sadler JE. 1998. Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (13):7603-7607.
- Yuwaraj S, Ding J, Liu M, Marsden PA, Levy GA. 2001. Genomic characterization, localization, and functional expression of FGL2, the human gene encoding fibroleukin: a novel human procoagulant. *Genomics*, 71 (3):330-338.
- Zhao Y, Dai ZP, Lv P, Gao XM. 2002. Phenotypic and functional analysis of human T lymphocytes in early second- and third-trimester fetuses. *Clin Exp Immunol*, 129 (2):302-308.
- Zhu XY, Zhou YH, Wang MY, Jin LP, Yuan MM, Li DJ. 2005. Blockade of CD86 signaling facilitates a Th2 bias at the maternal-fetal interface and expands

peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells to rescue abortion-prone fetuses. *Biol Reprod*, 72 (2):338-345.

Zimmermann J. 2004. Immunsuppressive Mechanismen in der humanen Placenta - Untersuchungen zur Verteilung von Lymphozytensubpopulationen in der humanen Placenta zum Zeitpunkt der Geburt [Doktorarbeit zur Erlangung des Titels Doctor medicinae]. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.

Zola H, Fusco M, Macardle PJ, Flego L, Robertson D. 1995. Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes. *Pediatr Res*, 38 (3):397-403.

Zola H, Fusco M, Weedon H, Macardle PJ, Ridings J, Robertson DM. 1996. Reduced expression of the interleukin-2-receptor gamma chain on cord blood lymphocytes: relationship to functional immaturity of the neonatal immune response. *Immunology*, 87 (1):86-91.

Zorzi W, Thellin O, Coumans B, Melot F, Hennen G, Lakaye B, Igout A, Heinen E. 1998. Demonstration of the expression of CD95 ligand transcript and protein in human placenta. *Placenta*, 19 (4):269-277.

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Perfusionsanlage .....	29
Abbildung 2 Plazenta vor und nach der Perfusion .....	29
Abbildung 3 Darstellung von Mausuteri .....	38
Abbildung 4 Relativer Anteil von CD3+ Lymphozyten .....	42
Abbildung 5 Relativer Anteil von CD4+ und CD8+ Lymphozyten .....	43
Abbildung 6 Relativer Anteil von CD19+, CD20+ und CD138+ Lymphozyten .....	44
Abbildung 7 Relativer Anteil von CD16+, CD56+ und CD16+CD56+ Lymphozyten .....	45
Abbildung 8 Relativer Anteil von CD95+, CD54+ sowie doppelpositiver Paare aus CD3+, CD54+ und CD95+ .....	47
Abbildung 9 Relativer Anteil von CD25+ Lymphozyten .....	49
Abbildung 10 Relativer Anteil von CD69+ Lymphozyten .....	49
Abbildung 11 Relativer Anteil von CD8+, CD69+ sowie von doppelpositiven Lymphozyten .....	50
Abbildung 12 Relativer Anteil von CD14+ Monozyten .....	52
Abbildung 13 Fgl2 Immunhistochemische Färbung von Uteri von CBA/JxDBA/2 Kreuzungen an den Tagen 5,5; 6,5 und 7,5 pc .....	54
Abbildung 14 Fgl2 Immunhistochemische Färbung an den Tagen 8,5 und 9,5 an Uteri von CBA/JxDBA/2 Schwangerschaften .....	55
Abbildung 15 Fgl2 Immunhistochemische Färbung an den Tagen 10,5, 11,5 und 12,5 von CBA/JxDBA/2 Schwangerschaften .....	56
Abbildung 16 Immunhistochemische Färbung von Fgl2 am 13,3 Gestationstag in CBA/JxDBA/2 gekreuzten Mäusen .....	57
Abbildung 17 Gestationszeitpunkt des Auftretens der Schwangerschaftsverluste in Fgl2+/-xFgl2+/- Kreuzungen von Mäusen .....	59



## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Marker für die Durchflußzytometrie .....	23
Tabelle 2: Schematische Darstellung des Pipettierschemas in Vorbereitung auf die durchflußzytometrische Analyse .....	32
Tabelle 3: Reaktionsschritte während der Polymerasekettenreaktion .....	40
Tabelle 4: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD3+ T-Lymphozyten mittels T-Test..	42
Tabelle 5: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD4+ und CD8+ Lymphozyten mittels T-Test .....	43
Tabelle 6: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD19+ und CD20+ Lymphozyten mittels T-Test .....	44
Tabelle 7: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD16+ und CD56+ T-Lymphozyten mittels T-Test.....	46
Tabelle 8: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD95 und CD54, sowie CD3 markierten T-Lymphozyten mittels T-Test .....	47
Tabelle 9: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD69+ T-Lymphozyten mittels T-Test	50
Tabelle 10: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von CD8CD69+ und CD8-CD69+ T- Lymphozyten mittels T-Test.....	51
Tabelle 11: Signifikante Unterschiede in Vergleichspaaren von Monozyten mittels T-Test.....	52
Tabelle 12: Versuchszahlen mit Angabe der Zahl an Versuchstieren und Implantationen.....	59
Tabelle 13: Defizit in der Anzahl an Fgl2 <sup>-/-</sup> und Fgl2 <sup>+/-</sup> Embryos in heterozygoten Fgl2 <sup>+/-</sup> Kreuzungen der N10 Generation .....	60
Tabelle 14: Defizit in der Anzahl an Fgl2 <sup>-/-</sup> und <sup>+/-</sup> Embryos in heterozygoten Fgl2 <sup>+/-</sup> Kreuzungen der N3 Generation .....	61
Tabelle 15: Vergleich der Verteilung der Lymphozyten im Nabelschnurblut mit Werten aus der Literatur .....	65
Tabelle 16: Verteilung der CD16+ und/oder CD56+ Lymphozyten .....	69
Tabelle 17: Effekt der Ausschaltung von Gerinnungs- und Angiogenesefaktoren auf das Überleben von Embryonen heterozygoten Kreuzungen <sup>+/-</sup> x <sup>+/-</sup> .....	84

## Anhang

### Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei Herrn PD Dr. med. habil. U.R. Markert für die Überlassung des Themas bedanken, aber auch für seine engagierte, zuverlässige und einfühlsame Betreuung. In diesem Zusammenhang ist es mir sehr wichtig seine große Unterstützung bei der Planung und Durchführung meines Auslandsaufenthaltes in Kanada zu erwähnen.

Mein Dank gilt ebenfalls den Hebammen im Kreissaal der Universitätsfrauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, die durch die effektive, zuverlässige und freundliche Zusammenarbeit mit unserem Labor unsere Forschung maßgebend unterstützen.

Ich möchte auch Prof. D.A. Clark und Dr. G.A. Levy für die Überlassung der Forschungsthemen, an denen ich während meines Auslandsaufenthaltes gearbeitet habe, danken. Prof. Clark hat mich sehr durch sein umfangreiches Wissen auf dem Gebiet der Reproduktionsimmunologie beeindruckt und hat mir geholfen meinen Horizont auf diesem Gebiet zu erweitern. Er ist darüber hinaus aber auch zu einem geschätzten persönlichen Kontakt geworden, der jederzeit mit Rat und Tat zur Seite steht.

Weiterhin möchte ich mich aber auch bei den Mitarbeitern der Labore in Hamilton und Toronto bedanken, die meine Zeit erfreulich und sehr produktiv werden ließen. Besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang D. Banwatt, Wei He, L. Fung und W. Zhang, die mir alle eine große Unterstützung in der schnellen Erlernung der notwendigen Techniken und Methoden waren.

Ich möchte an dieser Stelle auch meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Verlobten Sanjai danken. Sie haben es mir ermöglicht, meinen Weg zu gehen und damit den Grundstein für diese Arbeit und vieles mehr gelegt. Ihrer moralischen Unterstützung konnte ich mir in guten wie in schlechten Zeiten immer sicher sein.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Zeit motiviert, erfreut und abgelenkt haben. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang René, Gunilla, Simone, Claudia und Fabian, die immer Zeit und ein offenes Ohr für mich hatten.

Bei den Boehringer Ingelheim Fonds bedanke ich mich für ein Reisekostenstipendium, das es mir ermöglichte meinen Auslandsaufenthalt in Kanada zu realisieren.

## Lebenslauf

Name, Vorname Förster, Katharina  
 Geburtsdatum 12.09.1978  
 Geburtsort Karl-Marx-Stadt

### Schulische Ausbildung

September 1984-August 1986 Otto-Hofmann-Allgemeinbildende-  
 Polytechnische-Oberschule,  
 Karl-Marx-Stadt  
 September 1986-August 1992 Michael-Iwanowitsch-Kalinin-  
 Allgemeinbildende-Polytechnische-  
 Oberschule mit erweitertem Sprachunterricht,  
 Karl-Marx-Stadt  
 September 1992-Juli 1997 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Chemnitz,  
 Abitur

### Studium

WS1997/98 – WS 2004/05 Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität  
 Jena, Medizinische Fakultät  
 Physikum September 1999  
 Erstes Staatsexamen September 2000  
 Zweites Staatsexamen September 2002  
 Drittes Staatsexamen November 2004

01.04.2003- 31.06.2003 Forschungsaufenthalt bei Professor D.A. Clark  
 Mc Master University in Hamilton, Ontario, Kanada  
 und Doctor G.A. Levy University of Toronto,  
 Toronto, Ontario, Kanada  
 mit freundlicher Unterstützung durch eine Travel  
 Allowance der Boehringer Ingelheim Fonds

Stollberg, 18.06.2005

Katharina Förster

## Publikationsliste

### Artikel

Clark DA, Förster K, Fung L, He W, Lee L, Mendicino M, Markert UR, Gorczynski RM, Marsden PA, Levy GA. The fgl2 prothrombinase/fibroleukin gene is required for lipopolysaccharide-triggered abortions and for normal mouse reproduction. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10:99-108.

Markert UR, Färber A, Keil A, Förster K, Fahlbusch B. IgA, IgG and IgM production in B cell cultures from human term placenta, maternal and cord blood *Am. J. Reprod. Immunol.* (submitted).

### Vorträge

Färber A, Keil A, Förster K, Fahlbusch B, Markert UR. IgA, IgG and IgM production in B cell cultures from human placenta, Maternal and cord blood. VIII International Congress of Reproductive Immunology. July 2001, Opatija, Croatia.

### Publizierte Kurzschriften

Förster K, Schleussner E, Markert UR. Lymphocyten Subpopulationen in verschiedenen Kompartimenten der Placenta. 21. Kongress für Perinatale Medizin. October 2003, Berlin, Germany, *Z Geburtsh Neonatol* 2003; 207 Suppl. 2: 123.

Förster K, Poehlmann T, Neundorf R, Schleussner E, Markert UR. Lymphocyte subsets in different placental compartments. IFPA Meeting, 10<sup>th</sup> Meeting of the European Placenta Group, September 2003, Mainz, Germany, *Placenta* 2003; 24:A39.

Förster K, Markert UR. Distribution of Lymphocyte subsets in placental compartments, villous and cord blood. 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology, September 2003, Berlin, Germany, *Immunobiol.* 2003; 208: 304.

Förster K, He W, Levy GA, Markert UR, Clark DA. Fgl2 prothrombinase/fibroleukin distribution in normal murine reproduction. 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology, September 2003, Berlin, Germany, *Immunobiol.* 2003; 208; 304-305.

### Posterpräsentationen

Förster K, Neundorf R, Markert UR. Lymphocyte subsets in different placental compartments. 23rd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology, June 2003, Yale University School of Medicine, New Haven, USA, Poster presentation

Miranda S, Pöhlmann T, Förster K, Neundorf K, Kaufmann A, Markert UR. A refined method for lymphocyte isolation from the placenta. 8th Congress of the Alps Adria Society for Immunology of Reproduction, September 2002, Weimar, Germany, *Am. J. Reprod. Immunol.* 2002, 48: 156. Poster presentation.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. U.R. Markert (Jena, Deutschland)  
Prof. D.A. Clark (Hamilton, Kanada)  
Dr. G.A. Levy (Toronto, Kanada)
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Stollberg, 18.06.2005

Katharina Förster