

**Der Einfluss von Mastzellen auf reproduktive Prozesse und die zugrunde liegenden Mechanismen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von Dipl. Biol. Katja Woidacki

geb. am 22.03.1978 in Magdeburg

Gutachter: Frau Prof. Dr. Ana C. Zenclussen  
Herr Prof. Dr. Marcus Maurer

eingereicht am: 27.09.2012

verteidigt am: 20.02.2013

*Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Warum Mausmodelle für die Wissenschaft relevant sind	5
1.2	Der murine Östruszyklus	6
1.3	Die murine Trächtigkeit (Implantation, Dezidualisierung, Plazentation)	9
1.3.1	Die Implantation und Dezidualisierung	9
1.3.2	Die Plazentation	11
1.4	Der Vergleich zwischen humaner und muriner Plazenta	15
1.5	Das Immunsystem	16
1.5.1	Die Rolle des Immunsystems während der Schwangerschaft	19
1.6	Mediatoren an der föto-maternalen Grenzfläche	22
1.7	Mastzellen	27
1.7.1	Mausmodelle für die Untersuchung der Funktionalität von Mastzellen	32
1.7.2	Mastzellen und Schwangerschaft - eine kontroverse Beziehung	36
1.8	Zielsetzung	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
2.1	Chemische Stoffe und Substanzen, Lösungen	40
2.2	Labormaterialien	42
2.3	Laborgeräte	44
2.4	Biologische Stoffe und Substanzen	45
2.5	Antikörper	46
2.5.1	Durchflusszytometrie	46
2.5.2	Western Blot	46
2.5.3	Immunhistochemie	46
2.6	Primer, Sequenzen und Annealing-Temperaturen für Echtzeit RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaktion)	47
2.7	Medien, Lösungen und Pufferlösungen	48
2.7.1	Medien	48
2.7.2	Puffer und Lösungen	49
2.8	Mäuse und Haltung	52
2.8.1	Haltung	52
2.8.2	Mausstämme	52

2.9	Bestimmung des Östruszyklus	53
2.10	Verpaarungen	53
2.11	Präparationen	53
2.12	Aufbereitung von Gewebe für histologische Untersuchungen	54
2.13	Silanisierung von Objektträgern mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)	55
2.14	Histologie	56
2.14.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung)	56
2.14.2	Toluidinblau O-Färbung	57
2.14.3	Alcianblau/Safranin Färbung	58
2.14.4	DBA Lektin-Färbung	59
2.15	Zyklusabhängige Auszählung von Mastzellen im naiven Uterus	61
2.16	Aufbereitung des Uterus an Tag 5 der Schwangerschaft nach Chicago Blau-Injektion für histologische Untersuchungen	61
2.17	Aufbereitung von Implantationseinheiten an Tag 10 der Schwangerschaft für histologische Untersuchungen	63
2.18	Immunhistochemie (IHC)	65
2.19	Gewinnung von Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC, bone marrow derived mast cells)	67
2.20	Systemische Rekonstitution mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> mit Knochenmark-generierten Mastzellen	68
2.21	Lokale Rekonstitution mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> mit Knochenmark-generierten Mastzellen	69
2.22	Proteinisolierung	70
2.23	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test	70
2.24	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese und Western Blot	71
2.25	RNA-Isolierung mittels single-step Methode (Chomczynski & Sacchi 1987)	75
2.26	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription aus RNA	76
2.27	Echtzeit RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaktion)	77
2.28	Durchflusszytometrie	79
2.29	Zellkultur (SM9-2)	84
2.30	Proliferationsassay	85
2.31	Statistik	88

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>89</b>
3.1	Uterine Mastzellen repräsentieren einen einzigartigen, divergenten Phänotyp	89
3.2	Die Anzahl an Mastzellen erreichte ihr höchstes Niveau im Östrus und verblieb hoch bei Einsetzen einer Schwangerschaft	92
3.3	Eine Mastzelldefizienz führte zu einer verringerten Anzahl an implantierten Blastozysten, was durch den Transfer von Mastzellen reversiert werden konnte	93
3.4	Mastzellen üben keinen entscheidenden Einfluss auf die Ovulation aus	95
3.5	Mastzellen migrieren nach systemischer Rekonstitution in die Dezidua und in verschiedene Lymphknoten	96
3.6	Der Transfer von BMMC führte zu einer Erhöhung mastzellspezifischer Proteasen	97
3.7	Die verminderte Implantationsrate bei W-sh konnte nach lokaler Rekonstitution mit BMMC ausgeglichen werden	98
3.8	Die lokale Rekonstitution resultierte in einer erhöhten Expression mastzellspezifischer Proteasen in der Dezidua	100
3.9	Mastzelldefiziente Mäuse verfügten über deutlich kleinere Plazenten und eine eingeschränkte Modifikation der Spiralarterien	101
3.10	Die Mastzelldefizienz führte zu einer verringerten Implantationsgröße an den Tagen 5 und 6 der Trächtigkeit	103
3.11	Die Expression verschiedener Mastzellmediatoren, die auch für die Schwangerschaft relevant sind, war erhöht in der Dezidua nach systemischer Rekonstitution	105
3.12	Die Rekonstitution mit Mastzellen war verbunden mit einem positiven Zusammenspiel der Moleküle TGF- $\beta$ und CtGF sowie Mcpt-8 und TGF- $\beta$ bzw. CtGF in der Dezidua	107
3.13	Mastzellen exprimieren TGF- $\beta$ sowie dessen Rezeptor, jedoch kein CtGF, das aber in Plazentaprobe nachgewiesen werden konnte	109
3.14	Periphere Natürliche Killerzellen, dendritische Zellen sowie zytotoxische T-Zellen waren an der mastzellspezifischen Wirkung nicht beteiligt	110
3.15	Mastzellen exprimieren Galektin-1	112
3.16	Von Mastzellen gebildetes Galektin-1 ist essentiell für einen positiven Schwangerschaftsverlauf	113
3.17	Von Mastzellen gebildetes Galektin-1 ist essentiell für die Entwicklung der Plazenta und die Modifikation der Spiralarterien	115

3.18	Galektin-1 ist notwendig für die Migration und/oder lokale Proliferation von Mastzellen nach systemischer Rekonstitution	118
3.19	Galektin-1 ist entscheidend für die Proliferation von Mastzellen	120
3.20	Die Mastzelldefizienz führte zu einer Erhöhung von uterinen Natürlichen Killer-Zellen	122
3.21	Die Mastzelldefizienz führte zu einer Erhöhung von regulatorischen T-Zellen	123
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>125</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>148</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>186</b>
<b>9</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>188</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>189</b>

## **1 Einleitung**

Etwa die Hälfte aller Versuche einer erfolgreichen Implantation der befruchteten Eizelle in das Endometrium des mütterlichen Uterus schlägt beim Menschen fehl (Murphy *et al.* 2005, Plaks *et al.* 2008, Dekel *et al.* 2010). Die Wahrscheinlichkeit einer Fehlgeburt vor der zwanzigsten Schwangerschaftswoche liegt bei ca. 20 bis 30 % (Warburton *et al.* 1964). Die Gründe dieser Komplikationen sind vielfältig und schließen sowohl genetische und metabolische Unregelmäßigkeiten des Embryos als auch ungenügende Regulationsmechanismen des mütterlichen Immunsystems sowie die mangelhafte Rezeptivität des Uterus ein (Murphy *et al.* 2005, Dekel *et al.* 2010). Die Erforschung grundlegender schwangerschaftsrelevanter Mechanismen ist von elementarer Bedeutung für die Entwicklung adäquater Behandlungsmethoden, um Paaren den oftmals unerfüllten Wunsch nach eigenen Kindern ermöglichen zu können. Wenngleich eine Vielzahl dieser Mechanismen und Prozesse bereits aufgeklärt und eingehend untersucht worden ist, so ergeben sich doch insbesondere auf immunologischer Ebene stets breite Spektren neuer Forschungsansätze. Schließlich ist es das mütterliche Immunsystem, welches den Embryo aktiv tolerieren muss. Die vorliegende Arbeit mit dem Schwerpunkt der Untersuchung des Einflusses von Mastzellen auf reproduktive Prozesse liefert somit ein weiteres Puzzleteil für das Verständnis der dem Paradoxon der Schwangerschaft zugrunde liegenden immunmodulatorischen Abläufe. Dies wäre ohne die Verwendung einer Vielzahl an Mausmodellen in diesem Umfang nicht möglich. Sie leisten einen unerlässlichen Beitrag für die Forcierung und das Fortbestehen der wissenschaftlichen Forschung.

### **1.1 Warum Mausmodelle für die Wissenschaft relevant sind**

Die Labormaus repräsentiert seit Jahrzehnten einen unersetzlichen Modellorganismus für die wissenschaftliche Untersuchung der genetischen Grundlagen der menschlichen Physiologie und Pathophysiologie. Das menschliche und murine Genom stimmen zu ca. 99 % überein (Peters *et al.* 2007). Mensch und Maus teilen verschiedene vererbte Krankheiten wie Diabetes, Asthma, Arteriosklerose, Krebs und Herzerkrankungen. Ebenso ähneln

sich die prinzipiellen Abläufe schwangerschaftsrelevanter Prozesse wie Oogenese, Spermatogenese und Befruchtung; gleiches gilt für die frühen Abschnitte der Embryonalentwicklung sowie der Organentwicklung (Graw 2010). Die generelle Struktur des Immunsystems (Haley 2003) sowie der Plazenta und dessen Funktion (Georgiades *et al.* 2002) sind beim Menschen und der Maus vergleichbar. Letzteres wird im Abschnitt 1.3 näher beschrieben.

Die Generierung von Inzuchtstämmen bzw. transgenen Mäusen war eine der wichtigsten Aufgaben in der Geschichte der Mausgenetik. Bei transgenen Mäusen wird gezielt eine Mutation an deren Genom vorgenommen, welche an die Nachkommen stabil weitervererbt wird. Es können dabei ein oder mehrere zusätzliche Gene, mit der Fähigkeit der Expression, eingefügt werden (gain of function). Alternativ besteht die Möglichkeit, ein bestimmtes Gen und dessen Funktion gezielt zu inaktivieren (loss of function) oder zu verändern. Dies liefert die Grundlage zum Verständnis von genregulatorischen Abläufen für die Ursachenforschung menschlicher Krankheiten. In naher Zukunft sollten Mutanten für alle ca. 30.000 Mausgene zur Verfügung stehen (Schenkel 2006).

Die Haltung der Mäuse im Labor ist mit einem vergleichsweise geringen finanziellen Aufwand verbunden. Aufgrund der kurzen Trächtigkeitsdauer von 18 bis 21 Tagen verfügen sie über eine hohe Reproduktionsrate. Während ihrer langandauernden Reproduktionsaktivität, die ab dem 2. Lebensmonat beginnt und bis zu einem Alter von ca. 14 Monaten reichen kann, können sie 10 Würfe mit bis zu 100 Nachkommen hervorbringen (Rugh 1990).

## **1.2 Der murine Östruszyklus**

Jedweder Schwangerschaft bei den Säugetieren liegt ein normal verlaufender Menstrual- bzw. Östruszyklus zugrunde (Ashkar *et al.* 2001). Der murine Östruszyklus mit einer Dauer von 4 bis 5 Tagen unterliegt dem regulierten Zusammenspiel der im Ovar produzierten Sexualhormone Östrogen und Progesteron. Er wird in 4 Phasen namentlich Proöstrus, Östrus, Metöstrus sowie Diöstrus unterteilt, in deren Verlauf das uterine Endometrium extensive Umbauprozesse aufgrund systemischer Konzentrationsänderungen von Östrogen und Progesteron durchläuft (Wood *et al.* 2007). Beide Sexualhormone unterliegen

der Steuerung des Hypothalamisch-hypophysären Systems im Gehirn. Im Hypothalamus wird das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) gebildet, welches in der Hypophyse die Sekretion des luteinisierenden Hormons (LH) sowie des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) auslöst. LH und FSH gelangen in den peripheren Blutkreislauf und steuern im Ovar die Östrogen- und Progesteronproduktion (Abb. 1) (Caligioni *et al.* 2009).

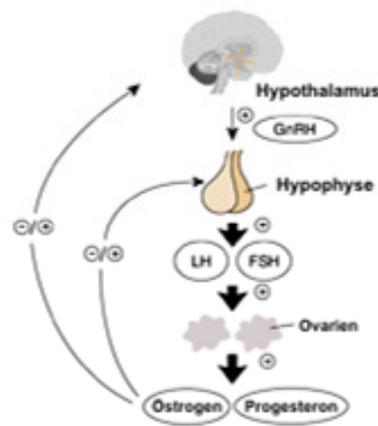


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkung von LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) auf die Östrogen- und Progesteronproduktion in den Ovarien nach Stimulation durch GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) aus dem Hypothalamus (modifiziert nach: Hiller-Sturmhöfel *et al.* 1998)

Die gewebespezifische Umgestaltung des Uterus im Verlauf des Östruszyklus ist charakterisiert durch die wiederholte Synchronisation folgender Prozesse: zelluläre Proliferation, Apoptose (programmierter Zelltod), Differenzierung, Umgestaltung der extrazellulären Matrix, Angiogenese und Leukozyteninfiltration (Wood *et al.* 2007). Die einzelnen Zyklusphasen können anhand der charakteristischen Zytologie des Vaginalesstrichs bestimmt werden (Rugh 1990). Im Proöstrus finden sich vereinzelt kernhaltige Epithelzellen, die zusammengelagert oder einzeln auftreten. Gelegentlich erscheinen Korneozyten (Hornzellen). Dieses Stadium entspricht der prä-ovulatorischen Phase, die durch eine Erhöhung der Östrogenkonzentration ausgelöst wird (Walmer *et al.* 1992). Während der Nacht erfolgt durch einen plötzlichen Anstieg der Hormone LH und FSH die Ovulation (Parkening *et al.* 1982). Während der Ovulation trennt sich die reife Eizelle von ihrem Follikel und wird durch pulsatorische Prozesse in den

periovariellen Raum entlassen. Die Eizelle wandert entlang eines Gradienten zum Eileiter (Ovidukt), in dem dann die Befruchtung erfolgt (Rugh 1990). Diese löst die Differenzierung von Follikelzellen zu Progesteron produzierenden Luteinzellen aus, die letztlich die Grundlage des Gelbkörpers (*Corpus luteum*) darstellen. Das *Corpus luteum* ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der frühen Schwangerschaft, bis die Plazenta die Progesteronproduktion übernimmt. Erfolgt keine Befruchtung der Eizelle, bildet sich der Gelbkörper durch apoptotische Prozesse zurück und wird durch Bindegewebe ersetzt. Man spricht dann vom *Corpus albicans* (Weißkörper) (Stocco *et al.* 2007).

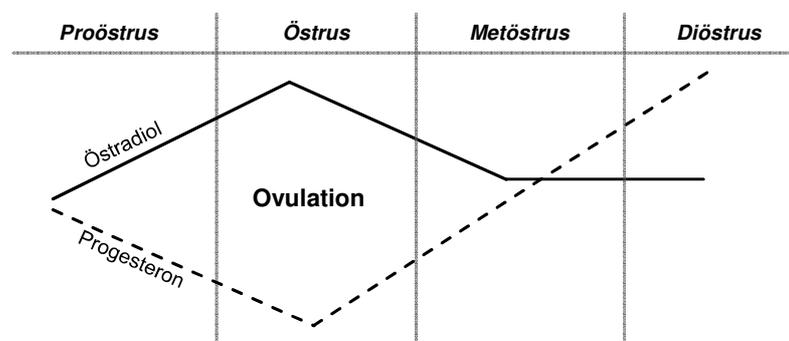


Abb. 2: Schematische Darstellung der zyklusabhängigen Konzentrationsänderungen von Östrogen und Progesteron (modifiziert nach: Fata *et al.* 2001)

Der Östrus wird dominiert von einer Vielzahl an kernhaltigen oder verhornten Epithelzellen; ihre Form ist unregelmäßig und Leukozyten sind nicht vorhanden. Zu Beginn des Östrus verbleibt die Östrogenkonzentration auf ihrem höchsten Niveau, während der Progesterongehalt in dieser Phase des Zyklus am niedrigsten ist (Fata *et al.* 2001, Wood *et al.* 2007). Der Metöstrus ist gekennzeichnet durch das Erscheinen verschiedener Zelltypen wie Leukozyten, weniger kernhaltiger Epithelzellen und/oder Hornzellen. Die Plasmakonzentration an Östrogen sinkt und verbleibt auf dessen Ausgangsniveau bis zum Beginn des Proöstrus. Progesteron hingegen steigt an und erreicht im Diöstrus die maximale Konzentration (Abb. 2) (Fata *et al.* 2001, Wood *et al.* 2007). In diesem Stadium dominieren Leukozyten, teilweise treten wenige kernhaltige Epithelzellen auf (Rugh 1990).

### **1.3 Die murine Trächtigkeit (Implantation, Dezidualisierung, Plazentation)**

Die Trächtigkeit der Maus erreicht je nach Mausstamm eine Dauer von 18 bis 21 Tagen (Rugh 1990). Nach der Befruchtung der Eizelle im Eileiter durchläuft die Zygote verschiedene Zellteilungsprozesse, um ab Tag 3 der Trächtigkeit die Morula zu bilden. Hierbei handelt es sich um eine verdichtete Ansammlung von anfangs 8 bis später 32 Zellen bzw. Blastomeren. Im Rahmen dieser Zellteilungen wandert der Embryo durch den Eileiter. Es entwickeln sich apolare innenliegende Zellen, die später als Grundlage der inneren Zellmasse dienen. Aus dieser gehen das primitive Endoderm (Hypoblast, beteiligt an der Ausbildung des Dottersacks) sowie der Epiblast, aus dem sich u.a. embryonale Gewebe entwickeln, hervor. Die polaren außenliegenden Zellen tragen zur Bildung des epithelialen Trophektoderms bei, aus dem die Trophoblasten hervorgehen. Im späten Morula-Stadium wandert der Embryo in das Lumen des rezeptiven Uterus und differenziert zur reifen Blastozyste, in der sich zuvor ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum (Blastozöl) gebildet hat (Abb. 4).

#### **1.3.1 Die Implantation und Dezidualisierung**

Die Implantation *per se* stellt den Prozess des engen physischen und physiologischen Kontaktes der Blastozyste mit dem uterinen Endometrium dar (Dey *et al.* 2008) und wird in drei Phasen unterteilt: Apposition des Trophektoderms an das uterine Lumenepithel mit anschließender Adhäsion sowie Penetration der Trophoblasten in das Epithel (Enders *et al.* 1969). Für den Prozess der Implantation muss sich der Embryo zunächst von der ihn umgebenden, nicht dehnbaren Zona pellucida befreien, um an Größe zunehmen zu können (Wang *et al.* 2006, Cockburn *et al.* 2010) (Abb. 3). Zeitgleich wird die Anheftung des Trophektoderms an das endometriale Oberflächenepithel eingeleitet, wobei sich die Blastozyste hierfür mit ihrer inneren Zellmasse in Richtung der mesometrialen Seite des Uterus orientiert (Dey *et al.* 2008). Im Zuge dessen beginnt der Prozess der Dezidualisierung. Durch den Anstieg der Permeabilität der lokalen Kapillaren schwillt das uterine Stroma an und wird

ödematös. Die Erhöhung der vaskulären Permeabilität kann durch intravenöse Injektion eines makromolaren Farbstoffes (Chicago Sky Blue) sichtbar gemacht werden. Dieser bindet mit zirkulierenden Proteinen und bildet Konjugate, die in Bereichen mit vermehrter vaskulärer Permeabilität respektive dem Areal der im Prozess befindlichen Anheftung der Blastozyste akkumulieren (Psychoyos *et al.* 1973, Enders *et al.* 1974, Paria *et al.* 2000 und 2001, Nagy *et al.* 2003). Die Stromazellen proliferieren und differenzieren zu Deziduazellen, nehmen an Größe zu, bilden eine Vielzahl an Verbindungen zu den Nachbarzellen aus und umschließen den Embryo zu gegebener Zeit vollständig. Die Epithelzellen hingegen durchlaufen zu diesem Zeitpunkt apoptotische Prozesse und werden von den Trophoblasten phagozytiert. Diese Degeneration des Epithels erlaubt die „Invasion“ der Trophoblasten in die Dezidua (Nagy *et al.* 2003). Das Zeitfenster der Implantation wird hierbei durch das Zusammenspiel von Progesteron und Östrogen bestimmt. An Tag 1 und 2 der Trächtigkeit stimuliert das aus den Ovarien stammende Östrogen die epitheliale Zellproliferation. An Tag 3 induziert das aus den Corpora lutea gebildete Progesteron die Teilung der Stromazellen, die zusätzlich durch die Östrogensekretion aus dem Ovar an Tag 4 verstärkt wird (Carson *et al.* 2000). Die Sensitivität des Uterus gegenüber den Änderungen der Hormonkonzentrationen in Bezug auf die Implantation der Blastozyste kann in drei Phasen eingeteilt werden: 1. In der prärezeptiven Phase (Tag 1 bis 3) wird der Uterus auf eine mögliche Implantation „vorbereitet“. Er ist allerdings in diesem Stadium nicht in der Lage, eine Nidation zu initiieren. 2. In der rezeptiven Phase am Tag 4 erfolgt die Implantation. 3. Ab dem 5. Tag beginnt die refraktäre Phase, in der das uterine Milieu das Überleben der Blastozyste nicht mehr gewährleisten kann (Wang *et al.* 2006). Demnach sollte die Implantation zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig abgeschlossen sein.

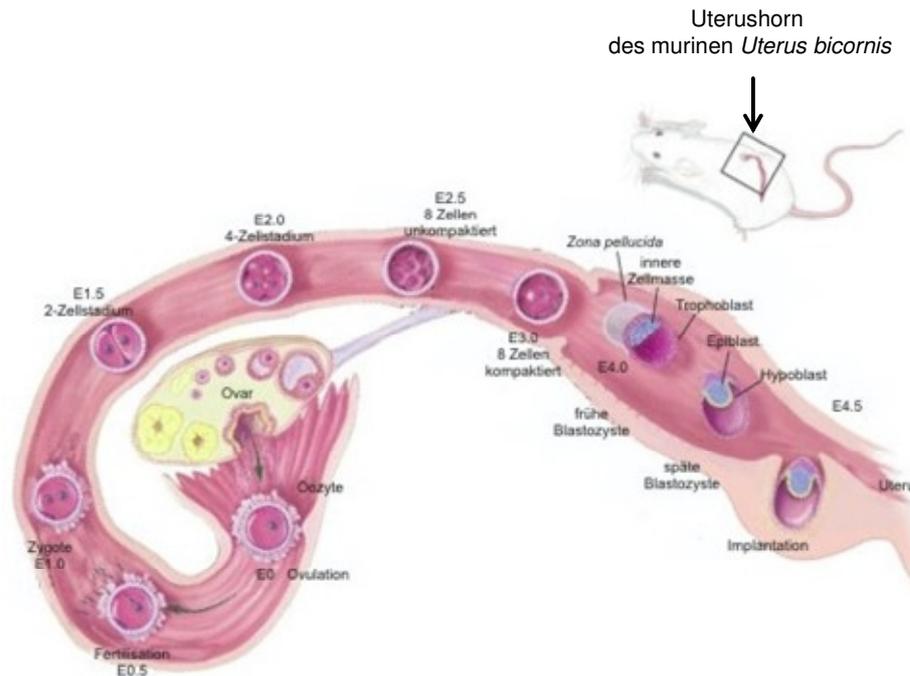


Abb. 3: Entwicklung der murinen Blastozyste von Embryonaltag 0 (E0) bis 5 (modifiziert nach: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>, © 2001 Terese Winslow)

### 1.3.2 Die Plazentation

Die Plazentation beginnt an Tag 8 der Trächtigkeit mit der Entwicklung des Labyrinths durch Anheftung der Allantois an das Chorion (Abb. 4). Eine ungenügende chorio-allantoide Fusion ist eine häufige Ursache für die embryonale Letalität im Verlauf der murinen Trächtigkeit (Rossant *et al.* 2001). Die Plazenta repräsentiert das erste Organ, das sich während der Embryogenese bei Säugetieren formt und ermöglicht als Kontaktfläche zwischen maternalem und fötalem Blutkreislauf den Austausch von Metaboliten und Gasen sowie den Abtransport von fötalen Stoffwechselendprodukten (Watson *et al.* 2005, Rossant *et al.* 2001). Die vollständig entwickelte Plazenta setzt sich aus drei Schichten zusammen: 1. Die äußere maternale Schicht beinhaltet deziduale Zellen des Uterus sowie Blutgefäße, die eine Blutversorgung der Implantation sicherstellen. 2. Die mittlere „Verbindungsschicht“ ermöglicht die Anheftung der fötalen Plazenta an den maternalen Uterus und enthält fötoplazentale respektive trophoblastäre Zellen, die in den Uterus und in mütterliche Blutgefäße invadieren. 3. Das innere Areal der Labyrinthzellen ist durchzogen von maternalem Blut und gewährleistet eine uneingeschränkte Versorgung des Föten mit Nährstoffen (Abb.4).

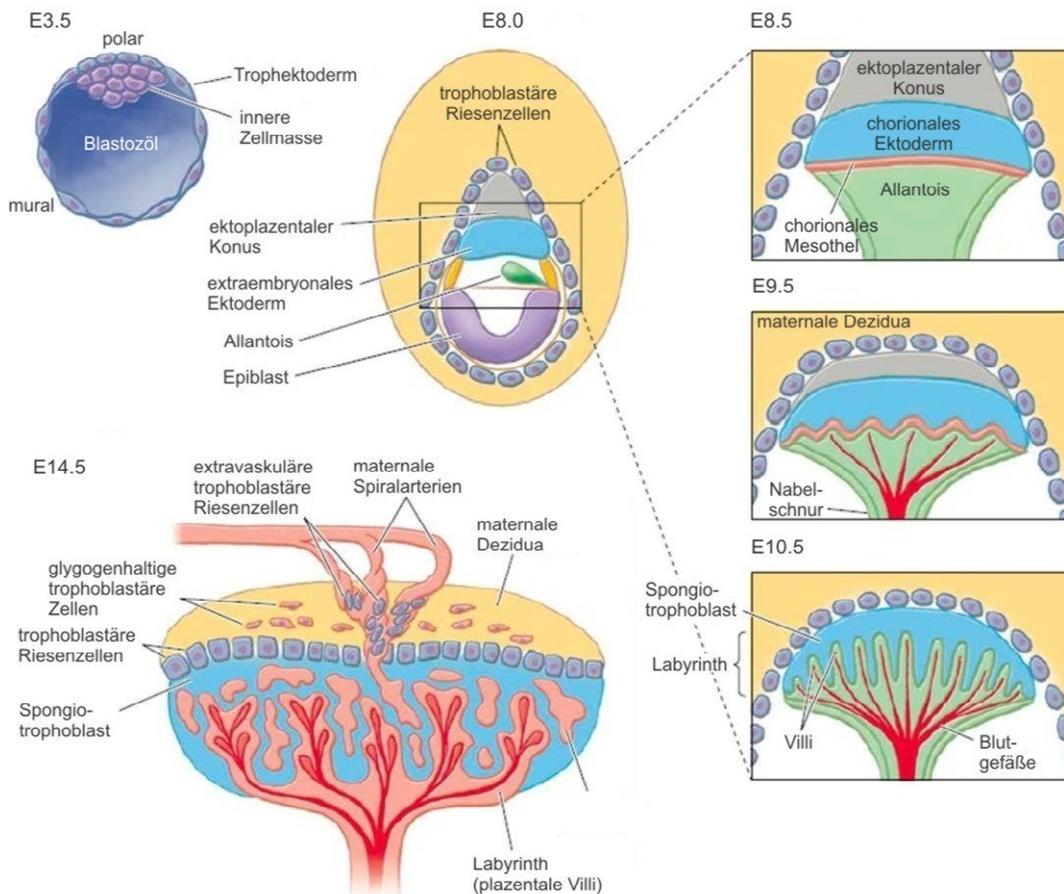


Abb. 4: Entwicklung der murinen Plazenta (modifiziert nach: Watson et al. 2005); E, Embryonaltag

Im Zuge der Implantation differenziert sich das Trophektoderm in verschiedene Trophoblastzelltypen, die wiederum spezifische Funktionen erfüllen. Es entwickeln sich 2 diploide Zelltypen aus dem polaren Trophektoderm, welches die innere Zellmasse der Blastozyste überlagert: Das extraembryonale Ektoderm bildet die Trophoblasten der Chorion-Schicht sowie später des Labyrinths und der ekto-plazentale Konus formt als Spongio-trophoblasten eine Schicht zwischen dem Labyrinth und der Riesenzellschicht (Watson *et al.* 2005) (Abb. 5). Die primären trophoblastären Riesenzellen ("giant cells") bilden sich durch direkte Differenzierung des muralen Trophektoderms (Abb. 5). Sie stellen die Mitose bzw. Zellteilung ein, nehmen an Größe zu, unterliegen wiederholten DNA-Replikationen (Endoreduplikation) und werden polyploid.

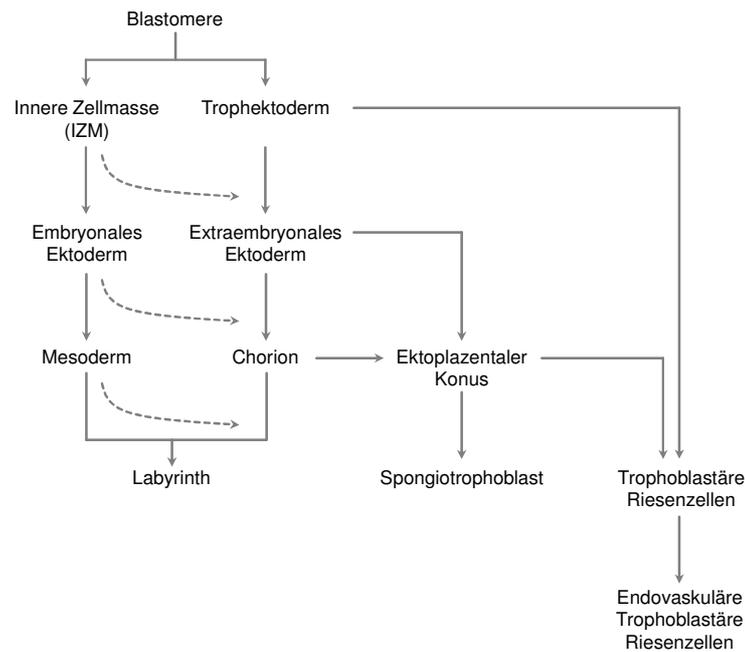


Abb. 5: Übersicht über die Entwicklung muriner plazentärer Zelltypen (modifiziert nach: Cross et al. 2005)

Im Laufe der kommenden Tage nach erfolgter Implantation steigt die Anzahl an Riesenzellen auf mehr als 400 an. Diese Zunahme wird durch den Prozess der Differenzierung der sekundären trophoblastären Riesenzellen aus Zellen des ekto-plazentalen Konus verstärkt (Cross *et al.* 2005). Zu Beginn sind die Riesenzellen entscheidend für die Vermittlung der Implantation sowie die Invasion des Embryos in den mütterlichen Uterus. Eine der wichtigsten lokalen Adaptationen an die Schwangerschaft ist die Modulation des mütterlichen Blutflusses zur Implantation. Durch Angiogenese bilden sich neue Blutgefäße, die dann im weiteren Verlauf dilatieren, um die verstärkte Blutzufuhr zu gewährleisten. Diese Prozesse werden entscheidend durch trophoblastäre Riesenzellen vermittelt. Sie invadieren in die maternalen Blutgefäße und ersetzen dort die Endothelzellen, wobei die Mehrheit der Riesenzellen lediglich einen kurzen Migrationsweg in die Dezidua zurücklegt. Darüber hinaus produzieren sie ein breites Spektrum an angiogenetischen und anti-angiogenetischen sowie vasoaktiven Mediatoren. Von besonderer Bedeutung sind hierbei der endotheliale Gefäß-Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) sowie der lösliche VEGF-Rezeptor sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1), der die Wirkung von VEGF antagonisieren kann (Cross *et al.* 2002). Im weiteren Verlauf der

Trächtigkeit produzieren die trophoblastären Riesenzellen verschiedene Hormone und Zytokine, die sowohl lokale als auch systemische Adaptationen des Embryos gewährleisten wie beispielsweise die Regulation des maternalen Blutflusses zur Implantation, die Progesteronproduktion im Ovar sowie die Laktogenese. Einen weiteren Zelltypen stellen die Synzytiotrophoblasten dar, die den Transport von Nährstoffen innerhalb des Labyrinths gewährleisten. Ihre Differenzierung beginnt erst nach dem achten Tag der Trächtigkeit (Cross *et al.* 2005).

Das maternale Blut durchläuft den Uterus durch Hauptarterien, die sich in 5 bis 10 Spiralarterien aufzweigen. Sie treffen an der trophoblastären Riesenzellschicht aufeinander und weisen zu diesem Zeitpunkt keine typischen Gefäßmerkmale mehr auf. Vielmehr sind die Gefäße erweitert und Elastin sowie glatte Muskulatur sind nicht mehr vorhanden (Cross *et al.* 2005). Nachdem das sauerstoffreiche, mütterliche Blut die arteriellen Kanäle passiert hat, fließt es durch ein dichtes Netzwerk an Sinusoiden innerhalb des Labyrinths zurück zur maternalen Seite der Plazenta. Das fötale, sauerstoffarme Blut passiert durch Arteriolen das Labyrinth in entgegengesetzter Richtung, erreicht die Schwammzellen und zweigt sich in Kapillaren auf, die zurück zur Basis verlaufen. Das aus den Kapillaren austretende, fötale venöse Blut steht im Gleichgewicht zu dem maternalen arteriellen Blut im Labyrinthareal, wodurch die Versorgung des Föten mit Sauerstoff maximiert wird (Adamson *et al.* 2002). Kürzlich ist es eindrucksvoll gelungen, den engen Kontakt zwischen fötalem und maternalem Blutfluss *in vivo* mittels intravitale Mikroskopie in der murinen Plazenta zu visualisieren (Abb. 6; Zenclussen *et al.* 2012).

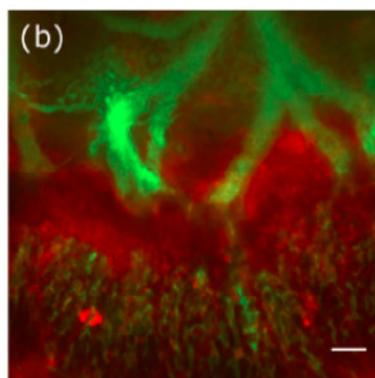


Abb. 6: Intravitale Aufnahmen des maternalen Blutflusses nach Injektion eines roten Farbstoffes (Rhodamin B isothiocyanate-Dextran) sowie des fötalen Blutflusses nach Injektion eines grünen Farbstoffes (FITC-Dextran), Maßstab = 100µm (Zenclussen *et al.* 2012)

Grundsätzlich kann eine eingeschränkte Ausbildung und Vaskularisierung nicht nur der Labyrinthzellschicht, sondern der gesamten Plazenta fatale und unter Umständen auch tödliche Konsequenzen sowohl für den Embryo als auch für die Mutter nach sich ziehen (Redecha *et al.* 2009, Rossant *et al.* 2001).

#### **1.4 Der Vergleich zwischen humaner und muriner Plazenta**

Die generellen Strukturen und die molekularen Mechanismen, die der Entwicklung der Plazenta unterliegen, sind beim Menschen und der Maus vergleichbar (Georgiades *et al.* 2002). Sowohl das humane als auch das murine Uterusendothel werden aufgelöst, wodurch das maternale Blut in direkten Kontakt mit dem fötalen Chorionepithel tritt (*Placenta haemochorialis*) (Rossant *et al.* 2001, Cross *et al.* 1994). Die humane Plazenta setzt sich ebenso wie die murine Plazenta aus drei Schichten zusammen: 1. Die äußere maternale Schicht wird gebildet aus der *Decidua basalis* sowie dem angrenzenden Myometrium und wird beim Menschen als Plazentabett bezeichnet. Die Invasion der Trophoblasten erstreckt sich hier bis zu einem Drittel des Myometriums, während sie sich in der murinen Plazenta nur auf die *Decidua basalis* beschränkt. Sowohl das humane Plazentabett als auch die murine *Decidua basalis* werden von maternalen Arterien (u.a. Spiralarterien) und Venen durchzogen und können als analoge Regionen angesehen werden. 2. Die mittlere Schicht verbindet die fötale Plazenta mit dem maternalen Uterus und enthält Zytotrophoblasten, aber kein fötales Blut bzw. fötale Blutgefäße. Auch diese Schicht ist vergleichbar bei beiden Spezies. 3. Das innere Areal weist hingegen anatomische und physiologische Unterschiede auf, die sich hauptsächlich auf die Struktur der Zotten (Villi) beschränken. Bei der humanen Zottenplazenta verzweigen sich die Chorionzotten in zahlreiche Äste. Hingegen generieren die villösen Strukturen bei der Maus aufgrund ihrer starken und engen Verbindung eine Art Labyrinth, was zu der Bezeichnung Labyrinthplazenta führte (Abb. 7) (Georgiades *et al.* 2002).

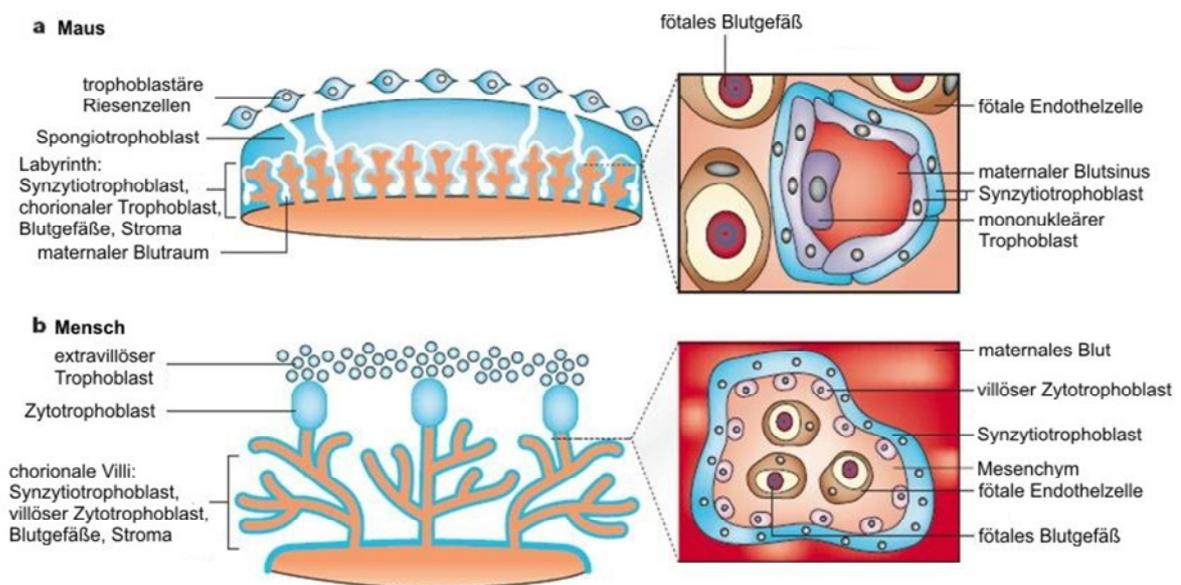


Abb. 7: Vergleich des Aufbaus der murinen Labyrinthplazenta (a) und humanen Zottenplazenta (b). Die Bildausschnitte illustrieren die Anzahl und Typen an Zellschichten zwischen maternalem und fötalem Blut. (modifiziert nach: Rossant and Cross 2001)

Aufgrund der Vergleichbarkeit der generellen Strukturen, vor allem aber der Funktion beider Plazentatypen, repräsentiert die Maus einen geeigneten Organismus zur detaillierten Untersuchung schwangerschaftsrelevanter Prozesse beim Menschen und generiert Einblicke in bislang unbekannte Mechanismen.

## 1.5 Das Immunsystem

Die elementare Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Pathogenen aufgrund seiner Fähigkeit, fremde Strukturen von eigenen zu unterscheiden. Diese Fähigkeit beruht auf der klonalen Selektion von Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren, die dann auf ein breites Spektrum an Antigenen reagieren können und eine spezifische Immunantwort auslösen. Bei den Lymphozyten unterscheidet man zwischen B-Zellen und T-Zellen, die sich beide im Knochenmark (Englisch: bone marrow) entwickeln, wobei nur die B-Zellen dort auch reifen. Die T-Zellen wandern zum Thymus, der den Ort ihrer Reifung darstellt. B-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen und können in dieser Form Antikörper freisetzen.

Aus didaktischen Gründen wird das Immunsystem in eine angeborene und erworbene Immunität unterteilt (Abb. 8, Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht der Vermittler der angeborenen (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) respektive der humoralen und zellulären Immunabwehr

	<b>Angeboren (Antigen-unspezifisch)</b>	<b>Erworben (Antigen-spezifisch)</b>
<b>Humoral</b>	antimikrobielle Substanzen (z.B. Lysozym) Komplement Zytokine	Antikörper Zytokine
<b>Zellulär</b>	Dendritische Zellen Makrophagen Mastzellen Natürliche Killerzellen Neutrophile Granulozyten B-Zellen	T-Gedächtniszellen T-Helferzellen T-Suppressorzellen Zytotoxische T-Zellen B-Zellen

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Barriere für Pathogene dar. Die zellulären Vermittler der unspezifischen Immunabwehr wie Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten und Dendritische Zellen werden bereits innerhalb weniger Sekunden aktiv. Sie sind durch die Expression eines breiten Repertoires an Oberflächenrezeptoren in der Lage, molekulare Strukturen der Pathogene (Antigene) als „fremd“ zu erkennen. Des Weiteren spielen sie eine entscheidende Rolle bei der phagozytotischen Beseitigung fremder Zellen bzw. fremder Strukturen. Darüber hinaus sind sie entscheidende Vermittler der Auslösung und der anschließenden Steuerung der adaptiven Immunreaktionen, da viele Pathogene die angeborenen Abwehrsysteme überwinden können (Abb. 8).

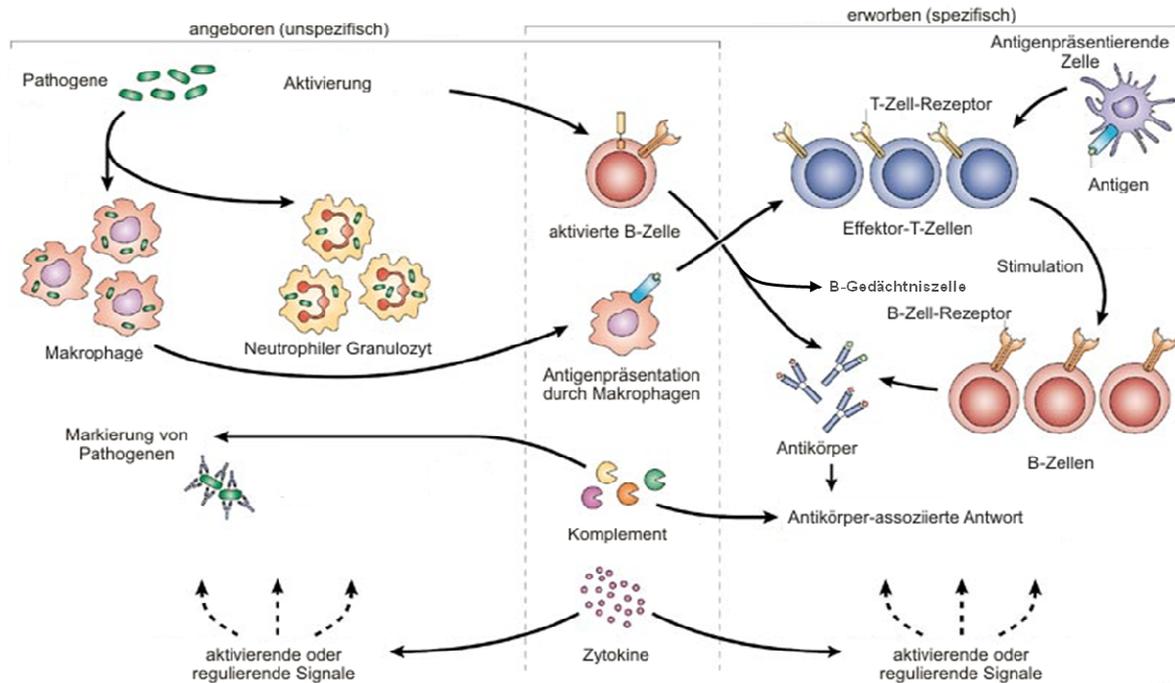


Abb. 8: Übersicht der Vermittler der angeborenen (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) Immunabwehr (modifiziert nach Gregersen et al. 2006)

Entweder gelangt das Antigen selbst in periphäre lymphatische Gewebe oder es wird dort durch Antigen-präsentierende Zellen (Dendritische Zellen, Granulozyten) den Lymphozyten des adaptiven Immunsystems präsentiert.

Während B-Zellen Antigene außerhalb von Körperzellen entdecken, wo beispielsweise die meisten Bakterien zu finden sind, reagieren T-Zellen nur auf Antigene, die innerhalb der Zellen z.B. von Viren gebildet werden. Zudem erkennen sie fremde Antigene nur, wenn diese auf der Oberfläche körpereigener Zellen (APC, antigen presenting cells) präsentiert werden. Die fremden Peptidbruchstücke werden von spezialisierten Glykoproteinen (MHC-Moleküle, major histocompatibility complex) der Wirtszelle an die Zelloberfläche transportiert, und der Komplex aus Peptidfragment und MHC-Molekül kann so von den T-Zellen geeigneter Spezifität erkannt werden. Diese erkennen aufgrund einer vorangegangenen Selektion das Pathogen als „fremd“. Dabei werden fremde Peptide aus dem Zytoplasma an MHC-I-Moleküle gebunden und von zytotoxischen T-Zellen vernichtet, die durch einen bestimmten Oberflächenmarker bzw. das Co-Rezeptormolekül CD8 (clusters of differentiation) gekennzeichnet sind (CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Der Transport von extrazellulären Antigenen erfolgt durch

Bindung an MHC-II-Moleküle, die dann von T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) erkannt werden. Diese sind durch das Oberflächenrezeptormolekül CD4 charakterisiert ( $CD4^+$  T-Zellen) und bilden zwei funktionale Klassen:  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen. Die  $T_H1$ -Zellen aktivieren hauptsächlich Makrophagen für die Eliminierung von intravesikulären Bakterien. Eine  $T_H1$ -Immunantwort ist durch das Leitzytokin IFN- $\gamma$  (Interferon-  $\gamma$ ) bzw. ein pro-inflammatorisches Milieu gekennzeichnet.  $T_H2$ -Zellen stimulieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern sowie Mastzellen und eosinophile Granulozyten zur antiparasitären Abwehr. Diese anti-inflammatorische Immunantwort wird hauptsächlich durch Interleukin-4 vermittelt (Abb. 9).

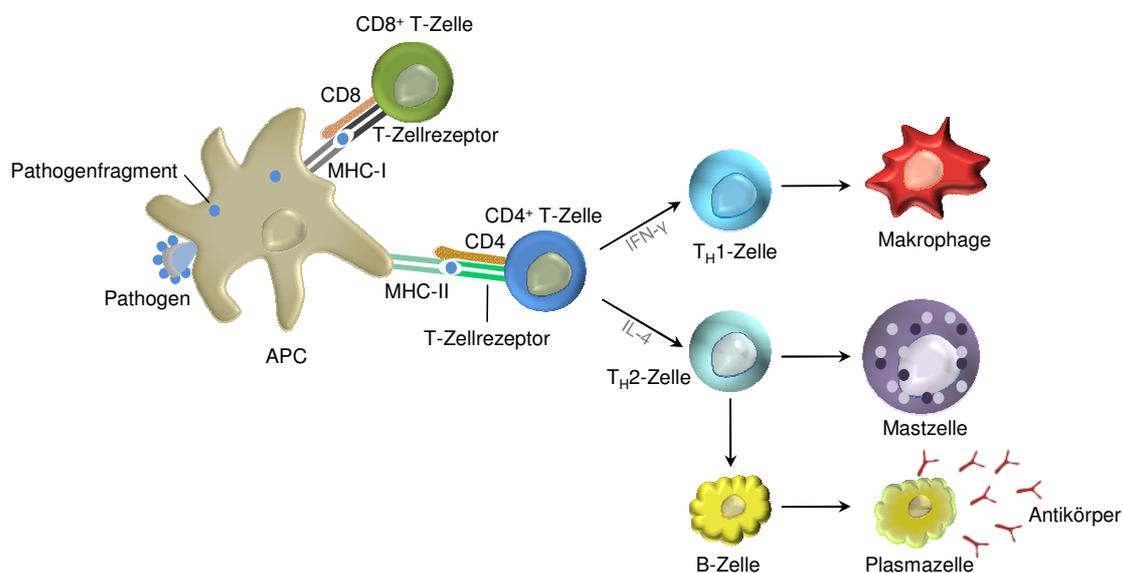


Abb. 9: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APC); MHC = major histocompatibility complex, CD = clusters of differentiation,  $T_H$  = T-Helferzelle, IL = Interleukin; IFN- $\gamma$  = Interferon- $\gamma$

Ein Teil der aktivierten Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion eine schnellere und wirksamere Immunantwort ermöglichen. Die Ausbildung dieses „immunologischen Gedächtnisses“ ist die einzigartige Eigenschaft des adaptiven Immunsystems (Janeway 2002, Schütt *et al.* 2006).

### 1.5.1 Die Rolle des Immunsystems während der Schwangerschaft

Die Schwangerschaft stellt für den gesamten mütterlichen Organismus eine spezielle Herausforderung dar, insbesondere für dessen Immunsystem, da der sich entwickelnde Fötus paternale und somit fremde Antigene exprimiert. Für eine

erfolgreiche Gravidität ist es demnach unerlässlich, Mechanismen zu entwickeln und zu aktivieren, die zu einer Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fötus führen. Gleichzeitig muss das maternale Immunsystem sowohl die Mutter selbst, als auch den Fötus vor Infektionen schützen. Dieses Paradoxon wurde erstmals 1953 von Peter Medawar analysiert, der 3 Postulate darüber aufstellte, weshalb der Fötus nicht Ziel einer Attacke des mütterlichen Immunsystems wird: 1. Embryo und Mutter sind durch die Plazenta anatomisch sowie physiologisch voneinander separiert. 2. Der Fötus ist immunologisch unreif. 3. Das maternale Immunsystem ist supprimiert. Wenngleich alle drei Mechanismen mittlerweile widerlegt wurden, so lieferten sie doch im Verlauf der letzten Jahrzehnte eine Vielzahl an Forschungsansätzen für die Untersuchung der heutzutage bezeichneten föto-maternalen Toleranz (Munoz-Suano *et al.* 2011). Tafuri *et al.* beschrieben 1995 eindrucksvoll, wie der Fötus eine spezifische und feinregulierte Immuntoleranz hervorruft und nicht vom mütterlichen Immunsystem ignoriert wird.

Die Prozesse der Implantation und Dezidualisierung erfolgen unter Einfluss eines inflammatorischen Milieus, welches unentbehrlich für die adäquate Wiederherstellung des uterinen Epitheliums sowie die Beseitigung zellulärer Fragmente ist. Während der Embryo heranwächst, sich entwickelt und zusammen mit der Mutter eine Art symbiotische Beziehung führt, wird eine anti-inflammatorische Phase induziert. Am Ende der Schwangerschaft, wenn die Entwicklung des Fötus abgeschlossen ist, werden erneut inflammatorische Prozesse ausgelöst, die letztlich zur eigentlichen Geburt und gleichsam zur Abstoßung der Plazenta führen. Vermittelt werden sowohl das inflammatorische als auch das anti-inflammatorische Milieu durch entsprechende Zytokine und Chemokine, deren Bildung entweder in Zellen des Endometriums selbst und/oder in Immunzellen erfolgt, die zur föto-maternalen Kontaktzone rekrutiert werden (Mor *et al.* 2011). Zu Beginn der Schwangerschaft infiltrieren Natürliche Killerzellen (NK), Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen (Zellen des angeborenen Immunsystems) die Dezidua (Mor *et al.* 2011). Die lokal am stärksten vertretene Immunzellpopulation mit bis zu 70 % der Lymphozyten stellen die uterinen Natürlichen Killerzellen (uNK) dar, eine Subpopulation der Natürlichen Killerzellen (Murphy *et al.* 2005). Als Teil der angeborenen Immunabwehr ist ihre Wirkung unabhängig von einer vorangegangenen Antigen-Exposition (Kiessling *et al.* 1975). Sie vermitteln in der frühen postimplantären Phase an der föto-maternalen

Grenzfläche die optimale Dezidualisierung und später dann bis zum Tag 12 der Trächtigkeit die Plazentation sowie Umwandlung der Spiralarterien (Greenwood *et al.* 2000, Bilinski *et al.* 2008). Bei Mäusen führt die Abwesenheit von uNK zu einer ungenügenden Modifikation der Spiralarterien. Die entscheidende Umwandlung dieser konstriktiven, muskulösen und vasoaktiven Arteriolen in dilatierte, dünnwandige und venenähnliche Gefäße könnte durch die uNK-vermittelte Sekretion des Zytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) erfolgen (Burke *et al.* 2010). Sie produzieren ca. 90 % an IFN- $\gamma$  in der mesometrialen Dezidua, und durch dessen Gabe kann bei uNK-defizienten Mäusen deren eingeschränkte Modifikation der Spiralarterien behoben werden (Ashkar *et al.* 2000). Wie die Vorläuferzellen der uNK an die feto-maternale Grenzfläche gelangen, ist bislang ungeklärt. Möglicherweise migrieren sie aus der Peripherie in die Dezidua und/oder es erfolgt eine lokale Proliferation *in situ* (Zhang *et al.* 2010).

Bereits zum Zeitpunkt der Insemination sind maternale Dendritische Zellen im Vaginalschleim bzw. Uterus detektierbar (McMaster *et al.* 1994, Blois *et al.* 2004, Zenclussen *et al.* 2010). Uterine DC können zudem einen direkten, Antigen-unspezifischen Einfluss auf die Dezidualisierung ausüben (Plaks *et al.* 2008). Sie interagieren nicht nur mit uNK, sondern beeinflussen gleichsam deren Funktion (Karsten *et al.* 2009). Darüber hinaus führt die DC-induzierte Präsentation von paternalen und somit fremden Antigenen zur Aktivierung der adaptiven Immunabwehr durch die Generierung von regulatorischen T-Zellen (Treg), deren Präsenz im Verlauf der Trächtigkeit aufrechterhalten wird. Der Grund hierfür könnte eine kontinuierliche Abgabe von plazentaren Antigenen in den mütterlichen Blutkreislauf sein (Zenclussen *et al.* 2010). Uterine DC werden als residente Zellen beschrieben, die wahrscheinlich nicht in die uterinen Lymphknoten migrieren. Da in der Studie von Collins *et al.* ebenso weitere Zelltypen nicht in der Lage zu sein scheinen, die föto-maternale Grenzfläche zu verlassen, wurde aufgrund dessen ein „zellfreier“, passiver Transport der Antigene durch das Blut oder die regionalen Lymphbahnen vorgeschlagen, die letztlich lokal von DC aufgenommen werden, welche in der Milz oder in den Lymphknoten vorhanden sind (Collins *et al.* 2009).

Der am umfangreichsten untersuchte Zelltyp als entscheidender Initiator der Ausbildung der Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fötus sind die regulatorischen T-Zellen. Als Vermittler des adaptiven Immunsystems sind sie

verantwortlich für die Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz durch die aktive Unterdrückung der Immunantwort gegenüber eigenen und fremden Antigenen (Sakaguchi *et al.* 1995). Treg repräsentieren ca. 5 - 10% an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Sakaguchi 2000) und können anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD25 (Sakaguchi *et al.* 1995) sowie des Transkriptionsfaktors Foxp3 (forkhead box Protein 3) identifiziert werden (Fontenot *et al.* 2003). Regulatorische T-Zellen expandieren nicht nur im Verlauf der Schwangerschaft systemisch und lokal an der föto-maternalen Grenzfläche (Aluvihare *et al.* 2004, Zenclussen *et al.* 2005), sondern bereits deutlich früher zum Zeitpunkt der Insemination, wenn das maternale Immunsystem mit Komponenten der Samenflüssigkeit konfrontiert wird. Durch diesen „ersten Kontakt“ wird eine Treg-vermittelte Toleranz gegenüber paternalen Alloantigenen aufgebaut, die später die mütterliche Akzeptanz des semiallogenen Fötus erleichtert (Robertson *et al.* 2009, Zenclussen *et al.* 2010). Ebenso wandern mütterliche Zellen durch die Plazenta und verbleiben in den fötalen Lymphknoten, um dort die Entwicklung von Treg zu induzieren. Somit wurde eine weitere Aufgabe des mütterlichen Immunsystems beschrieben: Die Generierung von regulatorischen T-Zellen, welche fötale Immunantworten gegenüber der Mutter unterdrücken. Dadurch ist der Fötus in der Lage, eine Toleranz gegenüber fremden und eigenen Antigenen, die während der Entwicklung *in utero* präsent sind, aufzubauen (Mold *et al.* 2008).

### **1.6 Mediatoren an der föto-maternalen Grenzfläche**

Die föto-maternale Grenzfläche ist mit hämatopoetischen Zellen reich besiedelt, auf die im vorherigen Kapitel bereits eingegangen wurde. Durch ein gut aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel einer Vielzahl an Mediatoren wird ein Milieu geschaffen, in dem der Fötus aktiv vom mütterlichen Immunsystem toleriert wird und somit heranwachsen kann. Hierfür sind gleichsam gewebespezifische Adaptionen des mütterlichen Uterus notwendig. Die Vermittlung dieser Umbauprozesse erfolgt durch Moleküle, die lokal sowohl von Immunzellen als auch von Nicht-Immunzellen wie z.B. uterinen Epithelzellen oder fötalen Trophoblasten gebildet werden. Von besonderer Bedeutung sind Proteasen,

Enzyme und Zytokine, welche den Auf- und Abbau extrazellulärer Matrix sowie die Bildung neuer Blutgefäße regulieren. Die Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind an der föto-maternalen Grenzfläche zum Zeitpunkt der Implantation der Blastozyste und der Invasion der Trophoblasten stark exprimiert und vermitteln dort die Degradierung der extrazellulären Matrix (Alexander *et al.* 1996, Das *et al.* 1997, Fata *et al.* 2000). Ihre Aktivität wird durch Gewebeinhibitoren der MMP gesteuert (TIMP, tissue inhibitors of MMP) (Bourboulija *et al.* 2010), und die Balance zwischen MMP und TIMP wird u.a. reguliert durch den Einfluss von Östrogen und Progesteron (Fata *et al.* 2000). Die Aktivierung der MMP kann u.a. durch Plasmin erfolgen (Amălinei *et al.* 2007). Plasmin, das Schlüsselenzym der Fibrinolyse, stammt vom Proenzym Plasminogen ab. Die Konvertierung der inaktiven Vorläuferform in ein aktives Enzym wird durch den gewebespezifischen (tPA, tissue-type plasminogen activator) sowie den Urokinase Plasminogenaktivator (uPA) vermittelt (Danø *et al.* 1985, Blasi *et al.* 1987, Collen *et al.* 1991, Vassalli *et al.* 1991, Bachmann *et al.* 1994). Rekombinantes tPA wurde *in vivo* erfolgreich als thrombolytisches Mittel bei Patienten eingesetzt (Neuhaus *et al.* 1988). Hauptsächlich wird die Aktivität von uPA und tPA durch physiologische Inhibitoren, den sog. PA-Inhibitoren (PAI), reguliert. Diese neutralisieren die Aktivatoren durch Bindung und Komplexbildung (Blasi *et al.* 1987, Kruithof 1988). Unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen ist eine Zunahme der Menge an zirkulierenden PA-Inhibitoren nachgewiesen worden (Dawson *et al.* 1992). Endothelzellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen stellen Quellen sowohl von PA als auch von PAI dar (Chapman *et al.* 1982, van Hinsbergh 1988, Bartha *et al.* 1991, Christ *et al.* 1993, Wojta *et al.* 1993, Lundgren *et al.* 1994, Louwrens *et al.* 1995). Die PAI-1-Defizienz in einem Mausmodell resultierte in einer vorübergehenden Reduktion sowohl der mütterlichen als auch der fötalen Vaskularisierung in der Plazenta und zu einer erhöhten Trophoblastendichte. Dies war verbunden mit einer verschlechterten Entwicklung des Labyrinthareals und einer Ausdehnung der Dezidua (Labied *et al.* 2011).

Darüber hinaus kann die Wirkung von Plasminogenaktivatoren auch durch den Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ) beeinflusst werden (Hiti *et al.* 1990). Dieses Zytokin wird von vielen Zellen des Immunsystems wie Mastzellen (Lindstedt *et al.* 2001) und Dendritischen Zellen (Kaplan *et al.* 2007) gebildet und ist in vielen verschiedenen Geweben

einschließlich der Plazenta und in dem sich entwickelnden Fötus detektierbar (Miller *et al.* 1989). Es ist unentbehrlich für die Embryogenese (Heine *et al.* 1987), die Angiogenese sowie für den Auf- und Abbau von Gewebe (Roberts *et al.* 1986). TGF- $\beta$  moduliert nicht nur die maternale Immuntoleranz während der Implantation, sondern reguliert auch *in vitro* verschiedene Moleküle wie MMP-9, uPA (Tobar *et al.* 2010) und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Pertovaara *et al.* 1994, Tokuda *et al.* 2003, Kanno *et al.* 2005), die für diesen Prozess relevant sind. Die Bedeutung von TGF- $\beta$  für entscheidende Prozesse des Lebens wird durch dessen Mangel bekräftigt: TGF- $\beta$ -defiziente Mäuse entwickeln eine Autoimmunerkrankung, die zu einem Multiorganversagen und letztlich zum Tod kurze Zeit nach der Geburt führt (Shull *et al.* 1992, Kulkarni *et al.* 1993). Bereits zum Zeitpunkt der Insemination scheint TGF- $\beta$  einen entscheidenden Einfluss auszuüben. Es ist in beachtlicher Menge in der Samenflüssigkeit enthalten, wobei hiervon nur ca. 30 % als aktive Form vorliegen. Die latente Form wird durch das uterine Mikromilieu aktiviert und stimuliert als solche die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine durch uterine Epithelzellen. Diese induzieren den Influx sowie die Aktivierung von Makrophagen, Dendritischen Zellen sowie Neutrophilen Granulozyten, was mit einer Entzündungsreaktion vergleichbar ist (Robertson *et al.* 1996, Tremellen *et al.* 1998). Die intravaginale Applikation von TGF- $\beta$  kann den Schwangerschaftserfolg in einem etablierten Mausmodell für Spontanaborte erhöhen (Clark *et al.* 2008).

TGF- $\beta$  steht u.a. in enger Interaktion mit einem weiteren Wachstumsfaktor, dem CtGF (Bindegewebe-Wachstumsfaktor) (Ryseck *et al.* 1991, Brunner *et al.* 1991, Igarashi *et al.* 1993, Abreu *et al.* 2002), der ebenfalls in wesentliche Prozesse wie Implantation, Entwicklung und Differenzierung des Embryos (Surveyor *et al.* 1998 und 1999, Friedrichsen *et al.* 2003), Bildung extrazellulärer Matrix sowie Angiogenese (Frazier *et al.* 1996, Brigstock *et al.* 1999) involviert ist. Auch CtGF-defiziente Mäuse sind nicht überlebensfähig und sterben innerhalb weniger Minuten nach der Geburt (Ivkovic *et al.* 2003).

Als Schlüsselmolekül bei der Vermittlung der Umwandlung bereits vorhandener (Angiogenese) und Bildung neuer Blutgefäße (Vaskulogenese) fungiert der vaskuläre Endothelwachstumsfaktor VEGF. Er stimuliert die Proliferation, Migration und Einsprossung von Endothelzellen (Ferrara *et al.* 2003) und ist durch

die Regulierung einer erhöhten endometrialen Permeabilität und endothelialen Zellproliferation im Bereich der Implantation in die Interaktionen zwischen Embryo und Endometrium involviert (Rabbani *et al.* 2001, Rockwell *et al.* 2002). Der Plazentawachstumsfaktor PGF (placental growth factor) zählt zu der gleichen Familie von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Maglione *et al.* 1993, DiPalma *et al.* 1996, Ziche *et al.* 1997) und scheint zusammen mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF, fibroblast growth factor) ähnliche Funktionen auszuüben wie die Induktion von angiogenetischen Prozessen, Zellwachstum und Migration von Endothelzellen (Ziche *et al.* 1997).

Galektin-1 (Gal-1) gehört zur Gruppe der Glykan-bindenden Proteine und erkennt als solches Glykokonjugate auf der Oberfläche verschiedener Zellen (Stillman *et al.* 2006, Rabinovich *et al.* 2007). Gal-1 moduliert die Funktion von Immunzellen durch dessen Einfluss auf Proliferation und Überleben von Effektor-T-Zellen (Stillman *et al.* 2006), die Antagonisierung der Aktivierung von T-Zellen (Chung *et al.* 2000), die Apoptose von T-Zellen (Stillman *et al.* 2006, Kopcow *et al.* 2008) sowie die Vermittlung der Suppressivität von Treg (Garin *et al.* 2007) (Abb. 10).

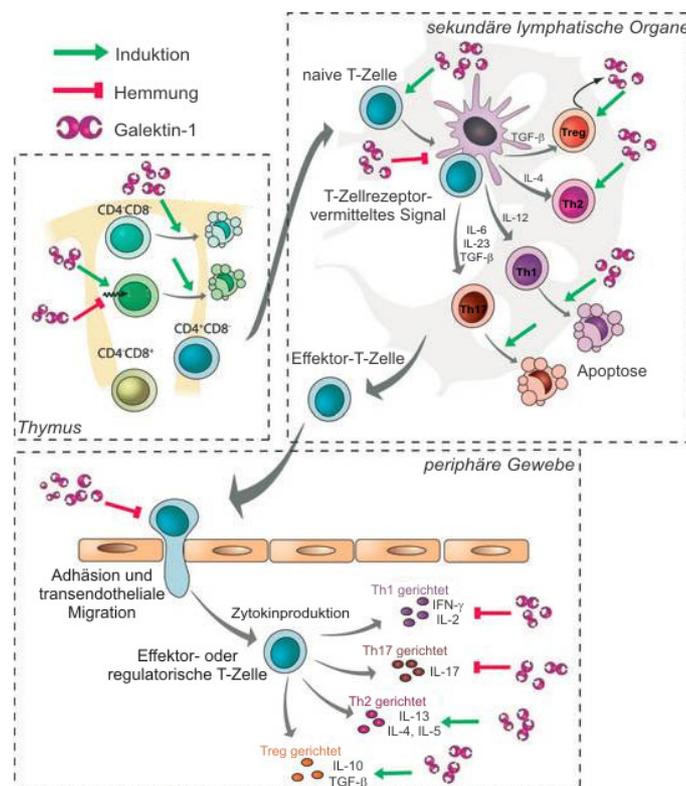


Abb. 10: Übersicht der regulatorischen Effekte von Galektin-1 auf T-Zellen (modifiziert nach Rabinovich *et al.* 2009); IL, Interleukin; Treg, regulatorische T-Zelle; Th, T-Helferzelle; CD, clusters of differentiation, Oberflächenmarker; TGF- $\beta$ , Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ , Interferon- $\gamma$

Die DC-vermittelte T-Zelltoleranz (Ilarregui *et al.* 2009) sowie die Induktion der Expansion von Treg (Blois *et al.* 2007, Ramhorst *et al.* 2012) können u.a. durch Gal-1 beeinflusst werden. Uterine NK produzieren apoptotisches Gal-1, das an aktivierte T-Zellen binden kann, um so deren Zelltod auszulösen. Dadurch wird an der föto-maternalen Kontaktzone ein lokales Mikromilieu geschaffen, welches den Fötus vor reaktiven T-Zellen schützt (Kopcow *et al.* 2008). Galektin-1 ist in viele schwangerschaftsrelevante Prozesse involviert. Es ist im Uterus sowie in den Ovarien stark exprimiert. Seine Genexpression ist während des murinen Östruszyklus im Proöstrus sowie zum Zeitpunkt der Implantation am höchsten (Choe *et al.* 1997), was die in der Literatur beschriebene Empfänglichkeit gegenüber der Wirkung von Hormonen wie Östradiol und Progesteron bekräftigt (Choe *et al.* 1997, Blois *et al.* 2009, Ramhorst *et al.* 2012). In zwei verschiedenen Mausmodellen führte die Gabe von Gal-1 zu einer verminderten Abortrate (Blois *et al.* 2009, Hirota *et al.* 2012) sowie zur Regulierung der Toleranz an der föto-maternalen Grenzfläche (Blois *et al.* 2009). Galektin-1 beeinflusst die Differenzierung von Trophoblasten (Jeschke *et al.* 2006, Fischer *et al.* 2010), und bei Frauen mit Fehlgeburten konnte eine verminderte Expression an Gal-1 nachgewiesen werden (Jeschke *et al.* 2010; Ramhorst *et al.* 2012).

Eine Vielzahl dieser schwangerschaftsrelevanten Mediatoren wird von Mastzellen gebildet und/oder beeinflusst (Valent *et al.* 1998, Galli *et al.* 2005, Crivellato *et al.* 2009, Theoharides *et al.* 2010). Aufgrund dessen sollte ihre Beteiligung an Prozessen sehr wahrscheinlich sein, denn basierend auf der Vielfalt an Forschungsansätzen und Untersuchungen in den letzten Jahren ist eines klar geworden: Nicht ein Zelltyp oder Mediator allein ist für die Vermittlung schwangerschaftsrelevanter Prozesse entscheidend. Vielmehr handelt es sich um eine perfekt organisierte Interaktion verschiedener Zellen und dessen Vermittlern wie Zytokinen und Chemokinen, vergleichbar mit dem harmonischen Zusammenspiel eines Orchesters. Kleine Fehler können hier kompensiert werden und/oder fallen im Gesamtgefüge nicht schwer ins Gewicht. Hingegen kann unter Umständen der „Totalausfall“ einer Zelle und/oder eines Mediators schwerwiegende Konsequenzen nach sich ziehen.

## **1.7 Mastzellen**

Als Paul Ehrlich 1879 im Rahmen seiner Doktorarbeit Zellen entdeckte, die „vollgestopft“ waren mit auffällig angefärbter Granula, sprach er ihnen seine einzige evidente Erklärung dafür zu: Sie sind Produkte der Mästung von Bindegewebszellen und geben somit Auskunft über den Ernährungszustand des Bindegewebes. Treffend gab er ihnen den Namen gemästete Zellen oder Mastzellen. Diese Annahme entsprach nicht ihrer tatsächlichen Funktion, die im Laufe der folgenden Jahrzehnte fast ausschließlich auf den Zusammenhang mit allergischen Reaktionen beschränkt wurde (Rocha e Silva *et al.* 1947, Riley 1953, Mota *et al.* 1956). In den frühen 60er und 70er Jahren erfolgten dann Untersuchungen besonders in Bezug auf ihr Vorhandensein und die quantitative Verteilung im Reproduktionstrakt im Allgemeinen sowie während des Östruszyklus im Speziellen bei verschiedenen Tierarten wie Ratte (Gibbons *et al.* 1972), Hamster (Harvey 1964) und Rind (Likar *et al.* 1964). Die phasenabhängige Änderung der Mastzellzahl im Verlauf des Östruszyklus aufgrund hormoneller Schwankungen schien eindeutig zu sein, wenngleich auch die Ergebnisse der damaligen Simplizität des Methodenspektrums angepasst waren. Entgegen dieser doch eindeutigen Hinweise wurde ihr möglicher Einfluss vor allem auf darauffolgende Prozesse, wie die Implantation der Blastozyste nach erfolgreicher Fekundation und somit der Trächtigkeit, nur marginal verfolgt (Menziez *et al.* 2011, Salamonsen *et al.* 1996).

Mastzellen entstammen hämatopoetischen, myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Kitamura *et al.* 1977 und 1978, Hallgren *et al.* 2011). Sie zirkulieren als solche durch das Gefäßsystem, um so ihr Zielgewebe zu erreichen (Du *et al.* 1996, Rodewald *et al.* 1996). Ihre Migration und auch Rekrutierung scheint gewebespezifisch zu sein und erfolgt durch die Wirkung verschiedener Zytokine, Chemokine, Integrine (Metcalf *et al.* 1997, Lu *et al.* 2006, Hallgren *et al.* 2011, Eller *et al.* 2011) und/oder Hormone (Wordinger *et al.* 1985, Rudolph *et al.* 2004, Jensen *et al.* 2010). In ihrem Zielgewebe angekommen, durchlaufen sie unter Einfluss des lokalen Mikromilieus verschiedene Prozesse der Reifung und/oder Differenzierung. Daher sind reife Mastzellen kaum im Blutkreislauf zu finden (Heib *et al.* 2008). Der wichtigste Wachstumsfaktor für Mastzellen ist der Stammzellularfaktor (stem cell factor, SCF), der als Ligand an den auf der Oberfläche

exprimierten c-Kit Rezeptor (CD117) bindet (Zsebo *et al.* 1990, Tsai *et al.* 1991, Metcalfe *et al.* 1997, Galli *et al.* 2008). Der Kit-Rezeptor oder auch CD117 ist auf allen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Während seine Expression aber im Zuge der Entwicklung und Differenzierung derjenigen Zellen, die dem Knochenmark abstammen, herunter reguliert ist, wird er auf der Mastzelloberfläche stetig präsentiert (Beaven 2009). Daher stellt dieser, zusammen mit dem Rezeptor FcεR1α ein entscheidendes Charakteristikum für die Detektion von reifen Mastzellen dar.

Mastzellen sind in besonders großer Menge in der Haut, den Atemwegen und im Gastrointestinaltrakt vorhanden. Es handelt sich hierbei um jene Gewebe, die in engem Kontakt mit der Umwelt stehen (Grimbaldeston *et al.* 2006, Galli *et al.* 2008, Tsai *et al.* 2011) oder aber inflammatorischen Prozessen unterliegen (Ikeda *et al.* 2003, Yu *et al.* 2006). Entsprechend ihrer Gewebespezifität bzw. des Gehalts an Proteoglykanen werden zwei verschiedene Mastzelltypen unterschieden: 1. Mastzellen des Bindegewebes (connective tissue) sind vornehmlich in der Haut sowie im Peritoneum lokalisiert. 2. Die mukösen (mucosal) Mastzellen findet man hauptsächlich im Intestinum (Metcalfe *et al.* 1997). Beide Zelltypen unterscheiden sich phänotypisch hinsichtlich ihrer morphologischen und histochemischen Eigenschaften, die man sich bei einer Färbung mit Alcianblau/Safranin zu Nutze macht: Je höher der Gehalt an sulfatierten Polysacchariden ist, umso stärker ist die Affinität gegenüber Safranin (Spicer 1960). Aufgrund des geringen Gehaltes an stark sulfatierten Proteoglykanen sind muköse Mastzellen Safranin-negativ sowie Alcianblau-positiv und werden auch als unreife Mastzellen angesehen. Hingegen sind Bindegewebsmastzellen durch die Speicherung von Heparin und Histamin in den sekretorischen Granula positiv für Safranin und färben sich rot (Michaloudi *et al.* 1999). Darüber hinaus werden Mastzellen beschrieben, deren Granula sich sowohl rot als auch blau anfärben und aufgrund dessen einen Status der Konvertierung zu repräsentieren scheinen (Reynolds *et al.* 1988, Kitamura 1989). Diese kann durch lokale inflammatorische Prozesse (Kitamura 1989, van Overveld 1990, Tsuji *et al.* 1990), aber auch durch die Anwesenheit von Fibroblasten (Levi-Schaffer *et al.* 1986) induziert werden. Uterine Mastzellen sind sowohl Alcianblau- als auch Safranin-positiv und repräsentieren demnach muköse respektive Bindegewebs-Mastzellen (Spicer 1960).

Mastzellen sind äußerst langlebig durch ihre Fähigkeit, ihren Zellzyklus erneut zu vollziehen und nach Stimulation zu proliferieren (Galli *et al.* 2008). Als Vertreter des angeborenen Immunsystems repräsentieren sie einen der ersten Zelltypen, welcher mit Antigenen, Allergenen und Toxinen aus der Umwelt sowie eindringenden Pathogenen interagiert (Galli *et al.* 2008, Tsai *et al.* 2011). Ihre allergische Aktivierung erfolgt durch die Quervernetzung zweier hochaffiner IgE Rezeptoren (FcεRIα) durch das entsprechende Allergen auf der Oberfläche der Mastzellen (Ishizaka *et al.* 1978) und führt zur Auslösung einer Signalkaskade (Abb. 11). Durch die Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren (Histamin, Prostaglandin) treten typische allergische Symptome, wie die Erweiterung der Gefäße, die Erhöhung der vaskulären Permeabilität sowie die Konstriktion der Bronchien, auf (Metcalf *et al.* 1997, Kraft *et al.* 2007) (Abb. 11).

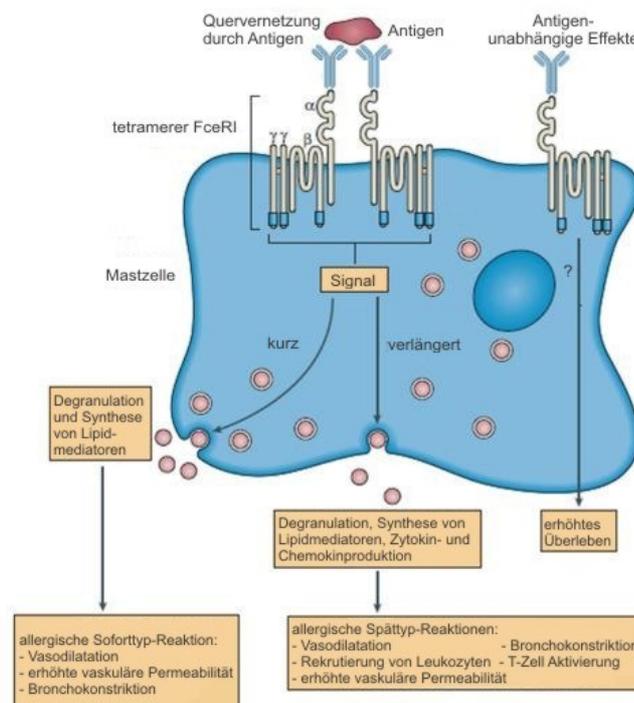


Abb. 11: Schematische Darstellung der allergischen Aktivierung von Mastzellen (Kraft & Kinet 2007); FcεRI = hochaffiner IgE-Rezeptor

Ihre Aktivierung muss aber nicht zwangsläufig durch immunologische Signale erfolgen, wie es bei der Auslösung einer Allergie der Fall ist. Vielmehr führen ebenso nicht-immunologische Signale zur Ausschüttung zuvor gebildeter und/oder neu synthetisierter Mediatoren (Metcalf *et al.* 1997). Diese können in 2 Kategorien eingeteilt werden: 1. zuvor gebildete Mediatoren, die allesamt in den

zytoplasmatischen Granula gespeichert und direkt nach Aktivierung abgegeben werden wie Histamin, Heparin, Proteasen sowie Zytokine; 2. Mediatoren, die in Abhängigkeit von der Aktivierung *de novo* synthetisiert werden wie verschiedene Wachstums- und Angiogenesefaktoren, Zytokine und Chemokine. Die größte Gruppe der ersten Kategorie repräsentieren die Proteasen mit den Serinproteasen Chymase und Tryptase und der Metalloprotease Carboxypeptidase A (Galli *et al.* 2005, Metz *et al.* 2007). Während mukosale Mastzellen nur Tryptasen enthalten, werden in den Granula der Bindegewebsmastzellen darüber hinaus ebenso Chymasen gespeichert (Miller *et al.* 1989).

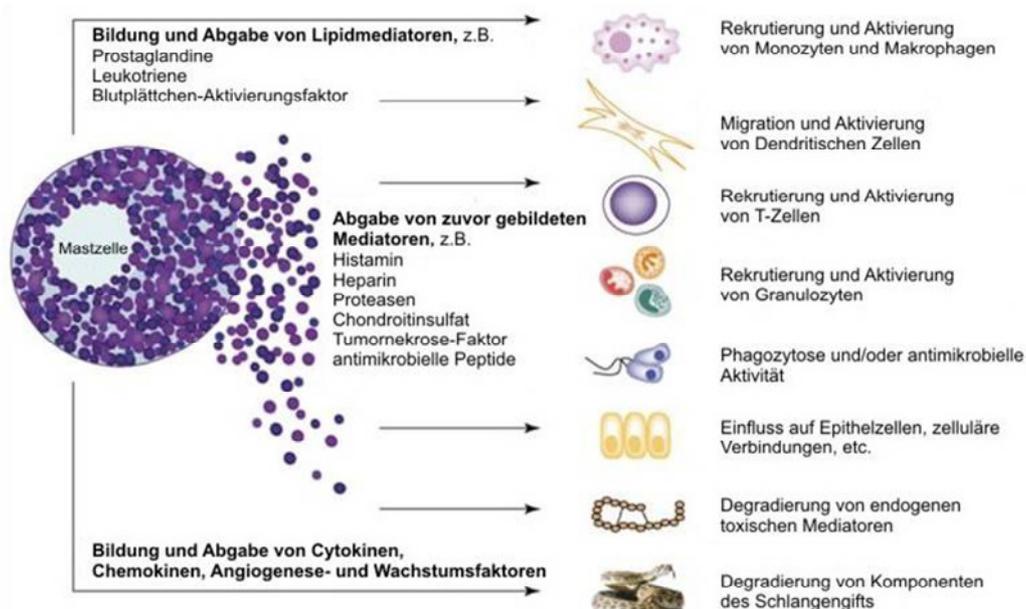


Abb. 12: Darstellung mastzellenspezifischer Mediatoren und deren Wirkung (modifiziert nach: Metz *et al.* 2007)

Der Einfluss dieser Mastzellmediatoren auf den Organismus ist vielfältig und bezieht gleichsam nicht immunologische Prozesse, wie Gewebeumbau und Angiogenese, mit ein (Theoharides *et al.* 2010). Eine Studie von Starkey *et al.* (1988) an mastzelldefizienten Mäusen weist auf den positiven Einfluss von Mastzellen nach lokaler Rekonstitution auf die Bildung neuer Gefäße hin.

Mastzellen sind multifunktionale Immunzellen, die ebenso die Aktivierung der Abwehr von Bakterien und Parasiten stimulieren (Malaviya *et al.* 1994 und 1996, Echtenacher *et al.* 1996, Gurish *et al.* 2004, Thakurdas *et al.* 2007, Shin *et al.*

2008), die Fähigkeit zur Phagozytose und Präsentation von Antigenen besitzen (Czarnetzki 1982, Malaviya *et al.* 1994 und 1996b, Metcalfe *et al.* 1997) sowie die Migration, Reifung, Differenzierung und/oder Funktion verschiedener Immunzellen (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten) beeinflussen (Galli *et al.* 2008, Tsai *et al.* 2011) (Abb. 12).

Die detaillierte Untersuchung dieser vielfältigen Aufgaben wäre ohne die Fähigkeit von Mastzellen, *in vitro* aus undifferenzierten Zellen zu reifen, nicht möglich. Zwar gelang es Wissenschaftlern in den 60er und 70er Jahren, Mastzellen aus Vorläuferzellen zu kultivieren, allerdings war hierfür die Anwesenheit von Fibroblasten notwendig, wodurch keine Reinkultur vorlag (Ginsburgh *et al.* 1963, Ishizaka *et al.* 1976 und 1977). Erst in den frühen 80er Jahren konnte diese Kontamination mit anderen Zellen umgangen werden (Nagao *et al.* 1981, Razin *et al.* 1981, Yung *et al.* 1981). Kurze Zeit später wurde erstmals Interleukin-3 (IL-3) als *in vitro* Wachstumsfaktor für jene Mastzellen beschrieben, die aus murinem Knochenmark generiert wurden (Razin *et al.* 1984). Obwohl *in vitro* allein durch die Gabe von IL-3 eine Reinheit von mehr als 95 % erzielt werden kann (Grimbaldeston *et al.* 2005, Wolters *et al.* 2005), scheint dieses Zytokin *in vivo* keinen entscheidenden Einfluss auszuüben, da IL-3-defiziente Mäuse keine Mastzelldefizienz aufweisen (Heib *et al.* 2008).

In einer Studie aus dem Jahr 2006 wiesen Wissenschaftler bei mastzelldefizienten C57BL/6J-*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen eine deutlich verringerte Toleranz gegenüber Allotransplantaten (allogen = artgleich) nach. Stammten die Transplantate allerdings von Mäusen des gleichen Stammes (syngen), so wurde eine verzögerte Abstoßung beobachtet, welche auf die genetische Ähnlichkeit des Empfängers und Spenders zurückgeführt wurde. Ebenso erhöhte sich die Akzeptanz der allogenen Transplantate, wenn man die mastzelldefizienten C57BL/6J-*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäuse mit Knochenmark-generierten Mastzellen rekonstituierte. Die tolerierten Transplantate wiesen darüber hinaus eine erhöhte Anzahl sowohl an Mastzellen als auch an regulatorischen T-Zellen auf. Lu und Kollegen schlussfolgerten daraus auf die Akzeptanz der Transplantate infolge der immunsuppressiven Effekte von Treg, die durch die Expression mastzellspezifischer Gene wie Mastzellprotease-1 und -5 hervorgerufen wurde. Dabei könnte Interleukin-9 (IL-9) als entscheidender Mediator des Zusammenspiels beider Zelltypen agieren, da es von aktivierten

Treg gebildet wird und sowohl die Rekrutierung von Mastzellen in das Gewebe als auch ihre dortige Aktivierung vermittelt (Lu *et al.* 2006). Aufgrund gewisser Ähnlichkeiten zwischen einem Allotransplantat und dem semiallogenen Fötus, der sowohl maternale eigene als auch paternale fremde genetische Merkmale aufweist, fungierten die eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf die mastzellvermittelte Toleranz gegenüber Transplantaten als Initialimpuls, einen möglichen Einfluss von Mastzellen auf die Gravidität näher zu untersuchen. Hierbei könnten Mastzellen in ihrer Funktion als Vermittler der angeborenen Immunität aber/und auch als Schaltstelle zum adaptiven Immunsystem agieren.

### **1.7.1 Mausmodelle für die Untersuchung der Funktionalität von Mastzellen**

Für die Untersuchung der Funktionalität und des Einflusses von Mastzellen auf angeborene und adaptive Immunantworten stehen verschiedene Mausmodelle zur Verfügung, die allesamt auf einer Mastzelldefizienz beruhen. Allerdings ist die Ausprägung dieser genetischen Mutationen unterschiedlich, und sie sind teilweise verbunden mit pathologischen Veränderungen des gesamten Organismus. Ein weit verbreitetes Mausmodell repräsentieren die  $WBB6F_1\text{-Kit}^{W/W^v}$  ( $W/W^v$ ), deren Mutation erstmals 1966 entdeckt wurde (Russel *et al.* 1966). Einige Jahre später beschrieb man diese Mäuse als defizient sowohl für Bindegewebe- als auch für mukosale Mastzellen (Kitamura *et al.* 1978, Crowle *et al.* 1981 und 1984). Von besonderem Interesse sind sie deshalb, weil sie mit kultivierten Mastzellen erfolgreich rekonstituiert werden können (Kitamura *et al.* 1978 und 1979). Im Gegensatz hierzu entwickeln sich bei  $WCB6F_1\text{-Sl/Sl}^d$  ( $Sl/Sl^d$ ) nach lokaler sowie systemischer Injektion von Wildtyp-Vorläuferzellen keine reifen Mastzellen (Kitamura *et al.* 1979, Galli *et al.* 1987). Gewinnt man allerdings von den  $Sl/Sl^d$  Knochenmarkzellen, die ebenso Mastzellvorläuferzellen repräsentieren, und injiziert diese in die  $W/W^v$ , so entwickeln sich daraus Mastzellen (Kitamura *et al.* 1979). Demnach deutet die Mastzelldefizienz bei den  $Sl/Sl^d$  auf eine abnorme Funktionalität gewebespezifischer Faktoren hin (Metcalf *et al.* 1997).

$WBB6F_1\text{-Kit}^{W/W^v}$  und  $WCB6F_1\text{-Sl/Sl}^d$  verfügen trotz ihrer Mastzelldefizienz in verschiedenen Organen über eine geringe Anzahl an Mastzellen in der Haut (<1 %

im Vergleich zu den Wildtypen) (Galli *et al.* 1987). Allerdings sind die Effekte der mutierten Allele sowohl auf dem *W* ("White spotting") als auch auf dem *Sl* ("Steel") Locus pleiotropisch: Obwohl nur ein Gen (*c-Kit*) betroffen ist, führen sie so zu verschiedenen phänotypischen Veränderungen wie ulzerativer Dermatitis, lymphozytärer Leukämie sowie makrozytärer Anämie (Murphy 1977, Galli *et al.* 1987). 100 % der weiblichen *Sl/Sl<sup>d</sup>* entwickeln bilaterale tubuläre Adenome des Eierstocks, und beide Mausmodelle sind als infertil beschrieben worden (Murphy 1977, Galli *et al.* 1987). Aufgrund dieser Infertilität waren beide Modelle für die vorliegende Arbeit ungeeignet.

Ein weiteres und wissenschaftlich wertvolles Mausmodell repräsentieren die C57BL/6J-*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*. Die *W-sash* Mutation trat spontan bei einer Kreuzung zweier Inzuchtstämme auf (C3H/HeH x 101/H) und wurde erstmalig 1982 beschrieben (Lyon *et al.* 1982). Es handelt sich hierbei um eine Inversionsmutation eines Segmentes auf Chromosom 5 der Maus. Diese Inversion, wie auch die Punktmutation bei den *W/W<sup>v</sup>*, führen zu einer eingeschränkten Expression des *Kit*-Gens und somit des *c-Kit* Rezeptors (Berrozpe *et al.* 1999), dessen Interaktion mit dem Stammzellofaktor SCF als Ligand entscheidend für Entwicklung, Reifung, Proliferation und Überleben der Mastzellen ist (Sharma *et al.* 2002). Die heterozygoten Tiere sind gekennzeichnet durch eine breite weiße Schärpe um ihre Körpermitte herum, was sowohl zur Namens- als auch Symbolgebung "sash" führte (Englisch für Schärpe), während die homozygoten Mäuse eine weiße Fellfärbung und schwarze Augen besaßen (Lyon *et al.* 1982) (Abb. 13).



Abb. 13: Charakteristische Aufnahmen der phänotypischen Ausprägung des Genotyps bei Wildtypen (C57BL/6J, links), heterozygoten *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* (mitte) sowie homozygoten *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* (rechts)

Genauere Untersuchungen der *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* ergaben schließlich einen Mangel an Mastzellen in den wenigen untersuchten Geweben (Stevens *et al.* 1982, Loutit *et*

al. 1981), wobei sie noch vereinzelt in der Haut bis zu einem Alter von 8 Wochen nachweisbar waren (Tono *et al.* 1992). Wolters erbrachte 2005 den Beweis für die Mastzelldefizienz 10 Wochen alter W-sh in deutlich mehr untersuchten Geweben. Von besonderer wissenschaftlicher Bedeutung ist allerdings die Tatsache, die nachgewiesene Defizienz in diesen Mäusen durch die intravenöse Injektion von Knochenmark-generierten Mastzellen (bone marrow derived mast cells, BMMC) aufzuheben (*“knock-in“*) (Grimbaldeston *et al.* 2005, Wolters *et al.* 2005). Dabei ist das Ausmaß der Rekonstitution abhängig von der Art der Injektion sowie der Zeit und erfolgt selektiv. Als besonders effektiv haben sich die lokale sowie die systemische Rekonstitution mittels intravenöser Injektion erwiesen (Grimbaldeston *et al.* 2005, Wolters *et al.* 2005). Die Tiere wurden zudem in einen einheitlichen C57BL/6 Hintergrund rückgekreuzt (Tono *et al.* 1992, Duttlinger *et al.* 1993). Dadurch schuf man uniforme Ausgangsbedingungen, die einen Vergleich mit kommerziell erhältlichen C57BL/6 Mäusen erlauben, die in diesem Fall als Wildtypkontrollen mit einer normalen Anzahl an Mastzellen fungieren.

Im Vergleich zu anderen mastzelldefizienten Mausmodellen, wie z.B. die WBB6F<sub>1</sub>-*Kit<sup>W/W-v</sup>*, werden C57BL/6J-*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* als fertil mit einer beachtlichen Menge an Keimzellen in ihren Gonaden sowie einer normalen Anzahl an Nachkommen (6 bis 8 Mäuse pro Wurf) beschrieben (Lyon *et al.* 1982, Wolters *et al.* 2005). Einzige bekannte pathologische Abnormalitäten sind eine verringerte Pigmentierung der Haut (Duttlinger *et al.* 1993), eine kardiale Hypertrophie (Nigrovic *et al.* 2008), ein Reflux der Gallenflüssigkeit in den Magen sowie ein Mangel an interstitiellen Cajal-Zellen im Darm (Grimbaldeston *et al.* 2005). Deren Absenz resultiert in einer gestörten Aktivität des basalen Rhythmus (*“Pacemaker“*) des Intestinums sowie in einer fehlenden Darmperistaltik (Huizinga *et al.* 1995, Der-Silaphet *et al.* 1998), die allerdings keinen Einfluss auf die Entstehung pathologischer Veränderungen wie Geschwüre zu haben scheint (Grimbaldeston *et al.* 2005). Generell spielen diese phänotypischen Auffälligkeiten aber eine eher untergeordnete Rolle im Vergleich zu jenen der *Kit<sup>W/W-v</sup>* Mäuse (Grimbaldeston *et al.* 2005). Entscheidender ist zudem die Tatsache, trotz eines Mangels an Mastzellen parallel über eine uneingeschränkte Entwicklung von hämatopoetischen sowie lymphoiden Zellpopulationen wie B-Zellen, T-Zellen, Dendritischen Zellen, Natürlichen Killer-Zellen (NK), Granulozyten und Makrophagen zu verfügen (Grimbaldeston *et al.* 2005). Aufgrund dieser zahlreichen Vorteile repräsentierten die

mastzelldefizienten C57BL/6J-*Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein wertvolles Modell für die Erforschung der Bedeutung von Mastzellen für reproduktive Prozesse *in vivo*.

Neben diesen, über Jahrzehnte hinweg genutzten Mausmodellen wurden kürzlich zwei Stämme beschrieben, die eine Untersuchung der Relevanz von Mastzellen auf verschiedene biologische Prozesse *in vivo* unabhängig von einer eingeschränkten Expression des *Kit*-Gens und somit des *c-Kit* Rezeptors erlauben. Feyerabend *et al.* generierten Mäuse, bei denen die Cre-Rekombinase (iCre) in den *Cpa3* Locus eingefügt wurde. Das *Cpa3*-Gen, welches die Mastzellprotease Carboxypeptidase 3 kodiert, ist mastzellspezifisch (Reynolds *et al.* 1989) und wird bereits von den frühesten Mastzellvorläuferzellen exprimiert (Rodewald *et al.* 1996). Die Rekombinase spaltet die DNA an einer spezifischen Zielsequenz und verbindet sie anschließend wieder (Kilby *et al.* 1993). Hierdurch konnte eine *Kit*-unabhängige Mastzelldefizienz sowohl von Bindegewebs- als auch von mukösen Mastzellen in der Haut bzw. im Peritoneum induziert werden. Allerdings war dies gleichsam verbunden mit einer Reduktion an basophilen Granulozyten um ca. 40 % in der Milz (Feyerabend *et al.* 2011). Aufgrund der zum derzeitigen Zeitpunkt noch ausstehenden Untersuchung der Defizienz an uterinen und weiteren gewebespezifischen Mastzellen sowie der zeitlichen Diskrepanz war dieses Modell für die vorliegende Arbeit nicht relevant.

Scholten *et al.* demonstrierten 2008 C57BL/6J-*Mcpt5-Cre ROSA26-EYFP* doppelt transgene Mäuse, bei denen die Mastzellprotease 5 an ein gelb fluoreszierendes Protein (EYFP, enhanced yellow fluorescent protein) gekoppelt wurde. Durch Kreuzung mit einer induzierbaren Cre-vermittelten DTR-transgenen Maus (iDTR, inducible diphtheria toxin) kann durch die Applikation des Diphtherie-Toxins die Mastzellprotease 5 depletiert werden (Dudeck *et al.* 2011). Als Alternative zu der induzierten *Mcpt-5*-Depletion wurden *Mcpt-5-Cre* Mäuse mit einer *R-DTA* Linie gekreuzt. Hierdurch kann eine kontinuierliche Ausschaltung der entsprechenden Protease erreicht werden. Allerdings beschränkt sich die Depletion lediglich auf Mastzellen des Bindegewebes und würde somit die uterine Mastzellpopulation nur teilweise beeinflussen, da diese gleichsam mukosale Mastzellen beinhaltet (Spicer 1960).

## 1.7.2 Mastzellen und Schwangerschaft - eine kontroverse

### Beziehung

Zwar findet sich in der Literatur eine limitierte Anzahl an Studien über den Zusammenhang von Mastzellen und Schwangerschaft, allerdings sind diese überaus kontrovers. Die Mehrheit der Untersuchungen beschränkt sich hauptsächlich auf Histamin als wichtigen Faktor für die Implantation des Embryos und basiert auf der Annahme, uterine Mastzellen stellen die Hauptquelle dieses Mediators dar (Shelesnyak 1957 und 1959, Cocchiara *et al.* 1992). Allerdings ist Histamin ebenso im Uterus von mastzelldefizienten  $WBB6F_1-W/W^V$  ( $W/W^V$ ) nach Behandlung mit Steroiden nachweisbar (Wordinger *et al.* 1985), was für einen alternativen Ursprungszelltyp innerhalb des Uterus spricht, wie z.B. Endothelzellen (Robinson-White *et al.* 1982) und/oder Deziduazellen, die bekanntermaßen nach Stimulation Histamin abgeben (Schrey *et al.* 1995). Trotzdem werden diese Mäuse als nicht fertil beschrieben (Galli *et al.* 1987), was auf atrophische Ovarien mit einem hyperplastischem Stroma sowie der Abwesenheit von Follikeln und *Corpora lutea* zurückzuführen ist (Wordinger *et al.* 1985). Um herauszufinden, ob sowohl Implantation als auch Lebendgeburt bei Abwesenheit von Mastzellen erfolgen, wurden in der Studie von Wordinger *et al.* weibliche  $W/W^V$  ovariectomiert. Nach der Transplantation eines Ovars von ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) transferierten sie Blastozysten von +/+ in pseudo-schwangere  $W/W^V$ . Es konnten weder Veränderungen in Bezug auf die Implantationsrate noch der Anzahl an Lebendgeburten nach dem Transfer der Blastozysten im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt werden. Als Ergebnis dieser Untersuchung sprachen Wordinger *et al.* uterinen Mastzellen eine Beteiligung an diesen Prozessen ab. Allerdings stammten die transferierten Ovarien von den Wildtyp-Wurfgeschwistern und sollten daher eine beachtliche Anzahl an bereits reifen und differenzierten Mastzellen aufweisen, wie es bei verschiedenen Spezies z.B. Maus (Skalko *et al.* 1968), Ratte (Jones *et al.* 1980, Gaytan *et al.* 1991, Aydin *et al.* 1998, Batth *et al.* 2000), Hamster (Shinohara 1987, Krishna 1991), Rind (Reibiger *et al.* 2000), Ziege (Karaca *et al.* 2007 und 2008) und Huhn (Parshad *et al.* 1993), beschrieben wurde. Diese könnten aufgrund des induzierten Implantationsprozesses in das umliegende Gewebe migrieren bzw. lokal proliferieren und somit einen entscheidenden Einfluss nicht nur auf den Verlauf der Schwangerschaft, sondern

auch auf die Geburt ausüben. Leider ist in der Wordinger-Studie keine Information über den Nachweis von Mastzellen in den Ovarien vor und nach Transplantation erhältlich. Darüber hinaus wurden die Empfänger-Weibchen mit Steroiden behandelt, und Mastzellen sind bekannt für ihre Sensibilität gegenüber der Wirkung von Hormonen, wie Östradiol und Progesteron (Wordinger *et al.* 1985, Cocchiara *et al.* 1992, Rudolph *et al.* 2004), und können dadurch in den Uterus migrieren (Jensen *et al.* 2011).

Diese Daten stehen im Widerspruch zu anderen Publikationen, in denen Mastzellen keine entscheidende Bedeutung für die Implantation (Salamonsen *et al.* 1996) oder die Auslösung der Geburt beigemessen wird (Salamonsen *et al.* 1996, Menzies *et al.* 2011), jedoch wurden hier stets syngene Verpaarungen der Weibchen mit Männchen desselben Stammes gewählt. Dies spiegelt nicht die natürliche Situation wider und sollte in der Natur aufgrund der teilweise schwerwiegenden Konsequenzen (Inzucht) vermieden werden (Pusey *et al.* 1996). Syngene Verpaarungen sind ausschließlich essentiell für die Aufrechterhaltung von Inzucht-Kolonien in den Laboratorien. Selbst hier müssen nach einigen Generationen Rückkreuzungen mit Wildtypen vorgenommen werden aufgrund der auftretenden genetischen Verarmung und der damit verbundenen pathologischen Veränderungen. In syngenen Verpaarungen findet keine Antigenpräsentation durch den Fötus statt, da dieser das Fortpflanzungsprodukt zweier genetisch identischer Individuen darstellt. Allerdings ist die Expression fremder Antigene entscheidend für die Ausbildung der notwendigen Allotoleranz, die z.B. durch die Sezernierung anti-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 und TGF- $\beta$  charakterisiert ist und die Schwangerschaft positiv beeinflusst.

Murine Föten und deren Plazenten weisen nach syngener Verpaarung ein deutlich geringeres Gewicht auf als nach allogener Verpaarung. Dies beruht auf einer verschlechterten Vaskularisierung der Dezidua verbunden mit einem verzögerten Wachstum von Plazenta und Fötus nach syngener Verpaarung. Allogene Plazenten erlauben aufgrund der adäquaten Modulation der Spiralarterien eine deutlich bessere Unterstützung des fötalen Wachstums (Madeja *et al.* 2011). Möglicherweise sind die fehlenden väterlichen Allo-antigene ursächlich für eine eingeschränkte Stimulation der maternalen Immunzellen und somit der Ausbildung der fötalen Toleranz (Tafari *et al.* 1995, Robertson *et al.* 2009). In diesem

Zusammenhang würden Zellen des angeborenen Immunsystems bereits nach der Insemination in einer allogenen Verpaarungskombination aufgrund ihrer Aktivierung und der Sezernierung verschiedener Moleküle ein optimales Milieu für die Implantation sowie die spätere Erzeugung der fötalen Toleranz schaffen.

Im Gegensatz zu den Studien von Menzies und Salamonson konnte ein entscheidender positiver Einfluss von Mastzellen auf die Angiogenese im Verlauf der Trächtigkeit bei Ratten nachgewiesen werden (Varayoud *et al.* 2004, Bosquiazzo *et al.* 2007). Das Wachstum neuer Blutgefäße bzw. die vaskuläre Versorgung ist von fundamentaler Bedeutung für reproduktive Prozesse (Ferrara *et al.* 1997 und 1998, Goth *et al.* 2003), die ebenso durch die Degranulation von Mastzellen beeinflusst wird (Varayoud *et al.* 2004, Bosquiazzo *et al.* 2007) wie das Ende der Schwangerschaft. In verschiedenen Studien löste die Mastzellaktivierung und somit die Ausschüttung von zuvor gespeicherten (Histamin) und/oder neu gebildeten Mediatoren Kontraktionen des Uterus aus (Garfield *et al.* 2000, Bytautiene *et al.* 2002, 2004 und 2008), mit deren Hilfe die eigentliche Geburt eingeleitet und vollzogen wird. Eine allergische Aktivierung von Mastzellen resultiert in einem deutlichen Anstieg der uterinen Kontraktilität (Garfield *et al.* 2006) und könnte somit für die Allergie-assoziierte Auslösung von humanen Frühgeburten verantwortlich sein (Habek *et al.* 2000, Bytautiene *et al.* 2004).

In Anbetracht dieser kontroversen Daten ist eine detaillierte Untersuchung des kausalen Zusammenhangs zwischen Mastzellen und reproduktiven Prozessen bzw. Schwangerschaft für das Verständnis ihrer Rolle umso entscheidender.

## **1.8 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die eingehende Untersuchung des Einflusses von Mastzellen auf reproduktive Prozesse. Besondere Aufmerksamkeit richtete sich hierbei auf entscheidende trächtigkeitsrelevante Prozesse wie der murine Östruzyklus, die Implantation des Embryos in den maternalen Uterus, die Dezidualisierung sowie die Plazentation und die Modifikation der Spiralarterien. Folgende Fragestellungen sollten hierbei geklärt werden:

1. Wie sind uterine Mastzellen charakterisiert, und ist ihr Phänotyp mit dem weiterer gewebespezifischer Mastzellen vergleichbar?
2. Welchen Einfluss üben der murine Östruzyklus sowie die Trächtigkeit auf die quantitative Verteilung von Mastzellen im Uterus aus?
3. Wie beeinflusst die Mastzelldefizienz in einem speziellen Mausmodell trächtigkeitsrelevante Prozesse wie die Implantation der Blastozyste, die Plazentation sowie die Umwandlung der Spiralarterien?
4. Wie wirkt sich eine Rekonstitution von mastzelldefizienten Mäusen mit Mastzellen auf die bereits beschriebenen trächtigkeitsrelevanten Prozesse aus?
5. Welche Mediatoren sind entscheidend für einen möglichen Einfluss von Mastzellen auf trächtigkeitsrelevante Prozesse?
6. Sind weitere Zellen des Immunsystems wie z.B. regulatorische T-Zellen oder uterine Natürliche Killerzellen an einer möglichen mastzellspezifischen Wirkung beteiligt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemische Stoffe und Substanzen, Lösungen

1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Sigma-Aldrich
2-Propanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Roth
3-Aminopropyltriethoxysilan (APES, C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> Si)	Sigma-Aldrich
5(6)-Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE)	Invitrogen
Acrylamid/bis-Acrylamid	Sigma-Aldrich
Alcianblau 8	Roth
Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich
Aquatex <sup>®</sup> (wässriges Eindeckmittel)	Merck
Azeton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Roth
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer
Betaisodona Lösung	Mundipharma
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Chicago Sky Blue 6B	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
D(+)-Saccharose	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Di-Methyl-Sulfoxid (DMSO)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Eosin Y Lösung, wässrig	Sigma-Aldrich
Ethanol 100 Vol-%	Otto Fischer
Ethanol 96 Vol-%	Otto Fischer
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Merck
FACS Clean	BD Biosciences
FACSFlow <sup>™</sup>	BD Biosciences
FACSRinse	BD Biosciences

Fixierungs-/Permeabilisations-Diluent	eBioscience
Fixierungs-/Permeabilisations-Konzentrat	eBioscience
Fluorescein	Fermentas
Glycerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Glyzin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin Lösung nach Mayer	Sigma-Aldrich
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore
Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 % BC	Berlin-Chemie
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck
Ketamin Inresa	Inresa Arzneimittel
Kodan® Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr
Luminol	Sigma-Aldrich
Lympholyte M®	Linaris
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich
Methanol (CH <sub>4</sub> O)	Merck
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	Promega
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Natriummetavanadat (NaO <sub>3</sub> V)	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	Merck
n-Dodecyl-beta-maltosid	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Paraplast Gewebe-Einbettmedium	Roth
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich

Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Permeabilisationspuffer 10x	eBioscience
Phenylnmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
PKH26	Sigma-Aldrich
Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories
Resflor <sup>®</sup> 300	Intervet
Rompun 2 %	Bayer
Roti <sup>®</sup> -Histokitt	Roth
Roti-Histokitt <sup>®</sup>	Roth
Safranin O	Roth
Stripping Puffer	Thermo Scientific
SYBR Green <sup>®</sup> PCR Mastermix	Applied Biosystems
TaqMan <sup>®</sup> Mastermix	Applied Biosystems
Tetramethylethyldiamin (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Toluidinblau O	Roth
Trizma <sup>®</sup> base (Tris-Base, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Trizma <sup>™</sup> -hydrochlorid (Tris-HCl, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl)	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Invitrogen
Tween <sup>®</sup> 20	Merck
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3 %)	Merck
Xylol (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> )	Roth
Zitronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	Merck

## 2.2 Labormaterialien

ABgene <sup>®</sup> PCR Plates	Thermo Scientific
Aluminiumfolie	Roth
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Berlin-Chemie
Chromatographie Papier	Whatman
Cryo 1 °C Freezing Container 'Mr. Frosty'	Nalgene
Cryovial <sup>®</sup> 2 ml	Simport

Deckgläser 24x40 mm, 24x50 mm, 24x60 mm	Thermo Scientific
Einbettkassette Kunststoff	Roth
Einbettmold	Leica
Einmal-Dentalkanüle 27 G	Braun
Einmalspritze Omnifix®-F 1 ml	Braun
Einwegskalpell	Feather
Eisbox	neoLab
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner bio-one
flüssiger Stickstoff	Air Liquide
Glasmaterialien	Schott; Brand; Simax
Heizkissen	Fine Science Tools
Immobilon™ Transfer Membran 0,2 µm	Millipore
Microseal® 'B' Film	Bio-Rad
Netzmikrometer 12,5X	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik
Objektträger mit Mattrand	Thermo Scientific
Parafilm	Bemis
Petrischalen 60x15 mm, 100x20 mm	Sarstedt
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt; Eppendorf
Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Reaktionsgefäße 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml RNase frei	Eppendorf
Röhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Rotilabo® Rundfilter, qualitativ	Roth
Rundbodenröhrchen 5 ml	BD Falcon
Serologische Pipette Glas 5 ml, 10 ml, 25 ml	Hirschmann
Serologische Pipette Kunststoff 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette Kunststoff 5 ml	Sarstedt
Tail Veiner (Apparatur zur intravenösen Injektion)	BioMedical Instruments
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt
Vernichtungsbeutel	neoLab
Wägebapier	Machery-Nagel

Wundklammern 7 mm	Fine Science Tools
Wundklammernapplikator	Fine Science Tools
Wundklammernentferner	Fine Science Tools
Zellkultureinsatz 8 µm	Becton Dickinson
Zellkulturflasche 125 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellkulturplatten 6 Well, 24 Well	Sarstedt
Zellsieb 100 µm	BD Falcon
Zubehör für Western Blot	Peqlab

### **2.3 Laborgeräte**

Abzug	Bense
Chemilumineszenzgerät SYGN/A609	Synoptics
Digitalkamera Canon IXUS 80 IS	Canon
Eismaschine	Ziegra
FACSCalibur™	BD Biosciences
Froster-720	Kirsch
HERA freeze HFU 586 Basic	Kendro
Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific
Kühlschrank FKEX 3600	Liebherr
Kühlschrank KTP 1810-20	Liebherr
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik
Magnetrührer mit Heizung RH basic 2	IKA Labortechnik
Mastercycler personal	Eppendorf
Microm HM355S (Rotationsmikrotom)	Microm
Microm HM560 (Kryostat)	Microm
Microprocessor pH Meter ph211	Hanna instruments
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop Observer.A1	Zeiss
Mini Shaker MS3 basic	IKA Labortechnik
MiniSpin	Eppendorf
Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad

Multifunktionsplattenlesegerät Synergy HT	BioTek
Paraffin-Ausgießstation + Kühleinheit EC 350	Microm
Paraffin-Streckbad 1052	GFL
Power Supply	Peqlab
Präzisionswaage LA620P	Sartorius
Schüttelwasserbad SWB25	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank Nu-437-400E	NuAire
Spülmaschine Miele professional G7883	Miele
Trockenschrank	Memmert
Ultra Turrax T25 Homogenisator	IKA Labortechnik
Ultra-Low Temperature Freezer MDF-U53V	Sanyo Electric
Ultraschallhomogenisator	Bandelin
Wasseraufbereitungsanlage Elix10	Millipore
Western Blot Apparatur	Peqlab
Wippschüttler PMR-30	Grant-bio
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

## **2.4 Biologische Stoffe und Substanzen**

AEC+ (3-Amino-9-Ethylcarbozol) High Sensitivity Substrate-Chromogen	Dako
Avidin/Biotin Blocking KIT	Vector Laboratories
BioSource™ Recombinant Mouse Interleukin-3 (IL-3)	Invitrogen
Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Amersham Biosciences
DNase	Stratagene
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom
Lectin from <i>Dolichos biflorus</i>	Sigma-Aldrich
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Oligo-Desoxy-Thymidin-Nukleotide (odTs)	Promega
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA
RNase-Inhibitor	Promega
Vectastain ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Durchflusszytometrie

PE-konjugiert anti-Maus CD117 (Klon : 2B8)	BD Biosciences
APC-konjugiert anti-Maus CD11c (Klon: HL3)	BD Biosciences
AF647-konjugiert anti-Maus Foxp3 (Klon: FJK-16s)	eBioscience
FITC-konjugiert anti-Ratte CD49b (Klon: Ha1/29)	BD Biosciences
FITC-konjugiert anti-Maus FcεRIα (Klon : MAR-1)	eBioscience
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5-konjugiert anti-Maus CD4 (Klon: RM4-5)	BD Biosciences
PE-Cy <sup>TM</sup> 5-konjugiert anti-Maus CD8a (Klon : 53-6.7)	BD Biosciences
PE-konjugiert anti-Maus I-A/I-E (Klon: M5/114.15.2)	BD Biosciences

### 2.5.2 Western Blot

#### Erstantikörper

anti-CTGF (L-20)	Santa Cruz
anti-Gal-1	Dr. G.A. Rabinovich
anti-TGFβ RII (C-16)	Santa Cruz
anti-TGFβ1 (V)	Santa Cruz
anti-β-Aktin (AC-15)	Sigma-Aldrich

#### Zweitantikörper

anti-Ziege, biotinyliert	DakoCytomation
ImmunoPure <sup>®</sup> anti-Kaninchen, Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific
ImmunoPure <sup>®</sup> anti-Maus, Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific

### 2.5.3 Immunhistochemie

#### Erstantikörper

anti-Mcpt-8 (TUG8)	BioLegend
anti-Gal-1	Dr. G.A. Rabinovich

*Zweitantikörper*

anti-Ratte, Biotin-konjugiert

Jackson Immuno

Research

anti-Kaninchen, biotinyliert

DakoCytomation

**2.6 Primer, Sequenzen und Annealing-Temperaturen für Echtzeit RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaktion)**

für SYBR Green®:

Zielgen:

Primer	Sequenzen (5' → 3')	Annealing-Temp. [°C]
Mcpt-1	vorwärts 5'- TGG CAC TTC TCT TGC CTT CT -3' rückwärts 5'- GCT CAC ATC ATG AGC TCC AA -3'	60
Mcpt-5	vorwärts 5'- CCG ACA CAC TGC AGG AAG TA -3' rückwärts 5'- TAT CCC AGC ACA CAG CAG AG -3'	60
Mcpt-8	vorwärts 5'- TCC TGA AGC TGG AAC GCA AA -3' rückwärts 5'- ATT TCC CAC ACA GAG CTG GA -3'	60
uPA	vorwärts 5'- TCA GAA ACC CTA CAA TGC CC -3' rückwärts 5'- TTC TGG TAG ATG GCT GCG AA -3'	60
tPA	vorwärts 5'- TGG AAT AGC AGT GTT CTG TCG C -3' rückwärts 5'- AGG GCT TCA AGT CTC GGT CTG -3'	60
PAI-1	vorwärts 5'- AGA TGT CTT CAG CCC TTG C -3' rückwärts 5'- TAT GCC TTT CCA CCC AGT C -3'	57
CtGF	vorwärts 5'- ACT ATG ATG CGA GCC AAC TGC -3' rückwärts 5'- AGC CCT GTA TGT CTT CAC AC -3'	57
Gal-1	vorwärts 5'- TGA ACC TGG GAA AAG ACA GC -3' rückwärts 5'- TCA GCC TGG TCA AAG GTG AT -3'	55
MMP9	vorwärts 5'- CAA TCC TTG CAA TGT GGA TG -3' rückwärts 5'- TAA GGA AGG GGC CCT GTA AT -3'	56
VEGF	vorwärts 5'- ATG GAC GTC TAC CAG CGA A -3' rückwärts 5'- ACT GTT CTG TCA ACG GTG A -3'	60
PGF	vorwärts 5'- TGT GTC CTT CTG AGT CGC TG -3' rückwärts 5'- TCT GCC TTT GTC GTC TCC AG -3'	57
Fgf1	vorwärts 5'- TCA CAA CCT TCG CAG CCC TG -3' rückwärts 5'- ACT TCG CCC GCA CTT TCC GC -3'	60

*Referenzgen:*

<i>Primer</i>	<i>Sequenzen (5' → 3')</i>	<i>Annealing-Temp. [°C]</i>
β-Aktin	vorwärts 5'- GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT -3' rückwärts 5'- GTT GTC GAC GAC CAG CGC -3'	55-60

*für TaqMan®:**Zielgen:*

<i>Primer</i>	<i>Sequenzen (5' → 3')</i>	<i>Annealing-Temp. [°C]</i>
TGF- β	vorwärts 5'- GCG TAC CAT GCC AAC TTC TGT CT -3' rückwärts 5'- CCG GGT TGT GTT GGT TGT AGA-3' Sonde 5'- CAC ACA GTA CAG CAA GGT CCT TGC CCT -3'	60

*Referenzgen:*

<i>Primer</i>	<i>Sequenzen (5' → 3')</i>	<i>Annealing-Temp. [°C]</i>
β-Aktin	vorwärts 5'- GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT -3' rückwärts 5'- GTT GTC GAC GAC CAG CGC -3' Sonde 5'- CGC CAC CAG TTC GCC ATG GAT -3'	60

**2.7 Medien, Lösungen und Pufferlösungen****2.7.1 Medien**

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)

Invitrogen

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

PAA

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1x, 10x

Invitrogen

*Kultur-Medium (a) und Wasch-Medium (b) für die Kultur von Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC, bone marrow derived mast cells)*

a:	445 ml IMDM	b:	45 ml IMDM
	50 ml FBS (10 %)		5 ml Pen/Strep (10 %)
	5 ml Pen/Strep (1 %)		
	rekombinantes IL-3 (30 ng/ml)		

*Kultur-Medium (a) und Einfrier-Medium (b) für die Kultur der murinen Trophoblasten-Zelllinie SM9-2*

a:	RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	b:	Kultur-Medium + 10 % DMSO
	1 mM Natriumpyruvat		
	5x 10 <sup>-5</sup> M 2-Mercaptoethanol		
	20 % FBS		
	1 % Pen/Strep		

## **2.7.2 Puffer und Lösungen**

### *allgemeine Puffer*

PBS (phosphate buffered saline) (10x):	80 g NaCl
	21,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 g KCl
	2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	<i>Aqua dest.</i> auf 1 l, pH = 7,4

PBS (5x): 1:2 Verdünnung des PBS (10x) mit *Aqua dest.*

PBS (1x): 1:10 Verdünnung des PBS (10x) mit *Aqua dest.*

TBS (Tris-buffered saline) (10x):	9 g NaCl
	87,8 g Tris-Base
	68,5 g Tris-HCl
	<i>Aqua dest.</i> auf 1 l, pH = 7,6

TBS (1x): 1:10 Verdünnung des TBS (10x) mit *Aqua dest.*

*Lyse-Puffer in Aqua dest. für Proteinisolierung*

10 %	Nonidet P-40 (Igepal CA-630)
0,1 mg/ml	LM (n-Dodecyl beta maltoside)
500 mM	Natriumfluorid (NaF)
10 mM	Natriummetavanadat
100 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
1 M	Tris (pH = 7,5)
0,5 M	EDTA
5 M	NaCl

*Puffer und Lösungen für Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese und Western Blot:*

Ammonium Persulfat (APS) 10 % (w/v):	1 g Ammonium Persulfat <i>Aqua dest.</i> auf 10 ml
Proben Puffer (5x):	15 % (w/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 6 % (w/v) SDS 60 % (w/v) Glyzerol 0,006 % (w/v) Bromphenolblau 0,18 M Tris, pH = 6,8
Elektroden-Puffer (10x):	30,25 g Tris-Base 144 g Glyzin Zugabe <i>Aqua dest.</i> auf 800 ml, pH = 8,3 10 g SDS <i>Aqua dest.</i> auf 1 l
Transfer-Puffer (10x):	30,3 g Tris-Base 144,15 g Glyzin <i>Aqua dest.</i> auf 1 l
Transfer-Puffer (1x):	frisch und kalt zubereitet 120 ml Transfer-Puffer (10x) <i>Aqua dest.</i> auf 1,2 l Zugabe Methanol auf 1,5 l
Blockierungslösung:	5 % (w/v) Milchpulver in 1x TBS

Waschlösung: 0,05 % Tween in 1x TBS

Detektionslösung: bestehend aus 2 Lösungen

Lösung 1:	<i>Aqua dest.</i>	4600 µl
	Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8	333 µl
	Cumarsäure 90 mM in DMSO	22 µl
	Luminol	50 µl
Lösung 2:	<i>Aqua dest.</i>	4660 µl
	Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8	333 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µl

*Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie:*

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS):

0,35 g NaHCO<sub>3</sub> in 1Liter *Aqua dest.*, pH = 7,2

- 100 ml verwerfen, auffüllen auf 1Liter mit 10x HBSS

1 mM DTT in 1x HBSS

FACS-Puffer: 1x PBS  
1 % BSA  
0,1 % NaN<sub>3</sub>

Lyse-Puffer (10x): 44,5 g NH<sub>4</sub>Cl  
5 g KHCO<sub>3</sub>  
0,19 g EDTA  
*Aqua dest.* auf 1 l

Lyse-Puffer (1x): 1:10 Verdünnung des Lyse-Puffers (10x) mit *Aqua dest.*

*Puffer und Lösungen für Immunhistochemie*

Citratpuffer zum Kochen: Lösung A – 0,1 M Zitronensäure

Lösung B – 0,1 M Natriumcitrat

18 ml von Lösung A + 82 ml von Lösung B + 900 ml *Aqua dest.*, pH = 6

Blockierungslösung (Peroxidase): 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol

Blockierungslösung (Protein): 1 % BSA in 100 mM PBS (DBA Lektin)  
10 % BSA in 1x TBS (Mcpt-8)

ABC-Lösung: 5 ml 1x TBS + 1 Tropfen Reagenz A + 1  
Tropfen Reagenz B

Lösung für Kultur der murinen Trophoblasten-Zelllinie SM9-2

Trypsin EDTA (0,25 % Trypsin + 0,2 % EDTA) 1:10 in PBS

## 2.8 Mäuse und Haltung

### 2.8.1 Haltung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierexperimente wurden von der Tierschutzbehörde in Halle/Saale (LVwA, Referat Verbraucherschutz und Vetrinärangelegenheiten; AZ. 10.08.2.179, DFG Ze 526/6-1) genehmigt.

In dem Haltungsraum herrschte ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden mit einer Hellphase von 7 bis 19 Uhr, eine Raumtemperatur von  $21 \pm 1$  °C und eine relative Luftfeuchte von  $45 \pm 5$  %. Allen Tieren standen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung.

### 2.8.2 Mausstämme

<i>Mausstamm</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Herkunft</i>
BALB/c	männlich	Charles River (Sulzfeld, Deutschland)
CBA/J	weiblich	Charles River (Sulzfeld, Deutschland)
C57BL/6J	weiblich	Charles River (Sulzfeld, Deutschland)
C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	weiblich	Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) oder institutseigene Zucht der Abteilung Dermatologische Allergologie unter der Leitung von Prof. Dr. Marcus Maurer (Allergie-Centrum-Charité, Berlin, Deutschland)
Lgals1 <sup>-/-</sup> (129/P3J)	weiblich	Institut Jacques Monod, Bâtiment Buffon, Paris, France (Francoise Poirier)
C57BL/6J-Mcpt-5-Cre ROSA26-EYFP		institutseigene Zucht des Instituts für Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. Axel Roers (Medizinische Fakultät „Carl Gustav Carus“, Dresden, Deutschland)

## **2.9 Bestimmung des Östruszyklus**

Die Determination der einzelnen Stadien des Östruszyklus bei geschlechtreifen CBA/J Weibchen erfolgte mittels Vaginalspülung mit 20 µl isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Die Zellsuspension wurde auf einen Objektträger aufgetragen und anhand des charakteristischen, phasenabhängigen Zellgehaltes per Durchlichtmikroskopie beurteilt (Rugh 1990). Bei der Detektion eines eindeutigen Stadiums fand die Tötung der Weibchen durch zervikale Dislokation mit anschließender Entnahme des bikornealen Uterus statt. Zur Bestätigung der Festlegung des Zyklusstadiums in der frischen Suspension wurden die Zellen luftgetrocknet, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und zusätzlich bewertet.

## **2.10 Verpaarungen**

Mindestens 10 Wochen alte Weibchen (max. 3) wurden zu geschlechtsreifen Männchen eines zum Weibchen unterschiedlichen Stammes (allogene Verpaarung) gesetzt und zweimal täglich auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfs (Plug) untersucht. Das Auftreten eines Plugs kennzeichnete Tag 0 der Schwangerschaft. Die entsprechenden Weibchen wurden von den Männchen getrennt und an den Tagen 2, 5 oder 10 der Schwangerschaft im Rahmen der Experimente getötet.

## **2.11 Präparationen**

Das Töten der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Nach Eröffnen der Haut entlang der abdominalen Seite wurden die inguinalen und axillären Lymphknoten entfernt. Das Eröffnen des Peritoneums ermöglichte die Entnahme der mesenterischen und para-aortalen Lymphknoten sowie des Thymus. Gleichfalls wurde der bikorneale Uterus sowohl im naiven Zustand als auch während der Trächtigkeit freipräpariert und die Anzahl an Implantationen (Tag 5 und 10) bzw. Aborten (Tag 10) bestimmt. Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte anteilig für histologische und molekularbiologische Methoden. Abgestorbene Embryonen bzw. Föten wurden als Aborte erfasst, wenn die entsprechenden Implantationen

entweder nekrotische Veränderungen aufwiesen (Abb. 14a) oder deren Größe deutlich verringert war. Letzteres war stets verbunden mit einer helleren Einfärbung der gesamten Implantation (Abb. 14b).

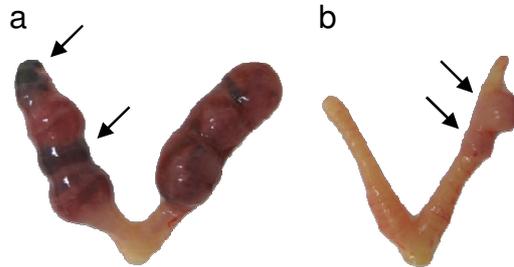


Abb. 14: Abgestorbene Embryonen in Form nekrotischer Veränderungen (a, Pfeile) sowie heller Einfärbungen, verbunden mit einer deutlichen Verringerung der Implantationsgröße (b, Pfeile) verglichen mit gesunden Implantationen (a) an Tag 10 der Trächtigkeit.

Die Ermittlung der Abortrate in % erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{(\text{Anzahl Aborte [total]}) \times 100}{(\text{Anzahl Implantationen [total]})}$$

## 2.12 Aufbereitung von Gewebe für histologische Untersuchungen

Die Aufbereitung verschiedener Gewebe nach Sainte-Marie (1962) ermöglichte eine schonende Fixierung. Diese sollte bei 4 °C und für mind. 15 Stunden in 96 %igem Ethanol erfolgen. Eine anschließend durchgeführte Alkoholreihe bereitete das Gewebe auf die Inklusion in flüssigem Paraffin vor.

*Protokoll:*

*Dehydrierung*

4x Ethanol	100 %	1 Std. (arbeiten auf Eis)
2x Xylol		1 Std. (arbeiten auf Eis)
1x Xylol		1 Std. (arbeiten bei Raumtemperatur)

*Inklusion in Paraffin*

bei 56 °C über Nacht

Am folgenden Tag wurde das Gewebe in einer Einbettform mit der späteren Schnittfläche nach unten platziert (Abb. 15) und von flüssigem Paraffin umschlossen.

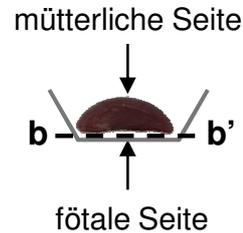


Abb. 15: Platzierung von Gewebe am Beispiel einer Plazenta, mit der fötalen Seite nach unten gerichtet, in einer Einbettform; Die Linie b-b' markiert die Schnittfläche.

Durch Aufsetzen einer Kunststoffkassette wurde der Gewebe-/Paraffinblock nach dem Erkalten aus der Form gelöst und in den Halter eines Rotationsmikrotoms zum Schneiden gespannt. Der Schnitt wies eine Dicke von 5 µm auf, wurde nach Überführung in ein warmes Wasserbad gestreckt und anschließend vorsichtig auf einen beschichteten Objektträger gezogen. Nach Trocknen des Schnittes über Nacht bei Raumtemperatur war dieser für histologische Färbetechniken einsetzbar.

### **2.13 Silanisierung von Objektträgern mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES)**

Um eine Haftung des Schnittes auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurde dieser zuvor mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet. Die Behandlung mit APES bewirkt eine positive Ladung der Glasoberfläche. Da im Gewebe reichlich negativ geladene Gruppen als Bindungsstellen vorhanden sind (Carboxyl-, Sulfatestergruppen), führen diese zu einem Anhaften auf den silanisierten Objektträgern (Lang 2006).

*Protokoll:*

2 % Aminoxyylan in Azeton	2 Min.
3x Aqua dest.	5 Min.

- Überführen in Trockenschrank für 1 Std. bei 70 °C
- Trocknen der Objektträger bei Raumtemperatur über Nacht

## 2.14 Histologie

Um die Paraffinschnitte für histologische Untersuchungen nutzen zu können, war im ersten Schritt eine Entfernung des Paraffins mit Xylol sowie im zweiten Schritt eine Vorbereitung des Schnittes auf das wässrige Milieu der Färbelösungen durch Einsatz von Alkohollösungen absteigender Konzentrationen unabdingbar.

*Protokoll:*

### *Deparaffinisierung/Hydrierung*

Xylol		15 Min.
Xylol		15 Min.
Ethanol	100 %	5 Min.
Ethanol	95 %	5 Min.
Ethanol	75 %	5 Min.

Nach der eigentlichen Färbung erfolgte mit Hilfe einer anschließend durchgeführten Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen eine Dehydrierung des Gewebeschnittes. Aufgrund der ungünstigen Lichtbrechungseigenschaften des Alkohols wurde dieser anschließend durch Spülen in Xylol verdrängt („Klären“).

*Protokoll:*

### *Dehydrierung/Klären*

Ethanol	75 %	10 Sek.
Ethanol	95 %	10 Sek.
Ethanol	100 %	10 Sek.
Xylol		2 Min.
Xylol		2 Min.

### 2.14.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung)

Die H/E-Färbung ist eine weit verbreitete Methode der Übersichtsfärbung in der Histologie zur Darstellung der Gewebemorphologie. Mit Hilfe zweier verschiedener Einzelfärbungen erscheinen saure bzw. basophile Strukturen, insbesondere die in den Zellkernen enthaltene Desoxyribonukleinsäure (DNA), blau und basische bzw. azidophile Strukturen rot. Nach dem ersten Färbeschritt mit Hämatoxylin bzw.

Hämalaun ist das Spülen in Leitungswasser notwendig. Durch die damit verbundene pH-Wert-Erhöhung der zuvor sauren Lösung erfolgt ein Farbumschlag der bereits rötlich-braun angefärbten sauren Strukturen in ein Blau. Der zweite Färbeschritt mit einer wässrigen Eosin-Lösung dient der Anfärbung des Zellplasmas.

*Protokoll:*

*Deparaffinisierung/Hydrierung*

wie in *Kap. 2.14* beschrieben

*Färbung*

Hämatoxylin            30 Sek. - 2 Min.

Leitungswasser zum „Bläuen“ (unter Sichtkontrolle)

Eosin                    20 Sek. - 1 Min.

*Aqua dest.*            kurz spülen

*Dehydrierung/Klären*

wie in *Kap. 2.14* beschrieben

*Eindecken*

mit xylollöslichem Eindeckmedium (Roti-Histokitt)

### **2.14.2 Toluidinblau O-Färbung**

Mastzellen bzw. deren Granula weisen eine hohe Dichte an sauren Proteoglykanen wie Heparin auf. Diese Tatsache macht man sich bei einer metachromatischen Färbung z.B. mit Toluidinblau zu Nutze. Es handelt sich hierbei um eine Färbung in einem anderen Farbton, als er der verwendeten, verdünnten Farbstofflösung zukommt (Mulisch *et al.* 2010). Basische Farbstoffmoleküle lagern sich an die in den Mastzellgranula enthaltenen sauren Polymere, wodurch es zu einer Farbänderung kommt (Pearce 1986). Mastzellen respektive deren Granula färben sich violett und heben sich somit eindeutig von dem in Blau angefärbten, übrigen Gewebe ab (*Abb. 16*).

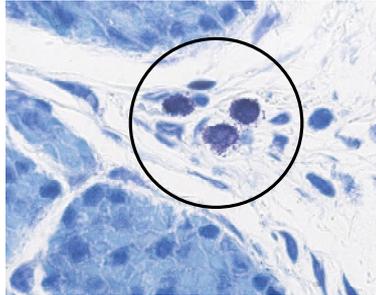


Abb. 16: Visualisierung von Mastzellen mittels Toluidinblau-Färbung in der murinen Dezidua an Tag 10 der Schwangerschaft (1000fache Vergrößerung)

Protokoll:

*Deparaffinisierung/Hydrierung*

wie in Kap. 2.14 beschrieben

*Färbung*

0,1 % Toluidinblau O in *Aqua dest.* (filtriert) 45 Sek. - 1 Min.

*Aqua dest.* kurz spülen

*Dehydrierung/Klären*

wie in Kap. 2.14 beschrieben

*Eindecken*

mit xylollöslichem Eindeckmedium (Roti-Histokitt)

### **2.14.3 Alcianblau/Safranin Färbung**

Die Unterscheidung zwischen mukösen und Bindegewebs-Mastzellen ist durch Färbung mit Alcianblau/Safranin möglich. Ausschlaggebend hierfür ist der Grad der Sulfatierung der sauren Proteoglykane, die in den Mastzellgranula gespeichert sind: Je höher die Menge an sulfatierten Polysacchariden ist, umso stärker ist die Affinität gegenüber Safranin (Spicer 1960). Dadurch werden Mastzellen des Bindegewebes, die auch als ausgereift beschrieben werden, rot angefärbt. Alcianblau färbt hingegen muköse bzw. unreife Mastzellen blau.

Protokoll:

*Deparaffinisierung/Hydrierung*

wie in Kap. 2.14 beschrieben

*Färbung Alcianblau*

3 % Essigsäure	3 Min.
1 % Alcianblau 8 in 3 % Essigsäure (pH = 1,8) (filtriert)	30 Min.
3 % Essigsäure	3 Min.
Leitungswasser	2 Min.

*Färbung Safranin*

0,5 % Safranin O in 0,125 N HCl (filtriert)	5 Min.
<i>Aqua dest.</i>	kurz spülen

*Dehydrierung/Klären*

wie in *Kap. 2.14* beschrieben

*Eindecken*

mit xylollöslichem Eindeckmedium (Roti-Histokitt)

**2.14.4 DBA Lektin-Färbung**

Vergleichbar mit einem Antigen-Antikörper-Komplex interagieren Lektine mit zellulären Glykoproteinen und können daher für deren histochemische Detektion verwendet werden (Roth 2011). Das Prinzip der Immunhistochemie ist in *Kap. 2.18* beschrieben.

Die Färbung mit *Dolichos biflorus* (DBA) Lektin ist spezifisch für den Nachweis von uterinen NK-Zellen (uNK). Es reagiert mit Glykokonjugaten (N-Azetyl- $\alpha$ -D-Galaktosamine), die sowohl an der Zelloberfläche als auch in den Granula lokalisiert sind (*Abb. 17a*). Dabei werden spezifisch uterine NK-Zellen in allen Stadien der Differenzierung sowie an allen Schwangerschaftstagen erfasst. Dies ist von Vorteil, da die Reifung der uNK im Verlauf der Schwangerschaft lokal im Uterus erfolgt (Paffaro *et al.* 2003).

Für die Negativkontrolle wurde das DBA Lektin durch Normalserum ersetzt (*Abb. 17b*).

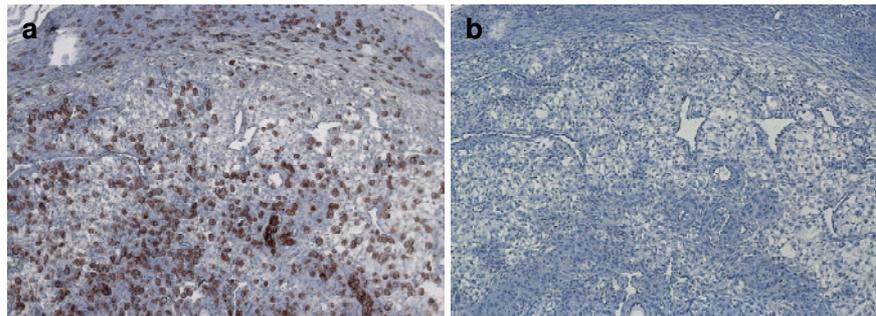


Abb. 17: Visualisierung von uterinen NK-Zellen mittels DBA Lektin-Färbung (a) mit Negativkontrolle (b) im Transversalschnitt einer murinen Implantationseinheit an Tag 10 der Schwangerschaft (100fache Vergrößerung)

#### Protokoll:

#### Deparaffinisierung/Hydrierung

wie in Kap. 2.14 beschrieben

- Durchführung der Inkubationsschritte in Feuchtekammer

#### Färbung DBA Lektin

Blockierung (Peroxidase)	30 Min. in 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol bei RT
Waschen	2x 5 Min. in 5x PBS
Blockierung (Avidin)	15 Min. 1 Tropfen Avidin
Waschen	2x 5 Min. in 5x PBS
Blockierung (Biotin)	15 Min. 1 Tropfen Biotin
Waschen	2x 5 Min. in 5x PBS
Blockierung (Protein)	30 Min. 1 % BSA in 10x PBS
DBA lectin	1:150 in 1 % BSA in 10x PBS ÜN bei 4 °C (Negativkontrolle: 1 % BSA in 10x PBS)

#### nächster Tag

Waschen	2x 5 Min. in 5x PBS
ABC-Lösung (Enzym)	30 Min. bei RT
Waschen	2x 5 Min. in 5x PBS
AEC-Lösung (Substrat)	4 Min. bei RT
Waschen	1x 5 Min. in 5x PBS

#### Gegenfärbung

Hämatoxylin	30 Sek. - 2 Min.
-------------	------------------

Leitungswasser zum „Bläuen“ (unter Sichtkontrolle)

*Eindecken*

mit Aquatex (wässriges Eindeckmittel)

Die Auszählung der uNK erfolgte wie die Auszählung der Mastzellen im Uterus (Kap. 2.15).

### **2.15 Zyklusabhängige Auszählung von Mastzellen im naiven Uterus**

Nachdem das Stadium des Östruszyklus bei geschlechtsreifen CBA/J Weibchen eindeutig bestimmt werden konnte, fand die Entnahme des Uterus statt. Nach Aufbereitung des Gewebes, wie zuvor beschrieben, erfolgte die Färbung der 5 µm Schnitte mit Toluidinblau O zur Visualisierung der Mastzellen. Die violett gefärbten Mastzellen wurden mittels Durchlichtmikroskopie (200fache Vergrößerung) und Netzmikrometer ausgezählt. Letzteres setzte sich aus 10 x 10 Einzelquadraten mit jeweils definierter Größe zusammen; diese beträgt im 20er Objektiv des Mikroskops jeweils 60x60 µm. Es wurden 10 Quadrate pro Uterus ausgezählt, was einer Gesamtfläche von 0,36 mm<sup>2</sup> entspricht. Nachfolgend ist die Berechnung zur Ermittlung der Anzahl an Mastzellen pro mm<sup>2</sup> aufgeführt:

$$\frac{\text{Mastzellzahl}}{0,36 \text{ mm}^2} = \frac{x}{1 \text{ mm}^2}$$

### **2.16 Aufbereitung des Uterus an Tag 5 der Schwangerschaft nach Chicago Blau-Injektion für histologische Untersuchungen**

Die Visualisierung der Implantationen an Tag 5 der Trächtigkeit erfolgte mittels intravenöser Injektion eines makromolekularen Farbstoffes (Chicago Blau), der mit zirkulierenden Proteinen bindet und Konjugate bildet, die in Bereichen mit vermehrter vaskulärer Permeabilität akkumulieren. Dies trifft im Besonderen auf jenes Areal zu, in dem der Prozess der Dezidualisierung induziert wurde. Die Implantationen färben sich blau (Abb. 18a) und stellen somit ein deutliches

Zeichen der sich im Prozess befindlichen Anheftung dar (Psychoyos 1973, Enders *et al.* 1974, Paria *et al.* 2000 und 2001, Nagy *et al.* 2003).

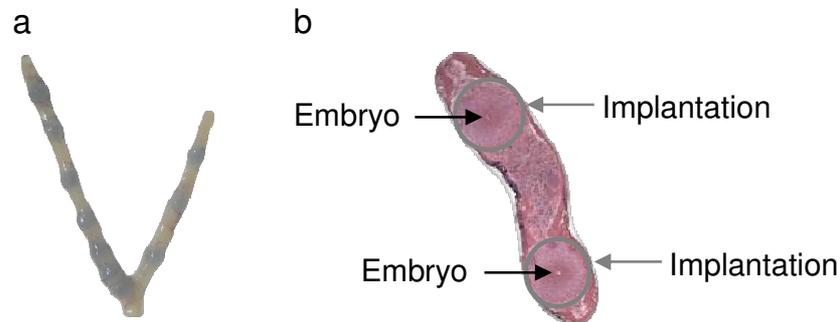


Abb. 18: Uterus einer Maus an Tag 5 der Schwangerschaft nach Injektion von Chicago Blau (a): Die Implantationen sind aufgrund des induzierten Dezidualisierungsprozesses blau gefärbt. (b): Longitudinalschnitt eines murinen Uterus an Tag 5 der Schwangerschaft mit 2 sichtbaren Implantationen nach H/E-Färbung; 10fache Vergrößerung

#### Protokoll:

- Einleitung der Narkose mit Ketamin (125 mg/kg)/Rompun (50 mg/kg) (s.c.)
- Injektion von 100  $\mu$ l Chicago Sky Blue-Lösung (0,5 % Chicago Sky Blue in 0,9 % NaCl) in die Schwanzvene (i.v.)
- Töten des Tieres mittels zervikaler Dislokation ca. 3 Min. nach der Injektion
- Herauspräparieren des Uterus mit anschließender Fixierung in 96 %igem Ethanol (nach Sainte-Marie, 1962)

Nach Anfertigung von longitudinalen Gewebeschnitten des Uterus sowie anschließender Färbung mit H/E (Abb. 18b) wurde die Größe der Implantationen mittels ImageJ bestimmt und in  $\text{pixel}^2$  angegeben. Um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die Ermittlung der Implantationsgröße zu schaffen, wurden nur jene Schnitte berücksichtigt, auf denen der Embryo zu erkennen war (Abb. 18b, schwarze Pfeile). 1 bis 7 Implantationen pro Tier wurden vermessen, daraus der Mittelwert bestimmt und der jeweilige Mittelwert pro Tier für die Datenauswertung verwendet.

## **2.17 Aufbereitung von Implantationseinheiten an Tag 10 der Schwangerschaft für histologische Untersuchungen**

Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, die Implantationen entnommen (*Abb. 19A*) und für 6 Stunden in 4 % PFA mit 0,1 M Saccharose (pH = 7,4) fixiert. Nach der Fixierung erfolgte eine transversale Teilung der Implantationseinheit entlang der Linie b-b' (*Abb. 19B*). Diese Achse liegt rechtwinkelig zur Längsachse des Uterus (Linie a-a'). Anschließend wurde das Gewebe wie folgt behandelt:

*Protokoll:*

### *Dehydrierung*

2x Ethanol	70 %	15 Min.
1x Ethanol	80 %	15 Min.
1x Ethanol	95 %	15 Min.
4x Ethanol	100 %	15 Min.
2x Xylol		25 Min.

### *Inklusion in Paraffin*

bei 56 °C über Nacht

Am folgenden Tag wurde die Verarbeitung des Gewebes fortgesetzt. Nach Platzierung des Teilstückes mit der Schnittfläche auf dem Boden einer Einbettform (*Abb. 19C*) erhält man das in *Abb. 19D* dargestellte Schnittbild (H/E Färbung, 10fache Vergrößerung). Die Färbung des Schnittes mit Hämatoxylin und Eosin ermöglicht die mikroskopische Beurteilung der Gesamtmorphologie sowie spezieller Charakteristika der gesamten Implantation im Transversalquerschnitt. Das Hauptaugenmerk richtete sich hierbei auf die Größe der Teilbereiche Decidua basalis, Plazenta und Embryohöhle (*Abb. 19D*) sowie auf die in der Decidua basalis lokalisierten Spiralarterien (*Abb. 19E*). Die Größenbestimmungen der einzelnen Bereiche wurden mit Hilfe des Programms ImageJ durchgeführt und in pixel<sup>2</sup> angegeben.

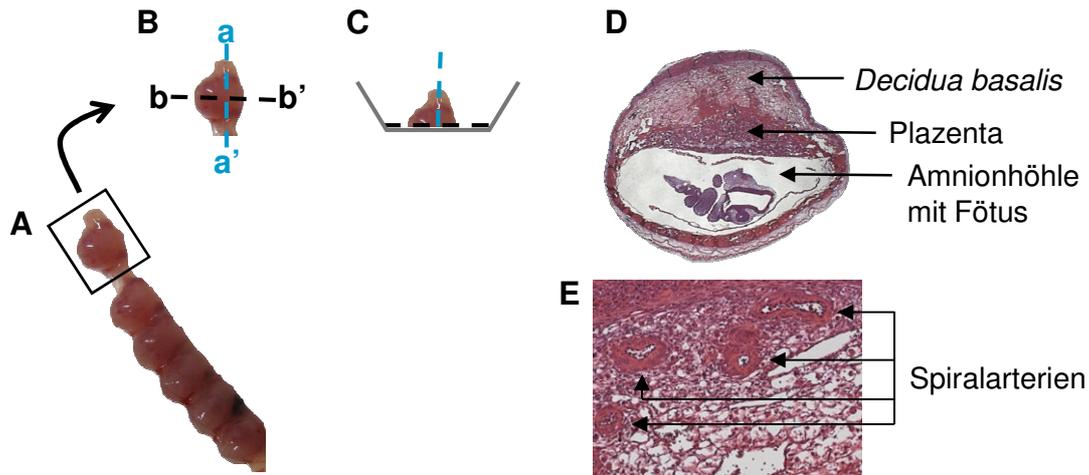


Abb. 19: Illustration der Präparation (A-B), Einbettung (C) sowie der Transversalansicht (D) einer Implantationseinheit an Tag 10 der Schwangerschaft mit beispielhafter Darstellung der Spiralarterien in der Decidua basalis nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (E) (modifiziert nach Croy 2010)

Die Vermessung der Spiralarterien (Abb. 20) erfolgte mittels AxioVision4 und bezog nachfolgend aufgeführte Parameter ein: Verhältnis von Umfang des Gefäßes zum Umfang des Lumens (Wand/Lumen Verhältnis), Wanddicke und Durchmesser des Lumens. Für die Erfassung des Wand/Lumen Verhältnisses sowie der Wanddicke war die Berechnung des Wand- und Lumendurchmessers nach folgender Formel notwendig:

$$\frac{\text{Umfang der Gefäßwand}}{\pi} = \text{Wanddurchmesser } [\mu\text{m}]$$

$$\frac{\text{Umfang des Lumens}}{\pi} = \text{Lumendurchmesser } [\mu\text{m}]$$

Das Wand/Lumen Verhältnis errechnete sich aus folgender Formel:

$$\frac{\text{Wanddurchmesser } [\mu\text{m}]}{\text{Lumendurchmesser } [\mu\text{m}]} = \text{Wand / Lumen Verhältnis}$$

Die Wanddicke errechnete sich aus folgender Formel:

$$\frac{(\text{Wanddurchmesser } [\mu\text{m}] - \text{Lumendurchmesser } [\mu\text{m}])}{2} = \text{Wanddicke } [\mu\text{m}]$$

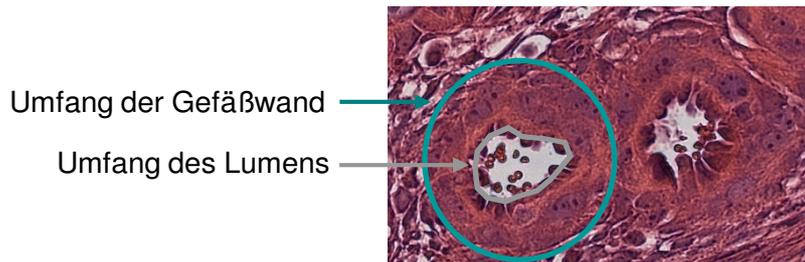


Abb. 20: Illustration der Vermessung einer Spiralarterie nach Transversalschnitt einer Implantationseinheit und anschließender H/E-Färbung an Tag 10 der Schwangerschaft; 400fache Vergrößerung

## 2.18 Immunhistochemie (IHC)

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Affinität von Antikörpern gegenüber einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch die Kopplung des Antikörpers an ein Detektionssystem kann dessen spezifische Bindung visuell erfasst werden. Bei der indirekten Methode bindet der primäre Antikörper an das entsprechende Antigen. Der Primärantikörper kann wiederum von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden werden. Das Biotin besitzt eine starke Affinität gegenüber Avidin. Der Avidin-Biotin-Komplex bindet die Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase, HRP, horseradish peroxidase), deren katalytische Aktivität durch ein spezifisches Substrat (AEC, Aminoethylcarbazol) sichtbar gemacht werden kann. Dieses oxidiert durch das Enzym sowie Wasserstoffperoxid und bildet ein stabiles braun-rotes Präzipitat, welches nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin einen guten Kontrast bildet. Da im Gewebe eine natürliche Enzymaktivität (endogene Peroxidase) vorhanden ist, sollte diese blockiert werden. Dies wird durch Substratzugabe im Überschuss erreicht. Um eine erhöhte Permeabilität des fixierten Gewebes und damit die Zugänglichkeit für die Bindung von Antikörpern zu erleichtern, kann feuchte Hitze hilfreich sein (Lang 2006).

Für die Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper durch Normalserum ersetzt.

*Protokoll:**Deparaffinisierung/Hydrierung*

wie in Kap. 2.14 beschrieben

- Durchführung der Inkubationsschritte in Feuchtekammer

Kochen in der Mikrowelle	10 Min. bei 600 W in Citratpuffer (nur für Mcpt-8, nicht für Gal-1)
	Abkühlen der Objekträger
Waschen	1x 5 Min. in 1x TBS
Blockierung (Peroxidase)	20 Min. in 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol bei RT
Waschen	2x 5 Min. in 1x TBS
Blockierung (Protein)	20 Min. 10 % BSA in 1x TBS
Erstantikörper	anti-Mcpt-8 (Ratte anti-Maus, 1:500 Verdünnung in 10 % BSA in 1x TBS) ÜN bei 4 °C anti-Gal-1 (Kaninchen anti-Maus, 1:500 Verdünnung in 4 % FBS in 1x PBS) ÜN bei 4 °C

*nächster Tag*

Waschen	2x 5 Min. in 1x TBS
Zweitantikörper	Ziege anti-Ratte (1:500 Verdünnung in 10 % BSA in 1x TBS) für 1 Std. bei RT Ziege anti-Kaninchen (1:500 Verdünnung in 4 % FBS in 1x PBS) für 1 Std. bei RT
Waschen	2x 5 Min. in 1x TBS
ABC-Lösung (Enzym)	30 Min. bei RT
Waschen	2x 5 Min. in 1x TBS
AEC-Lösung (Substrat)	7 Min. bei RT
Waschen	1x 5 Min. in 1x TBS

*Gegenfärbung*

Hämatoxylin	30 Sek. - 2 Min.
Leitungswasser zum „Bläuen“ (unter Sichtkontrolle)	

*Eindecken*

mit Aquatex (wässriges Eindeckmittel)

## **2.19 Gewinnung von Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC, bone marrow derived mast cells)**

Mastzellen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich aus Zellen des Knochenmarks von Femur und Tibia des jeweils rechten und linken Beines jungfräulicher, 6 Wochen alter Mäuse generiert (BMMC, bone marrow derived mast cells). Hierdurch konnte eine herangegangene Exposition gegenüber einem spezifischen Gewebemilieu vermieden werden. Die Kultur der gewonnenen Knochenmarkzellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Zusatz von 30 ng/ml Interleukin-3 (IL-3). IL-3 ist *in vitro* ein essentieller Wachstumsfaktor für Mastzellen, wohingegen dieses Zytokin *in vivo* keinen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Mastzellen zu haben scheint, da IL-3 defiziente Mäuse keine Mastzelldefizienz aufweisen (Lantz *et al.* 1998). Zu Beginn der Kultur ist die Anwesenheit von Fibroblasten förderlich, da diese den für Mastzellen wichtigsten Wachstumsfaktor SCF produzieren, der neben IL-3 einen weiteren positiven Einfluss auf das Wachstum und die Reifung der Knochenmarkzellen ausübt. Mit zunehmender Dauer der Kultur sollte allerdings eine Entfernung der Fibroblasten erfolgen, da sonst keine Reinkultur vorliegen würde.

### *Protokoll:*

- Töten der Maus durch zervikale Dislokation
- Herauspräparieren jeweils des Femurs und der Tibia mit Entfernung der anhaftenden Muskulatur
- Eröffnen der Knochen, Ansetzen der Nadel einer mit Wasch-Medium befüllten 1ml Spritze an den geöffneten Knochen und Herausspülen des Marks
- Überführen des Knochenmarks in ein 15 ml Reaktionsgefäß
- Brechen der Zellen mit einer Kunststoff-Pasteurpipette
- Zentrifugieren der Zellen für 10 Min. mit 1200 rpm bei Raumtemperatur
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit Kultur-Medium und anschließende Überführung in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>)

Für eine Maus wurden 10 ml Kultur-Medium + 30 ng IL-3/ml Medium benötigt.

- Fortführen der Kultur mit entsprechender Anpassung der Flaschengröße an die Zellmenge

Eine Färbung mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD117 und FcεR1α im Verlauf der Kultur gab Auskunft über den Reifegrad der Mastzellen (Abb. 21). Beide Marker sind in Kombination charakteristisch für Mastzellen. Nach 5 Wochen Kultur erhielt man in der Regel mehr als 97 % doppelt positive Zellen (Abb. 21), welche nun für die Versuche einsetzbar waren.

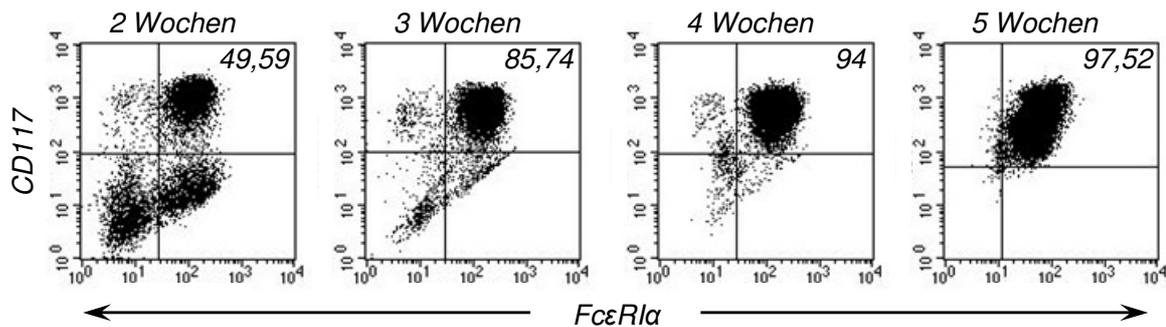


Abb. 21: Verlauf der Reifung von Knochenmarkszellen zu Mastzellen nach 2 bis 5wöchiger Kultur; Die Population und Prozentzahl an doppelt positiven Zellen (CD117 und FcεR1α) wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und ist im rechten oberen Quadranten abgebildet.

## 2.20 Systemische Rekonstitution mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit Knochenmark-generierten Mastzellen

C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>-Mäuse, die im Alter von 10 Wochen mastzelldefizient sind, können sowohl systemisch als auch lokal erfolgreich mit Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC, bone marrow derived mast cells) rekonstituiert werden. Die systemische Rekonstitution erfolgte mittels intravenöser Injektion von  $5 \times 10^6$  kultivierten Mastzellen in 200 µl sterilem PBS in die laterale Schwanzvene an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Gesamtzellzahl:  $1 \times 10^7$  kultivierte Mastzellen). 12 Wochen nach dem Transfer wurden die Weibchen allogenen mit BALB/c-Männchen verpaart. Die große Zeitspanne bis zur Verpaarung beruht auf der in der Literatur angegebenen Dauer der erfolgreichen Rekonstitution einzelner Organe (Wolters *et al.* 2005).

## **2.21 Lokale Rekonstitution mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit Knochenmark-generierten Mastzellen**

Die lokale Rekonstitution von weiblichen C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>-Mäusen mit Knochenmark-generierten Mastzellen erfolgte durch lokale Injektion von  $1 \times 10^6$  kultivierten Mastzellen in 100  $\mu$ l sterilem PBS in eines der beiden Uterushörner, während das jeweils andere Horn als Kontrolle mit 100  $\mu$ l sterilem PBS behandelt wurde.

### *Lösungen:*

Anästhetikum: Ketamin (125 mg)/Rompun (50 mg)/kg

Analgetikum: Resflor<sup>®</sup> (Wirkstoffe: Flufenicol, Flunixin) 2,5 mg/kg

Desinfektion: Betaisodona Lösung, Kodan Tinktur forte farblos

- Augensalbe zum Schutz vor Austrocknung der Augen (Bepanthen Augen- und Nasensalbe)

### *Prozedur:*

- Anästhesieren der Maus
- Auftragen der Augensalbe zum Schutz der Augen
- Rasieren des Bauches, Desinfizieren des Operationsfeldes
- Eröffnen der oberen Haut
- Eröffnen des Peritoneums entlang der *Linea alba*
- Fixieren der Uterushörner
- Injizieren von 100  $\mu$ l PBS bzw. BMDCs in PBS in jeweils ein Uterushorn
- Verschließen der Wunde mittels Wundklammern
- Desinfizieren der Wunde
- subcutane Injektion des Analgetikums unmittelbar nach der Operation sowie einen Tag danach mit Überprüfung der Wunde
- Entfernen der Wundklammern eine Woche nach der Operation in Abhängigkeit vom Fortschreiten der Wundheilung

## 2.22 Proteinisolierung

Proteine sind auf der DNA kodiert und können als exekutive Endprodukte von transkriptionalen und translationalen Prozessen angesehen werden. Somit kann durch Nachweis eines speziellen Proteins direkt auch auf die Aktivität des für dieses Protein kodierenden Gens geschlossen werden. Um Proteine nachweisen zu können, müssen diese zuvor aus dem entsprechenden Gewebe bzw. Zellen isoliert werden.

### Protokoll:

- Gabe von Lyse-Puffer auf Gewebe bzw. Zellen
- Homogenisieren unter Verwendung eines Ultraschall-Homogenisators
- Lyse der Zellen auf Eis für 60 Min.
- Zentrifugieren der Zellen mit 12000 rpm für 30 Min. bei 4 °C
- Abnahme des Überstandes mit den darin enthaltenen Proteinen, Überführen in ein neues Gefäß und Lagerung bei -80 °C ÜN

## 2.23 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat. Diese basiert auf der Methode nach Bradford (1976) und bedient sich der Farbänderung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Die quantitative Bestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und erfolgte anhand einer Eichgerade, die mittels Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine) erstellt wurde.

Herstellen der BSA-Lösung für Standardreihe: 10 mg BSA in 10 ml *Aqua dest.*

Konzentration	Zugabe BSA Lösung	Zugabe <i>Aqua dest.</i>
1 mg/ml	1000 $\mu$ l	0 $\mu$ l
0,5 mg/ml	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
0,25 mg/ml	250 $\mu$ l	750 $\mu$ l
0,1 mg/ml	100 $\mu$ l	900 $\mu$ l
0,05 mg/ml	50 $\mu$ l	950 $\mu$ l
0,025 mg/ml	25 $\mu$ l	975 $\mu$ l
0,01 mg/ml	10 $\mu$ l	990 $\mu$ l

- Verdünnen der Proben entsprechend der Größe bzw. Menge des ursprünglichen Gewebes sowie den Erfahrungswerten mit *Aqua dest.*
- Überführen von jeweils 10  $\mu$ l jedes Standards bzw. jeder Probe (als Doppelbestimmung) zu 400  $\mu$ l Bio-Rad-Lösung in eine Vertiefung (Well) einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen (96-Well Platte)
- Messung der optischen Dichte bei 595 nm
- Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Standardreihe

## **2.24 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese und Western Blot**

Das grundlegende Prinzip aller elektrophoretischen Trenntechniken für Proteine ist deren Wanderung im elektrischen Feld aufgrund ihrer Ladung, Größe und Gestalt. Polyacrylamid als Trägermittel bildet ein dreidimensionales Netzwerk aus, welches konzentrationsabhängig variable Porengrößen aufweisen kann. Durch den Zusatz von SDS wird die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt: Es wird eine negative Gesamtladung eingeführt. Dadurch hängt die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels ab. Im Sammelgel findet zunächst eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der Proteine statt. Im Puffersystem des Trenngels löst sich der zuvor gebildete „Proteinstapel“ auf, die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der positiven Elektrode (Anode) und werden aufgrund ihrer Größe getrennt. Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer und gleichfalls ein identischer Abdruck oder Abklatsch (Blot) der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran, welche dann mittels Immundetektion bzw.

spezifischer Antikörper visualisiert werden können (Western Blot) (Schrimpf 2002; Löffler & Petrides 2007). Eine verbreitete Methode basiert auf einer Enzymgekoppelten Immundetektion Antigen-spezifischer Antikörper durch anti-IgG Zweitantikörper konjugiert mit Merrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase). Die Visualisierung des Antikörper-Antigen-Komplexes erfolgt durch die Enhanced Chemiluminiscent Methode (ECL). Diese Methode beruht auf der Emission von Licht durch die Oxidation von Luminol durch das Enzym HRP (Abb. 22) (Madamanchi *et al.* 2001).

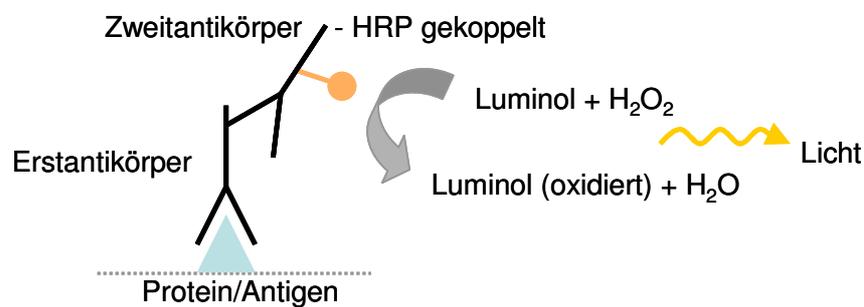


Abb. 22: Schematische Darstellung der Detektion eines Proteins bzw. Antigens durch Bindung eines spezifischen Erstantikörpers, der wiederum durch einen HRP-gekoppelten Zweitantikörper gebunden wird; HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, als Reaktion entsteht Licht (modifiziert nach Crisp 1994)

#### Protokoll:

- Zusammensetzen der Gelapparatur gemäß Herstellerangaben
- Vorbereiten und Gießen eines 15 %igen Trenngels

H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Tris-HCL 1,5 mM pH = 8,8 (4 °C)	3,7 ml
Acrylamid (4 °C)	7,6 ml
SDS 10 % (RT)	150 µl
APS 10 % (-20 °C)	150 µl
TEMED (4 °C)	12 µl

- Vorbereiten und Gießen eines 5 %igen Sammelgels auf das Trenngel

H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Tris-HCL 1,0 mM pH = 6,8 (4 °C)	630 µl
Acrylamid (4 °C)	830 µl
SDS 10 % (RT)	50 µl
APS 10 % (-20 °C)	50 µl
TEMED (4 °C)	10 µl

- Platzieren des Kammes im Sammelgel
- Resuspendieren von 50 µg Protein-Lysat mit Probenpuffer und *Aqua dest.* auf ein Endvolumen von 30 µl
- Hitzedenaturierung der Polypeptide in Probenpuffer für 5 Min. bei 95 °C
- Inkubation der Proben auf Eis für 5 Min.
- Zusammensetzen der Elektrophorese-Apparatur gemäß Herstellerangaben
- Befüllen mit Elektrophorese-Puffer
- Entfernen des Kammes und Beladen der Taschen mit den vorbereiteten Proben sowie dem Marker
- Anschließen an die Stromversorgung (80 V, maximal 150 mA)
- Vorbereiten der Blockierungslösung sowie der Antikörper:
  - 5 % Milchpulver (entrahmt) in 1x TBS, versetzt mit 0,05 % Tween
- Inkubation der Nitrozellulosemembran für 30 Sek. in Methanol, 2 Min. in *Aqua dest.* und anschließend in Transfer-Puffer bis zur Verwendung
- Belegen der Blot-Kassette nach folgender Vorlage:

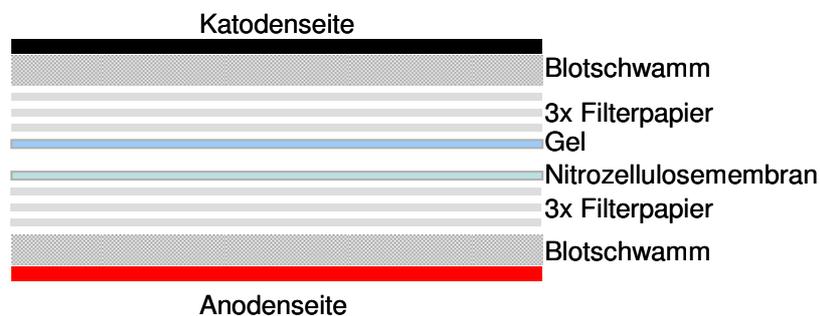


Abb. 23: Aufbau einer Blot-Kassette zum anschließenden Überführen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

- Waschen der Membran mit 1x TBS
- Inkubation in Blockierungslösung für 1 Std. bei RT
- 3x Spülen in Waschlösung für jeweils 5 Min.
- Inkubation mit Erstantikörper (in Abhängigkeit vom Antikörper entweder 2 Std. bei RT oder ÜN bei 4 °C)

Das Molekül  $\beta$ -Aktin dient als Positivkontrolle und gleichsam als Referenz ("house keeping gene") für eine mögliche Berechnung der relativen Expression des Zielproteins.

Verwendung folgender Erstantikörper:

<i>Erstantikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>
TGF- $\beta$ I	Kaninchen, polyklonal	1:200
CTGF	Ziege, polyklonal	1:100
TGF- $\beta$ RII	Kaninchen, polyklonal	1:200
Gal-1	Kaninchen, monoklonal	1:3000
$\beta$ -Aktin	Maus, monoklonal	1:10 000

Die Antikörper gegen TGF- $\beta$ I, CtGF, TGF- $\beta$ RII und  $\beta$ -Aktin waren kommerziell erhältlich. Der Antikörper gegen Gal-1 wurde im Labor von Dr. Gabriel A. Rabinovich generiert (Laboratorio de Immunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Buenos Aires, Argentina) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

- 3x Spülen in Waschlösung für jeweils 5 Min.
- Inkubation mit Zweitantikörper für 1 Std. bei RT

Verwendung folgender Zweitantikörper:

<i>Zweitantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
Ziege anti-Kaninchen	1:1000
Kaninchen anti-Ziege	1:1000
Ziege anti-Maus	1:10 000

- Entwicklung der Membran nach vorheriger Inkubation mit Detektionslösung im Chemilumineszenzgerät

Aufgrund der höheren Sensitivität wurde für alle Moleküle exklusive  $\beta$ -Aktin eine kommerziell erhältliche Detektionslösung verwendet. Nach Detektion des Zielproteins ist es möglich, die auf der Membran haftenden Antikörper unter Verwendung einer speziellen Lösung zu entfernen (Stripping). Somit kann dieselbe Membran anschließend ebenso mit dem Antikörper gegen das Referenzprotein inkubiert werden.

- 1x Spülen in Waschlösung für 5 Min.
- Inkubation der Membran in Stripping-Puffer für max. 10 Min.
- 3x Spülen in Waschlösung für jeweils 5 Min.
- Inkubation mit Erstantikörper gegen  $\beta$ -Aktin für 2 Std. bei RT und anschließender Inkubation mit entsprechendem Zweitantikörper für 1 Std. bei RT

### **2.25 RNA-Isolierung mittels single-step Methode (Chomczynski & Sacchi 1987)**

Starke Denaturierungsmittel wie phenolhaltiges Guanidinthiocyanat (Trizol) lysieren die Zellen, während gleichsam RNasen und andere Enzyme deaktiviert werden. Nach der Isolation erhält man die Gesamt-RNA, von der später bei der cDNA-Synthese lediglich die mRNA in cDNA umgeschrieben wird (Schrimpf 2002).

#### *Protokoll:*

- Überführen von 50 bis 100 mg gefrorenem Gewebe in ein 2 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von 600  $\mu$ l Trizol mit anschließender Homogenisierung mittels Ultra Turrax T25
- Zugabe von 400  $\mu$ l Trizol
- Inkubation bei RT für 5 Min.
- Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform mit anschließendem Invertieren des Reaktionsgefäßes und Inkubation bei RT für 2 - 3 Min.
- Zentrifugieren der Zellen bei 4 °C mit 12209 rpm für 15 Min.

- Abnehmen der oberen wässrigen Phase und Überführen in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe der entsprechenden Menge an kaltem Isopropanol im Verhältnis 1:1
- Präzipitation der RNA bei -80 °C ÜN
- Zentrifugieren der Zellen bei 4 °C mit 12209 rpm für 15 Min.
- Verwerfen des Überstandes
- zweimaliges Waschen des Zell-Pellets in jeweils 500 µl 80 %igem, kaltem EtOH durch Vortexen und anschließendes Zentrifugieren bei 4 °C mit 9600 rpm für 5 Min.
- Verwerfen des Überstandes, Lufttrocknen des Zell-Pellets und resuspendieren mit RNase-freiem Wasser
- Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA mittels Spektrometer

## 2.26 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription aus RNA

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig (Doma *et al.* 2007) und kann darüber hinaus nicht direkt als Template in der PCR (polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion) eingesetzt werden. Aufgrund dessen muss die RNA zunächst in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden (reverse Transkription). Für diese Reaktion stehen verschiedene RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die Reversen Transkriptasen, zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit fand die Two-Step-RT-PCR Anwendung. Hierbei erfolgt zunächst die cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Template. Eine Probe dieser RT-Reaktion wird dann in einer PCR eingesetzt, in der die gebildete cDNA wiederum als Template dient. Mithilfe eines Oligo(dT)-Primers, der im Bereich der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert, werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle (2 - 4 % der Gesamt-RNA) selektiv in cDNA umgeschrieben (Schrimpf 2002).

*Protokoll:*

- Überführen von 2 µl isolierter RNA in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß mit Zugabe von 16 µl RNase-freiem Wasser (Endvolumen: 18 µl)

- Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  odTs (Startprimer)
- Inkubation bei 75 °C für 10 Min. in einem Thermocycler (Anlagerung des Startprimers)
- Lagerung der Proben auf Eis für 2 Min.
- Zugabe von 18,5  $\mu\text{l}$  (pro Ansatz) der folgenden Lösung:

Reverse Transkriptase Puffer	8 $\mu\text{l}$
RNase-freies Wasser	4 $\mu\text{l}$
dNTP	4 $\mu\text{l}$
DNase	2 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor	0,5 $\mu\text{l}$

- Inkubation bei 37 °C für 30 Min. (Abbau von möglicherweise enthaltener DNA durch DNase)
- Inkubation bei 75 °C für 5 Min. (Denaturierung der DNase)
- Inkubation bei 4 °C für 2 Min. (Abkühlung für die Verwendung der Reversen Transkriptase)
- Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  (pro Ansatz) der folgenden Lösung:

Reverse Transkriptase	1 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor	1 $\mu\text{l}$

- Inkubation bei 42 °C für 60 Min. (reverse Transkription)
- Inkubation bei 94 °C für 5 Min. (Denaturierung und Inaktivierung aller enthaltenen Enzyme)

## **2.27 Echtzeit RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaktion)**

Die Echtzeit RT-PCR stellt eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren dar, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht. Zusätzlich bietet sie die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus. Die während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur Menge an Ausgangs-DNA.

Die herkömmliche PCR ahmt das natürliche Prinzip der DNA-Replikation nach und erfolgt in drei, sich wiederholenden Reaktionszyklen: 1. Denaturierung, 2. Primeranlagerung (Annealing), 3. Verlängerung (Elongation). Ein Zyklus beginnt mit der Denaturierung eines DNA-Doppelstranges, der bei 90 - 95 °C aufgeschmolzen wird. Es entstehen einzelsträngige DNA-Moleküle, an die sich bei etwa 55 - 60 °C zwei synthetisch, gegenläufig orientierte Oligonukleotide (Primer) an die jeweils komplementäre Sequenz anlagern (Anlagerungstemperatur). Die Primer dienen der DNA-Polymerase als Startmoleküle zur Verlängerung der Zielsequenz. Die Verlängerung der Zielsequenz findet bei 72 °C statt und wird meist mit einer rekombinanten, hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) durchgeführt. Dieser Zyklus wird ca. 30 bis 40x wiederholt und führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Die zusätzliche Verwendung von Fluoreszenzsonden bzw. Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine Quantifizierung der gewonnenen DNA.

Als sequenzspezifische Fluoreszenzsonde hat sich die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde bewährt, die während des Annealing-Schrittes an die denaturierte Zielsequenz bindet. Sie besteht aus einem Primer, der endständig jeweils einen Reporter- und einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff trägt. Der Quencher unterdrückt die Emission des Reporters. Wird der Reporter durch die Taq-Polymerase freigesetzt, steigt die Emission des Reporterfarbstoffes an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto höher ist die Emission. Die TaqMan<sup>®</sup>-Methode wurde für die Moleküle TGF- $\beta$  sowie für  $\beta$ -Aktin als Referenzgen mit den entsprechenden Sequenzen eingesetzt.

Mit einem anderen Prinzip arbeitet der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green<sup>®</sup>, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Mit jedem Schritt der Vervielfältigung steigt somit die Emission des DNA-Farbstoff-Komplexes. Die SYBR Green<sup>®</sup>-Methode wurde für alle übrigen Moleküle sowie für  $\beta$ -Aktin als Referenzgen mit den entsprechenden Sequenzen eingesetzt.

Zu Beginn einer PCR ist die DNA-Menge begrenzt (Startphase). Zum Ende hin führt die stark angestiegene DNA-Menge der Zielsequenz zur vermehrten Hybridisierung von Produktfragmenten und somit zur Hemmung der PCR (Plateauphase). In der exponentiellen Phase (zwischen Startphase und Plateauphase) verdoppelt sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen, und ihr Beginn wird zur Quantifizierung verwendet. Dabei wird der Zyklus, an dem die

Hintergrundfluoreszenz ansteigt, als CT-Wert (Threshold Cycle, Schwellenwert) angegeben. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens mit der eines Referenzgens ("housekeeping gene") normalisiert, indem die Signale des Referenzgens verwendet werden, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA-Probe auszugleichen (Holzapfel *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen  $\beta$ -Aktin eingesetzt.

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta CT}$$

$$\Delta CT = CT \text{ Ziel gen} - CT \text{ Referenzgen}$$

*Protokoll:*

Die Arbeitslösung für TaqMan<sup>®</sup> bzw. SYBR Green<sup>®</sup> wurde wie folgt hergestellt:

	SYBR Green <sup>®</sup>	TaqMan <sup>®</sup>
Mastermix	6,5 $\mu$ l	6,25 $\mu$ l
RNase freies Wasser	2 $\mu$ l	2,25 $\mu$ l
Primer Mix	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
Fluoreszin	0,5 $\mu$ l	-
Sonde	-	0,5 $\mu$ l

- Verwendung von 1  $\mu$ l cDNA für jeweils das Zielgen und das Referenzgen (Doppelbestimmung) sowie 12  $\mu$ l der entsprechenden Arbeitslösung

Anstelle von cDNA wurde als Negativkontrolle (NTC, No Template Control) RNase freies Wasser verwendet (Doppelbestimmung).

## 2.28 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften. Eine Zellsuspension wird durch einen Hüllstrom verdünnt und anschließend fokussiert in einer Sequenz von Einzelzellen im rechten Winkel an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Im Moment des Durchtritts

durch den Fokus des Lasers werden als physikalische Messgrößen die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laser-Licht als Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) und die Lichtstreuung im Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) detektiert. Das FSC ist ein Maß der Größe von Zellen, während das SSC eine Aussage über deren Granularität und Binnenstruktur zulässt. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die gleichsam vom Durchflusszytometer detektiert werden können, erlaubt die Selektion verschiedener Zellen bzw. Zellpopulationen in einer Probe mit möglicherweise ähnlichem Phänotyp. Üblicherweise handelt es sich um spezifische, fluoreszenzmarkierte Antikörper, die gegen Oberflächenproteine der entsprechenden Zellen gerichtet sind (CD, cluster of differentiation), sowie intrazellulär wirksame Farbstoffe. Passieren die Zellen den Laserstrahl mit entsprechender Wellenlänge, werden die Elektronen des Farbstoffes angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Die Anregung verschiedener Fluorochrome kann bei identischer Wellenlänge erfolgen, jedoch verfügt jeder Farbstoff über ein spezifisches Emissionsspektrum und kann daher detektiert werden. Der Rücksprung der Elektronen auf das ursprüngliche Niveau erfolgt unter Abgabe von Energie, wodurch das emittierte Licht über eine größere Wellenlänge verfügt als das vom Laser abgegebene (Sack *et al.* 2007, Shapiro 2004).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zytometer FACSCalibur der Firma BD Biosciences stellte das erste System für eine Multifarben-Analyse dar. Es arbeitet mit zwei verschiedenen Lasern, die räumlich voneinander getrennt sind: einem luftgekühlten Argon-Laser (488 nm) und einem roten Dioden-Laser (635 nm). Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Pro und FlowJo. Dabei repräsentierte jede vom Gerät erfasste Zelle ein Punktereignis. Zellen einer bestimmten Population bildeten entsprechend eine Art „Punktewolke“, auf die sich bei der Auswertung bezogen wurde (*Abb. 24a*). Jeweils eine ungefärbte Probe (Negativkontrolle) diente als Referenz (*Abb. 24b*). In Abhängigkeit vom zellspezifischen Repertoire der Oberflächen- bzw. intrazellulären Proteine kann man innerhalb eines Diagramms zwischen einfach und doppelt gefärbten Zellen unterscheiden, die wiederum in Quadranten dargestellt wurden (*Abb. 24c*).

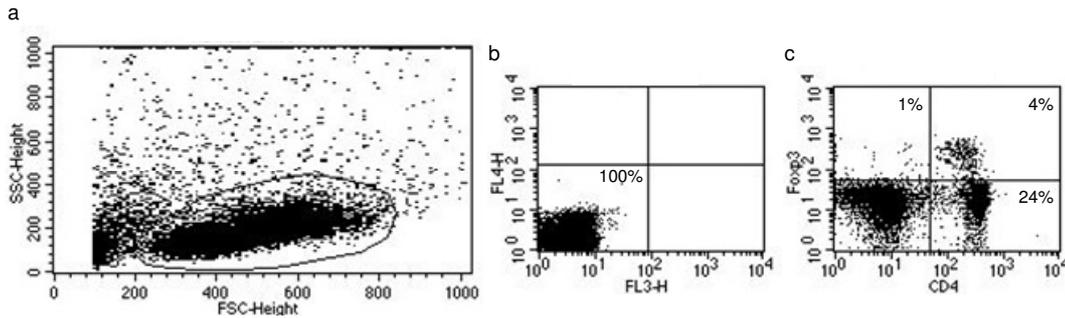


Abb. 24: Beispielhafte Darstellung durchflusszytometrischer Diagramme nach Zellisolierung aus einem Lymphknoten und Auswertung mittels CellQuest Pro. (a) eingegrenzte Leukozytenpopulation nach Zellzählung; (b) ungefärbte Negativkontrolle; (c) einfach gefärbte CD4-Zellen im unteren rechten Quadranten (24 %), einfach gefärbte Fopx-3-Zellen im oberen linken Quadranten (1 %), doppelt gefärbte CD4/Fopx-3 Zellen im oberen rechten Quadranten (4 %)

In der nachstehenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper, deren Fluoreszenzfarbstoff sowie der damit detektierte Zelltyp aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Antikörper mit den entsprechenden, an sie gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen für die durchflusszytometrische Detektion verschiedener Zelltypen

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Zelltyp
anti CD117 (c-kit)	Phycoerythrin (PE)	Mastzellen
anti FcεRIα	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	
anti CD4	Peridinin-chlorophyll protein-cyanin (PerCP-Cy5.5)	regulatorische T-Zellen
anti Fopx3	Alexa Fluor (AF) 647	
anti CD49b	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Natürliche Killerzellen
anti CD11c	Allophycocyanin (APC)	aktivierte Dendritische Zellen
anti MHCII (IA/IE)	Phycoerythrin (PE)	
anti CD8a	Phycoerythrin-cyanin (PE-Cy5)	zytotoxische T-Zellen

Protokoll der Gewinnung mononukleärer Zellen mit anschließender extrazellulärer Färbung für Oberflächenmarker:

1. Lymphknoten (inguinal, mesenterisch, para-aortal), Milz, Thymus

- Zerdrücken des Gewebes mittels Kolben einer 1 ml Spritze durch ein 100 µm Netz mit 5 ml RPMI-1640
- Überführen der Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß

- Auffüllen auf 50 ml mit 1x Lyse-Puffer
- Inkubation für 10 Min. bei RT
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Auffüllen auf 10 ml mit RPMI-1640
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit 1 ml RPMI-1640 und Verteilen des Gesamtvolumens auf die entsprechenden Rundbodenröhrchen
- Zugabe von je 1 ml FACS-Puffer
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit je 100 µl Antikörperlösung (1:100 Verdünnung des Antikörpers mit FACS-Puffer) bzw. 100 µl FACS-Puffer (Negativkontrolle)
- Inkubation für 30 Min. bei 4 °C
- Zugabe von 1 ml FACS-Puffer
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit je 100 µl Fixierungslösung (eBioscience)
- Lagerung der Proben bei 4 °C ÜN

## 2. aus Dezidua

Für die Aufbereitung des dezidualen Gewebes wurde Dithio-DL-threitol (DTT) verwendet. DTT verhindert einerseits die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken und führt andererseits zur Entfaltung von Proteinen. Somit kann es als eine Art Konservierungsmittel von Proteinen in ihrer funktionalen Form angesehen werden (Cleland 1964).

- Zerkleinern des Gewebes in 5 ml HBSS (1x)
- Zugabe von 45 ml RPMI-1640 mit 1 mM DTT
- Inkubation im 37 °C warmen Wasserbad unter Schwenken für 20 Min.
- Transfer des Überstandes (ohne Gewebereste) durch ein 100 µm Netz in ein zweites 50 ml Reaktionsgefäß
- Zentrifugieren des Überstandes für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes

- Befüllen des Reaktionsgefäßes (mit Geweberesten) mit HBSS (auf 50 ml), Überführen ins Wasserbad für weitere 20 Min.
- Transfer des Überstandes (ohne Gewebereste) durch ein 100 µm Netz in das zweite 50 ml Reaktionsgefäß
- Zentrifugieren des Überstandes für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes
- Befüllen des Reaktionsgefäßes (mit Geweberesten) mit HBSS (auf 50 ml), Überführen ins Wasserbad für weitere 20 Min.
- Transfer des Überstandes mit gleichzeitigem Zerdrücken der Gewebereste durch ein 100 µm Netz in das zweite 50 ml Reaktionsgefäß
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes
- Resuspendieren der Zellen mit 5 ml RPMI-1640
- Überschichten der Zellsuspension auf 3 ml LympholyteM in einem 15 ml Reaktionsgefäß
- Dichtegradientenzentrifugation für 20 Min. mit 2400 rpm bei 4 °C bei deaktivierter Bremse
- Abnehmen und Überführen der milchigen Bande in ein zweites 15 ml Reaktionsgefäß
- Auffüllen auf 8 ml mit RPMI-1640
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit 1 ml RPMI-1640 und Verteilen des Gesamtvolumens in die entsprechenden Rundbodenröhrchen

Das Fortführen der Aufbereitung der Deziduazellen verlief identisch mit jener der übrigen Organe (Milz, Thymus, Lymphknoten).

#### *Protokoll der intrazellulären Färbung (für Foxp3):*

Die intrazelluläre Färbung erfordert die Permeabilisation der lymphozytären Zellmembran. In der vorliegenden Arbeit wurde der Permeabilisations-Puffer der Firma eBioscience verwendet. Um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu erreichen, wurden alle Proben inklusive der Negativkontrollen gleichsam mit diesem Puffer behandelt.

- Zugabe von 1 ml FACS-Puffer
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit je 100 µl Antikörperlösung (1:100 Verdünnung des Antikörpers mit Permeabilisations-Puffer) bzw. 100 µl Permeabilisations -Puffer (Negativkontrolle)
- Inkubation für 30 Min. bei 4 °C
- Zugabe von 1 ml Permeabilisations-Puffer
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren der Zellen mit je 100 µl FACS-Puffer
- Lagerung der Proben bei 4 °C

## **2.29 Zellkultur (SM9-2)**

Die murine Trophoblasten-Zelllinie SM9-2 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Joan Hunt (Dept. of Anatomy and Cell Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, USA) zur Verfügung gestellt. Die Generierung erfolgte aus Plazenten von Swiss-Webster Weibchen am Tag 9 der Schwangerschaft (Sharma 1998). Diese Zellen bilden sowohl adhärenente, die eine gleichmäßige Monoschicht auf dem Boden der Zellkulturflasche formen, als auch nicht-adhärenente Populationen aus.

*Protokoll:*

*Kultur der Zellen*

- Überführen der nicht adhärenenten Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß
- Spülen der Zellkulturflasche mit 5 ml 1x HBSS
- Lösen der adhärenenten Zellen mit 2 ml Trypsin EDTA
- Inkubation der Flasche im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden
- Zugabe von 3 ml Kultur-Medium, Spülen der Flasche und poolen mit den nicht adhärenenten Zellen
- Zentrifugieren mit 1200 rpm für 5 Min. bei RT
- Verwerfen des Überstandes, resuspendieren mit 3 ml Kultur-Medium und Zählen der Zellen

- Kultivieren von  $1,5 - 2 \times 10^6$  Zellen in 30 ml Medium

#### *Einfrieren*

- Einfrieren von  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen in 1ml Einfrier-Medium

#### *Auftauen*

- Auftauen der Zellen bei 37 °C
- Überführen der Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche
- Zugabe von 10 ml Kultur-Medium
- Überführen von 5 ml der Zellsuspension in eine zweite 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche
- Inkubation beider Kulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

### **2.30 Proliferationsassay**

Fluoreszenzfarbstoffe wie 5 (6) – Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) und PKH26 ermöglichen die Markierung von Zellen mit dem Ziel, dessen Fähigkeit der Migration und Proliferation *in vitro* aber auch *in vivo* zu verfolgen. CFDA-SE kann aufgrund seiner hohen Membran-Permeanz leicht von Zellen aufgenommen werden. Die intrazellulären Esterasen katalysieren die Abspaltung der Azetat-Gruppen vom CFDA-SE und somit die Umwandlung des ehemals nicht-fluoreszenten Moleküls zu einem fluoreszenten Ester, dem CFSE. In dieser Form ist es weniger membrangängig und verbleibt so intrazellulär. Im Gegensatz hierzu wird der lipophile rote Fluoreszenzfarbstoff PKH26 in die Membran eingebaut, wobei er aufgrund seiner Streuung innerhalb der Zellmembran gleichsam die gesamte Zelle anfärben kann (Parish 1999).

Die erwähnten Farbstoffe ermöglichen die Detektion der Teilung von Zellen in Tochterzellen und damit deren Proliferation aufgrund der progressiven Halbierung der Fluoreszenzintensität der Fluorochrome nach jeder Zytokinese. Zusätzlich bietet sich die Möglichkeit der Markierung verschiedener Zellpopulationen mit CFDA-SE bzw. PKH26 zur simultanen Erfassung der Proliferation zweier Zelltypen. Die Fähigkeit der Zellen sich zu vermehren und damit die Abnahme der Fluoreszenzintensität kann mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden (Parish 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden BMMCs aus C57BL/6J und *Lgals1<sup>-/-</sup>* Weibchen mit CFDA-SE gefärbt und zusammen mit PKH26-gefärbten murinen Trophoblasten (SM9-2) kultiviert. Die Trophoblasten wurden dem System einen Tag zuvor zugeführt, um deren Anheftung an den Flaschenboden zu gewährleisten. Die eigentliche Ko-Kultur erfolgte nach Zugabe von CFDA-SE-gefärbten BMMCs. Die Proliferationsrate beider Zelltypen wurde nach 24 und 48 Stunden zytometrisch bestimmt und ins Verhältnis zum Ausgangswert nach 0 Stunden gesetzt. In einer Vertiefung (Well) einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (24 Well Plate) wurden je 50.000 PKH26-gefärbte SM9-2 mit je 100.000 CFDA-SE-gefärbten BMMCs bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ko-kultiviert. Das Zählen der Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus 4 Großquadraten mit jeweils 4 x 4 Gruppenquadraten. Die Zellen wurden 1:10 mit Trypanblau verdünnt, um vitale und somit für den Versuch relevante Zellen von toten Zellen mittels Durchlichtmikroskopie unterscheiden zu können. Bei Verteilung von Zellen auf den Rändern der Quadrate wurden jeweils nur 2 Ränder berücksichtigt. Die Zellzahl der untersuchten Zellsuspension errechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\sum \text{Zellzahl}}{4} \times 10.000 \times 10 (\text{Verdünnung mit Trypanblau}) \times \text{Verdünnung der Zellsuspension}$$

#### *Protokoll der Färbung von BMMCs mit CFDA-SE*

Um CFDA-SE verwenden zu können, musste zunächst eine 5 mM Stocklösung in DMSO hergestellt werden. Die Lagerung der Aliquots bis zur Verwendung erfolgte bei -20 °C.

- 2maliges Zentrifugieren der Zellen für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT mit Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 10 ml PBS (steril)
- Resuspendieren der Zellen mit 4 - 5 ml PBS
- Zählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT
- Verwerfen des Überstandes
- Ansetzen der Färbelösung:  
1 µl CFDA-SE + 9999 µl PBS (steril)

- Resuspendieren der Zellen mit der Färbelösung (100 µl Färbelösung pro  $1 \times 10^6$  Zellen)
- Inkubation für 90 Sek. bei RT
- Abstoppen der Reaktion durch Auffüllen auf 10 ml mit SM9-2 Kultur-Medium
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT
- Verwerfen des Überstandes, Zugabe von 5 ml SM9-2 Kultur-Medium
- 2maliges Zentrifugieren der Zellen für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT mit Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 5 ml SM9-2 Kultur-Medium
- Resuspendieren der Zellen mit 1 ml SM9-2 Kultur-Medium
- Wiederholung des Zählens der vitalen Zellen

#### *Protokoll der Färbung von SM9-2 mit PKH26*

In der vorliegenden Arbeit wurde das PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Es besteht aus dem Farbstoff und einer wässrigen Lösung, dem Diluent C. Letzteres dient der Aufrechterhaltung der Zellviabilität, wobei es gleichsam die Löslichkeit des Farbstoffes sowie die Effizienz der Färbung maximiert (Poon *et al.* 2000).

- Entnahme der Zellen aus Zellkulturflasche
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT
- Verwerfen des Überstandes, Zugaben von 4 ml RPMI-1640
- Zählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer
- Entnahme von  $5 \times 10^6$  Zellen aus der Zellsuspension, Überführen in ein 15 ml Reaktionsgefäß, Auffüllen auf 5 ml mit RPMI-1640
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT
- Verwerfen des gesamten Überstandes (Verbleib von max. 25 µl)
- Resuspendieren der Zellen mit 1 ml Diluent C
- Ansetzen der Färbelösung:
  - 15 µl PKH-26 + 985 µl Diluent C
- Zugabe der Zellsuspension auf die Färbelösung
- Inkubation für 10 Min. bei RT
- Abstoppen der Reaktion mit 2 ml purem FBS
- Inkubation für 1 Min. bei RT

- Zugabe von 4 ml SM9-2 Kultur-Medium
- Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT
- Verwerfen des Überstandes, Zugabe von 5 ml SM9-2 Kultur-Medium
- 3maliges Zentrifugieren für 10 Min. mit 1200 rpm bei RT mit Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 5 ml SM9-2 Kultur-Medium
- Resuspendieren der Zellen mit 3 ml SM9-2 Kultur-Medium
- Wiederholung des Zählens der vitalen Zellen

### 2.31 Statistik

Die Durchführung der statistischen Tests sowie die Generierung der graphischen Darstellungen erfolgten mittels GraphPad Prism5.

Bei einer Stichprobengröße von mind. 10 wurde mittels Shapiro Wilk Test die Normalverteilung der Daten überprüft. Lag diese vor, wurden nicht-verbundene Daten als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt, mittels einfaktorier ANOVA auf Unterschiede getestet und die Änderungen mittels *t*-Test auf Signifikanzen untersucht. Folgte die Daten keiner Normalverteilung und/oder betrug die Gruppengröße weniger als 10, erfolgte die Darstellung der nicht-verbundenen Daten als Mediane, der Test auf Unterschiede mittels Kruskal-Wallis Test und die Untersuchung der Änderungen auf Signifikanzen mittels Mann-Whitney-*U* Test. Die verbundenen Daten des Proliferationsassays wurden als Mittelwerte dargestellt und mittels unpaired *t*-Test auf Signifikanzen untersucht. Die Abbildung der Daten nach Vermessung der Spiralarterien sowie der Implantationseinheiten erfolgte als Mittelwerte $\pm$ SEM mit Überprüfung auf Signifikanzen mittels *t*-Test.

Für die Ermittlung der Korrelationen wurden zunächst die Interaktionen der Moleküle Mcpt-8, TGF- $\beta$  und CtGF multivariat mittels ANCOVA auf Signifikanzen getestet. Aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung der Daten wurde post hoc der Spearman-Test gewählt und der Korrelationskoeffizient  $r_s$  ermittelt. Dieser Test ermöglichte die Bestimmung der Interaktion der o.g. Moleküle zwischen den Gruppen.

Die Signifikanzgrenzen wurden wie folgt festgelegt und dargestellt:

$P < 0,05$ : \*,  $P < 0,01$ : \*\*,  $P < 0,001$ : \*\*\*

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Uterine Mastzellen repräsentieren einen einzigartigen, divergenten Phänotyp

Um uterine Mastzellen phänotypisch zu charakterisieren, wurde eine kombinierte Alcianblau/Safranin-Färbung durchgeführt. Im murinen Uterus reagierten Mastzellen sowohl positiv auf Alcianblau (*Abb. 25a*) als auch auf Safranin (*Abb. 25b*) und repräsentierten demnach mukosale respektive Bindegewebs-Mastzellen (Spicer 1960). Darüber hinaus wurden ebenso Zellen doppelt angefärbt (*Abb. 25c*), die sich höchstwahrscheinlich in einem Zwischenstadium der Differenzierung in einen der beiden Zelltypen befanden (Reynolds *et al.* 1988).



*Abb. 25: Visualisierung Alcianblau-positiver, mukosaler Mastzellen (a), Safranin-positiver Bindegewebsmastzellen (b) sowie doppelt positiver Mastzellen (c) im murinen Uterus nach Färbung mit Alcianblau/Safranin (1000fache Vergrößerung)*

Die Präsenz von zwei verschiedenen Mastzelltypen innerhalb des murinen Uterus konnte durch die Verwendung von *Mcpt5-Cre ROSA26-EYFP* doppelt transgenen Mäusen bestätigt werden. In diesem Mausmodell ist die Mastzellprotease-5 (*Mcpt-5*) an das gelbfluoreszierende Protein *EYFP* gekoppelt (Scholten *et al.* 2008), wodurch alle Mastzellen, welche die *Mcpt-5* exprimieren, aufgrund ihrer gelb/grünen Fluoreszenz detektiert werden können. Allerdings handelt es sich bei der *Mcpt-5* um eine Mastzellprotease, die ausschließlich in den Granula von Bindegewebs-, nicht aber von mukosalen Mastzellen gespeichert wird (Galli *et al.* 2011). Uterine Mastzellen exprimierten lediglich 5 bis 25 % an *EYFP*-positiven Zellen (*Abb. 26*). Dieses Ergebnis stützt die histologische Untersuchung des Uterus nach Färbung mit Alcianblau/Safranin, die das Vorhandensein eines divergenten Mastzellphänotyps bestehend aus mukosaler und Bindegewebs-Mastzellen belegt. Diese Ergebnisse schließen außerdem die Nutzung der *Mcpt5-*

*Cre* Mausmodelle aus, da sowohl bei den *Mcpt5-Cre iDTR* (induzierte Depletion) als auch bei den *Mcpt5-Cre R-DTA* (kontinuierliche Depletion) ausschließlich die Bindegewebs- nicht aber die mukosalen Mastzellen ausgeschaltet werden würden.

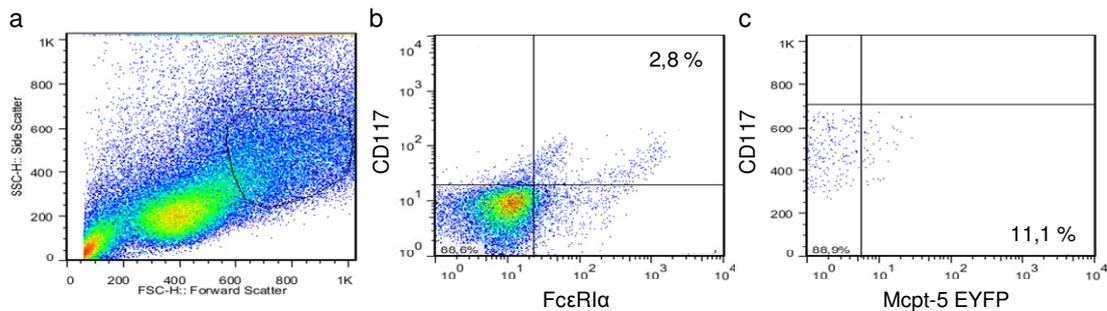


Abb. 26: Durchflusszytometrische Analyse EYFP-positiver Zellen (11,1 %, c) innerhalb der uterinen Mastzellpopulation nach Färbung gegen CD117 und FcεR1α (2,82 %, b) bezogen auf die eingegrenzte Mastzellpopulation innerhalb der Leukozytenpopulation nach Isolierung uteriner Zellen (a)

Uterine Mastzellen exprimieren die Mastzellprotease 8 (Mcpt-8). Diese Serinprotease wurde zwar ursprünglich in einer Mastzelltumor-Zelllinie erstmals detektiert und als mastzellspezifisch angesehen, allerdings führte *in vivo* erst eine induzierte parasitäre Infektion zu einem deutlichen Anstieg an Mcpt-8 in der murinen Lunge. In nicht-infiziertem Gewebe konnte dieses Molekül hingegen nicht nachgewiesen werden (Lützelschwab *et al.* 1998). In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Mcpt-8 als spezifischer Marker für basophile Granulozyten beschrieben (Wada *et al.* 2010). Nach durchflusszytometrischer Analyse der uterinen Mastzellpopulation an Tag 10 der Trächtigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit eine Expression an Mastzellprotease 8 festgestellt werden (Abb. 27), die zusätzlich durch eine immunhistochemische Färbung von Implantationseinheiten unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Mcpt-8 bestätigt wurde (Abb. 28).

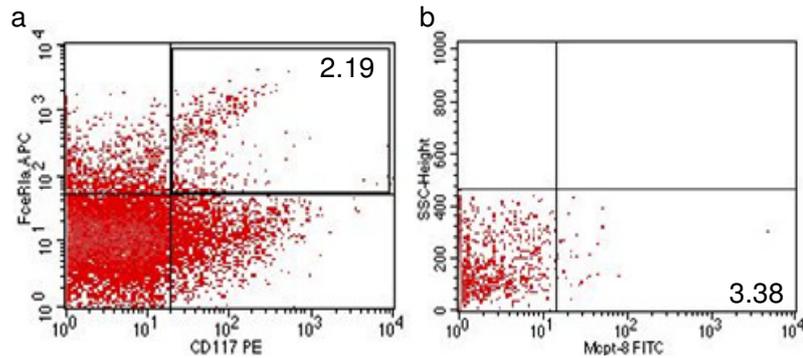


Abb. 27: Durchflusszytometrische Analyse Mcpt-8-positiver Zellen (3,38 %, b) innerhalb der uterinen Mastzellpopulation nach Färbung gegen CD117 und FcεR1a (2,19 %, a)

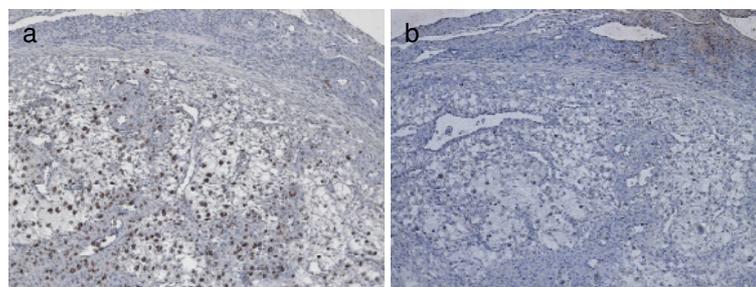


Abb. 28: (a) Expression von Mastzellprotease 8 an der föto-maternalen Grenzfläche nach immunhistochemischer Färbung einer Implantationseinheit an Tag 10 der Trächtigkeit; (b) Negativkontrolle; 100fache Vergrößerung

In frühen Stadien der Trächtigkeit waren die Mastzellen intrainplantär verteilt (Abb. 29a), während sie generell sowohl im naiven als auch im trächtigen Uterus oftmals in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert waren (Abb. 29b-c).

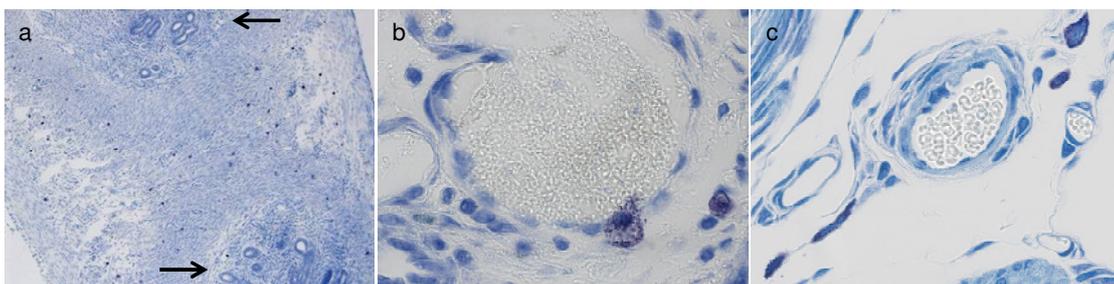


Abb. 29: (a) Charakteristische intrainplantäre Verteilung der Mastzellen im murinen Uterus an Tag 2 der Trächtigkeit nach Toluidinblau O-Färbung. Die violett gefärbten Zellen stellen Mastzellen dar, die schwarzen Pfeile kennzeichnen jeweils eine Implantation mit dem sich entwickelnden Embryo (100fache Vergrößerung); Lokalisation von Mastzellen in direktem Kontakt zu einem Blutgefäß nach Toluidinblau O-Färbung im naiven Uterus (b) und in der Dezidua an Tag 10 der Trächtigkeit (c) (1000fache Vergrößerung)

1997 wurde die Mastzellprotease 9 (Mcp-9) als spezifisch für uterine Mastzellen aus BALB/c Mäusen beschrieben (Hunt *et al.* 1997). Allerdings konnte dies in der vorliegenden Arbeit, zumindest bei weiblichen C57BL/6 nicht bestätigt werden, da in deren Uterusproben keine Expression von Mcp-9 nachweisbar war.

Uterine Mastzellen lassen sich demnach nicht einem bestimmten Typus zuordnen. Sie scheinen vielmehr eine Uterus-spezifische Population zu repräsentieren, die sich im Vergleich zu denen anderer Gewebe wie Haut oder Intestinum unterscheidet.

### **3.2 Die Anzahl an Mastzellen erreichte ihr höchstes Niveau im Östrus und verblieb hoch bei Einsetzen einer Schwangerschaft**

Geschlechtsreife CBA/J und C57BL/6J Weibchen zeigten einen regelmäßigen Zyklus, der mit Hilfe des in der Zellsuspension nach Vaginallavage enthaltenen, charakteristischen Zellgehalts eindeutigen Stadien zuzuordnen war (*Abb. 30a-d*). Zusätzlich erfolgte die allogene Verpaarung mit BALB/c Männchen, um eine Aussage über die Mastzellzahl im Uterus im Verlauf der frühen Trächtigkeit (Tag 2 und 5) treffen zu können.

Nach Färbung mit Toluidinblau färbten sich die Mastzellen im Uterus violett, wohingegen das sie umgebende Gewebe blau erschien (*Abb. 30e-h*). Mastzellen oszillierten im Verlauf des murinen Östruszyklus und erreichten ihr höchstes Niveau im Östrus, der rezeptiven Phase des Weibchens. Dies konnte sowohl bei den CBA/J als auch bei den C57BL/6J nachgewiesen werden (*Abb. 31a und b*). Sie verblieben auf diesem hohen Niveau bei den CBA/J (*Abb. 31a*) bzw. stiegen signifikant an bei den C57BL/6J (*Abb. 20b*) sowohl an Tag 2 als auch an Tag 5 der Trächtigkeit, wohingegen das Einsetzen des Metöstrus nach nicht erfolgter Befruchtung zu einer Abnahme der Mastzellzahl führte (*Abb. 31a und b*). Die darauf folgenden Phasen Diöstrus und Proöstrus waren gekennzeichnet durch einen stetigen Anstieg der Anzahl an Mastzellen bei den CBA/J (*Abb. 31a*) bzw. durch ein gleichbleibend niedriges Niveau bei den C57BL/6J (*Abb. 31b*), die im Östrus erneut ihr Maximum erreichten (*Abb. 31a und b*).

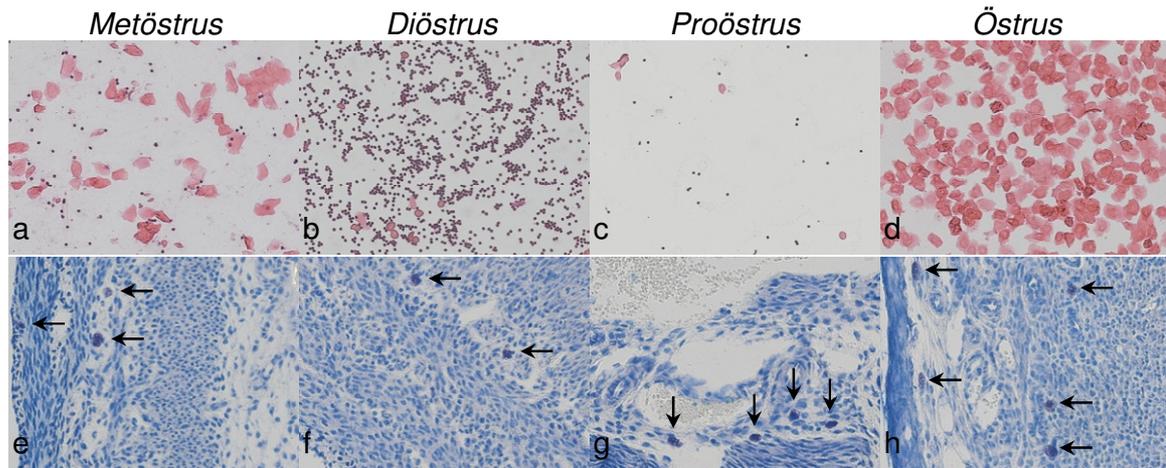


Abb. 30: Charakteristische Aufnahmen der einzelnen Östrusphasen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Vaginallavage bzw. Zellsuspension (a-d, 200fache Vergrößerung) sowie beispielhafte Präsenz von Mastzellen (Pfeile) nach Toluidinblau O-Färbung (e-h, 400fache Vergrößerung) in den entsprechenden Zyklusstadien im Uterus von geschlechtsreifen CBA/J Weibchen

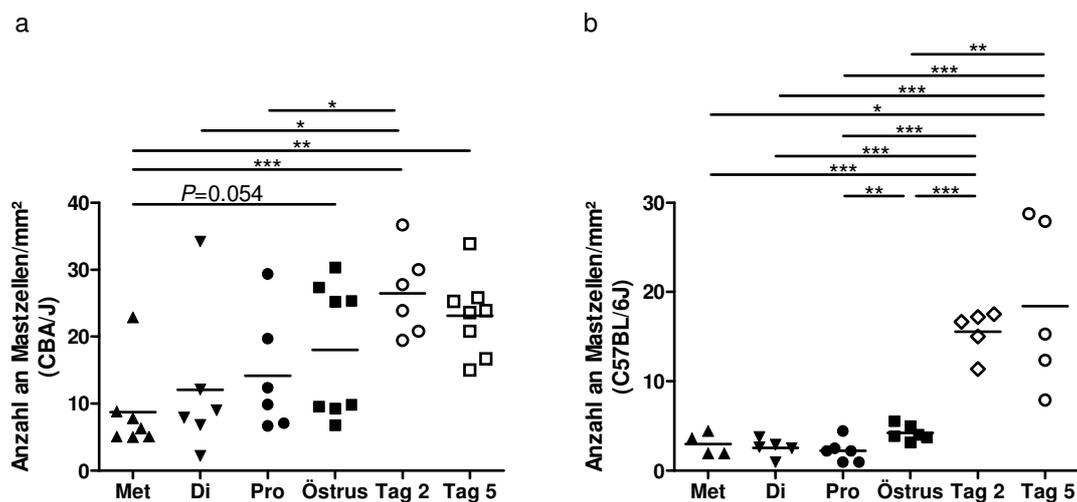


Abb. 31: Anzahl an Mastzellen pro mm<sup>2</sup> im Uterus von geschlechtsreifen CBA/J (a) und C57BL/6J (b) Weibchen nach Toluidinblau O-Färbung während des Metöstrus (Met, n=4-7), Diöstrus (Di, n=5-6), Proöstrus (Pro, n=5-6), Östrus (n=6-8) sowie an Tag 2 (n=5-6) und Tag 5 (n=5-8) der Schwangerschaft; Mittelwerte±SEM, unpaired t-Test

### 3.3 Eine Mastzelldefizienz führte zu einer verringerten Anzahl an implantierten Blastozysten, was durch den Transfer von Mastzellen reversiert werden konnte

Die Anzahl an implantierten Blastozysten im Uterus von mastzelldefizienten W-sh war signifikant geringer im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. So wiesen

insgesamt 24 weibliche W-sh lediglich 81 Implantationen auf, was einem Median von 0 entspricht, verglichen mit 144 Implantationen bei 19 Wildtypen (Median = 9) (Tab. 3). Wurde bei mastzelldefizienten Weibchen eine Trächtigkeit festgestellt, so schien diese mit Ausnahme der geringeren Implantationsrate normal zu verlaufen. Allerdings wies der Uterus von den weniger als 50 % der nicht trächtigen W-sh nach eindeutiger Plug-Detektion auffällige Veränderungen auf: Die Hörner waren extrem verdickt und entzündet im Vergleich zu einem normalen Uterus nicht trächtiger Weibchen (Abb. 32). Eine systemische Rekonstitution von W-sh mit BMMC führte zu einer Erhöhung der Anzahl an Implantationen auf ein vergleichbares Niveau zu den Wildtypen (Median = 7) und hatte somit einen entscheidenden positiven Einfluss. Zudem wiesen lediglich 47,8 % der W-sh nach Feststellung eines eindeutigen Vaginalplugs eine Trächtigkeit auf verglichen mit 84,2 % bei den BL/6 und 76,5 % bei den W-sh Weibchen nach Rekonstitution mit BMMC (Tab. 3).

Tab.3: Totale Anzahl, Mittelwert und Median an Implantationen pro Weibchen sowie Anzahl an trächtigen Weibchen pro Detektion eines eindeutigen Vaginalplugs (Plug) und Prozentzahl an Trächtigkeiten nach allogener Verpaarung von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> sowie C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC mit BALB/c Männchen; \*  $P < 0,05$  versus Mediane der Implantationen/Weibchen von C57BL/6J und C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC; Mann-Whitney-U Test

Versuchsgruppe	Implantationen/Weibchen (Mittelwert/Median)	trächtig/Plug (%)
C57BL/6J	144/19 (7,6; 9)	16/19 (84,2)
C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	81/24 (3,4; 0*)	11/24 (45,8)
C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC	113/17 (6,6; 7)	13/17 (76,5)



Abb. 32: Exemplarische Aufnahmen des Uterus einer jungfräulichen C57BL/6J verglichen mit dem einer nicht trächtigen C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh) nach Verpaarung sowie einer weiblichen C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh) und einer rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen

### 3.4 Mastzellen üben keinen entscheidenden Einfluss auf die Ovulation aus

Um zu untersuchen, ob die verringerte Implantationsrate bei mastzelldefizienten W-sh auf eine verminderte Ovulation bzw. Anzahl an Follikeln zurückzuführen war, wurde die Gesamtzahl an Follikeln bzw. *Corpora lutea* (Gelbkörpern) in den Ovarien bestimmt. Die Mastzelldefizienz führte zwar zu einer leicht verringerten Anzahl an Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln im Vergleich zur Wildtypgruppe bzw. zur Gruppe der mit BMMC rekonstituierten W-sh, allerdings erreichte dieser Unterschied keine Signifikanz. Deutlich entscheidender ist allerdings eine vergleichbare Anzahl an Gelbkörpern (*Corpora lutea*) bei allen drei Gruppen, wodurch ein negativer Einfluss von Mastzellen auf die Ovulation ausgeschlossen werden kann (Abb. 33). Das Corpus luteum ist aufgrund seiner Progesteronproduktion essentiell für die Aufrechterhaltung der frühen Schwangerschaft. Später übernimmt die Plazenta diese Funktion (Stocco *et al.* 2007).

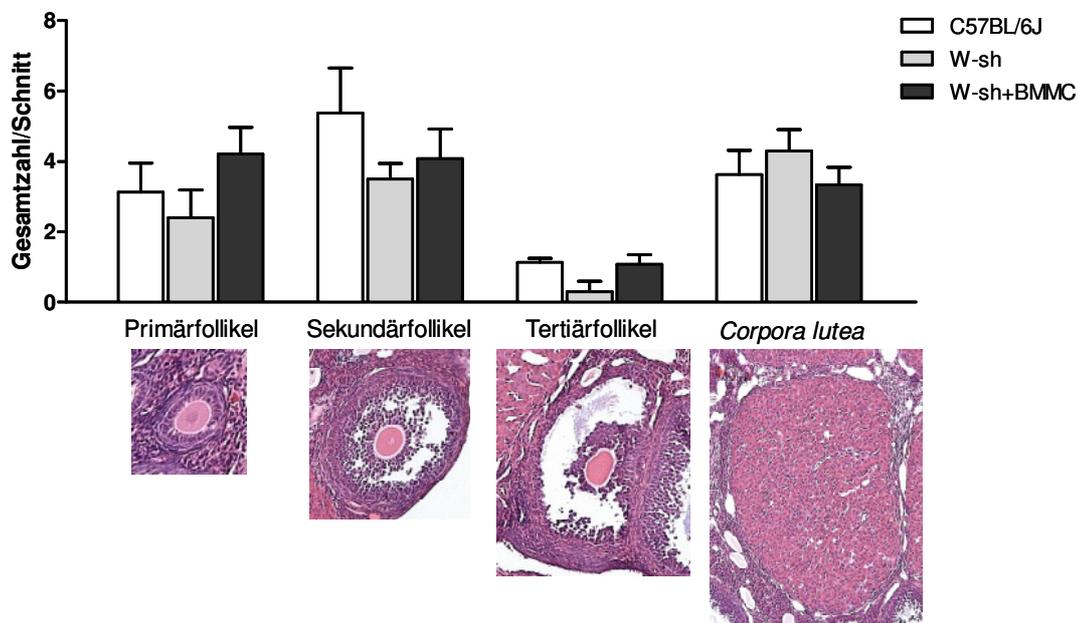
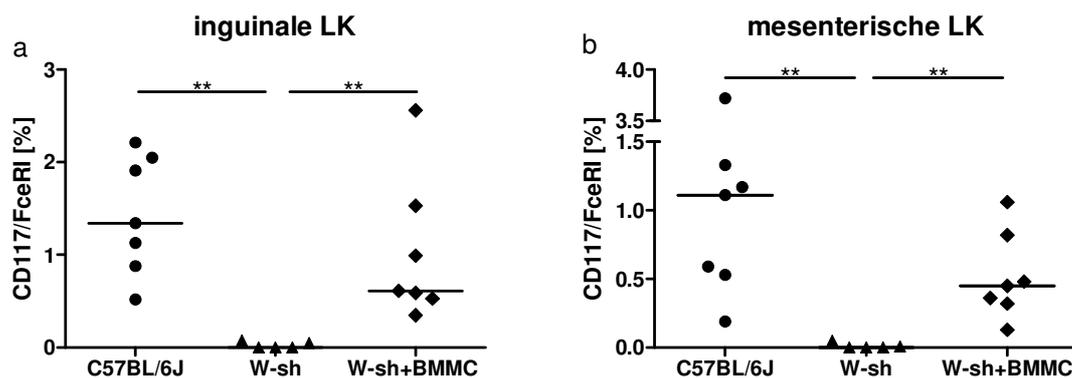


Abb. 33: Gesamtzahl an Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln bzw. Corpora lutea pro Gewebeschnitt des jeweils rechten und linken Ovars mit entsprechenden exemplarischen Aufnahmen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (100fache Vergrößerung) unterhalb der Grafik von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mittelwerte±SEM, unpaired t-Test

### 3.5 Mastzellen migrieren nach systemischer Rekonstitution in die Dezidua und in verschiedene Lymphknoten

Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte die Migration und somit die Anwesenheit von Mastzellen nach systemischer Rekonstitution von W-sh mit BMMC in allen untersuchten Organen wie Dezidua, dem maternalen Part der föto-maternalen Grenzfläche sowie inguinalen, mesenterischen und para-aortalen Lymphknoten (LK) (Abb. 34a-d). Die Doppelfärbung gegen die mastzellspezifischen Oberflächenmarker CD117/FcεRIα diente zugleich als Nachweis der Mastzelldefizienz und des Erfolgs der Rekonstitution. Die Anzahl an Mastzellen stieg nach Transfer von BMMC in W-sh signifikant an und erreichte hierbei vergleichbare (inguinale und mesenterische LK; Abb. 34a-b) und sogar identische Niveaus (para-aortale LK, Dezidua; Abb. 34c-d) zu jenen der Wildtypen. Letzteres ist insofern von besonderem Interesse, als dass die para-aortalen Lymphknoten den Reproduktionstrakt drainieren und die Dezidua die Kontaktstelle zwischen Fötus und Mutter darstellt. Eine erfolgreiche Migration und/oder lokale Proliferation und somit Anwesenheit von Mastzellen in diesen relevanten Organen sollte demnach zumindest lokal einen entscheidenden Einfluss auf die Schwangerschaft ausüben.



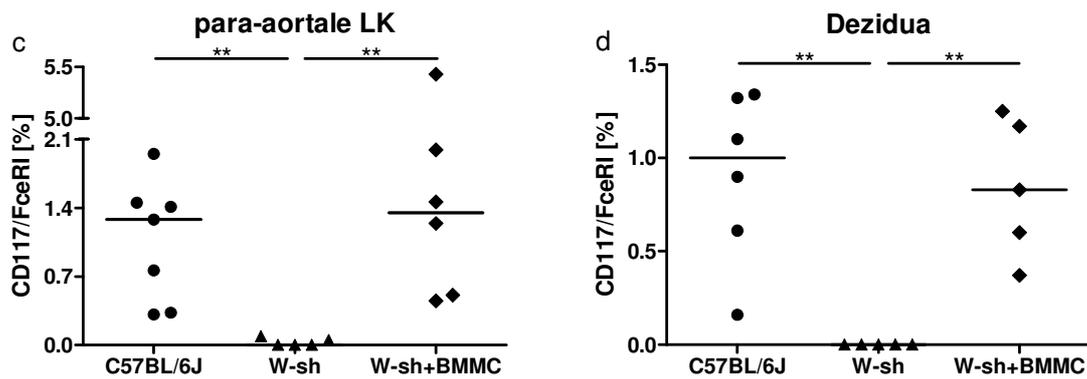


Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse von Mastzellen (CD117/FcεRIα) in inguinalen (a), mesenterischen (b) und para-aortalen (c) Lymphknoten sowie Dezidua (d) von weiblichen C57BL/6J (n=6-7), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=5) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC, n=5-7) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allgener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test

### 3.6 Der Transfer von BMMC führte zu einer Erhöhung mastzellspezifischer Proteasen

In der Dezidua von mastzelldefizienten W-sh an Tag 10 der Trächtigkeit war wie erwartet lediglich eine geringe oder nicht vorhandene Expression mastzellspezifischer Proteasen nachweisbar verglichen mit jener bei den BL/6 (Abb. 35a-c). Dieser Unterschied war höchst signifikant und bestätigte zudem die durchflusszytometrischen Ergebnisse des vorherigen Kapitels. Die Rekonstitution der W-sh mit BMMC führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg der mRNA aller untersuchten Chymasen gegenüber den nicht-rekonstituierten W-sh, obgleich die Expression von Mcpt-1 und Mcpt-5 signifikant niedriger war als jene der BL/6 (Abb. 35a-b). Hingegen wurde die Mastzellprotease-8 in der Dezidua der mit BMMC transferierten W-sh sowie der Kontrollgruppe vergleichbar stark exprimiert und erreichte dort das höchste Level verglichen mit jenem der übrigen untersuchten Proteasen (Abb. 35c).

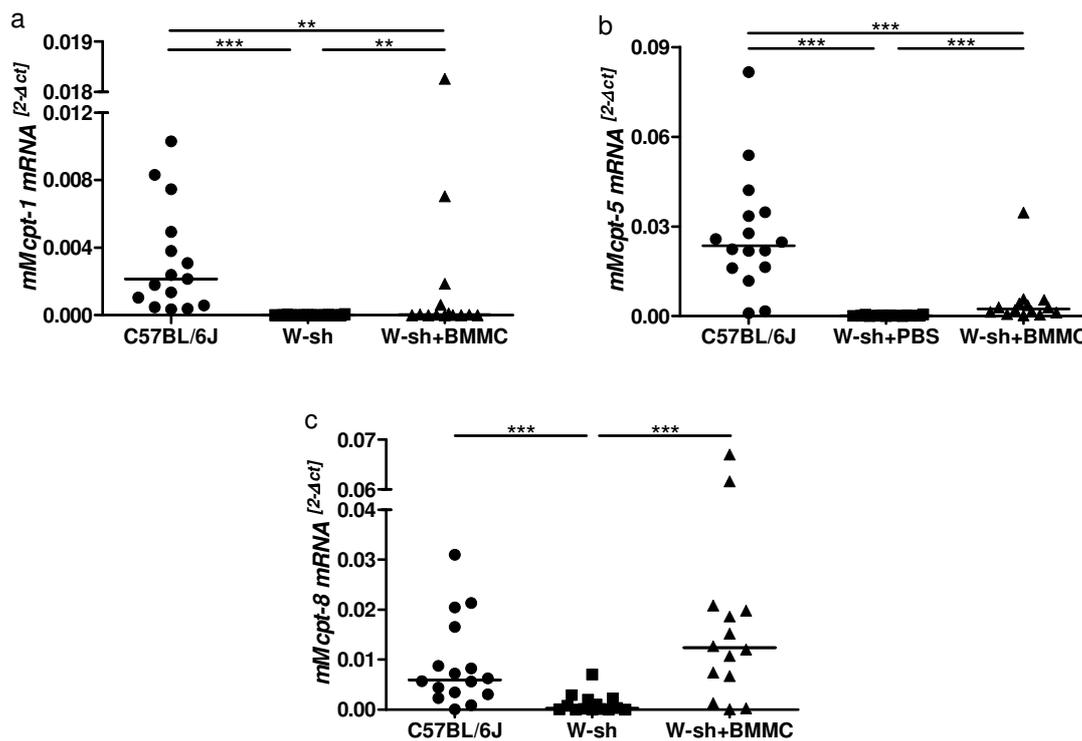


Abb. 35: Expression der murinen Mastzellproteasen (mMcpt) Mcpt-1 (a), Mcpt-5 (b) sowie Mcpt-8 (c) auf mRNA-Ebene in Dezidua von weiblichen C57BL/6J (n=15-16), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=14) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC, n=14) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test

### 3.7 Die verminderte Implantationsrate bei W-sh konnte nach lokaler Rekonstitution mit BMMC ausgeglichen werden

Die lokale Injektion von BMMC in das jeweils linke Uterushorn von W-sh, während das rechte Horn mit PBS behandelt wurde, führte ebenfalls zu einer Zunahme der Implantationsrate auf 9,5 im Median gegenüber 0 bei den W-sh und 9 in der Wildtyp-Gruppe (Tab. 4). Ebenso erhöhte sich nach lokaler Rekonstitution die Prozentzahl an trächtigen Weibchen nach Detektion eines Vaginalplugs auf 90 % verglichen mit weniger als 50 % bei den W-sh. Als Kontrollen sollten jene W-sh dienen, denen in das jeweils rechte und linke Uterushorn PBS injiziert wurde. Allerdings führte die Defizienz an Mastzellen in dieser Kontrollgruppe zu einem totalen Ausfall, da keines der 6 W-sh Weibchen eine Trächtigkeit aufwies, obwohl ein eindeutiger Plug detektiert wurde. Dies wiederum bekräftigte die Daten hinsichtlich der deutlich geringeren Anzahl an Implantationen bei den mastzelldefizienten W-sh gegenüber den Wildtypen, obwohl nunmehr die

Vergleichsgruppe zu den lokal rekonstituierten, trächtigen W-sh entfiel. Als Kontrollgruppe bei der Auswertung der Daten fungierten demnach die nicht trächtigen Weibchen.

Tab. 4: Totale Anzahl, Mittelwert und Median an Implantationen pro Weibchen (Implant./Weibchen) sowie Anzahl an trächtigen Weibchen pro Detektion eines eindeutigen Vaginalplugs (Plug) und Prozentzahl an Trächtigkeiten von C57BL/6J + PBS systemisch, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + PBS systemisch, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC systemisch, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + PBS lokal sowie C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC lokal nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; signifikante Unterschiede (P) in Bezug auf die Implantationen bestimmt durch Mann-Whitney-U Test

Versuchsgruppe	Implant./Weibchen (Mittelwert/Median)	P	trächtig/Plug (%)
<sup>(a)</sup> C57BL/6J + PBS systemisch	144/19 (7,6; 9)		16/19 (84,2)
<sup>(b)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + PBS systemisch	81/24 (3,4; 0)	* zu <sup>(a)</sup> * zu <sup>(c)</sup>	11/24 (45,8)
<sup>(c)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC systemisch	113/17 (6,6; 7)		13/17 (76,5)
<sup>(d)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + PBS lokal	0/6 (0; 0)	** zu <sup>(a)</sup> * zu <sup>(c)</sup> ** zu <sup>(e)</sup>	0/6 (0)
<sup>(e)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC lokal	87/10 (8,7; 9,5)		9/10 (90)

Die lokale Rekonstitution des linken Uterushorns von mastzelldefizienten W-sh mit BMMC führte selbst mehr als 6 Wochen nach Injektion zur Anwesenheit von Mastzellen in der Dezidua an Tag 10 der Trächtigkeit. Überraschenderweise konnten die Zellen ebenfalls im rechten Uterushorn mittels Toluidinblau O Färbung detektiert werden, obwohl dieses ausschließlich mit PBS behandelt wurde und eigentlich als zusätzliche interne Kontrolle dienen sollte (Abb. 36).

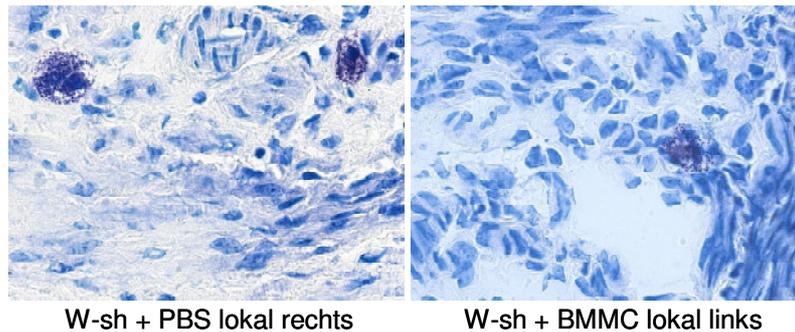


Abb. 36: Exemplarische Aufnahmen von Mastzellen nach Toluidinblau O Färbung in der Dezidua des lokal rekonstituierten linken Uterushorns sowie des mit PBS behandelten rechten Uterushorns von C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; 1000fache Vergrößerung

### **3.8 Die lokale Rekonstitution resultierte in einer erhöhten Expression mastzellspezifischer Proteasen in der Dezidua**

Obwohl die lokale Injektion der BMMC in das linke Uterushorn von mastzelldefizienten W-sh erfolgte, war die Expression der Mastzell-Proteasen auf mRNA-Ebene in beiden Uterushörnern nicht nur vergleichbar (Abb. 37a), sondern im rechten, mit PBS behandelten Horn bezogen auf Mcpt-5 und Mcpt-8, sogar signifikant höher (Abb. 37b-c). Im Uterus derjenigen W-sh, denen PBS sowohl in das rechte als auch in das linke Horn injiziert wurde, waren die untersuchten Chymasen wie erwartet lediglich gering oder nicht exprimiert. Die Weibchen dieser Kontrollgruppe wiesen allerdings allesamt keine Trächtigkeit auf und erfüllten somit keine vergleichbaren Ausgangsbedingungen zu den lokal, mit BMMC rekonstituierten W-sh an Tag 10 der Trächtigkeit. Da jedoch keine trächtigen, mit PBS behandelten Weibchen als Kontrollen zur Verfügung standen und ohnehin nur eine sehr geringe oder nicht vorhandenen Expression an Mastzell-Proteasen aufgrund der genetischen Defizienz an Mastzellen bei den W-sh zu erwarten war, wurden die Daten der nicht trächtigen PBS-Kontrollen trotzdem für die Auswertung der PCR-Ergebnisse herangezogen.

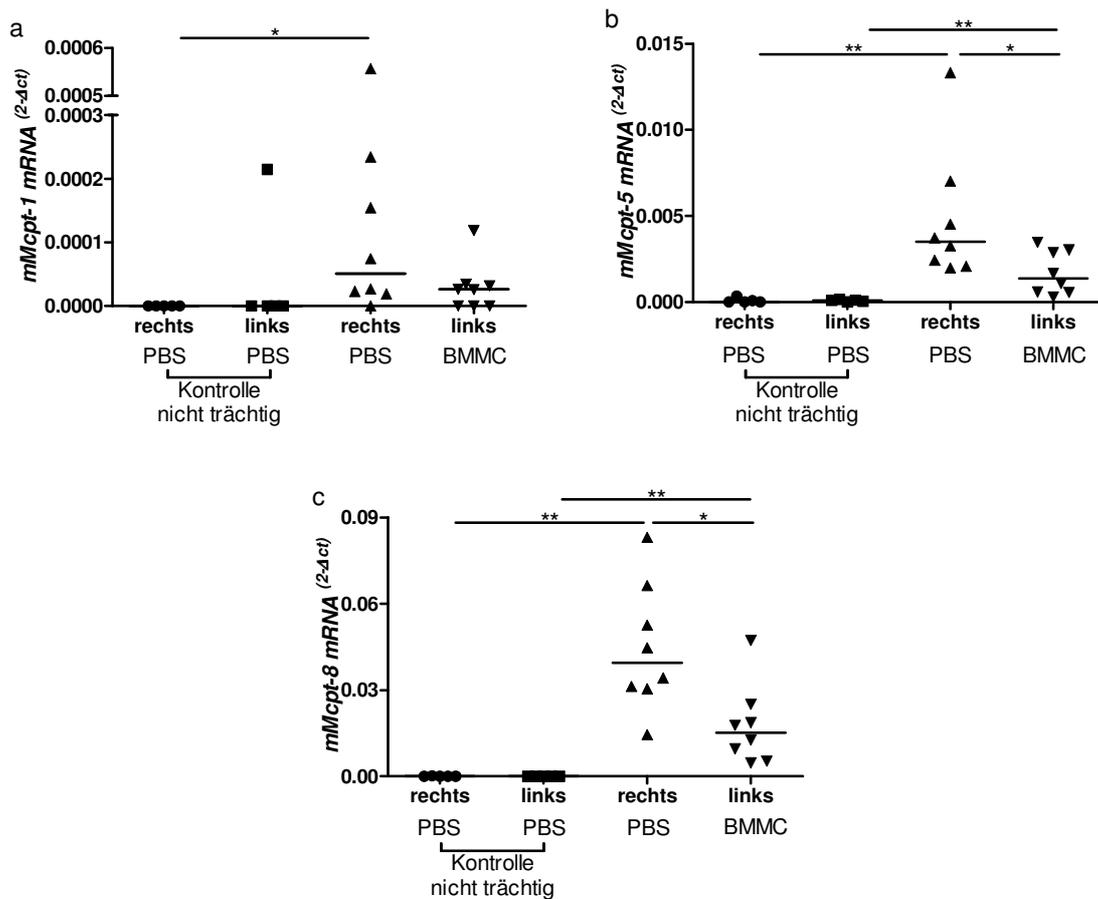


Abb. 37: Expression der murinen Mastzellproteasen (mMcpt) Mcpt-1 (a), Mcpt-5 (b) sowie Mcpt-8 (c) auf mRNA-Ebene in Dezidua beider Uterushörner (rechts, links) behandelt entweder beidseitig mit PBS (nicht trächtige Kontrolle,  $n=6$ ) oder einseitig mit PBS (rechts PBS) und BMMC (links BMMC) von weiblichen C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> ( $n=8$ ) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test (zwischen den Gruppen), Wilcoxon Test (innerhalb der Gruppen)

### 3.9 Mastzelldefiziente Mäuse verfügten über deutlich kleinere Plazenten und eine eingeschränkte Modifikation der Spiralarterien

Trotz der verminderten Implantationsrate bei den mastzelldefizienten W-sh wurden doch einige Blastozysten implantiert. Obgleich die Mastzelldefizienz augenscheinlich keinen negativen Einfluss auf die Ausbildung und die Distribution der durch Riesenzellen, Spongiotrophoblasten und Labyrinth-Zellen charakterisierten Schichten der Plazenta zu haben schien, so konnten doch im Hinblick auf deren Größe starke Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Abwesenheit von Mastzellen führte bei weiblichen W-sh an Tag 10

der Trächtigkeit zu einer signifikant kleiner ausgeprägten Plazenta im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Interessanterweise konnte die Rekonstitution mit BMMC dieses Defizit in Bezug auf die Größe der Plazenta ausgleichen, was die unterhalb des Graphen bzw. der jeweiligen Gruppe abgebildeten Aufnahmen der Implantationseinheiten im Transversalquerschnitt mit gekennzeichnetem Plazentaareal veranschaulicht (Abb. 38).

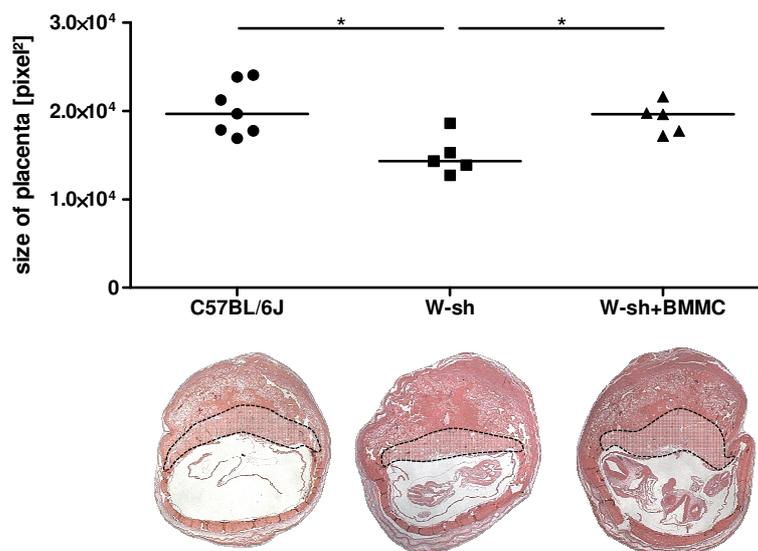


Abb. 38: Größe der Plazenten an Tag 10 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J (n=7), mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=5) sowie BMMC rekonstituierter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh+BMMC, n=5) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen mit exemplarischen Aufnahmen der entsprechenden Implantationseinheiten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie vermessenem Plazenta-Areal im Transversalquerschnitt (25fache Vergrößerung); Mediane, Mann-Whitney-U Test

Die Vermessung der in der *Decidua basalis* lokalisierten Spiralarterien ergab ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Arterien der mastzelldefizienten W-sh wiesen einen geringeren Lumendurchmesser (Abb. 39a) und ein höheres Verhältnis von Gefäßwand zu Lumen (Abb. 39b) verglichen mit den Wildtypen auf. Diese ungenügende Modifikation der Spiralarterien und somit eine eingeschränkte Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen kann fatale Konsequenzen für dessen Entwicklung nach sich ziehen. Die Rekonstitution von W-sh mit Mastzellen konnte dieses Defizit allerdings wieder ausgleichen und führte sowohl zu einem Anstieg des Innendurchmessers der Gefäße (Abb. 39a) als auch zu einer Abnahme des Wand/Lumen Verhältnisses

(Abb. 39b) auf das Niveau der Kontrollgruppe. Zur visuellen Verdeutlichung der Unterschiede wurden exemplarische Aufnahmen der Spiralarterien aller drei Gruppen rechtsseitig der Graphen abgebildet.

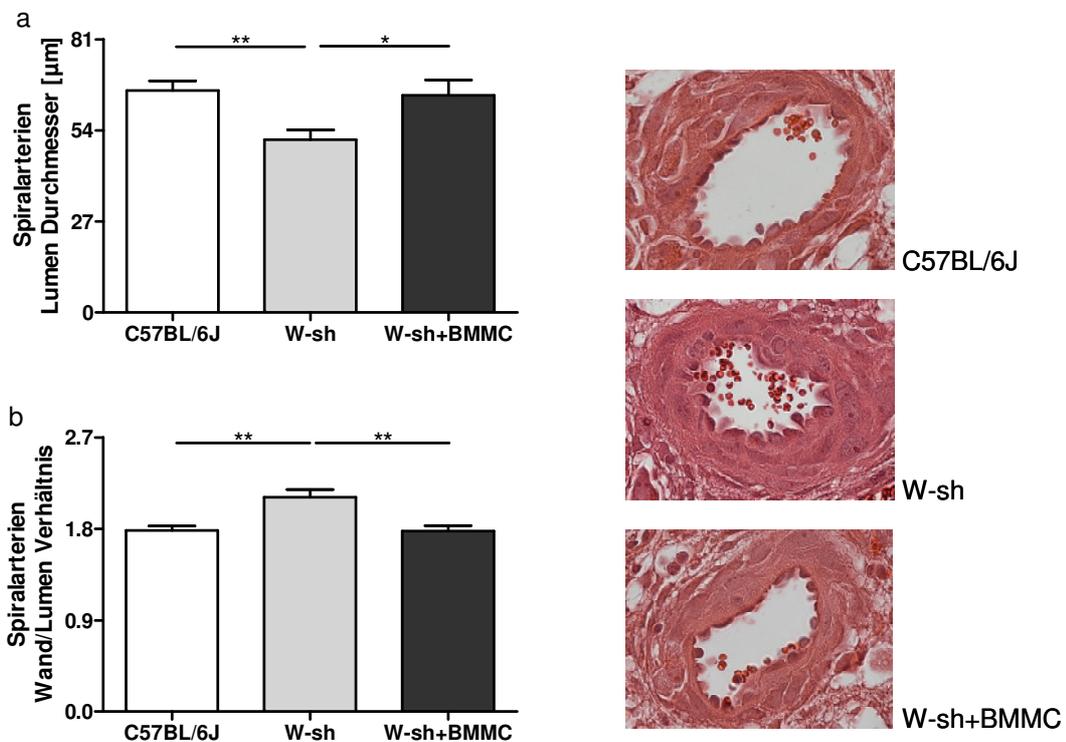


Abb. 39: Größe von Lumendurchmesser (a) sowie Wand/Lumen Verhältnis (b) von 2-10 Spiralarterien in der Decidua basalis an Tag 10 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J ( $n=8$ ), mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh,  $n=5$ ) sowie BMMC rekonstituierter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh+BMMC,  $n=5$ ) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen mit exemplarischen Aufnahmen der entsprechenden Spiralarterien nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (1000fache Vergrößerung); Mittelwerte $\pm$ SD, unpaired t-Test

### 3.10 Die Mastzelldefizienz führte zu einer verringerten Implantationsgröße an den Tagen 5 und 6 der Trächtigkeit

Wie bereits erwähnt, waren die wenigen Implantationen bei den W-sh gekennzeichnet durch signifikant kleinere Plazenten sowie ungenügend modifizierte Spiralarterien. Beides könnte die Konsequenz eines suboptimal verlaufenden Implantationsprozesses sein. Daher wurden die Implantationen am Schwangerschaftstag 5 genauer untersucht. Die intravenöse Injektion des Farbstoffs Chicago Sky Blau führte zur Anfärbung und damit Visualisierung der

Implantationen an Tag 5 der Trächtigkeit von allogenen verpaarten weiblichen C57BL/6J (BL/6, Wildtypen), mastzelldefizienten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh+BMMC) (Abb. 40a-c) aufgrund der erhöhten vaskulären Permeabilität des Uterusstromas.

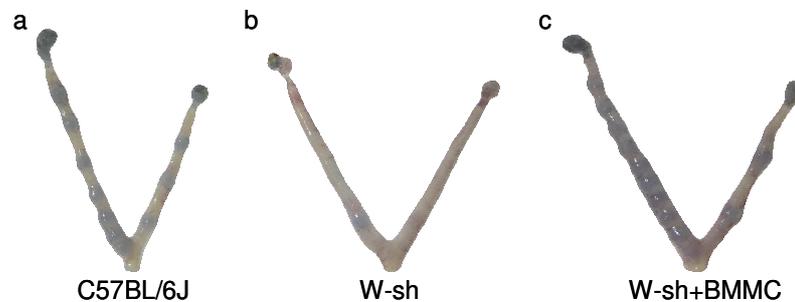


Abb. 40: Representative Aufnahmen der Uteri nach Chicago Sky Blau Injektion an Tag 5 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J (a), mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, b) sowie BMMC rekonstituierter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh+BMMC, c) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen

Die Vermessung der Implantationen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergab signifikante Unterschiede in Bezug auf deren Größe: So führte die Mastzelldefizienz bei weiblichen W-sh zu einer geringeren Größe der Implantationen verglichen mit jenen gleichaltriger Wildtypen. Dieses Defizit hinsichtlich der Größe konnte trotz vergleichbarer Anzahl an Implantationen mittels systemischer Rekonstitution mit BMMC ausgeglichen werden (Abb. 41).

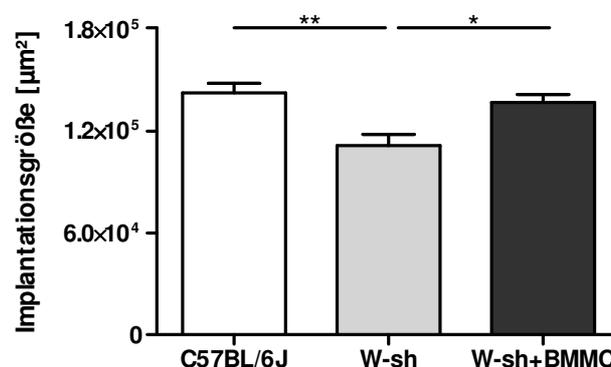


Abb. 41: Größe der Implantationen in µm<sup>2</sup> an Tag 5 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J (n=9), mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=7) sowie BMMC rekonstituierter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh+BMMC, n=4) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mittelwerte ± SD, unpaired t-Test

Um zu untersuchen, ob die signifikant kleinere Implantationsgröße bei den mastzelldefizienten W-sh auch mit einem verlangsamten Wachstum verbunden ist, wurden die Implantationen zusätzlich an Tag 6 vermessen. Auch an Tag 6 der Trächtigkeit waren die Implantationen der W-sh signifikant kleiner verglichen mit denen der Wildtypen (Abb. 42a), was auf eine verlangsamte Wachstumskinetik schließen lässt. Abb. 42 zeigt charakteristische Bilder der Implantationen von C57BL/6J und W-sh an den Tagen 5 und 6, die diese Größenunterschiede verdeutlichen.

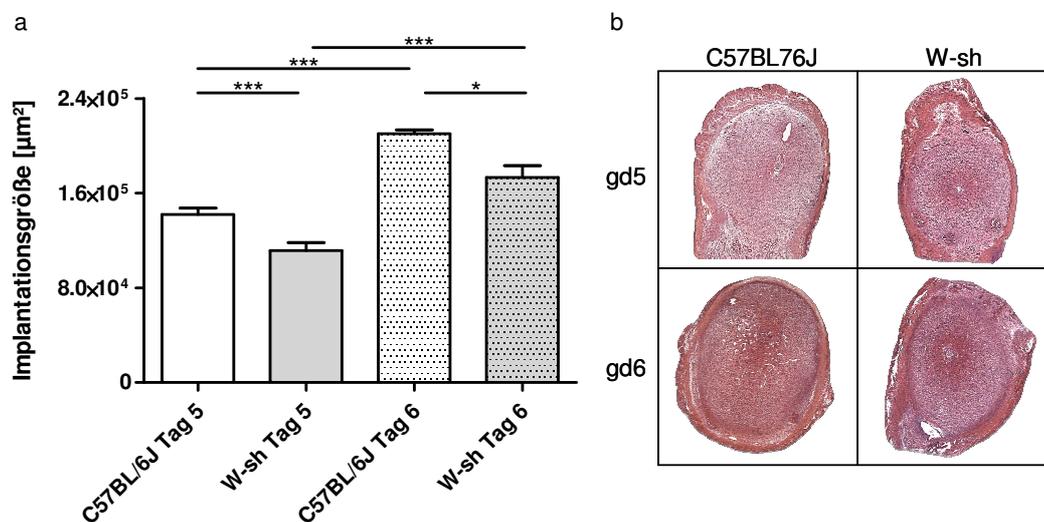
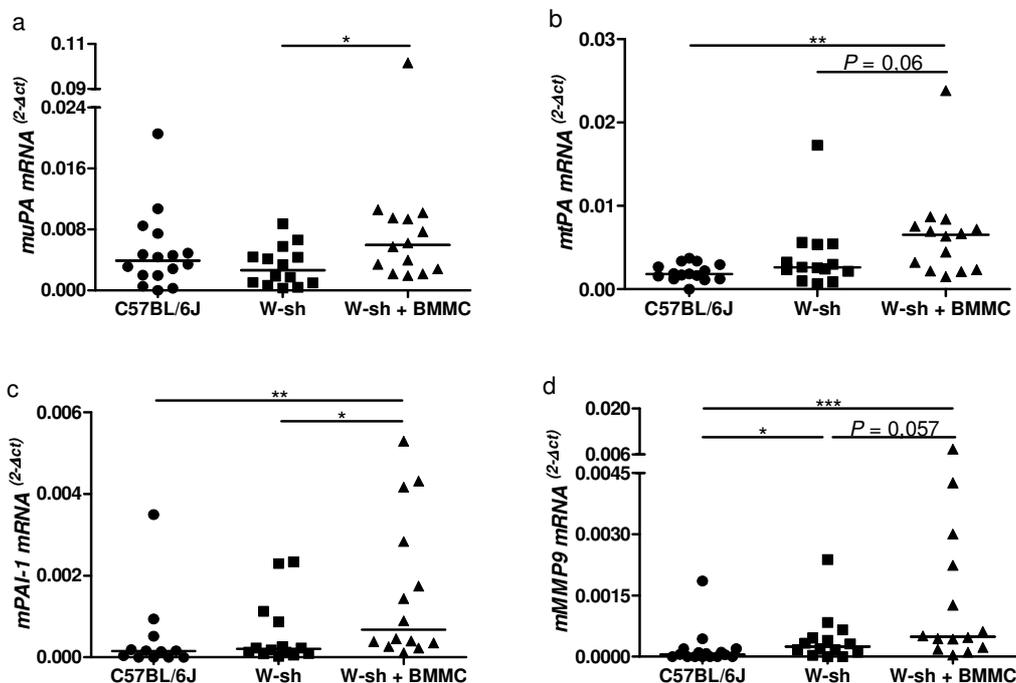


Abb. 42: (a) Größe der Implantationen in  $\mu\text{m}^2$  sowie (b) beispielhafte Aufnahmen der Implantationsgrößen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung an den Tagen 5 und 6 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J ( $n=4-9$ ) sowie mastzelldefizienter C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh,  $n=4-6$ ) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mittelwerte $\pm$ SEM, unpaired t-Test. (b)

### 3.11 Die Expression verschiedener Mastzellmediatoren, die auch für die Schwangerschaft relevant sind, war erhöht in der Dezidua nach systemischer Rekonstitution

Verschiedene Moleküle, entscheidend für Gewebeumbauprozesse und/oder Angiogenese sowie im Falle von Galektin-1 (Gal-1) für die Regulation der Toleranz gegenüber dem Fötus, wurden in der Dezidua untersucht. Sie könnten als mögliche Vermittler bzw. „Mitspieler“ des mastzellabhängigen Verlaufs der Schwangerschaft fungieren. Tatsächlich waren alle untersuchten Moleküle nach

Rekonstitution mit BMMC in W-sh höher exprimiert als die der nicht rekonstituierten W-sh (Abb. 43a-h). Trotzdem lagen die mRNA-Level einiger Moleküle bei den Wildtyp-Kontrollen und bei den W-sh entweder auf vergleichbarem Niveau (uPA, tPA, PAI-1, Gal-1; Abb. 43a-c, f) oder waren bei den BL/6 signifikant niedriger als bei den W-sh (MMP9, VEGF; Abb. 43d-e). Obgleich das Niveau von Gal-1 in der Dezidua von BL/6 und mastzelldefizienten W-sh nicht signifikant unterschiedlich war, konnte man doch einen Trend in Richtung geringerer Expression bei den W-sh (Median[ $2^{-\Delta\text{ct}}$ ]: 23,3), verglichen mit jener bei den Kontrollen (Median[ $2^{-\Delta\text{ct}}$ ]: 36,6), erkennen wohingegen der Unterschied zu den rekonstituierten W-sh signifikant ausfiel (Median[ $2^{-\Delta\text{ct}}$ ]:55,5) (Abb.f). Aufgrund dieser Ergebnisse, der bedeutend höheren generellen Expression an Gal-1 bei allen drei Gruppen im Vergleich zu sämtlichen anderen untersuchten Molekülen sowie dessen entscheidender Bedeutung für die Regulation der föto-maternalen Toleranz wurde der Einfluss von Gal-1 auf die Trächtigkeit näher untersucht (Kap. 3.15-3.19).



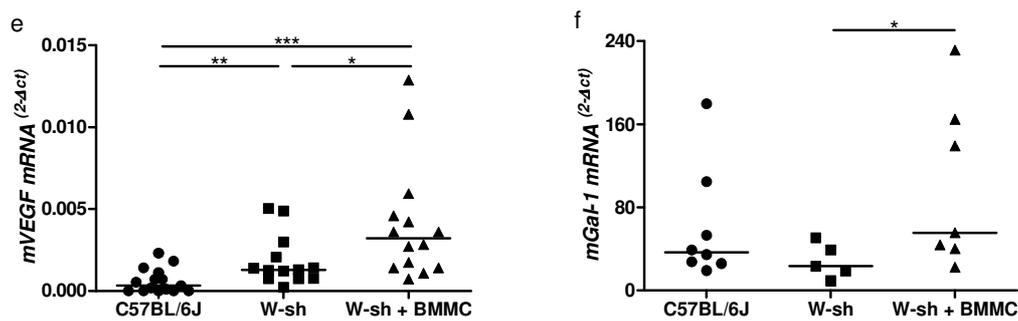


Abb. 43: Expression von murinem Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (a; *muPA*), gewebsspezifischem Plasminogen Aktivator (b; *mtPA*, tissue-type plasminogen activator), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (c; *mPAI-1*, plasminogen-activator-inhibitor), muriner Matrix-Metalloprotease 9 (d; *mMMP9*), murinem endotheliale Gefäß-Wachstumsfaktor (e; *mVEGF*, vascular endothelial growth factor), Galektin-1 (f; *Gal-1*), Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$  (g; *mTGF- $\beta$* , transforming growth factor- $\beta$ ), Bindegewebe-Wachstumsfaktor (h; *CtGF*, connective tissue growth factor) auf mRNA-Ebene in Dezidua von weiblichen C57BL/6J ( $n=8-16$ ), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh,  $n=5-14$ ) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC,  $n=7-14$ ) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test

### 3.12 Die Rekonstitution mit Mastzellen war verbunden mit einem positiven Zusammenspiel der Moleküle TGF- $\beta$ und CtGF sowie Mcpt-8 und TGF- $\beta$ bzw. CtGF in der Dezidua

Neben den zuvor beschriebenen Mediatoren wurde die Expression zweier Zytokine (TGF- $\beta$  und CtGF) ermittelt, deren Funktionen sowie Interaktion miteinander die mastzellenspezifische Wirkung an der föto-maternalen Grenzfläche beeinflussen könnte. Sowohl TGF- $\beta$  (Abb. 44a) als auch CtGF (Abb. 44b) waren in der Dezidua mastzelldefizienter W-sh signifikant niedriger exprimiert als bei den Kontrollen. Die Rekonstitution mit BMMC führte zu einem deutlichen Anstieg der Expression beider Zytokine auf vergleichbares Niveau der Wildtypen.

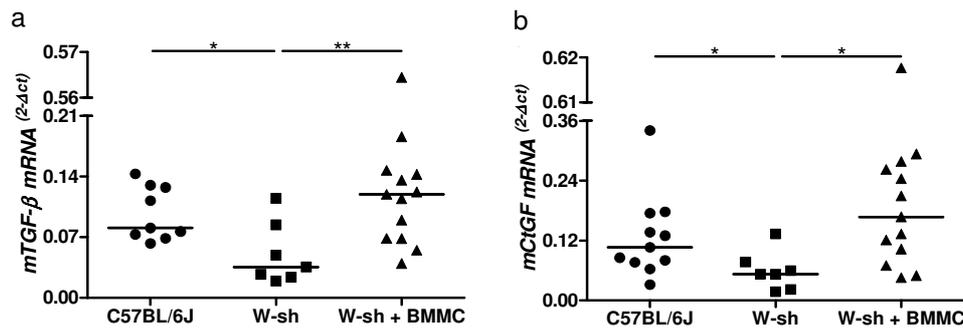
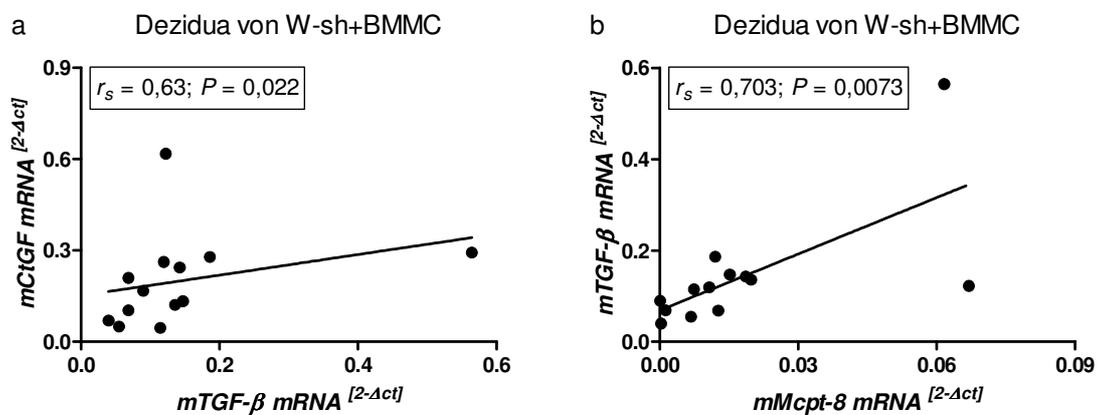


Abb. 44: Expression von murinem Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$  (a; mTGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ) und Bindegewebe-Wachstumsfaktor (b; CtGF, connective tissue growth factor) auf mRNA-Ebene in Dezidua von weiblichen C57BL/6J ( $n=9-11$ ), C57BL/6J-Ki<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh,  $n=7$ ) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Ki<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC,  $n=13$ ) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test

Die mögliche Beteiligung der Zytokine TGF- $\beta$  und CtGF am mastzellspezifischen Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf wurde durch Korrelationstests verdeutlicht. Die Rekonstitution von W-sh mit BMMC und damit auch deren entscheidender Einfluss auf die Plazentation bzw. Modifizierung der Spiralarterien war verbunden mit einem positiven Zusammenspiel folgender Moleküle: Je höher TGF- $\beta$  exprimiert wurde, umso stärker war auch die Expression von CtGF (Abb. 45a). Ebenso konnte ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Mcpt-8 und TGF- $\beta$  (Abb. 45b) bzw. CtGF (Abb. 45c) ermittelt werden: Der Anstieg an Mcpt-8 auf mRNA-Ebene war verbunden mit einer Erhöhung an TGF- $\beta$  bzw. CtGF.



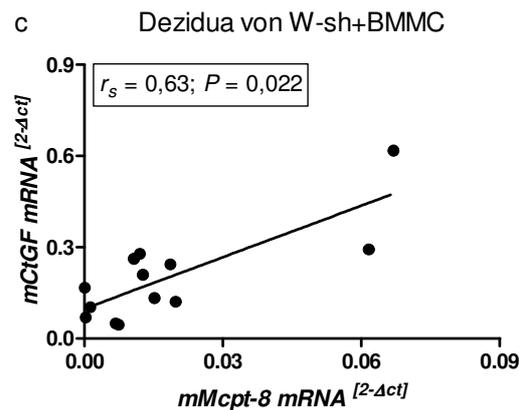


Abb. 45: Korrelationen von TGF- $\beta$  mit CtGF (a) sowie Mcpt-8 mit TGF- $\beta$  (b) bzw. CtGF (c) in der Dezidua von rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC, n=13) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Spearman Test

### **3.13 Mastzellen exprimieren TGF- $\beta$ sowie dessen Rezeptor, jedoch kein CtGF, das aber in Plazentaprobe nachgewiesen werden konnte**

Angesichts der signifikant höheren Expressionen an TGF- $\beta$  und CtGF bei W-sh nach Rekonstitution mit BMMC (Abb. 45a-b) und aufgrund des positiven Zusammenhangs zwischen TGF- $\beta$  und CtGF (Abb. 45a) sowie Mastzell-Protease-8 und TGF- $\beta$  (Abb. 45b) bzw. CtGF (Abb. 45c) wurde nach der Quelle der beiden Wachstumsfaktoren auf Protein-Ebene gesucht. Als Proben dienten hierbei die murine Trophoblastenzelllinie SM9-2, eine Plazenta sowie BMMC von BL/6. TGF- $\beta$  wurde sowohl von den BMMC als auch von den Trophoblasten exprimiert, obgleich letztere das Protein als latente Form (zu erkennen an der Doppelbande) bildeten. CtGF hingegen wurde lediglich in den SM9-2 sowie der Plazenta exprimiert, die somit die Hauptquelle für dieses Protein darstellten. Während der Rezeptor für TGF- $\beta$  sowohl bei den Trophoblasten als auch in der Plazenta nicht nachweisbar war, konnte dessen Synthese von den Mastzellen belegt werden. Als Referenz diente  $\beta$ -Aktin, welches trotz gleicher Menge an aufgetragenem Protein von den BMMC stärker exprimiert wurde als von den Trophoblasten (Abb. 46). Aufgrund des bekannten Einflusses von TGF- $\beta$  auf entscheidende schwangerschaftsrelevante Prozesse wie Angiogenese und Gewebeumbau

(Roberts *et al.* 1996) könnten Mastzellen durch ihre Expression an TGF- $\beta$  in diese Prozesse involviert sein.

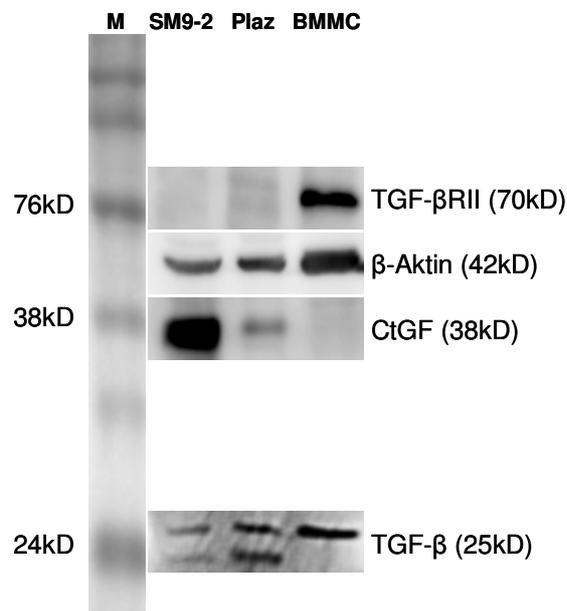


Abb. 46: Überprüfung der Expression von TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$ ), CtGF (connective tissue growth factor, Bindegewebe-Wachstumsfaktor), TGF- $\beta$ RII (transforming growth factor- $\beta$  Rezeptor II, Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$  Rezeptor II) und  $\beta$ -Aktin auf Protein-Ebene in Kilodalton (kD) mittels Western Blot in murinen Trophoblasten (SM9-2) sowie Plazenta (Plaz.) und Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC) von C57BL/6J. Auf der linken Seite ist der Marker (M) abgebildet.

### **3.14 Periphere Natürliche Killerzellen, dendritische Zellen sowie zytotoxische T-Zellen waren an der mastzellspezifischen Wirkung nicht beteiligt**

Die Mastzelldefizienz bei W-sh-Mäusen ist auf eine eingeschränkte *c-Kit* Genexpression zurückzuführen (Berrozpe *et al.* 1999). Allerdings benötigen weitere hämatopoetische Stammzellen den Liganden des c-Kit Rezeptors (SCF) für ihr Wachstum. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit einige Immunzellpopulationen hinsichtlich ihrer Quantität in verschiedenen Organen untersucht. Periphere Natürliche Killerzellen (Tab. 5), Dendritische Zellen (Tab. 6) sowie zytotoxische T-Zellen (Tab. 7) schienen auf die mastzellspezifische Wirkung keinen entscheidenden Einfluss auszuüben, da der Anteil der verschiedenen Zelltypen in den untersuchten Organen vergleichbare Niveaus erreichte. Somit

konnte sowohl ein systemischer als auch ein lokaler Effekt dieser Immunzellen ausgeschlossen werden.

Tab. 5: Anzahl an peripheren Natürlichen Killerzellen (Median in %) nach durchflusszytometrischer Analyse der CD49b-positiven Zellen in verschiedenen Organen wie Milz, inguinalen Lymphknoten (LK), axillären LK, mesenterischen LK, para-aortalen LK, Blut und Dezidua von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC (W-sh+BMMC) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; signifikante Unterschiede (P) mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt

Organ	Natürliche Killerzellen (%)			P
	(a) C57BL/6J	(b) W-sh	(c) W-sh+BMMC	
Milz	3,93	3,05	1,83 **, ***	** zu (b) *** zu (a)
inguinale LK	1,01	0,85	0,33 **, **	** zu (b) ** zu (a)
axilläre LK	1,38	0,84	0,5 ***	*** zu (a)
mesenterische LK	1,0	0,56*	0,51 **	** zu (a) * zu (a)
para-aortale LK	0,96	0,73	0,17 **, **	** zu (b) ** zu (a)
Blut	6,11	6,29	5,04	
Dezidua	2,82	4,69 *	2,62	* zu (a und c)

Tab. 6: Anzahl an aktivierten dendritischen Zellen (Median in %) nach durchflusszytometrischer Analyse der CD11c/MHCII-positiven Zellen in verschiedenen Organen wie Milz, inguinalen Lymphknoten (LK), axillären LK, mesenterischen LK, para-aortalen LK, Blut und Dezidua von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC (W-sh+BMMC) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; signifikante Unterschiede (P) mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt

Organ	Dendritische Zellen (%)			P
	(a) C57BL/6J	(b) W-sh	(c) W-sh+BMMC	
Milz	5,98	4,88	5,62	
inguinale LK	9,45	3,77	5,87	
axilläre LK	10,66	2,82 *	7,94 *	* zu (b) * zu (a)
mesenterische LK	9,9	2,86	5,91	* zu (b)
para-aortale LK	5,15	4,65	5,92	
Blut	7,12	2,44	4,16	* zu (a)
Dezidua	2,96	1,22	2,42	

Tab. 7: Anzahl an zytotoxischen T-Zellen (Median in %) nach durchflusszytometrischer Analyse der CD8-positiven Zellen in verschiedenen Organen wie Milz, inguinalen Lymphknoten (LK), axillären LK, mesenterischen LK, para-aortalen LK, Blut und Dezidua von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC (W-sh+BMMC) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; signifikante Unterschiede (P) mittels Mann-Whitney-U Test bestimmt

Organ	Zytotoxische T-Zellen (%)			P
	(a) C57BL/6J	(b) W-sh	(c) W-sh+BMMC	
Milz	9,57	9,4	10,66	
inguinale LK	22,97 *	31,77	28,68	* zu <sup>(b)</sup>
axilläre LK	26,59 *, **	36,15	33,83	* zu <sup>(b)</sup> ** zu <sup>(c)</sup>
mesenterische LK	24,63	27,58	26,29	
para-aortale LK	19,99	24,74	24,015	
Blut	19,3 **	27,41	28,48	** zu <sup>(b)</sup> ** zu <sup>(c)</sup>
Dezidua	1,3	1,25	2,0	

### 3.15 Mastzellen exprimieren Galektin-1

Die Western Blot Analyse von Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC) aus C57BL/6J ergab eine starke Expression auf Proteinebene an Gal-1. Als Negativkontrolle bzw. zur Bestätigung des Mangels an Gal-1 dienten BMMC aus Gal-1-defizienten Weibchen (*Lgals1*<sup>-/-</sup>). Um speziell bei der Negativkontrolle das generelle Vorhandensein von Proteinen nachzuweisen, wurde  $\beta$ -Aktin als "house keeping gene" eingesetzt und dessen Expression bestätigt (Abb. 47a). Ein zusätzlicher Beweis der Expression von Gal-1 in C57BL/6J BMMC wurde mittels Immunhistochemie erbracht (Abb. 47b). Nach aktuellem Kenntnisstand stellt dies die erste Beschreibung der Expression von Galektin-1 in Mastzellen dar, die aus weiblichen C57BL/6J Mäusen generiert wurden.

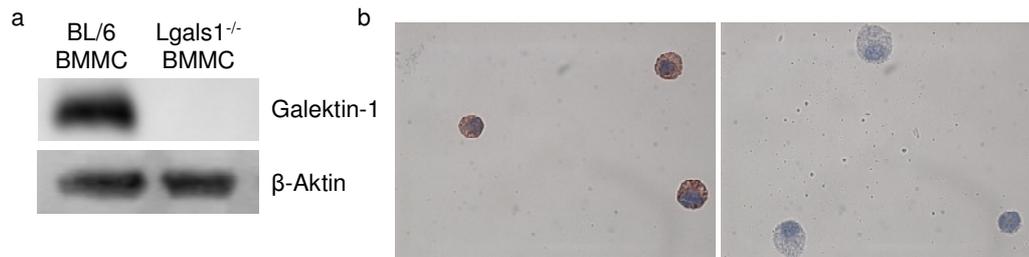


Abb. 47: Bestätigung der Expression von Galektin-1 und  $\beta$ -Aktin auf Protein-Ebene mittels Western Blot (a) in Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC) von C57BL/6J (BL/6) sowie Gal-1-defizienten (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) Weibchen sowie mittels Immunhistochemie (b) in Knochenmark-generierten Mastzellen von weiblichen C57BL/6J mit Negativkontrolle (1000fache Vergrößerung)

### 3.16 Von Mastzellen gebildetes Galektin-1 ist essentiell für einen positiven Schwangerschaftsverlauf

Das Fehlen von Galektin-1 in dafür defizienten Weibchen (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) schien keinen negativen Einfluss auf die Anzahl an implantierten Blastozysten an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen zu haben, da sie sich im Median auf gleichem Niveau befand wie jene der Kontrollgruppe. Jedoch führte die Defizienz an Galektin-1 zu einer Erhöhung der Abortrate auf 18,75 % im Median gegenüber 0 % bei den BL/6 Weibchen. Interessanterweise konnte die erhöhte Abortrate durch den Transfer von Galektin-1-exprimierenden BMMC (Abb. 47a) auf 0 % reduziert werden (Tab. 8). Dies deutet auf die Relevanz von Mastzell-abstammendem Gal-1 für einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Schwangerschaft hin.

Nach Bestätigung der Expression von Gal-1 in BL/6-BMMC sowie dessen vollständigem Mangel in BMMC, generiert aus Gal-1-defizienten Weibchen (*Lgals1*<sup>-/-</sup>, Abb. 47a), wurde die systemische Rekonstitution von W-sh wiederholt, allerdings mit *Lgals1*<sup>-/-</sup>-BMMC. Dieser Transfer hatte fatale Konsequenzen für den Schwangerschaftsverlauf, denn er resultierte in einer Abortrate von 100 % im Median. Diese hohe Anzahl an abgestoßenen Embryonen bzw. Föten war signifikant verglichen mit allen übrigen Gruppen. Besondere Aufmerksamkeit galt hier dem Unterschied zu jenen W-sh, die mit BMMC aus BL/6 rekonstituiert wurden (Median 18,2 %). Diese BMMC waren gekennzeichnet durch eine starke Expression an Gal-1, wohingegen die Gruppe mit der höchsten Abortrate (Median

100 %) BMMC erhielt, bei denen dieses Protein nicht nachweisbar war (Abb. 47a). Zur visuellen Verdeutlichung dienen die in Abb. 48 dargestellten Uteri aus den entsprechenden Gruppen mit den markierten Aborten.

Die Rekonstitution mit *Lgals1*<sup>-/-</sup>-BMMC führte allerdings zu keinen signifikanten Unterschieden in Bezug auf die Implantationsrate im Vergleich zu den mastzelldefizienten Weibchen, die BMMC aus BL/6 erhalten hatten. Ebenso waren Mittelwerte und Mediane der implantierten Blastozysten pro Weibchen mit allen anderen Gruppen vergleichbar. Eine Ausnahme hierzu bildeten die nicht rekonstituierten W-sh, welche die niedrigste Anzahl an Implantationen aufwiesen, auch wenn dieser Unterschied keine Signifikanz erreichte. Galektin-1 scheint daher für später einsetzende Prozesse und somit für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft entscheidend zu sein, in dem es die Plazentation und folglich die Versorgung und Gewährleistung des Überlebens des Fötus beeinflusst.

Tab. 8: Totale Anzahl, Mittelwert und Median an Implantationen pro Weibchen sowie Abortrate in % (Median) von C57BL/6J <sup>(a)</sup>, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> <sup>(b)</sup>, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC, generiert von C57BL/6J <sup>(c)</sup>, *Lgals1*<sup>-/-</sup> <sup>(d)</sup>, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC, generiert von *Lgals1*<sup>-/-</sup> <sup>(e)</sup> sowie *Lgals1*<sup>-/-</sup> + BMMC, generiert von C57BL/6J <sup>(f)</sup> nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; signifikante Unterschiede (P) in Bezug auf die Abortrate bestimmt mittels Mann-Whitney-U Test

Versuchsgruppe	Implantationen/Weibchen (Mittelwert/Median)	Abortrate (Median in %)	P
<sup>(a)</sup> C57BL/6J	73/10 (7,3; 9)	0	
<sup>(b)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	40/10 (4; 3)	0	
<sup>(c)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + C57BL/6J-BMMC	59/9 (6,6; 6,8)	18,2	* zu (a) ** zu (b)
<sup>(d)</sup> <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	72/10 (7,2; 9,5)	18,8	* zu (b)
<sup>(e)</sup> C57BL/6J-Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> + <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup> -BMMC	35/6 (5,8; 5,5)	100	* zu (d) * zu (c) ** zu (b) ** zu (a)
<sup>(f)</sup> <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup> + C57BL/6J-BMMC	68/9 (5,7; 9)	0	** zu (c) * zu (d) ** zu (e)

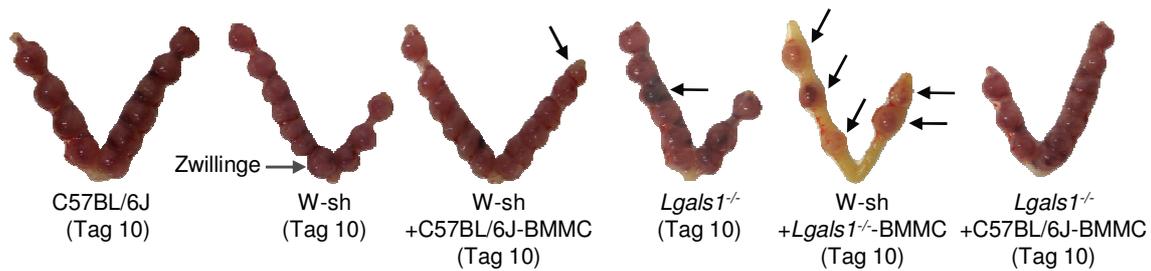


Abb. 48: Exemplarische Aufnahmen der Uteri von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC, generiert von C57BL/6J, Lgals1<sup>-/-</sup>, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC, generiert von Lgals1<sup>-/-</sup> sowie Lgals1<sup>-/-</sup> + BMMC, generiert von C57BL/6J nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Kennzeichnung der Aborte durch schwarze Pfeile

### 3.17 Von Mastzellen gebildetes Galektin-1 ist essentiell für die Entwicklung der Plazenta und die Modifikation der Spiralarterien

Die Defizienz an Gal-1 führte zwar bei Lgals1<sup>-/-</sup> Weibchen an Tag 10 der Trächtigkeit zu signifikant größer ausgebildeten Plazenten, verglichen mit den Plazenten normaler Größe in der Kontrollgruppe (Abb. 49), allerdings waren diese gekennzeichnet durch eine ungewöhnliche Morphologie: Das Areal der Riesenzellen erreichte deutlich stärkere Ausmaße gegenüber jenem der BL/6, wobei die Zellen *per se* augenscheinlich keine pathologischen Modifikationen aufwiesen. Während die Schicht der Spongiotrophoblasten nicht auffallend verändert zu sein schien, war jedoch das Labyrinth-Areal entweder erheblich reduziert oder aber nicht angelegt (Abb. 50). Dies könnte sich nachteilig auf die Versorgung des Fötus mit Sauerstoff und Nährstoffen auswirken, da in dieser Zone der Austausch zwischen maternalem und fötalem Blut stattfindet. Durch einen Transfer von BMMC, die aus Wildtypen generiert wurden und somit eine beachtliche Menge an Galektin-1 exprimierten (Abb. 47), verkleinerte sich die Schicht der Riesenzellen bei den Gal-1-defizienten Weibchen auf eine vergleichbare Größe wie bei den C57BL/6J (Abb. 52). Ebenso waren die Areale der Spongiotrophoblasten und der Labyrinthzellen nach dem wt-BMMC-Transfer ähnlich stark ausgebildet, und die Größe der Plazenta erreichte ein vergleichbares Niveau zu jenem der Wildtypen (Abb. 49).

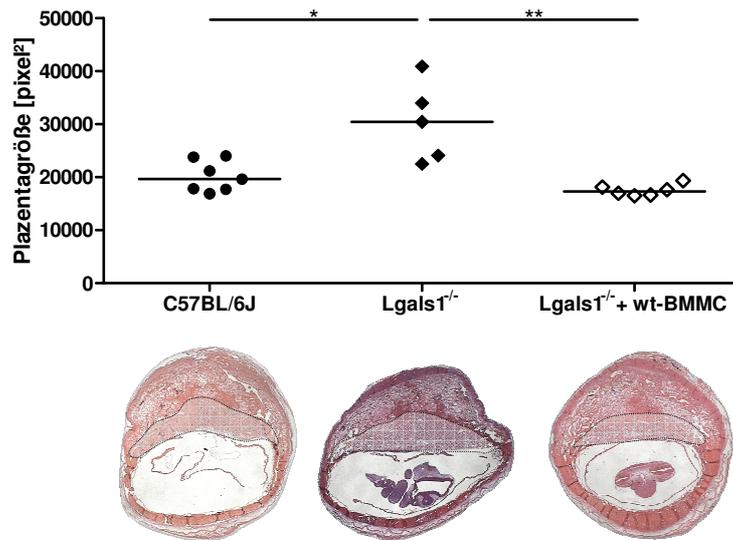


Abb. 49: Größe der Plazenten an Tag 10 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J (n=7), Gal-1-defizienter Weibchen ( $Lgals1^{-/-}$ , n=5) sowie Gal-1-defizienter, mit C57BL/6J-BMMC transferierter Weibchen ( $Lgals1^{-/-}$  + wt-BMMC, n=6) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen mit exemplarischen Aufnahmen der entsprechenden Implantationseinheiten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie vermessenem Plazenta-Areal im Transversalquerschnitt (10fache Vergrößerung); Mediane, Mann-Whitney-U Test

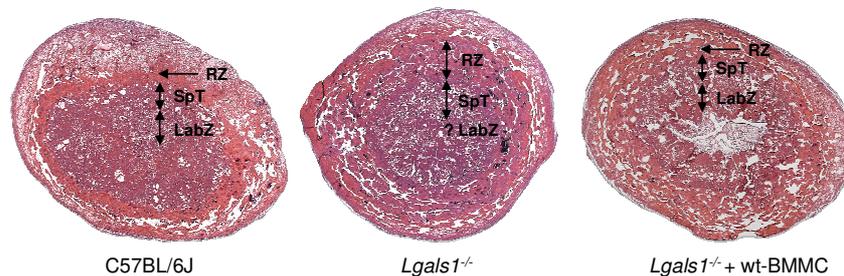
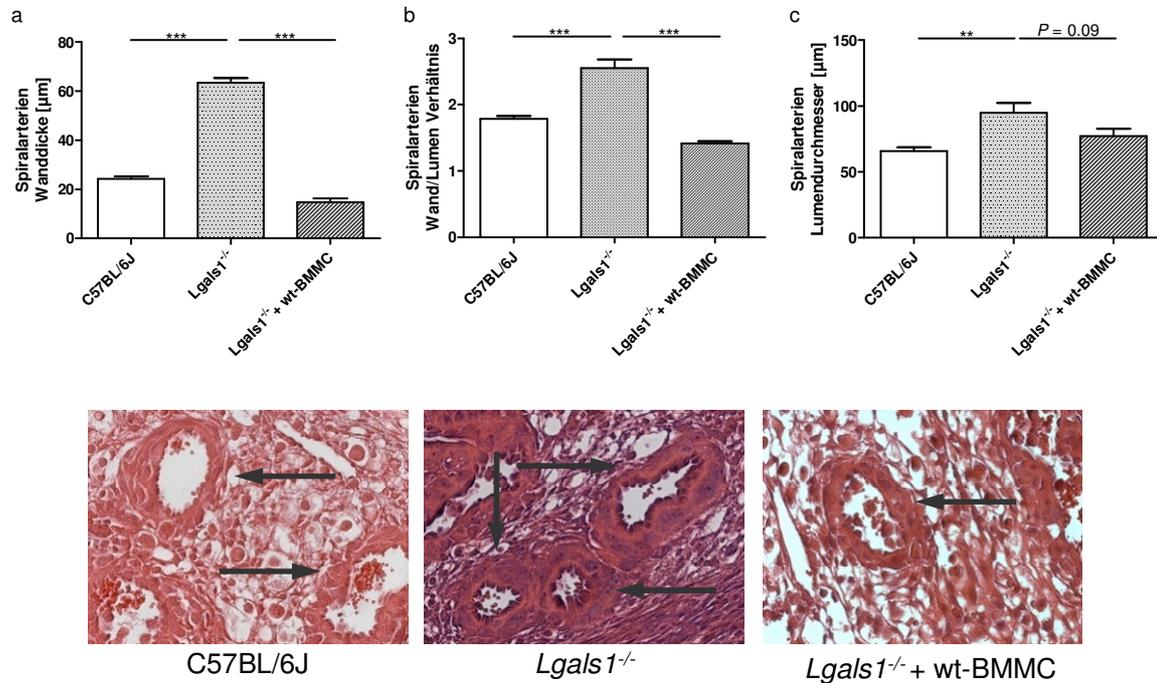


Abb. 50: Exemplarische Aufnahmen der Plazenten im Längsquerschnitt nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (25fache Vergrößerung) von C57BL/6J, Gal-1-defizienter Weibchen sowie Gal-1-defizienter, mit C57BL/6J-BMMC transferierter Weibchen an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Kennzeichnung der Areale: RZ=Riesenzellen, SpT=Spongiotrophoblasten, LabZ=Labyrinthzellen, ?=nicht vorhanden

Zudem ergab die Vermessung der in der *Decidua basalis* lokalisierten Spiralarterien von Gal-1-defizienten Weibchen signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen: Zwar war das Lumen der Arterien deutlich vergrößert (Abb. 51c), allerdings führte die Defizienz an Gal-1 auch zu einer Zunahme der Dicke der Gefäßwand (Abb. 51a). Dadurch stieg das Verhältnis von Wand zu Lumen höchst signifikant gegenüber jenem der BL/6 an (Abb. 51b). Interessanterweise konnten alle Parameter durch den Transfer von Gal-1-exprimierenden BMMC „normalisiert“ werden und erreichten vergleichbare

Niveaus zu den Kontrollen. Die in *Abb. 51* dargestellten Aufnahmen der Spiralarterien unterhalb der Graphen von weiblichen C57BL/6 sowie *Lgals1*<sup>-/-</sup> und *Lgals1*<sup>-/-</sup> + wt-BMMC illustrieren diese deutlichen Unterschiede.



*Abb. 51:* Größe von Wanddicke (a), Wand/Lumen Verhältnis (b) sowie Lumendurchmesser (c) von 3-8 Spiralarterien in der Decidua basalis an Tag 10 der Trächtigkeit weiblicher C57BL/6J ( $n=8$ ), Gal-1-defizienter Weibchen (*Lgals1*<sup>-/-</sup>,  $n=5$ ) sowie Gal-1-defizienter, mit C57BL/6J-BMMC transferierter Weibchen (*Lgals1*<sup>-/-</sup> + wt-BMMC,  $n=6$ ) nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen mit exemplarischen Aufnahmen der entsprechenden, mit Pfeilen markierten Spiralarterien nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (400fache Vergrößerung); Mittelwerte $\pm$ SD, unpaired t-Test

Die Rekonstitution von mastzelldefizienten W-sh mit BMMC, generiert aus Gal-1-defizienten Weibchen (*Lgals1*<sup>-/-</sup>), resultierte in einer ungewöhnlich breiten Schicht an Riesenzellen wie sie auch in den Plazenten der *Lgals1*<sup>-/-</sup> an Tag 10 der Trächtigkeit vorzufinden war, wodurch sich die Areale sowohl der Spongiotrophoblasten als auch der Labyrinthzellen stark verkleinerten (*Abb. 50*). Während bei den ersten drei Gruppen (C57BL/6J, W-sh, W-sh+C57BL/6J-BMMC) bereits die sich dem Areal der Riesenzellen anschließende Schicht der Spongiotrophoblasten erkennbar war, füllten die Riesenzellen sowohl bei den *Lgals1*<sup>-/-</sup> als auch bei den W-sh, die Gal-1-defiziente BMMC erhalten haben, fast den gesamten Bildausschnitt aus (*Abb. 52*). Zudem wiesen die Riesenzellen pathologische Veränderungen in Form von Vakuolen auf; ihre Verteilung erschien inhomogen, verbunden mit großen interstitiellen Zwischenräumen (*Abb. 53*). Diese

morphologischen Veränderungen lassen auf eine eingeschränkte Funktionalität der Plazenta schließen und somit auf eine limitierte Versorgung des Föten.

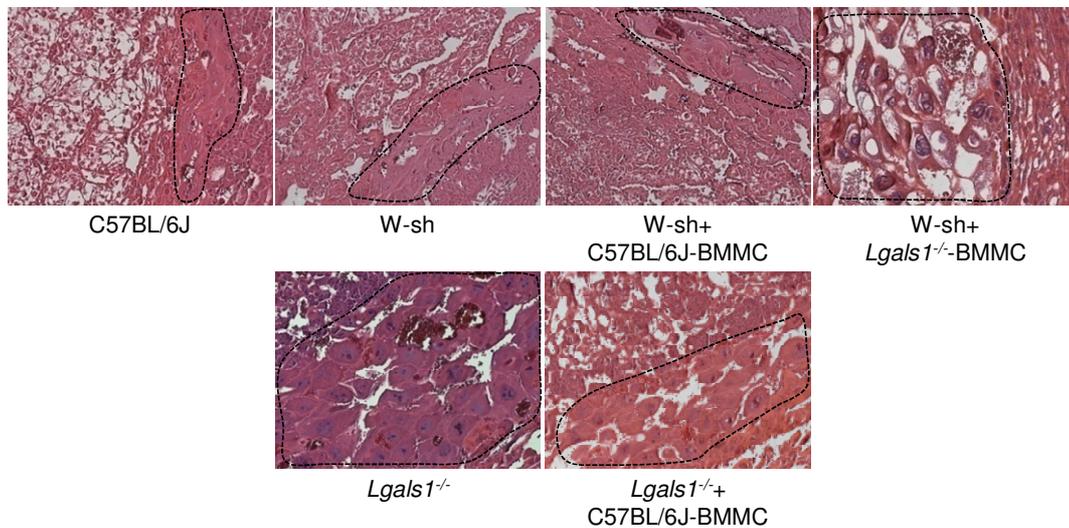


Abb. 52: Exemplarische Aufnahmen der Riesenzell-Zonen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (200fache Vergrößerung) in den Plazenten von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC, generiert von C57BL/6J, C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> + BMMC, generiert von Lgals1<sup>-/-</sup>, Lgals1<sup>-/-</sup> sowie Lgals1<sup>-/+</sup> + BMMC, generiert von C57BL/6J an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen

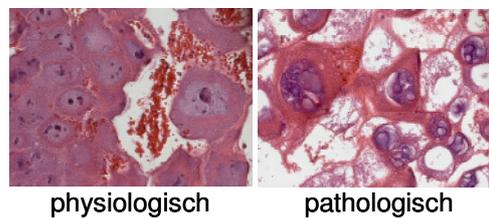


Abb. 53: Beispielhafte Aufnahmen (400fache Vergrößerung) von physiologisch auftretenden Riesenzellen gekennzeichnet u.a. durch ihre Mehrkernigkeit sowie deren pathologische Veränderungen nach Rekonstitution von W-sh mit Gal-1-defizienten BMMC an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen

### **3.18 Galektin-1 ist notwendig für die Migration und/oder lokale Proliferation von Mastzellen nach systemischer Rekonstitution**

Die Bestätigung der Migration von BMMC, generiert aus C57BL/6J Weibchen, nach systemischem Transfer in mastzelldefiziente W-sh wurde bereits in Kap. 3.5 erbracht. Diese durchflusszytometrische Analyse wurde nun mit jener von W-sh Weibchen verglichen, die systemisch mit BMMC aus Gal-1-defizienten Weibchen rekonstituiert wurden. Überraschenderweise resultierte die Defizienz an Galektin-1 in den BMMC in einer signifikanten, prozentual geringeren Menge an Mastzellen in

den inguinalen und para-aortalen Lymphknoten sowie der Dezidua, verglichen mit der Anzahl an CD117/FcεRIα-positiven Zellen in den entsprechenden Organen derjenigen W-sh, die C57BL/6J-BMMC erhalten hatten und demnach auch der Wildtyp-Kontrollen (Abb. 54a-d). Möglicherweise fungiert Galektin-1 als entscheidender Mediator für die Migration und/oder lokale Proliferation von Mastzellen.

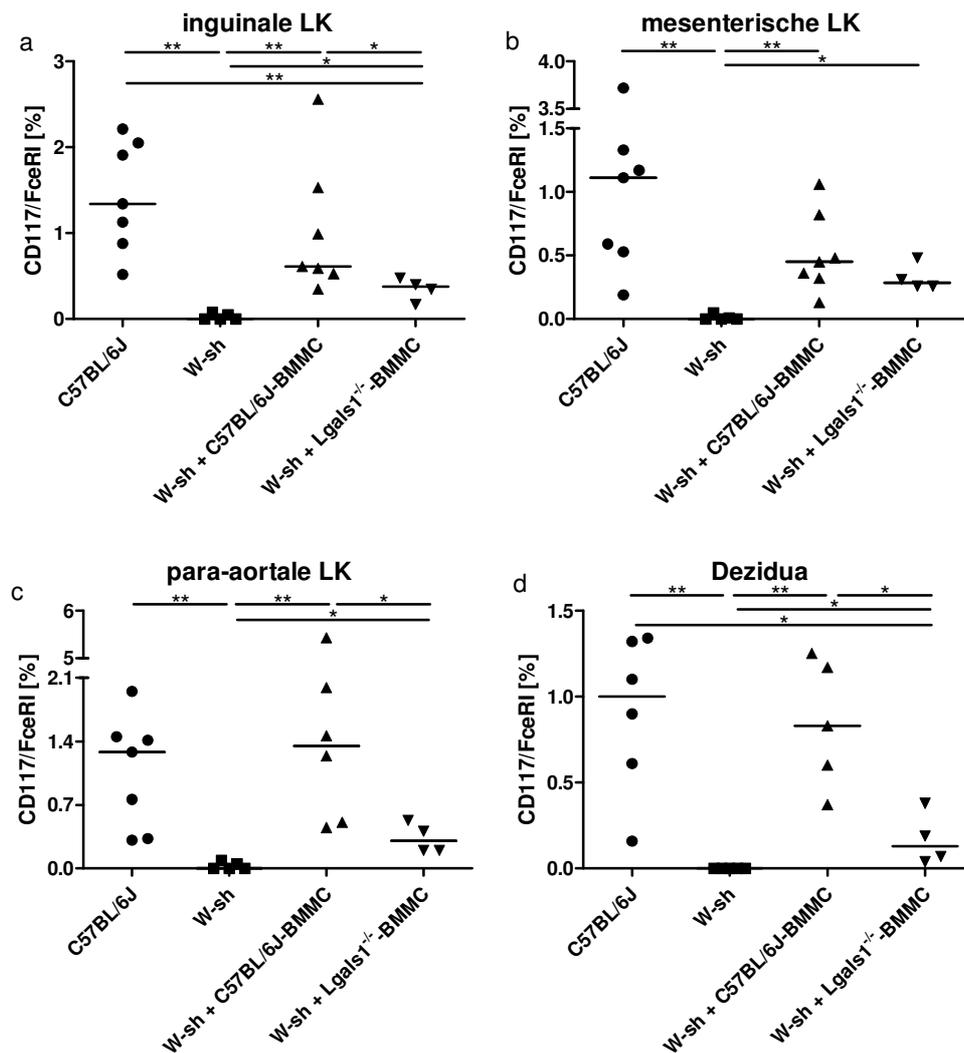


Abb. 54: Durchflusszytometrische Analyse von Mastzellen (CD117/FcεRIα) in inguinalen (a), mesenterischen (b) und para-aortalen (c) Lymphknoten sowie Dezidua (d) von weiblichen C57BL/6J (n=6-7), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=5), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> rekonstituiert mit C57BL/6J-BMMC (W-sh+C57BL/6J-BMMC, n=5-7) sowie C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> rekonstituiert mit Lgals1<sup>-/-</sup>-BMMC (W-sh+ Lgals1<sup>-/-</sup>-BMMC, n=4) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test

### **3.19 Galektin-1 ist entscheidend für die Proliferation von Mastzellen**

Mastzellen, generiert aus C57BL/6J und *Lgals1*<sup>-/-</sup> (gefärbt mit CFDA-SE) wurden jeweils allein oder zusammen mit Trophoblasten (SM9-2, gefärbt mit PKH26) kultiviert und im Hinblick auf ihre Fähigkeit der Proliferation verglichen. Während die Proliferation der *Lgals*<sup>-/-</sup>-BMMC im Vergleich zu den C57BL/6J-BMMC (Mittelwert 29 %) nach 24 Stunden mit 7,9 % im Mittel signifikant geringer ausfiel, konnte dieser Unterschied nach 48 Stunden wieder ausgeglichen werden (Mittelwert 44,1 % zu 43,4 %). Die Präsenz von Trophoblasten in der Kultur führte bei den C57BL/6J-BMMC sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu keinen Veränderungen in Bezug auf deren Proliferationsrate verglichen mit der alleinigen Kultur. Hingegen schien sich der Mangel an Galektin-1 in den *Lgals*<sup>-/-</sup>-BMMC bzw. die Anwesenheit von Trophoblasten negativ auf deren Zellteilung auszuwirken: So erhöhte sich zwar die Prozentzahl an proliferierten Mastzellen von 5 % nach 24 Stunden auf 29 % nach 48 Stunden, jedoch fiel die Fähigkeit der Teilung von Beginn an signifikant geringer aus im Vergleich zu den BMMC, die aus C57BL/6J generiert wurden (27 % nach 24 Stunden, 43 % nach 48 Stunden) und erreichte zu keinem Zeitpunkt deren Niveau (*Abb. 55*). Zur visuellen Verdeutlichung der Unterschiede zwischen beiden BMMC-Gruppen im Hinblick auf deren Proliferation dienen exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (200fache Vergrößerung). Die BMMC wurden mit CFDA-SE gefärbt und erschienen grün während die Inkubation der Trophoblasten mit dem Farbstoff PKH26 erfolgte, wodurch diese rot fluoreszierten (*Abb. 56*).

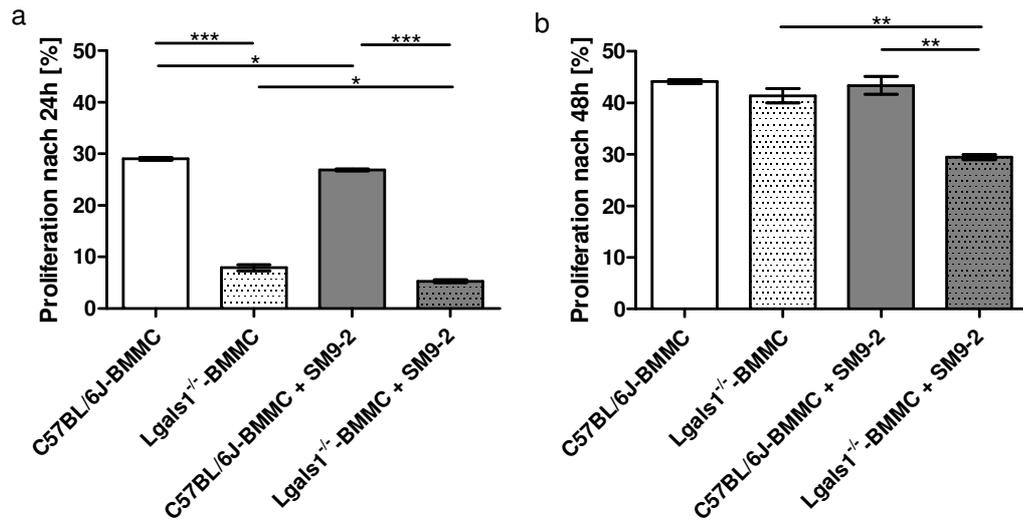


Abb. 55: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation (%) von allein, oder zusammen mit PKH26-angefärbten Trophoblasten (SM9-2, 50.000 Zellen), kultivierten, CFDA-SE-gefärbten BMMC (100.000 Zellen, Triplikate), generiert entweder aus C57BL/6J oder Lgals<sup>-/-</sup> Weibchen nach 24 (a) und 48 Stunden (b) Kultur; Mittelwerte±SEM, unpaired t-Test (zwischen den Gruppen), paired t-Test (innerhalb der Gruppen)

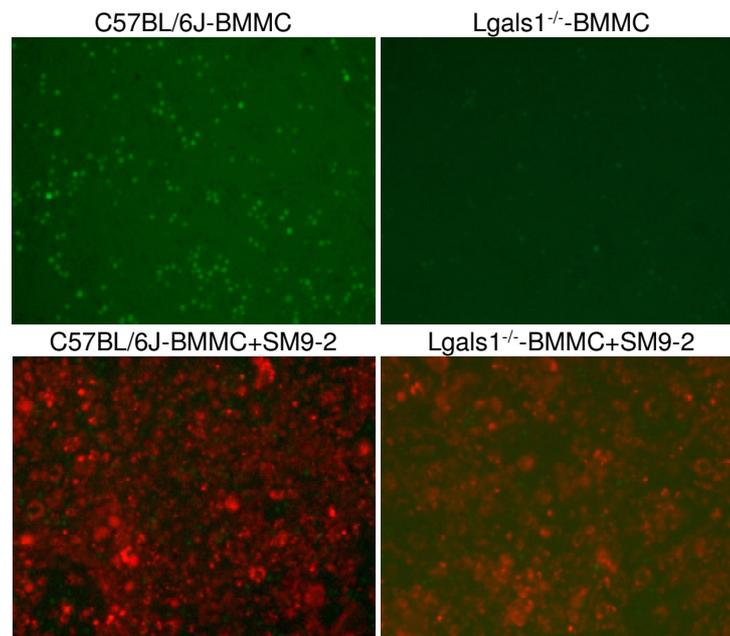


Abb. 56: Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CFDA-SE-gefärbten BMMC (generiert entweder aus C57BL/6J oder Lgals<sup>-/-</sup> Weibchen) nach Kultivierung mit PKH26 gefärbten Trophoblasten (SM9-2) zur Verdeutlichung des Unterschiedes in Bezug auf deren Proliferation; 200fache Vergrößerung

### 3.20 Die Mastzelldefizienz führte zu einer Erhöhung von uterinen Natürlichen Killer-Zellen

Aufgrund des offensichtlichen Einflusses von Mastzellen auf schwangerschaftsrelevante Prozesse, wie Plazentation und Modifikation der Spiralarterien, scheinen sie sich mit uterinen NK-Zellen (uNK) ähnliche Funktionen zu teilen. Ebenso ist eine Vielzahl ihrer gebildeten Mediatoren mit denen der uNK identisch. Für die Untersuchung einer möglichen lokalen Beteiligung von uNK an dem offensichtlichen Einfluss von Mastzellen auf die o.g. Prozesse wurde die DBA Lektin Färbung verwendet. Interessanterweise führte der Mangel an Mastzellen zu einer erhöhten Anzahl an uNK, wohingegen sich ihre Anzahl bei den Wildtypen sowie bei den rekonstituierten W-sh auf vergleichbar niedrigerem Niveau befand (Abb. 57a). Der möglicherweise aufgrund eines Kompensationsmechanismus hervorgerufene Unterschied wird durch die unterhalb der Grafik eingefügten exemplarischen Aufnahmen DBA Lektin-gefärbter Implantationen deutlich (Abb. 57b). Somit schienen uNK als Vertreter des angeborenen Immunsystems offensichtlich lokal auf die mastzellspezifischen Veränderungen zu reagieren.

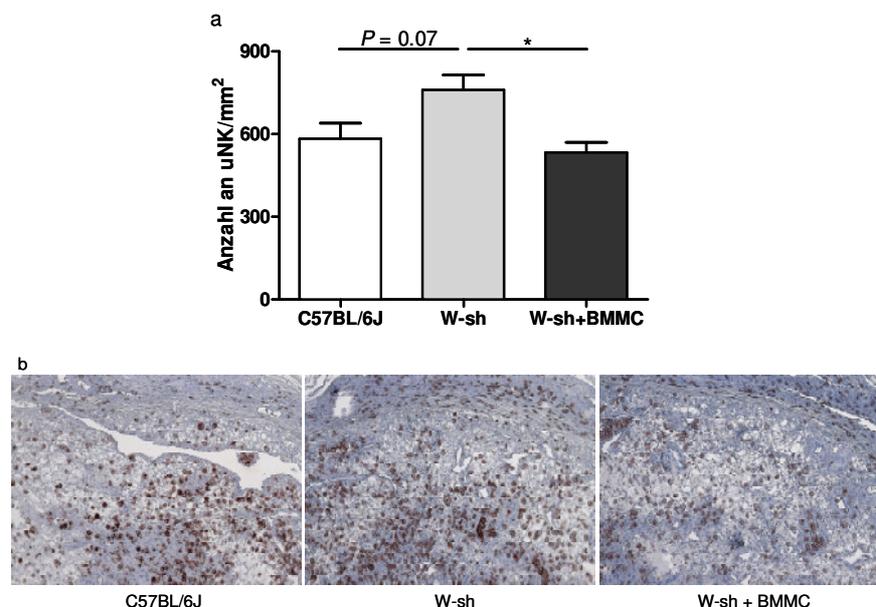
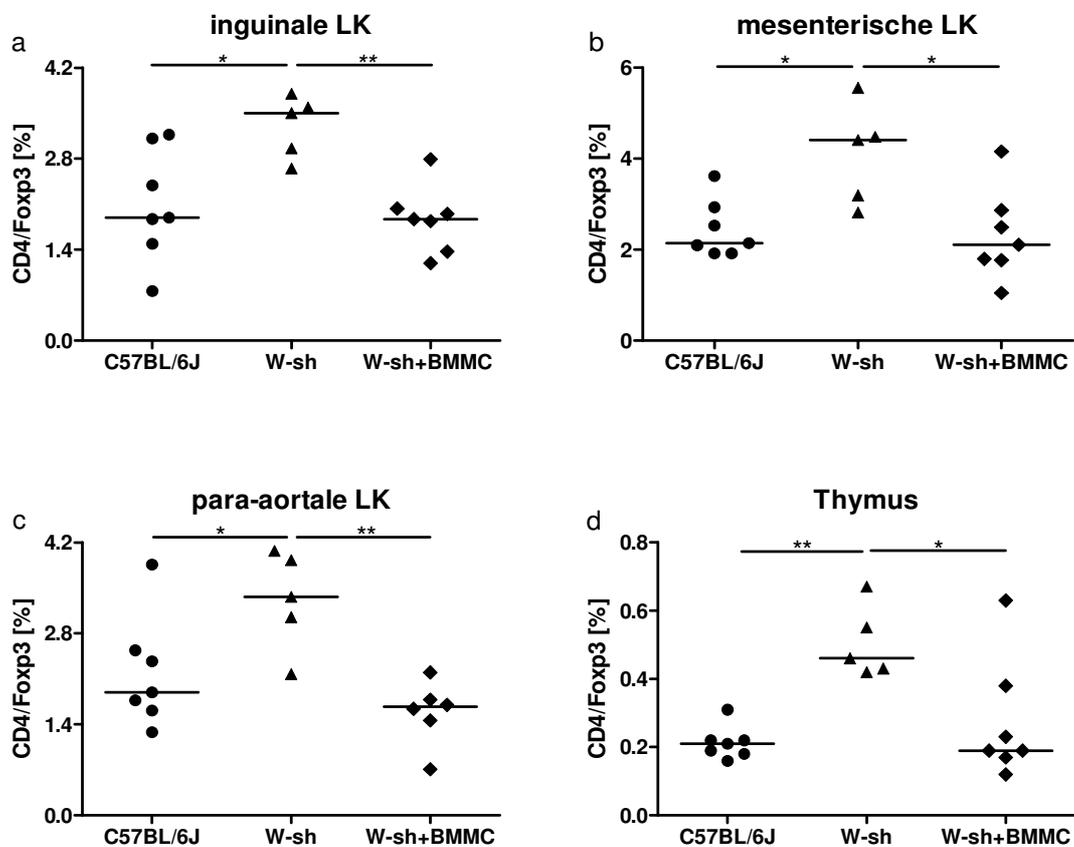


Abb. 57: Anzahl an uterinen Natürlichen Killerzellen (uNK) pro mm<sup>2</sup> in der Dezidua von allogenen verpaarten C57BL/6J (n=6), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=4) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC, n=4) an Tag 10 der Trächtigkeit (a) nach DBA Lektin-Färbung (b). Uterine NK erscheinen bräunlich.; Mittelwerte, unpaired t-Test

### 3.21 Die Mastzelldefizienz führte zu einer Erhöhung von regulatorischen T-Zellen

Eine Form der Gegenregulation, wie sie bei den uterinen NK-Zellen zu beobachten war, wurde gleichsam bei den regulatorischen T-Zellen (Treg) nachgewiesen. So führte hier die Mastzelldefizienz zu einem signifikanten Anstieg der Treg, wohingegen sich deren Anzahl bei BL/6 und W-sh+BMCC auf einem vergleichbar niedrigeren Niveau befand. Dieser vermutlich stattfindende Kompensationsmechanismus traf für alle untersuchten Lymphknoten (Abb. 58a-c), den Thymus (Abb. 58d) und ebenso für die Dezidua (Abb. 58e) zu. Diese Ergebnisse deuten auf eine offensichtliche Beteiligung von Treg an dem schwangerschaftsspezifischen Einfluss von Mastzellen hin. Da regulatorische T-Zellen als Vermittler der erworbenen Immunität fungieren, scheint es sich generell um ein gut organisiertes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen sowohl auf peripherer als auch auf lokaler Ebene zu handeln.



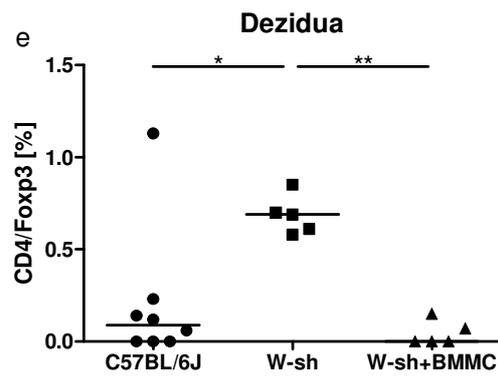


Abb. 58: Durchflusszytometrische Analyse von regulatorischen T-Zellen (CD4/Foxp3) in inguinalen (a), mesenterischen (b) und para-aortalen (c) Lymphknoten (LK) sowie im Thymus (d) und in der Dezidua (e) von weiblichen C57BL/6J (n=6-7), C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh, n=5) sowie rekonstituierten C57BL/6J-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> mit BMMC (W-sh+BMMC, n=5-7) an Tag 10 der Trächtigkeit nach allogener Verpaarung mit BALB/c Männchen; Mediane, Mann-Whitney-U Test

## **4 Diskussion**

Die entscheidende Grundlage für eine uneingeschränkte Entwicklung des Fötus im mütterlichen Uterus ist die Ausbildung maternaler Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fötus, der sowohl mütterliche eigene als auch väterliche fremde Antigene exprimiert. Der Fötus induziert dabei eine spezifische und feinregulierte Immuntoleranz (Tafari *et al.* 1995), die aufgrund einer aktiven Kommunikation zwischen ihm und der Mutter aufgebaut werden kann (Piotrowski *et al.* 1996, Khosrotehrani *et al.* 2005, Tan *et al.* 2005, Mold *et al.* 2008). Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die lokale Anwesenheit verschiedener Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wie dezidualer Dendritischer Zellen (Plaks *et al.* 2008, Collins *et al.* 2009) und Makrophagen (Mor *et al.* 2003, Houser *et al.* 2011), uteriner Natürlicher Killerzellen (Greenwood *et al.* 2000, Bilinski *et al.* 2008) sowie regulatorischer T-Zellen (Aluvihare *et al.* 2004, Zenclussen *et al.* 2005). Diese üben an der föto-maternalen Grenzfläche nicht nur einen immunregulatorischen Einfluss aus, sondern vermitteln auch zentrale, nicht-immunologische Prozesse der Schwangerschaft wie die Implantation der Blastozyste, die Plazentation sowie die Modifikation der Spiralarterien. Die Relevanz von uterinen Mastzellen für diese elementaren Ereignisse wurde dabei nur marginal untersucht und insbesondere kontrovers diskutiert (Shelesnyak 1957 und 1959, Cocchiara *et al.* 1992, Salamonsen *et al.* 1996, Menzies *et al.* 2011). Hingegen sind ihre quantitativen Variationen im Verlauf des menschlichen Menstrualzyklus (Drudy *et al.* 1991) sowie des Östruszyklus in verschiedenen Spezies, wie Ratten (Gibbons *et al.* 1972), Hamstern (Harvey 1964) und Kühen (Likar *et al.* 1964), umfassend beschrieben. Weiterhin existieren Studien, in denen die Aktivierung von Mastzellen ursächlich für die Auslösung von Uteruskontraktionen war (Martinez *et al.* 1999, Garfield *et al.* 2006).

Aufgrund der gegensätzlichen Diskussionen erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst eine eingehende Charakterisierung der murinen uterinen Mastzellpopulation. Verschiedene histologische Methoden offenbarten ein interessantes Ergebnis: Uterine Mastzellen repräsentieren einen einzigartigen und vor allem divergenten Phänotyp. Während Mastzellen in verschiedenen Geweben aufgrund des lokalen Mikromilieus für gewöhnlich einen speziellen Phänotyp ausbilden, scheinen sie mit jenen im Uterus nicht vergleichbar zu sein. So konnten

im murinen Uterus sowohl mukosale als auch Bindegewebs-Mastzellen nachgewiesen werden. Bereits 1960 war es gelungen, im murinen Uterus mit den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Farbstoffen Alcianblau und Safranin, zwei unterschiedliche Mastzelltypen anzufärben (Spicer 1969). Allerdings existierte damals noch keine didaktische Einteilung in mukosale und Bindegewebs-Mastzellen. Erst 1981 wurden Fixierungsbedingungen für Gewebe und histochemische Färbemethoden definiert, die eine Unterscheidung zwischen beiden Mastzelltypen erlauben (Enerbäck 1981). Überraschenderweise wurden in der vorliegenden Arbeit gleichsam Mastzellen detektiert, die sich in einem Zwischenstadium der Differenzierung in einen der beiden Zelltypen befanden (Reynolds *et al.* 1988), in dem sich der Gehalt an Proteoglykanen, Amininen und Peptiden im Zellinneren ändert (Michaloudi *et al.* 1999). Möglicherweise sind hier die hormonellen Schwankungen im Verlauf des Östruszyklus ursächlich, denn Mastzellen sind für ihre Sensitivität gegenüber der Wirkung von Sexualhormonen wie Östradiol und Progesteron bekannt (Wordinger *et al.* 1985, Cocchiara *et al.* 1992, Rudolph *et al.* 2004, Jensen *et al.* 2011). Solche Konvertierungsprozesse können auch durch lokale inflammatorische Prozesse (Kitamura 1989, van Overveld 1990, Tsuji *et al.* 1990, Moon *et al.* 2010) oder durch die Anwesenheit von Fibroblasten (Levi-Schaffer *et al.* 1986) ausgelöst werden. Zudem vermittelt die Sekretion des wohl wichtigsten Wachstumsfaktors für Mastzellen, des SCF (stem cell growth factor, Stammzellen-Wachstumsfaktor) von glatten Muskelzellen die Proliferation und Differenzierung von Mastzellen im Uterus (Mori *et al.* 1997b). Darüber hinaus wurde Heparin als entscheidender Mediator für die Regulierung des Gehalts an mastzellspezifischen Proteasen beschrieben (Humphries *et al.* 1999), welche die Grundlage zur Differenzierung in mukosale bzw. Bindegewebs-Mastzellen darstellen. Beide Phänotypen waren im Uterus von trächtigen Ratten nachweisbar (Salamonsen *et al.* 1996). Des Weiteren exprimieren uterine Mastzellen die Mastzellprotease-8 (Mcp-8), welche zwar ursprünglich als mastzellspezifisch galt (Lützelshwab *et al.* 1998), allerdings 2010 als Marker für basophile Granulozyten charakterisiert wurde (Wada *et al.* 2010). Eine weitere, als uteruspezifisch beschriebene Mastzellprotease, Mcp-9, konnte in Uterusproben von weiblichen C57BL/6J auf mRNA Ebene nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mausstamm C57BL/6J verwendet, wohingegen der Nachweis der MCP-9 in BALB/c erfolgte (Hunt *et al.* 1997). Möglicherweise ist die

Expression verschiedener Mastzellproteasen nicht nur abhängig vom Gewebe, sondern auch vom Mausstamm, wie es z.B. Ghildyal *et al.* (1994) aufzeigen konnten. In dieser Studie exprimierten Mastzellen im Ohr von BALB/c Mäusen Mctp-7, während diese Protease bei C57BL/6J nicht detektiert werden konnte. Offensichtlich repräsentieren uterine Mastzellen eine einzigartige heterogene Zellpopulation mit einem divergenten Phänotyp, der sich durch Einfluss des lokal existenten Mikromilieus entsprechend anpassen kann.

Jedweder Gravidität, dementsprechend auch der murinen, liegt ein normal verlaufender, hormonell gesteuerter Östruszyklus zugrunde (Ashkar *et al.* 2001). Dessen Einfluss auf die Änderung der Mastzellzahl wurde bei Weibchen zweier verschiedener Mausstämmen (CBA/J und C57BL/6J) untersucht. Toluidinblau O-gefärbte Longitudinalschnitte der Uteri in den einzelnen Zyklusstadien dienten der Visualisierung von Mastzellen, die ihren quantitativen Höhepunkt in der Östrus-Phase des Östruszyklus erreichten. Dieses Stadium wird durch die höchste Konzentration an Östrogen und den niedrigsten Gehalt an Progesteron ausgelöst und stellt die rezepptive Phase des Weibchens dar. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die Ovulation und die Vorbereitung des uterinen Gewebes auf eine mögliche Nidation (Fata *et al.* 2001, Wood *et al.* 2007). Die zyklusabhängige Variation der Mastzellzahl mit dessen Anstieg im Östrus wurde ebenfalls bei Ratten beobachtet und auch hier in Zusammenhang mit simultanen Änderungen der Sexualhormonkonzentrationen gebracht (Gibbons *et al.* 1972, Aydin *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit führte das Einsetzen der Trächtigkeit zu einem Verbleib der Mastzellzahl auf dem hohen Niveau wie im Östrus (CBA/J Weibchen) oder sogar zu einem Anstieg wie bei weiblichen C57BL/6J. Dies hielt bis zum Tag 5 der Trächtigkeit an, dem Zeitpunkt der Einnistung der befruchteten Blastozyste in die maternale Gebärmutterschleimhaut sowie dem damit verbundenen Prozess der Dezidualisierung. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls für Wühlmäuse beschrieben, bei denen zwar am Tag 0 bis 3 *post coitum* ein Abfall der Mastzellzahl, danach allerdings ein rapider und deutlicher Anstieg bis einschließlich Tag 4 zu verzeichnen war (Brandon *et al.* 1984). Im Gegensatz hierzu gab es jedoch auch Untersuchungen an Ratten, deren Menge an Mastzellen im Uterus zum Zeitpunkt der Implantation signifikant abfiel. Diese Reduktion wurde als Konsequenz des Östrogenabfalls angesehen (Shelesnyak 1959). Findet keine Befruchtung der Eizelle statt, so wird durch Abnahme der

Östrogen- und Zunahme der Progesteronkonzentration die Schleimhaut der Gebärmutter abgebaut und gleichfalls der Metöstrus eingeleitet (Fata *et al.* 2001, Wood *et al.* 2007). Im Zuge dessen sank die Anzahl an Mastzellen ab, um hiernach im Di- sowie im Proöstrus anzusteigen, möglicherweise aufgrund des in der Literatur beschriebenen Anstiegs des Progesteronlevels (Fata *et al.* 2001). Generell konnten Mastzellen sowohl im naiven Uterus als auch in der Dezidua an Tag 10 der Schwangerschaft oftmals in der Nähe von Blutgefäßen detektiert werden. Dieses Phänomen wurde auch in Gewebeproben von Menschen (Jeziorska *et al.* 1995, Mori *et al.* 1997, Cabanillas-Saez *et al.* 2002) und Ratten (Varayoud *et al.* 2004, Bosquiazzo *et al.* 2007, Bytautiene *et al.* 2008) beschrieben. In der frühen Schwangerschaft waren sie zwischen den Implantationen (interimplantär) sowie auch in ihrer unmittelbaren Nähe entlang des Uterus verteilt. Salamonsen *et al.* konnten dies 1996 nicht feststellen. Im Gegenteil, aufgrund des Mangels an Mastzellen in direkter Umgebung der Implantationen schlossen sie deren Beteiligung am Implantationsprozess aus. Da sowohl die Charakteristik der Färbung als auch die histochemische Heterogenität von Mastzellen stark von der zuvor erfolgten Fixierung des Gewebes abhängt (el Sayed *et al.* 1993), könnte dies die Erklärung für die unterschiedlichen Daten zur quantitativen Verteilung von uterinen Mastzellen sein.

Aufbauend auf diesen aussagekräftigen Zyklusdaten, wurden weiterführende Untersuchungen geplant, um den Einfluss von Mastzellen auf die Trächtigkeit detaillierter zu hinterfragen. Hierfür fand ein spezielles Mausmodell Anwendung, deren genetische Mastzelldefizienz hervorragende Voraussetzungen im Rahmen dieser Grundlagenforschung bot. Im Vergleich zu anderen mastzelldefizienten Modellen wurden die C57BL/6J-*Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh) als fertil mit einer hohen Anzahl an Keimzellen in ihren Gonaden und 6 bis 8 Nachkommen pro Wurf beschrieben (Lyon 1982, Wolters *et al.* 2005). Einzige bekannte pathologische Abnormalitäten sind eine verringerte Pigmentierung der Haut (Duttlinger *et al.* 1993), eine kardiale Hypertrophie (Nigrovic *et al.* 2008), ein Mangel an interstitiellen Cajal-Zellen im Darm sowie ein Reflux der Gallenflüssigkeit in den Magen (Grimbaldeston *et al.* 2005). Von besonderer wissenschaftlicher Bedeutung ist allerdings die Tatsache, die nachgewiesene Defizienz an Mastzellen in diesen Mäusen durch die intravenöse Injektion von Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC, bone marrow derived mast cells) aufzuheben (*“knock-in“*) (Grimbaldeston *et al.* 2005,

Wolters *et al.* 2005). Die systemische Rekonstitution mit BMMC führt zur Präsenz von Mastzellen in den meisten, zuvor defizienten Geweben und somit zur Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Mausmodell verwendet, um die Relevanz von Mastzellen für die Etablierung sowie Aufrechterhaltung der Schwangerschaft *in vivo* genauer zu untersuchen. Die Mastzelldefizienz führte an Tag 10 der Trächtigkeit zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl an implantierten Blastozysten im Vergleich zu den Wildtypen. Sowohl die systemische als auch die lokale Rekonstitution mit BMMC übte einen entscheidenden positiven Einfluss aus: Die Anzahl an Implantationen erhöhte sich signifikant und erreichte das Niveau der Kontrollgruppe. Ursächlich für die geringere Anzahl an Implantationen an Tag 10 der Schwangerschaft bei den W-sh-Mäusen könnten die auffälligen Veränderungen der Uterushörner an Tag 5 sein. Sie erschienen bei den nicht schwangeren Weibchen verdickt und entzündet und waren teilweise durch flüssigkeitsgefüllte Hohlräume innerhalb des Endometriums gekennzeichnet, deren Anordnung mit denen von Implantationen vergleichbar war. Hier liegt die Vermutung einer bereits in der frühen Phase der Trächtigkeit (Tag 5) beginnenden Resorption der kleineren Implantationen respektive Blastozysten nahe, wodurch diese an Tag 10 nicht mehr detektierbar wären.

Die Mastzelldefizienz in W-sh wird durch eine Mutation des *c-Kit* Gens hervorgerufen (Berrozpe *et al.* 1999). Aufgrund dessen ist eine Bindung des Liganden SCF an den entsprechenden Rezeptor c-Kit (CD117) nicht mehr möglich. Allerdings beeinflusst die Interaktion von c-Kit und SCF entscheidende Prozesse wie die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Überleben hämatopoetischer Zellen, Keimzellen sowie Melanozyten (Russell 1979, Kitamura 1989, Ogawa *et al.* 1991), die Vermittlung von Zellkontakten (Dastych *et al.* 1994, Kinashi *et al.* 1994, Kovach *et al.* 1995), die Spermatogenese (Ohta *et al.* 2000, Morimoto *et al.* 2009), die Oogenese und Follikulogenese (Driancourt *et al.* 2000, Hutt *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2006) sowie die Plazentation (Horie *et al.* 1992, Sharkey *et al.* 1994, Kauma *et al.* 1996). Die verminderte Implantationsrate bei mastzelldefizienten W-sh-Mäusen könnte somit die Konsequenz einer eingeschränkten Ovulationsrate bzw. Anzahl an Follikeln sein. Deshalb wurde die Zahl der Follikel und Gelbkörper in den Ovarien von Wildtypmäusen, mastzelldefizienten W-sh- sowie rekonstituierten W-sh-Mäusen bestimmt. Da

Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel bei den W-sh-Mäusen quantitativ vergleichbar stark vertreten waren wie bei den Wildtypen, konnte ein entscheidender Einfluss der c-Kit-Defizienz auf die Follikulogenese ausgeschlossen werden. Ebenso interessant ist die vergleichbare Anzahl an Gelbkörpern, da diese in der frühen Schwangerschaft die Progesteronproduktion bis zur Entwicklung der Plazenta übernehmen (Stocco *et al.* 2007). Die Rekonstitution von W-sh-Mäusen mit BMMC führte zu keinen Veränderungen in Bezug auf die Anzahl an Follikeln.

Der Erfolg der Rekonstitution von mastzelldefizienten W-sh-Mäusen und somit die Anwesenheit von Mastzellen wurde mittels Durchflusszytometrie in der Milz und in verschiedenen Lymphknoten (inguinal, mesenterisch, para-aortal) sowie insbesondere in der Dezidua überprüft. Die Analyse basierte auf der Messung von CD117/FcεR1α doppelt positiven Zellen und bestätigte die Präsenz von Mastzellen in allen untersuchten Organen nach BMMC-Transfer an Tag 10 der Trächtigkeit, d.h. mehr als 14 Wochen nach Injektion. Die Anzahl an CD117/FcεR1α doppelt positiven Zellen war vergleichbar zu jener der Kontrollen. Dies ist nach derzeitigem Kenntnisstand die erste Beschreibung der Abwesenheit von Mastzellen im Uterus von W-sh-Mäusen sowie die Bestätigung der Reversierbarkeit dieses Zustandes nach systemischer Rekonstitution mit BMMC. Ein zusätzlicher Nachweis der Präsenz von Mastzellen in der Dezidua nach Transfer konnte mittels Toluidinblau-Färbung erbracht werden. Zwar wurde der Erfolg einer Rekonstitution mit BMMC und somit die Anwesenheit von Mastzellen in vielen verschiedenen Organen, außer in der Dezidua, bereits in der Literatur nachgewiesen, allerdings handelte es sich hierbei um nicht trächtige Tiere (Grimbaldeston *et al.* 2005, Wolters *et al.* 2005). Salamonsen *et al.* beschrieben 1996 die Dezidua als nahezu mastzellfrei. Dieses Ergebnis kann aber möglicherweise aufgrund der von den Autoren verwendeten Fixierungsmethode des Gewebes beeinflusst worden sein. Die Mastzelldefizienz der W-sh-Mäuse ging mit einer signifikant herabgesetzten Anzahl an implantierten Blastozysten einher; eine negative Konsequenz, die sich allerdings durch die Injektion von Mastzellen korrigieren ließ. Die Anwesenheit von Mastzellen an der föto-maternalen Grenzfläche nach Transfer führte zu einer deutlichen Steigerung der Implantationsrate. Die Milz und auch die Lymphknoten könnten nach intravenöser BMMC-Injektion hierbei als eine Art Mastzellreservoir dienen, wie es zumindest für

die Milz bereits beschrieben wurde (Wolters *et al.* 2005). Die Migration bzw. Rekrutierung von Mastzellen *per se* wäre dann aufgrund ihrer Empfänglichkeit gegenüber der Wirkung von Progesteron denkbar. Diese Hypothese wird durch eine vergleichbare Anzahl an progesteron-produzierenden Gelbkörpern in den Ovarien von Wildtypen, W-sh- sowie rekonstituierten W-sh-Mäusen gestützt. Es konnte sowohl die Expression des Progesteronrezeptors (Jensen *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2001) als auch die Vermittlung der Migration von Mastzellen aus der Peripherie in den Uterus und ihre dortige Degranulation nach Gabe von Progesteron und Östradiol nachgewiesen werden (Jensen *et al.* 2010). Progesteron ist nicht nur entscheidend für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, sondern wird vom *Corpus luteum* im Ovar (Stocco *et al.* 2007) sowie in der Plazenta auch in großen Mengen sezerniert (Yamamoto *et al.* 1994). Es ist essentiell für die Etablierung der immunologischen Toleranz der Mutter gegenüber dem Fötus (Arck *et al.* 2007) und könnte den Effekt von Mastzellen entweder vermitteln und/oder stimulieren.

Als Nächstes erfolgte die Untersuchung der Expression von drei verschiedenen Mastzellproteasen (Mcp) auf mRNA-Ebene. Die ausgewählten Proteasen sind allesamt spezifisch für Mastzellen, werden in deren sekretorischen Granula gespeichert und weisen als Chymasen ein deutlich höheres Spaltungspotential von Peptiden und Proteinen auf als Trypsasen (Caughey 2007). Eine Expression auf mRNA-Ebene dient als zusätzlicher Beweis für die Anwesenheit von Mastzellen in den untersuchten Geweben. Darüber hinaus lässt dieser Nachweis auf die Aktivität der Mastzellen und ihr Potenzial, diese Proteasen zu produzieren, schließen. In der Literatur fehlen Daten, die ihre Relevanz für die Schwangerschaft aufzeigen. Jedoch wurden sie bereits im Zusammenhang mit der Förderung der Angiogenese und mit dem Abbau extrazellulärer Matrixproteine erwähnt. Dies kann sowohl auf direktem Weg als auch indirekt nach Aktivierung der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9) erfolgen (Lindstedt *et al.* 2004, Caughey 2007). Für die Implantation *per se* und den Umbau der Uterusschleimhaut (Dezidualisierung) sind sowohl Neovaskularisierung als auch Matrixdegradierung essentiell (Salamonsen *et al.* 1999). Aufgrund dessen sollten Mastzellproteasen für diese Prozesse bedeutsam sein. Tatsächlich konnte nach systemischer Rekonstitution der W-sh-Mäuse mit BMDC ein signifikanter Anstieg der Mastzellproteasen-1, -5 und -8 auf mRNA Ebene in der Dezidua beobachtet werden, wobei das Niveau der

Expression an Mastzellprotease-8 (Mcpt-8) bei den rekonstituierten W-sh-Mäusen und den Wildtypen vergleichbar war. Möglicherweise ist hier die nicht vorhandene Expression an Chymasen in der Dezidua, vor allem die der Mcpt-8, bei den W-sh-Mäusen mit deren verringerter Implantationsrate verbunden. Wenngleich die Mastzellprotease-8 ursprünglich als mastzellspezifisch angesehen wurde (Lützelschwab *et al.* 1998), beschrieben sie Wada *et al.* 2010 als charakteristischen Marker für basophile Granulozyten. Deren Nachweis erfolgte in dieser Studie mittels Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Oberflächenmolekül CD49b gerichtet ist. Allerdings wird CD49b ebenso von peripheren NK-Zellen (Luther *et al.* 2011, Meinhardt *et al.* 2012) sowie regulatorischen T-Zellen (Charbonnier *et al.* 2010) gebildet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Erhöhung an CD49b in der Dezidua von weiblichen W-sh-Mäusen beobachtet, wohingegen das Niveau von Mcpt-8 am niedrigsten war. Somit ist zumindest eine CD49b- bzw. Basophil-spezifische Bildung von Mcpt-8 unwahrscheinlich. Außerdem konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse die Expression von Mcpt-8 innerhalb isolierter uteriner Mastzellen an Tag 10 der Schwangerschaft eindeutig nachgewiesen werden. Die Expression von Mastzellproteasen-1, -5 und -8 in der Dezidua wurde ebenso nach lokaler Rekonstitution der W-sh-Mäuse überprüft und bestätigt. Interessanterweise waren aber die mRNA Level der Mcpt-5 und -8 im rekonstituierten Horn signifikant niedriger als auf der mit PBS behandelten Seite. Hiermit wurde die Fähigkeit der Migration von Mastzellen zumindest innerhalb des Uterus bestätigt, die zudem offensichtlich den Verlauf der Trächtigkeit an Tag 10 positiv beeinflusste. Hier könnte die lokale Wirkung von Östradiol und Progesteron vor allem aufgrund ihrer Konzentrationsschwankungen im Verlauf des Östruszyklus die Migration von Mastzellen aus dem rekonstituierten Uterushorn in das nicht-rekonstituierte Horn vermitteln (Jensen *et al.* 2010), die dann in der frühen Schwangerschaft einen positiven Einfluss auf die Implantation der Blastozyste und die Entwicklung des heranwachsenden Föten ausüben.

Zu den Grundlagen einer optimalen Embryo- bzw. Fötogenese zählt der uneingeschränkte Austausch von Nährstoffen, Abfallprodukten und Gasen, insbesondere von Sauerstoff via Hämproteinen, der durch die stark vaskularisierte Plazenta gewährleistet wird und innerhalb des Plazentalabyrinths stattfindet (Ihara *et al.* 1998, Ottersbach *et al.* 2010). Eine suboptimale Entwicklung der Plazenta

kann mit gravierenden Konsequenzen, wie Wachstumsretardierung und Letalität, für den Fötus einhergehen (Song *et al.* 2002, Watson 2005). Die Defizienz an Mastzellen bei weiblichen *W-sh*-Mäusen führte nicht nur zu signifikant kleiner ausgeprägten Plazenten, sondern auch zu einer ungenügenden Modifizierung der Spiralarterien. Das Lumen der Arterien war deutlich verringert und das Verhältnis von Gefäßwand zu Lumen signifikant erhöht. Der systemische Transfer von Mastzellen führte zu einer Vergrößerung der Plazenten sowie zu einer Zunahme des Lumendurchmessers und einer Abnahme des Verhältnisses von Gefäßwand zu Lumen der Spiralarterien, vergleichbar mit den Werten der Kontrollgruppe. Spiralarterien erscheinen histologisch in der *Decidua basalis* ab Tag 8 der Trächtigkeit und unterliegen ab diesem Zeitpunkt bis ca. Tag 10 enormen Umwandlungsprozessen, die letztlich zur Ausbildung von Arterien mit venösem Charakter führen. Durch die Reduzierung der Muskelschicht innerhalb der Gefäßwand werden sie dünnwandiger und großlumiger (Burke *et al.* 2010) und ermöglichen so eine verstärkte Versorgung der Plazenta bzw. des Fötus (Leonard *et al.* 2005). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheinen Mastzellen nicht nur für das Ereignis der Implantation entscheidend zu sein. Sie beeinflussen außerdem den weiteren Verlauf der Trächtigkeit, da die Plazenten und insbesondere die Spiralarterien der scheinbar normal trächtigen mastzelldefizienten *W-sh*-Mäuse ungenügend modifiziert waren und somit den Fötus suboptimal versorgten. Eine vergleichbare Bedeutung kommt den uterinen Natürlichen Killer Zellen (uNK) zu. Zeitgleich mit dem einsetzenden Prozess der Dezidualisierung erscheinen große granulierte, stark proliferierende Lymphozyten, die so genannten uterinen NK, innerhalb des Uterus von Tag 7 bis 12 der Trächtigkeit (Croy *et al.* 2010). Diese Zellen sind essentiell für die optimale Umwandlung der Spiralarterien. Ähnlich wie bei den *W-sh*-Mäusen sind die Plazenten *IL-15*-defizienter Mäuse, die keine uterinen NK-Zellen besitzen, kleiner ausgebildet und die Spiralarterien eingeschränkt modifiziert (Greenwood *et al.* 2000). Diese Anomalien können allerdings durch eine Rekonstitution mit Knochenmarkzellen, die ebenso NK-Vorläuferzellen enthalten, korrigiert werden (Ashkar *et al.* 2001). Auch bei mastzelldefizienten *W-sh*-Mäusen kann eine Rekonstitution mit Mastzellen diese Anomalien reversieren. Es scheint sich bei den uNK und den Mastzellen um Zellen des Immunsystems zu handeln, die ähnliche Funktionen an der föto-maternalen Grenzfläche ausüben. Möglicherweise

findet eine Interaktion beider Zelltypen statt, um die Umwandlung des Gewebes sowie die Entwicklung der Spiralarterien zu unterstützen. Interessanterweise konnte bei den W-sh-Mäusen eine erhöhte Anzahl an uterinen NK-Zellen im Vergleich zu den Wildtypen detektiert werden. Ferner führte die Rekonstitution mit BMMC zu einem Abfall der uNK/mm<sup>2</sup> auf das Niveau der Wildtypen. Möglicherweise handelt es sich hier um einen lokal stattfindenden Kompensationsmechanismus (an der Kontaktfläche zwischen Mutter und Fötus), der den Mangel an Mastzellen ausgleichen soll. Dies scheint insofern als wahrscheinlich, als dass beide Zelltypen ein vergleichbares Repertoire an Mediatoren sezernieren können (Tab. 9) (Galli *et al.* 2005, Lash *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2011). Von besonderem Interesse ist hierbei die Synthese und Sezernierung von Galektin-1 (Tab. 9) (Koopman *et al.* 2003), worüber später diskutiert wird.

Tab.9: Vergleichende Übersicht der spezifischen Mediatoren für Mastzellen sowie für uterine Natürliche Killerzellen (uterine NK-Zellen); (IL = Interleukin; VEGF = endothelialer Gefäß-Wachstumsfaktor; TGF- $\beta$  = Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$ ; FGF = Fibroblasten-Wachstumsfaktor; PGF = plazentarer Wachstumsfaktor, MMP = Matrix-Metalloprotease; LIF = Leukämie inhibierender Faktor; tPA = gewebspezifischer Plasminogen Aktivator; IFN- $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ; GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor; M-CSF = Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor; SCF = Stammzellen Wachstumsfaktor)  
 Quellen: <sup>1</sup>Galli *et al.* 2005, <sup>2</sup>Lash *et al.* 2011, <sup>3</sup>Nakayama *et al.* 2004, <sup>4</sup>Koopman *et al.* 2003, <sup>5</sup>Norrby 2002, <sup>6</sup>Kanbe *et al.* 1999

<b>Funktion</b>	<b>Mediatoren, gebildet von Mastzellen</b>	<b>Mediatoren, gebildet von uterinen NK-Zellen</b>
Angiogenese Gewebeumbau	VEGF <sup>1</sup> , TGF- $\beta$ <sup>1</sup> , FGF <sup>1</sup> , Angiopoietin-1 <sup>3</sup> , IL-8 <sup>1</sup> , Galektin-1 <sup>vorliegende Arbeit</sup> , tPA <sup>5</sup> , MMP2 <sup>5</sup> , MMP9 <sup>5</sup>	VEGF <sup>2</sup> , TGF- $\beta$ <sup>4</sup> , PGF <sup>2</sup> , Angiopoietin-1 <sup>2</sup> , IL-8 <sup>2</sup> , Galektin-1 <sup>4</sup> , MMP2 <sup>2</sup> , MMP9 <sup>2</sup>
Zellteilung Zelldifferenzierung Zellwachstum Zell-Zell- Interaktion Zellstimulierung Zelllyse	IL-1 $\beta$ <sup>1</sup> , IL-2 <sup>1</sup> , IL-4 <sup>1</sup> , IL-6 <sup>1</sup> , IL- 8 <sup>1</sup> , IL-10 <sup>1</sup> , IL-15 <sup>1</sup> , LIF <sup>1</sup> , TGF- $\beta$ <sup>1</sup> IFN- $\gamma$ <sup>1</sup> , TNF- $\alpha$ <sup>1</sup> , GM-CSF <sup>1</sup> , M-CSF <sup>1</sup> , FGF <sup>1</sup> , SCF <sup>1</sup> Galektin-1 <sup>vorliegende Arbeit</sup>	IL-1 $\beta$ <sup>2</sup> , IL-6 <sup>2</sup> , IL-8 <sup>2</sup> , IL-10 <sup>2</sup> , LIF <sup>2</sup> , TGF- $\beta$ <sup>4</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>2</sup> , TNF- $\alpha$ <sup>2</sup> , GM-CSF <sup>2</sup> , M-CSF <sup>2</sup> , Galektin-1 <sup>4</sup> , Perforin <sup>2</sup>

Eine unzureichende oder gar verspätete Implantation der Blastozyste kann fatale Konsequenzen für die Entwicklung des Fötus nach sich ziehen (Song *et al.* 2002, Zenclussen *et al.* 2011). Um zu untersuchen, ob der Implantationsprozess durch Mastzellen beeinflusst wird und dies möglicherweise die Grundlage der eingeschränkten Plazentation sowie der ungenügenden Modifikation der Spiralarterien bei mastzelldefizienten W-sh-Mäusen darstellt, wurde ein frühes Stadium der Trächtigkeit (Tag 5) ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Implantation der Blastozyste in das Endometrium des mütterlichen Uterus abgeschlossen sein. Dieses Ereignis ist entscheidend für den weiteren Schwangerschaftsverlauf, stellt es doch den ersten Schritt der Plazentation dar, der schließlich eine adäquate Blutversorgung des Fötus sicherstellt. Die Visualisierung der Implantationen erfolgte mittels Injektion eines Farbstoffs (Chicago Sky Blau), der nach intravenöser Injektion diese Areale blau anfärbte und dadurch deren Detektion vereinfachte. Die Implantationen der W-sh-Mäuse erschienen bei visueller Betrachtung kleiner als jene der Wildtypen. Diese Größenunterschiede konnten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung mittels mikroskopischer Vermessung bestätigt werden. Die Rekonstitution mit BMBC führte zu einer Normalisierung der Implantationsgrößen am Tag 5 der Schwangerschaft. Da eine geringere Größe der Implantationen auf eine Verzögerung bzw. Verlangsamung des Prozesses hindeutet, wurde in einem weiteren Experiment der Tag 6 der Schwangerschaft untersucht. Zu diesem Zeitpunkt waren die Implantationsareale bei den W-sh-Mäusen deutlich kleiner als jene der Wildtypkontrollen. Vermutlich führen verzögerte Anheftungen der Blastozysten zu ihrem langsameren Wachstum wie es für ein anderes Mausmodell kürzlich beschrieben wurde. Beispielsweise rief die Defizienz an dem Enzym Hämoxygenase-1 (HO-1) eine Verzögerung der Blastozysten-Anheftung *in vitro* hervor und wirkte sich nachteilig auf den weiteren Verlauf der Trächtigkeit aus. Als Konsequenz einer suboptimalen Entwicklung der Plazenten kam es zu intrauterinen Wachstumsretardierungen der Föten. Im Falle einer totalen genetischen Defizienz an HO-1 waren die Föten bereits intrauterin abgestorben. Die Behandlung der Tiere mit Kohlenmonoxid (CO), einem Produkt des HO-1-Katabolismus, konnte die Funktion von HO-1 im Hinblick auf die Plazentation sowie das Wachstum des Fötus ersetzen (Zenclussen *et al.* 2011). Außerdem befindet sich der Uterus bereits am Nachmittag des fünften Tages der Trächtigkeit

in seiner nicht rezeptiven Phase, wodurch eine Implantation der Blastozyste zu diesem Zeitpunkt nicht mehr gewährleistet werden kann (Wang *et al.* 2006). Demnach könnte eine geringere Größe der Implantationen an den Tagen 5 und 6 zu einem suboptimalen Verlauf der Plazentation führen, was wiederum ein möglicher Grund für die ungenügende Modifikation der Spiralarterien bei den mastzelldefizienten W-sh-Mäusen wäre.

Aufbauend auf diesen Daten wurden mögliche Mediatoren, die den Mastzelleffekt vermittelten könnten, auf mRNA-Ebene untersucht. Relevant waren hierbei die Expressionen verschiedener Moleküle wie Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), gewebspezifischer Plasminogen Aktivator (tPA), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (mPAI-1), Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9), endothelialer Gefäß-Wachstumsfaktor (VEGF), Transformations-Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sowie Bindegewebe-Wachstumsfaktor (CtGF). Diese ausgewählten Moleküle sind allesamt für ihre entscheidende Rolle bei Gewebeumbauprozessen und/oder Angiogenese bekannt. TGF- $\beta$  und CtGF waren in der Dezidua mastzelldefizienter W-sh-Mäuse geringer exprimiert als in den Kontrollen. Die systemische Rekonstitution mit BMMC führte zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Niveaus beider Moleküle, die zudem mit denen der Wildtypen vergleichbar war. Beide Moleküle sind nicht nur bekannt für ihre Bedeutung im Hinblick auf die Induktion der Angiogenese und die Stimulation des Auf- und Abbaus von extrazellulären Matrixkomponenten (Roberts *et al.* 1986, Border *et al.* 1992, Brigstock 1999, Ivkovic *et al.* 2003), sondern auch für ihre entscheidende Rolle in der Entwicklung des Embryos (Border *et al.* 1992, Moussad *et al.* 2000). Darüber hinaus weiß man um die aktive Interaktion beider Moleküle (Brunner *et al.* 1991, Ryseck *et al.* 1991, Igarashi *et al.* 1993) sowie ebenso mit Mastzellen (Gruber *et al.* 1994, Ozaki *et al.* 2005). Alle anderen untersuchten Moleküle wiesen zwar bei den mit BMMC-rekonstituierten W-sh-Mäusen stets eine signifikant höhere Expression auf als bei den unbehandelten W-sh-Mäusen, jedoch lagen hier die mRNA-Level von uPA, tPA, PAI-1 entweder auf vergleichbarem oder aber im Falle von MMP9 und VEGF auf deutlich niedrigerem Niveau zu den Wildtypen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Relevanz dieser Moleküle für die Vermittlung der Mastzell-spezifischen Prozesse ausgeschlossen.

Allerdings konnte eine positive Korrelation der Expression von Mcpt-8 und TGF- $\beta$  sowie Mcpt-8 und CtGF in Deziduaproben von rekonstituierten W-sh-Mäusen bestätigt werden. So war der Anstieg an Mcpt-8 nach BMMC-Transfer mit einer stärkeren Expression an TGF- $\beta$  und CtGF im Gewebe verbunden. Ebenso ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von TGF- $\beta$  und CtGF, der die Daten in der verfügbaren Literatur unterstützt. Hier führt die direkte Bindung von CtGF an TGF- $\beta$  zu einer Verstärkung des TGF- $\beta$ -Signals (Abreu *et al.* 2002). Wenngleich detaillierte Untersuchungen zur Funktion der Mastzellprotease-8 fehlen, wird sie als Serin-Protease klassifiziert (Caughey 2007). Letzterer wurde eine entscheidende Bedeutung im Zusammenhang mit dem Abbau extrazellulärer Matrix zugesprochen (Barrett 1994). In der vorliegenden Arbeit war die Expression der Serin-Protease Mcpt-8 mit einem positiven Verlauf der Trächtigkeit assoziiert. In Bezug auf TGF- $\beta$  können hier zwei mögliche Szenarien angenommen werden: Entweder löst die Degranulation von Mastzellen und somit die Abgabe von Mcpt-8 die simultane Sekretion von TGF- $\beta$  aus, begründet auf der Ko-Speicherung in den Granula (Lindstedt *et al.* 2001), und/oder TGF- $\beta$  bewirkt nach dessen Ausschüttung die Rekrutierung weiterer Mastzellen (Gruber *et al.* 1994). Möglicherweise dienen hierbei die Lymphknoten bzw. die Milz als Reservoir (Wolters *et al.* 2005). Um die Chemotaxis über einen direkten Weg zu ermöglichen, sollten Mastzellen einen spezifischen Rezeptor für TGF- $\beta$  exprimieren. Zunächst wurde die bereits in der Literatur erwähnte Expression von TGF- $\beta$  (Lindstedt *et al.* 2001) sowie des TGF- $\beta$  Rezeptors in den Mastzellen (Gruber *et al.* 1994, Macey *et al.* 2010) mittels Western Blot in BMMC aus Wildtypen bestätigt. Es blieb also die Frage der simultanen Erhöhung an CtGF im Vergleich zu Mcpt-8 bzw. TGF- $\beta$  nach systemischer Rekonstitution. Um dies zu beantworten, wurden eine Trophoblasten-Zelllinie (SM9-2) sowie Plazentagewebe einer C57BL/6J Maus an Tag 10 der Trächtigkeit verwendet. Die SM9-2-Zellen wurden ursprünglich aus murinen Plazenten an Tag 9 der Trächtigkeit isoliert (Sharma 1998). Mittels Western Blot konnte in den Trophoblasten sowie im Plazentagewebe eine starke Expression an CtGF nachgewiesen werden, während der TGF- $\beta$  Rezeptor nicht detektiert werden konnte; TGF- $\beta$  selbst wurde nur in seiner latenten Form exprimiert, was sich mit den publizierten Daten von Sharma (1998) deckt. Mastzellen wiesen dagegen eine starke Expression des TGF- $\beta$  Rezeptors sowie der aktiven Form von TGF- $\beta$  auf, wohingegen CtGF nicht

nachgewiesen werden konnte. Demnach wäre folgendes Szenario denkbar: Die Trophoblasten sezernieren TGF- $\beta$ , welches durch Mastzellchymasen aktiviert wird (Jahanyar *et al.* 2008) und somit an den TGF- $\beta$  Rezeptor auf den Mastzellen binden kann. Letztere werden durch dieses Signal zur simultanen Abgabe von Mcpt-8 und TGF- $\beta$  stimuliert. Die Mastzellprotease wiederum bewirkt die Bildung von CtGF in den Trophoblasten und TGF- $\beta$  könnte auf indirektem Weg aufgrund des fehlenden TGF- $\beta$  Rezeptors Einfluss auf die Entwicklung der Trophoblasten nehmen (Erlebacher *et al.* 2004). Dieses Szenario würde auf diese Weise die positiven Zusammenhänge von Mcpt-8 und TGF- $\beta$  bzw. CtGF sowie TGF- $\beta$  und CtGF erklären und lässt zumindest in Bezug auf TGF- $\beta$  einen autoregulatorischen Mechanismus vermuten. Ferner deutet es auf die Ausbildung eines Gleichgewichts im Hinblick auf die Anwesenheit der beteiligten Moleküle an der föto-maternalen Grenzfläche hin, die eine bestmögliche Entwicklung des Föten innerhalb des mütterlichen Uterus gewährleisten. Wenngleich verschiedene Faktoren zur Aktivierung von CtGF führen, erlangt die TGF- $\beta$ -abhängige Stimulation zunehmend Aufmerksamkeit (Moussad *et al.* 2000). Bezogen auf die entscheidende Relevanz beider Wachstumsfaktoren für die Simulation und die Vermittlung von Angiogenese, Gewebeumbau (Roberts *et al.* 1986, Border *et al.* 1992, Brigstock 1999, Ivkovic *et al.* 2003) sowie Embryogenese (Border *et al.* 1992, Moussad *et al.* 2000), sollte sich deren geringere Expression an der föto-maternalen Grenzfläche nachteilig auf den Schwangerschaftsverlauf von mastzelldefizienten *W-sh*-Mäusen auswirken. Eine genauere Untersuchung des Zusammenspiels von TGF- $\beta$  und CtGF *in vivo* war leider nicht möglich, da die entsprechenden *knock-out* Mäuse kurz nach ihrer Geburt versterben (Shull *et al.* 1992, Kulkarni *et al.* 1993, Ivkovic *et al.* 2003).

Die Mastzelldefizienz bei *W-sh*-Mäusen beruht auf einer Mutation des *c-Kit* Gens, wodurch die Expression des c-Kit Rezeptors (CD117) beeinträchtigt ist (Berrozpe *et al.* 1999). Dieser bindet als Liganden den Stammzellen-Wachstumsfaktor (SCF, stem cell factor). SCF trägt entscheidend zur Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen und somit auch weiterer Immunzellen bei, welche demnach durch die eingeschränkte *c-Kit* Genexpression bei den *W-sh*-Mäusen nachteilig beeinflusst sein könnten. Allerdings verfügen diese Mäuse über normale Mengen an T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen, Natürlichen Killerzellen, Granulozyten und Makrophagen (Grimbaldeston *et al.* 2008), was in der

vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Somit sind die Effekte der *c-Kit*-Defizienz ausschließlich auf den Mangel an Mastzellen zurückzuführen, was sowohl die systemischen als auch die lokalen Rekonstitutionsexperimente eindrucksvoll bestätigen. Alleine regulatorische T-Zellen (Treg) zeigten Veränderungen aufgrund der An- bzw. Abwesenheit von Mastzellen. Die Bedeutung von Treg im Hinblick auf die Trächtigkeit wurde bereits eingehend untersucht (Zenclussen *et al.* 2005). Hier führte der signifikant geringere Anteil an Treg bei den Weibchen zu einer Erhöhung der Abortrate auf 15 bis 20 % gegenüber den Kontrollen. Ein Transfer mit regulatorischen T-Zellen glich diesen Mangel nicht nur aus, sondern bewirkte eine Verringerung der Anzahl an abgestoßenen Föten auf 0 %. Um eine mögliche Bedeutung dieser Zellen für die Trächtigkeit des mastzelldefizienten Mausmodells zu prüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich CD4/Foxp3 positive Zellen, die in dieser Kombination Marker für Treg darstellen, in verschiedenen Lymphknoten sowie im Thymus mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Überraschenderweise konnte eine Gegenregulation beider Zelltypen beobachtet werden, denn die Lymphknoten derjenigen *W-sh*-Mäuse, in denen wie erwartet keine Mastzellen detektierbar waren, wiesen die signifikant höchste Menge an Treg auf im Vergleich zu den Wildtypen und zu den rekonstituierten *W-sh*. Die enge Interaktion beider Zelltypen und insbesondere diese Form der Gegenregulation wurde in der Literatur bereits beschrieben (Gri *et al.* 2008). Bezogen auf die Daten der vorliegenden Arbeit, lassen sowohl Mastzellen als auch regulatorische T-Zellen und uterine NK-Zellen als Voraussetzung ihrer simultanen Wirksamkeit ein Gleichgewicht hinsichtlich ihrer Anzahl vermuten, so wie es sowohl bei den Wildtypen als auch bei den rekonstituierten *W-sh* zu beobachten war.

Uterine Mastzellen scheinen offensichtlich ähnliche Funktionen wie uterine NK-Zellen auszuüben. Aufgrund dessen lag der Fokus als Nächstes auf einem Mediator, der von uNK sezerniert wird. Es handelt sich hierbei um das Glykanbindende Protein Galektin-1 (Gal-1) (Kopcow *et al.* 2008), welches u.a. die Proliferation, Aktivierung sowie Apoptose von T-Zellen regulatorisch beeinflusst (Chung *et al.* 2000, Stillman *et al.* 2006, Kopcow *et al.* 2008). Zudem fördert es an der föto-maternalen Grenzfläche die Expansion und/oder Rekrutierung von uterinen Dendritischen Zellen mit einem tolerogenen Phänotyp, die durch Hochregulation regulatorischer T-Zellen den Verlust des Föten verhindern können

(Blois *et al.* 2007). Gal-1 ist nicht nur in großer Menge im murinen Reproduktionstrakt vorhanden (Phillips *et al.* 1996, Choe *et al.* 1997), sondern reguliert die Differenzierung von Trophoblasten (Jeschke *et al.* 2006, Fischer *et al.* 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte in Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC) die Expression von Gal-1 mittels Western Blot und Immunhistochemie nachgewiesen werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand stellt dies die erste Beschreibung des Nachweises der Bildung von Galektin-1 in Mastzellen dar. In der Dezidua von systemisch rekonstituierten W-sh-Mäusen mit BMMC stieg die Expression von Gal-1 auf mRNA Ebene signifikant an, verglichen mit jener der nicht-rekonstituierten W-sh-Mäuse.

Als Nächstes wurde die Konsequenz der Gal-1-Defizienz für den Verlauf der Trächtigkeit in Gal-1-defizienten Mäusen (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) untersucht. Diese Mäuse entwickeln sich scheinbar normal, sind lebensfähig und fertil (Poirier *et al.* 1993), weisen allerdings nach allogener Verpaarung eine erhöhte Abortrate auf (Blois *et al.* 2007). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Trotz einer vergleichbaren Anzahl an Implantationen wiesen die *Lgals1*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Erhöhung der Abortrate auf ca. 19 % im Median auf im Vergleich zu 0 % bei den Kontrollen. Diese Daten decken sich mit jenen von Blois *et al.* (2007), wenngleich in deren Arbeit die allogene Verpaarung der weiblichen *Lgals1*<sup>-/-</sup> mit DBA/2J Männchen erfolgte anstelle von BALB/c wie in der vorliegenden Arbeit. Bei der morphologischen Betrachtung der signifikant größeren Plazenten fielen ungewöhnliche Veränderungen auf: Die Schicht der Riesenzellen erreichte deutlich stärkere Ausmaße als jene der Wildtypen, wobei die Zellen *per se* keine erkennbaren pathologischen Modifikationen aufwiesen. Jedoch war das Areal der Labyrinth-Zellen entweder erheblich reduziert oder gar nicht vorhanden. Ein vergleichbar abnormaler Phänotyp der Plazenta wurde für Mäuse beschrieben, die defizient für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) sind. Dieser reguliert die Aktivität von uPA und tPA (Binder *et al.* 2002), beeinflusst direkt die Angiogenese (Bacharach *et al.* 1992) und wird von Spongiotrophoblasten und trophoblastären Riesenzellen gebildet (Teesalu *et al.* 1998). Die offensichtlich gestörte Differenzierung der Trophoblasten während der frühen Plazentation wurde bereits beim Menschen als mögliche Ursache für eine vorzeitige Beendigung der Schwangerschaft beschrieben, hervorgerufen durch die

verringerte Gal-1-Expression (Jeschke *et al.* 2010). Darüber hinaus konnte in der *Decidua basalis* der *Lgals1<sup>-/-</sup>*-Mäuse eine Beeinträchtigung der Umbildung der Spiralarterien beobachtet werden. Trotz eines vergrößerten Lumendurchmessers waren die Gefäßwände extrem verdickt und das Verhältnis von Wand zu Lumen deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die ungenügende Modifikation der Spiralarterien wurden sowohl bei den mastzelldefizienten *W-sh* in der vorliegenden Arbeit als auch bei uNK-defizienten Mäusen gewonnen (Greenwood *et al.* 2000). Da die Expression von Gal-1 in den Riesenzellen nachgewiesen wurde (Phillips *et al.* 1996), wäre dessen Mangel möglicherweise eine Erklärung für die erhöhte Abortrate. Ebenso könnte hieran auch die ungenügende Ausbildung des Labyrinth-Areals beteiligt sein, denn innerhalb dessen findet zu Beginn der Schwangerschaft der Austausch von Nährstoffen, Gasen und später auch Abfallprodukten zwischen maternalem und fötalem Kreislauf statt (Ihara *et al.* 1998, Ottersbach *et al.* 2010). Interessanterweise konnte der Transfer von Gal-1-exprimierenden BMMC in Gal-1-defiziente *Lgals1<sup>-/-</sup>*-Mäuse alle beschriebenen Parameter reversieren. So wurde die Abortrate auf 0 % reduziert und die Größe der Plazentaareale sowie der Riesenzellschicht verringerte sich auf jene der Wildtypkontrollen. Gleichsam waren die Bereiche der Spongiotrophoblasten und Labyrinthzellen normal ausgebildet und die Modifikation der Spiralarterien erfolgte auf vergleichbare Art und Weise wie bei den Wildtypen. Somit scheint mastzell-abstammendes Galektin-1 einen entscheidenden Einfluss auf Prozesse wie die Plazentation auszuüben, die eine uneingeschränkte Entwicklung des Föten gewährleisten.

Wenn Mastzellen in der Lage sind, nach dem Transfer in mastzelldefiziente *W-sh*-Mäuse diesen zu einem erfolgreichen Verlauf ihrer Trächtigkeit zu verhelfen, könnte dies durchaus mit der Speicherung von Gal-1 als Mediator in Zusammenhang gebracht werden. Um dies explizit zu untersuchen, wurden BMMC aus Gal-1-defizienten *Lgals1<sup>-/-</sup>*-Mäusen generiert mit dem Ziel, diese in *W-sh*-Mäuse zu transferieren und ihren Einfluss auf den Ausgang der Trächtigkeit zu spezifizieren. Der Mangel des Gal-1-Proteins wurde mittels Western Blot bestätigt. Diejenigen *W-sh*-Mäuse, die BMMC aus *Lgals1<sup>-/-</sup>*-Mäusen erhielten, wiesen eine Abortrate von 100 % im Median auf. Besondere Aufmerksamkeit gilt hier dem Vergleich mit jenen *W-sh*-Mäusen, die mit BMMC aus den Wildtypen (C57BL/6J) rekonstituiert wurden (Median 18,2 %) und eine starke Expression an Gal-1

aufwiesen. Demnach scheinen Mastzellen nur dann ihren positiven Einfluss auf die Implantation der Blastozyste bzw. den weiteren Verlauf der Trächtigkeit ausüben zu können, wenn ihnen Galektin-1 als Mediator zu Verfügung steht. Diese Annahme wurde nach Betrachtung der Plazenten bekräftigt. Zwar standen davon aufgrund der extrem hohen Rate an abortierten Embryonen respektive Föten nur wenige zur Verfügung, jedoch war das Ergebnis in Bezug auf die Morphologie eindeutig. Die Rekonstitution von W-sh-Mäusen mit *Lgals1*<sup>-/-</sup>-BMMC resultierte in einer ungewöhnlich breiten Schicht an Riesenzellen, aufgrund dessen sich die Areale sowohl der Spongiotrophoblasten als auch der Labyrinthzellen stark verkleinerten. In den Riesenzellen bildeten sich anstelle der sonst typischen Zellkerne flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, ähnlich Vakuolen. Ihre Verteilung wirkte zudem inhomogen und war geprägt durch große interstitielle Zwischenräume. Trophoblastäre Riesenzellen sind in der frühen Phase der Trächtigkeit entscheidend für die Vermittlung des Implantationsprozesses sowie für die Invasion der Blastozyste in das maternale Endometrium. Im weiteren Verlauf produzieren sie Hormone und Zytokine, die sowohl lokale als auch systemische physiologische Anpassungen der Mutter fördern (Cross 2005). Dies beinhaltet die Regulation des mütterlichen Blutflusses in Richtung Implantation, die Produktion von Progesteron in den Ovarien sowie die Laktogenese. Zudem wurde von anderen Autoren ein enger Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Expression an Galektin-1 in der Dezidua von trächtigen Mäusen nach Behandlung mit Progesteron nachgewiesen. Der durch Stress induzierte Abort war mit einer eingeschränkten Bildung von Gal-1 sowie einer signifikanten Reduktion der Progesteronkonzentrationen verbunden (Blois *et al.* 2007). Mastzellen beeinflussen demnach nicht nur entscheidend den Beginn der Schwangerschaft, sondern auch deren weiteren Verlauf durch die Gal-1-vermittelte Stimulation der Plazentation und Modifikation der Spiralarterien.

Weiterhin war zu überprüfen, ob der Mangel an Galektin-1 in den Mastzellen möglicherweise auch deren Migrations- und Proliferationsfähigkeit beeinflusste, weshalb eine mastzellspezifische Wirkung auf den Verlauf der Schwangerschaft nur eingeschränkt möglich wäre. Zunächst wurde die Präsenz von CD117/FcεR1α-doppelt positiven Zellen in verschiedenen Lymphknoten sowie der Dezidua von mastzelldefizienten W-sh-Mäusen nach Rekonstitution mit Gal-1-defizienten BMMC mittels Durchflusszytometrie untersucht. Interessanterweise migrierten die

*Lgals1*<sup>-/-</sup>-Mastzellen nach Transfer in W-sh-Mäuse weniger stark als BMMC von Wildtypmäusen, da die Anzahl an CD117/FcεRIα-positiven Zellen deutlich niedriger ausfiel als in den entsprechenden Organen derjenigen W-sh, die Gal-1-exprimierende BMMC erhielten. Dieser Unterschied war besonders deutlich in den para-aortalen Lymphknoten, welche die Organe der Beckenregion und eben auch den Reproduktionstrakt drainieren und vor allem in der Dezidua, dem mütterlichen Part der föto-maternalen Grenzfläche. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse könnten allerdings nicht nur mit einer herabgesetzten Fähigkeit der Migration zu erklären sein, sondern auch mit einem verminderten Proliferationsvermögen der *Lgals1*<sup>-/-</sup>-Mastzellen an der föto-maternalen Grenzfläche. Um Letzteres zu untersuchen, wurden BMMC entweder aus Wildtyp- oder *Lgals1*<sup>-/-</sup>-Weibchen generiert, zusammen mit Trophoblasten kultiviert und ihre Teilungsfähigkeit bestimmt. Die Anwesenheit der Trophoblasten und/oder die Defizienz an Galektin-1 in den Mastzellen führte zu deren verminderter Proliferationsfähigkeit. Verglichen mit dem Teilungspotential jener BMMC, die aus den Wildtypkontrollen generiert wurden, erreichten die *Lgals1*<sup>-/-</sup>-Mastzellen dieses Niveau in Ko-Kultur mit den Trophoblasten zu keinem Zeitpunkt. Im Gegensatz hierzu war die Rate an proliferierten Wildtyp-BMMC nach 48 Stunden Ko-Kultur signifikant höher, was zusätzlich auf eine Interaktion zwischen Galektin-1 und den Trophoblasten hindeutet. Außerdem unterstützen die Daten des Proliferationsassays die bereits in der Literatur beschriebene aktive Kommunikation zwischen Mastzellen und Trophoblasten sowie das Potenzial von Mastzellen, nach Hormongabe an die föto-maternale Grenzfläche zu migrieren (Jensen *et al.* 2010). Mastzellen scheinen demnach nur dann einen entscheidenden positiven Einfluss auf den Verlauf der Trächtigkeit auszuüben, wenn ihnen Galektin-1 als Mediator zur Verfügung steht.

Aufgrund der vorliegenden Daten sowie unter Einbeziehung der bereits bekannten Ergebnisse wäre folgendes Szenario denkbar (Abb. 59):

Unreife Mastzell-Vorläuferzellen migrieren aufgrund der simultanen Wirkung von Östradiol und Progesteron aus der Peripherie in den Uterus (Jensen *et al.* 2010). Unter Einfluss des Wachstumsfaktors SCF erfolgt *in utero* ihre Reifung und Differenzierung (Zsebo *et al.* 1990, Tsai *et al.* 1991, Metcalfe *et al.* 1997, Galli *et al.* 2008). Die intrauterine Aktivierung der Mastzellen könnte durch Östradiol und

Progesteron nach Bindung an die entsprechenden Rezeptoren stattfinden. Die Aktivierung führt zur simultanen Ausschüttung zuvor gebildeter und/oder *de novo* synthetisierter Mediatoren wie TGF- $\beta$  und Gal-1 sowie Trypsasen und Chymasen, insbesondere Mastzellprotease-8 (Mcp-8). Diese Mediatoren üben entweder direkt oder indirekt, einzeln oder interagierend einen entscheidenden Einfluss auf die Prozesse der Implantation der Blastozyste, die Dezidualisierung sowie die Plazentation mit der Umwandlung der Spiralarterien aus. Gal-1, welches von Mastzellen gebildet wird, ist dabei von elementarer Bedeutung für deren Migration und Proliferation. Weiterhin vermittelt Gal-1 die uneingeschränkte Entwicklung des Fötus, da ein Mangel dieses Proteins zu einer Zunahme des fötalen Todes führt. Von den Trophoblasten gebildetes oder periphäres TGF- $\beta$  kann an den TGF- $\beta$ -Rezeptor auf der Mastzelloberfläche binden und so einen zweiten Mechanismus ihrer Aktivierung vermitteln. TGF- $\beta$  stimuliert darüber hinaus die Rekrutierung von weiteren Mastzellen aus den als Reservoir dienenden Lymphknoten und der Milz in der Peripherie (Wolters *et al.* 2005) in die Kontaktzone zwischen Mutter und Fötus. Fibroblastäres und später trophoblastäres CtGF ist aktiv am Abbau extrazellulärer Matrix, der Angiogenese sowie dem Umbau von Gewebe beteiligt und steht im Zusammenhang mit der Wirkung von TGF- $\beta$  sowie Mcp-8. Diese Prozesse sind von fundamentaler Bedeutung nicht nur für die Einnistung des Fötus in das uterine Endometrium, sondern auch für den weiteren Verlauf der Schwangerschaft.

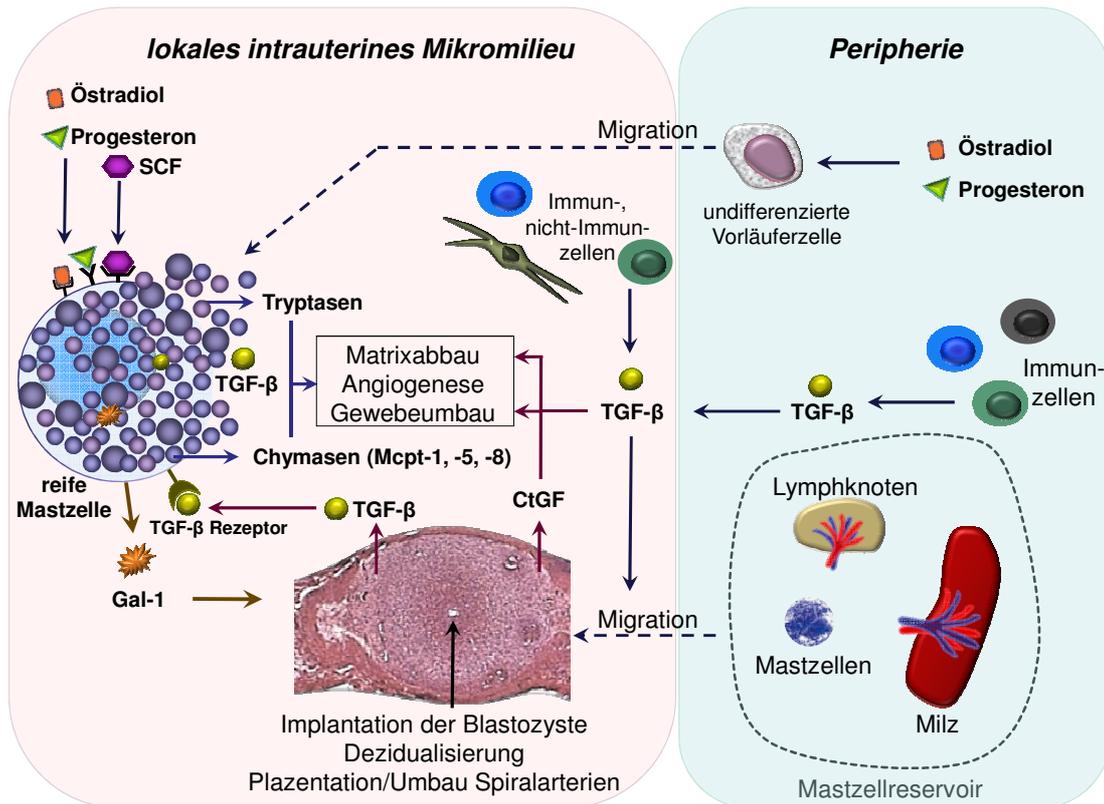


Abb. 59: Hypothetisches Szenario der Wirksamkeit von Mastzellen an der föto-maternalen Grenzfläche; SCF = stem cell factor (Stammzellen-Wachstumsfaktor), Gal-1 = Galektin-1, Mcpt = mast cell protease (Mastzellprotease), TGF-β = transforming growth factor-β (Transformations-Wachstumsfaktor-β), CtGF = connective tissue growth factor (Bindegewebe-Wachstumsfaktor)

Die Daten der vorliegenden Arbeit offenbaren gänzlich neuartige Funktionen von Mastzellen, die offensichtlich nicht nur entscheidend für die frühen Prozesse der Trächtigkeit, wie die Implantation und die Dezidualisierung, sind. Aufgrund des Zusammenspiels mit Molekülen, wie TGF-β, CtGF und Gal-1, beeinflussen sie auch den weiteren Verlauf der Schwangerschaft positiv, insbesondere durch die Vermittlung der optimalen Entwicklung der Plazenta sowie die Modifikation der Spiralarterien. Beide Prozesse gewährleisten eine uneingeschränkte Entwicklung des Fötus innerhalb des mütterlichen Uterus. Diese Ergebnisse bieten bislang unbekannte Einblicke in die Funktion von uterinen Mastzellen und tragen dazu bei, die zellulären und molekularen Mechanismen der Implantation und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft besser zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Mastzellen auf reproduktive Prozesse und die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen.

Zu Beginn wurde die phasenabhängige Variation der Mastzellzahl im Verlauf des murinen Östruszyklus sowie in der frühen Trächtigkeit analysiert. Uterine Mastzellen präsentierten sich quantitativ am stärksten im Östrus (rezeptive Phase). Sie verblieben auf hohem Niveau, wenn die Implantation der Blastozyste in das maternale Endometrium erfolgte und fielen bei nicht erfolgter Befruchtung ab.

Für weitere Experimente bediente man sich eines Mausmodells mit nachgewiesener Mastzelldefizienz (C57BL/6J-*Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh)). Diese resultierte in einer deutlichen Abnahme der Anzahl an Implantationen, die jedoch nach Rekonstitution mit Knochenmark-generierten Mastzellen (BMMC) vollständig auf das Niveau der Wildtypen angehoben werden konnte. Ebenso führte die Mastzelldefizienz zu einer ungenügenden Ausbildung der Spiralarterien und somit zu suboptimal entwickelten Plazenten. Auch diese Abnormalitäten konnten mittels BMMC-Transfer behoben werden. Die Mastzelldefizienz resultierte in einer signifikant geringeren Implantationsgröße an den Tagen 5 und 6 *post coitum*, was ursächlich für die abnormale Plazentation sein könnte. Als Mediatoren dieser Prozesse werden die Mastzellprotease-8 sowie TGF- $\beta$  und CtGF vorgeschlagen, indem sie ein Gleichgewicht in Bezug auf ihre Anwesenheit bzw. Interaktion ausbilden. Allerdings scheinen Mastzellen ihren positiven Einfluss auf die Trächtigkeit nur dann ausüben zu können, wenn ihnen Galektin-1 (Gal-1) als Mediator zu Verfügung steht. W-sh-Mäuse, die BMMC von Gal-1-defizienten Weibchen erhielten, wiesen eine hohe Rate an intrauterinem Tod auf. Hervorgerufen wurde dies durch eine mangelhafte Plazentaentwicklung bzw. Modifikation der Spiralarterien, möglicherweise aufgrund der eingeschränkten Migration von Gal-1-defizienten Mastzellen in den Uterus.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bieten neue Einblicke in die Funktionen von Mastzellen: Sie unterstützen die Implantation, Dezidualisierung und Plazentation, die letztlich durch Interaktion verschiedener Mediatoren an der föto-maternalen Grenzfläche eine uneingeschränkte Entwicklung des Föten gewährleisten. Somit bieten sie bislang unbekanntes Forschungsansätze für das Verständnis des Paradoxons ‚Schwangerschaft‘.

## 6 Summary

The aim of this study was to investigate the influence of mast cells on reproductive processes and the underlying mechanisms.

At first, stage-dependent variations in mast cell frequencies during the hormonal regulated murine estrous cycle as well as on early pregnancy stages, e.g. days 2 and 5 were investigated. The number of mast cells (MCs) reached their highest level during estrus (receptive phase) and remained high if implantation of the blastocyst within the maternal endometrium occurred. If no pairing took place, the number of MCs went back to the levels observed in diestrus.

For subsequent experiments a well established mouse model was used, namely C57BL/6J-*Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> (W-sh mice). Because of their MC-deficiency they represent a useful tool to address the functions of MCs in pregnancy establishment and maintenance. A defective *c-Kit* gene expression and therefore a lack of MCs resulted in significantly reduced numbers of implanted blastocysts, which could be completely restored by reconstitution with bone marrow-derived mast cells (BMMC). W-sh mice developed significantly smaller placentas and showed impaired spiral artery remodeling. These defects could be completely corrected by BMMC-transfer. The restricted placentation could be the consequence of a suboptimal implantation process as significant smaller implantations on gestation days 5 and 6 could be observed. Possible mediators of these processes could be mast cell protease-8 as well as TGF- $\beta$  and CtGF which act through a direct and orchestrated interaction. However, obviously MCs only positively influence the nidation of the blastocyst and pregnancy outcome when Galectin-1 (Gal-1) is stored within their granules. W-sh females, transferred with BMMC from Gal-1-deficient mice, lost the majority of their fetuses because of an inadequate placentation and spiral artery modification.

The data of the present work reveal novel mast cell functions with respect to pivotal pregnancy-related processes like implantation, decidualization and placentation which have one aspect in common: The nonrestrictive development of the fetus *in utero*. These processes are arranged by the interaction of different mediators at the fetal-maternal interface. Consequently these data provide so far unknown research approaches for the understanding of the pregnancy paradigm.

## 7 Literaturverzeichnis

Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G (2004): Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51:275-282.

Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM (2002): Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell. Biol.* 4:599-604.

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC (2002): Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 250:358-573.

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z (1996): Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122:1723-1736.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004): Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5:266-271.

Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA (2007): Biology of metalloproteinases. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 48:323-334.

Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J (2007): Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58:268-279.

Ashkar AA, Croy BA (2001): Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin. Immunol.* 13:235-241.

Aydin Y, Tunçel N, Gürer F, Tuncel M, Koşar M, Oflaz G (1998): Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats: cyclic changes and contribution to tissue histamine. *Comp. Biochem. Physiol.* 120:255-262.

Bacharach E, Itin A, Keshet E (1992): In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10686-10690.

Barrett AJ. (1994): Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 244:1-15.

Bartha K, Declerck PJ, Moreau H, Nelles L, Collen D (1991): Synthesis and secretion of plasminogen activator inhibitor 1 by human endothelial cells in vitro. Effect of active site mutagenized tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 266:792-797.

Batth BK, Parshad RK (2000): Mast cell dynamics in the house rat (*Rattus rattus*) ovary during estrus cycle, pregnancy and lactation. *Eur. J. Morphol.* 38:17-23.

Beaven MA (2009): Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur. J. Immunol.* 39:11-25.

Berrozpe G, Timokhina I, Yukl S, Tajima Y, Ono M, Zelenetz AD, Besmer P (1999): The W(sh), W(57), and Ph Kit expression mutations define tissue-specific control elements located between -23 and -154 kb upstream of Kit. *Blood* 94:2658-2666.

Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW (2002): Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci.* 17:56-61.

Bilinski MJ, Thorne JG, Oh MJ, Leonard S, Murrant C, Tayade C, Croy BA (2008): Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reprod. Biomed. Online* 16:218-226.

Blasi F, Vassalli JD, Danø K (1987): Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol.* 104:801-804.

Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC (2004): Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol. Reprod.* 70:1018-1023.

Blois SM, Illarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC (2007): A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat. Med.* 13:1450-1457.

Border WA, Ruoslahti E (1992): Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J. Clin. Invest.* 90:1-7.

Bosquiazzo VL, Ramos JG, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH (2007): Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. *Reproduction* 133:1045-1055.

Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010): Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.* 20:161-168.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brandon JM, Evans JE (1984): Observations on uterine mast cells during early pregnancy in the vole, *Microtus agrestis*. *Anat. Rec.* 208:515-520.

Brigstock, DR (1999): The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* 20:189-206.

Brunner A, Chinn J, Neubauer M, Purchio AF (1991): Identification of a gene family regulated by transforming growth factor- $\beta$ . *DNA Cell Biol.* 10:293-300.

Burke SD, Barrette VF, Gravel J, Carter AL, Hatta K, Zhang J, Chen Z, Leno-Durán E, Bianco J, Leonard S, Murrant C, Adams MA, Croy BA (2010): Uterine NK cells, spiral artery modification and the regulation of blood pressure during mouse pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63:472-481.

Bytautiene E, Vedernikov YP, Saade GR, Romero R, Garfield RE (2002): Endogenous mast cell degranulation modulates cervical contractility in the guinea pig. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186:438-445.

Bytautiene E, Vedernikov YP, Saade GR, Romero R, Garfield RE (2004): Degranulation of uterine mast cell modifies contractility of isolated myometrium from pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191:1705-1710.

Bytautiene E, Vedernikov YP, Saade GR, Romero R, Garfield RE (2008): IgE-independent mast cell activation augments contractility of nonpregnant and pregnant guinea pig myometrium. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 147:140-146.

Cabanillas-Saez A, Schalper JA, Nicovani SM, Rudolph MI (2002): Characterization of mast cells according to their content of tryptase and chymase in normal and neoplastic human uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Cancer* 12:92-98.

Caligioni CS (2009): Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Appendix 4:Appendix 4I.

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. (2000): Embryo implantation. *Dev. Biol.* 223:217-37.

Caughey GH (2007): Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol. Rev.* 217:141-154.

Chapman HA Jr, Vavrin Z, Hibbs JB Jr (1982): Macrophage fibrinolytic activity: identification of two pathways of plasmin formation by intact cells and of a plasminogen activator inhibitor. *Cell* 28:653-662.

Charbonnier LM, Han WG, Quentin J, Huizinga TW, Zwerina J, Toes RE, Jorgensen C, Louis-Pence P (2010): Adoptive transfer of IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> regulatory T cells suppresses ongoing arthritis. *J. Autoimmun.* 34:390-399.

Choe YS, Shim C, Choi D, Lee CS, Lee KK, Kim K (1997): Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol. Reprod. Dev.* 48:261-266.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Christ G, Seiffert D, Hufnagl P, Gessl A, Wojta J, Binder BR (1993): Type 1 plasminogen activator inhibitor synthesis of endothelial cells is downregulated by smooth muscle cells. *Blood* 81:1277-1283.

Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC (2000): Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 165:3722-3729.

Clark DA, Fernandes J, Banwatt D (2008): Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59:525-534.

Cleland WW (1964): Dithiothreitol, A New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* 3:480-482

Cocchiara R, Albeggiani G, Di Trapani G, Azzolina A, Lampiasi N, Rizzo F, Diotallevi L, Gianaroli L, Geraci D (1992): Oestradiol enhances in vitro the histamine release induced by embryonic histamine-releasing factor (EHRF) from uterine mast cells. *Hum. Reprod.* 7:1036-1041.

Cockburn K, Rossant J (2010): Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* 120:995-1003.

Collen D, Lijnen HR (1991): Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78:3114-3124.

Collins MK, Tay CS, Erlebacher A (2009): Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J. Clin. Invest.* 119:2062-2073.

Crisp SJ, Dunn MJ (1994): Detection of proteins on protein blots using chemiluminescent systems. *Methods Mol. Biol.* 32:233-237.

Crivellato E, Travan L, Ribatti D (2009): Mast cells and basophils: a potential link in promoting angiogenesis during allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 151:89-97.

Cross JC (2005): How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review. *Placenta* 26:S3-9.

Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL (2002): Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell Endocrinol.* 187:207-212.

Cross JC, Werb Z, Fisher SJ (1994): Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1508-1518.

Crowle PK, Reed ND (1981): Rejection of the intestinal parasite *Nippostrongylus brasiliensis* by mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> anemic mice. *Infect. Immun.* 33:54-58.

Crowle PK, Reed ND (1984): Bone marrow origin of mucosal mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 73:242-247.

Croy BA, Zhang J, Tayade C, Colucci F, Yadi H, Yamada AT (2010): Analysis of uterine natural killer cells in mice. *Methods Mol. Biol.* 612:465-503.

Czarnetzki BM (1982): Release of mediators from purified rat mast cells during phagocytosis. *Scand. J. Immunol.* 15:581-586.

Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985): Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139-266.

Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK (1997): Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev. Genet.* 21:44-54.

Dastych J, Metcalfe DD (1994): Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J. Immunol.* 152:213-9.

Dawson S, Henney A (1992): The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis* 95:105-1017.

Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G (2010): Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63:17-21.

Der-Silaphet T, Malysz J, Hagel S, Larry Arsenault A, Huizinga JD (1998): Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 114:724-736.

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004): Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* 25:341-373.

DiPalma T, Tucci M, Russo G, Maglione D, Lago CT, Romano A, Saccone S, Della Valle G, De Gregorio L, Dragani TA, Viglietto G, Persico MG (1996): The placenta growth factor gene of the mouse. *Mamm. Genome* 7:6-12.

Doma MK, Parker R (2007): RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 131:660–668.

Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J (2000): Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev. Reprod.* 5:143-152.

Drudy L, Sheppard BL, Bonnar J (1991): The ultrastructure of mast cells in the uterus throughout the normal menstrual cycle and the postmenopause. *J. Anat.* 175:51-63.

Du T, Friend DS, Austen KF, Katz HR (1996): Tissue-dependent differences in the asynchronous appearance of mast cells in normal mice and in congenic mast cell-deficient mice after infusion of normal bone marrow cells. *Clin. Exp. Immunol.* 103:316-321.

Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Köhler A, Peschke K, Vöhringer D, Waskow C, Krieg T, Müller W, Waisman A, Hartmann K, Gunzer M, Roers A (2011): Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* 34:973-984.

Duttlinger R, Manova K, Chu TY, Gyssler C, Zelenetz AD, Bachvarova RF, Besmer P (1993): W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression: ectopic c-kit expression at sites of kit-ligand expression affects melanogenesis. *Development* 118:705-717.

Echtenacher B, Männel DN, Hültner L (1996): Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75-77.

Ehrlich P (1879): Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Arch. Anat. Physiol.* 3:166-169.

el Sayed SO, Dyson M. (1993): Histochemical heterogeneity of mast cells in rat dermis. *Biotech. Histochem.* 68:326-332.

Eller K, Wolf D, Huber JM, Metz M, Mayer G, McKenzie AN, Maurer M, Rosenkranz AR, Wolf AM (2011): IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *J. Immunol.* 186:83-91.

Enders AC, Schlafke S (1969): Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am. J. Anat.* 125:1-29.

Enders AC, Schlafke S (1974): Surface coats of the mouse blastocyst and uterus during the preimplantation period. *Anat. Rec.* 180:31-45.

Enerbäck L (1981): The gut mucosal mast cell. *Monogr. Allergy* 17:222.

Erlebacher A, Price KA, Glimcher LH (2004): Maintenance of mouse trophoblast stem cell proliferation by TGF-beta/activin. *Dev. Biol.* 275:158-169.

Fata JE, Chaudhary V, Khokha R (2001): Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 65:680-688.

Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R (2000): Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:77-95.

Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH (1998): Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 4:336-340.

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18:4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9:669-676.

Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, Radermacher P, Möller P, Benoist C, Mathis D, Fehling HJ, Rodewald HR (2011): Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* 35:832-844.

Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Friese K, Walzel H, Jeschke U (2010): Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1. *Placenta* 31:825-832.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:330-336.

Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR (1996): Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J. Invest. Dermatol.* 107:404-411.

Friedrichsen S, Heuer H, Christ S, Winckler M, Brauer D, Bauer K, Raivich G (2003): CTGF expression during mouse embryonic development. *Cell Tissue Res.* 312:175-188.

Galli SJ (2000): Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* 7:32-39.

Galli SJ, Arizono N, Murakami T, Dvorak AM, Fox JG (1987): Development of large numbers of mast cells at sites of idiopathic chronic dermatitis in genetically mast cell-deficient WBB6F1-W/W<sup>v</sup> mice. *Blood* 69:1661-1666.

Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA (2011): Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12:1035-1044.

Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M (2008): Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8:478-486.

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M (2005): Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23:749-786.

Galli SJ, Kitamura Y (1987): Genetically mast-cell-deficient W/W<sup>v</sup> and Sl/Sl<sup>d</sup> mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *Am. J. Pathol.* 127:191-198.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M (2005): Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6:135-142.

Garfield RE, Bytautiene E, Vedernikov YP, Marshall JS, Romero R (2000): Modulation of rat uterine contractility by mast cells and their mediators. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183:118-125.

Garfield RE, Irani AM, Schwartz LB, Bytautiene E, Romero R (2006): Structural and functional comparison of mast cells in the pregnant versus nonpregnant human uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194:261-267.

Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI (2007): Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Blood* 109:2058-2065.

Gaytan F, Aceitero J, Bellido C, Sánchez-Criado JE, Aguilar E (1991): Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biol. Reprod.* 45:27-33.

Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002): Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23:3-19.

Gibbons AF, Chang MC (1972): Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biol. Reprod.* 6:193-203.

Ghildyal N, Friend DS, Freelund R, Austen KF, McNeil HP, Schiller V, Stevens RL (1994): Lack of expression of the tryptase mouse mast cell protease 7 in mast cells of the C57BL/6J mouse. *J. Immunol.* 153:2624-2630.

Ginsburgh H, Sachs L (1963): Formation of pure suspensions of mast cells in tissue culture by differentiation of lymphoid cells from the mouse thymus. *J. Natl. Cancer Inst.* 31:1-39.

Góth MI, Hubina E, Raptis S, Nagy GM, Tóth BE (2003): Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Microsc. Res. Tech.* 60:98-106.

Graw J (2010): Genetik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Greenwood JD, Minhas K, di Santo JP, Makita M, Kiso Y, Croy BA (2000): Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta* 21:693-702.

Gregersen PK, Behrens TW (2006): Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat. Rev. Genet.* 7:917-928.

Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, Viola A, Odom S, Rivera J, Colombo MP, Pucillo CE (2008): CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 29:771-781.

Grimbaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ (2005): Mast cell-deficient W-sash *c-kit* mutant *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol.* 167:835-848.

Grimbaldeston MA, Metz M, Yu M, Tsai M, Galli SJ (2006): Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 18:751-760.

Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR (1994): Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J. Immunol.* 52:5860-5867.

Gurish MF, Austen KF (2001): The diverse roles of mast cells. *J. Exp. Med.* 194:F1-F5.

Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS, Oettgen HC (2004): IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* 172:1139-1145.

Habek D, Cerkez-Habek J, Jalsovec D (2000): Anaphylactic shock in response to wasp sting in pregnancy. *Zentralbl. Gynäkol.* 122:393-394.

Haley PJ (2003): Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 188:49-71.

Hallgren J, Gurish MF (2011): Mast cell progenitor trafficking and maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 716:14-28.

Harvey EB (1964): Mast Cell Distribution in the Uterus of Cycling and Pregnant Hamsters. *Anat. Rec.* 148:507-516.

Heib V, Becker M, Taube C, Stassen M (2008): Advances in the understanding of mast cell function. *Br. J. Haematol.* 142:683-694.

Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB (1987): Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J. Cell Biol.* 105:2861-2876.

Hiller-Sturmhöfel S, Bartke A (1998): The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res. World* 22:153-164.

Hirota Y, Burnum KE, Acar N, Rabinovich GA, Daikoku T, Dey SK (2012): Galectin-1 markedly reduces the incidence of resorptions in mice missing immunophilin FKBP52. *Endocrinology* 153:2486-2493.

Hiti AL, Rideout WM 3rd, Laug WE, Jones PA (1990): Plasminogen activator regulation by transforming growth factor-beta in normal and neoplastic human urothelium. *Cancer Commun.* 2:123-128.

Holzapfel B & Wickert L (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). In: *Biologie in unserer Zeit.* 37: 120-126.

Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Kaneko Y, Iwai M, Nakayama H, Mori T (1992): Expression of c-kit protein during placental development. *Biol. Reprod.* 47:614-620.

Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL (2011): Two unique human decidual macrophage populations. *J. Immunol.* 186:2633-2642.

Hu D, Cross JC (2010): Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.* 54:341-354.

Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A (1995): W/kil gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373:347-349.

Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL (1999): Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 400:769-772.

Hunt JE, Friend DS, Gurish MF, Feyfant E, Sali A, Huang C, Ghildyal N, Stechschulte S, Austen KF, Stevens RL (1997): Mouse mast cell protease 9, a novel member of the chromosome 14 family of serine proteases that is selectively expressed in uterine mast cells. *J. Biol. Chem.* 272:29158-29166.

Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK (2006): KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol. Reprod.* 75:421-433.

Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR (1993): Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol. Cell* 4:637-645.

Ihara N, Akagi R, Ejiri K, Kudo T, Furuyama K, Fujita H (1998): Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *FEBS Lett.* 439:163-167.

Ikeda RK, Miller M, Nayar J, Walker L, Cho JY, McElwain K, McElwain S, Raz E, Broide DH (2003): Accumulation of peribronchial mast cells in a mouse model of ovalbumin allergen induced chronic airway inflammation: modulation by immunostimulatory DNA sequences. *J. Immunol.* 171:4860-4867.

Illarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA (2009): Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat. Immunol.* 10:981-991.

Ishizaka T, Adachi T, Chang TH, Ishizaka K (1977): Development of Mast Cells in Vitro: II. Biologic Function of Cultured Mast Cells. *J. Immunol.* 118:211-217.

Ishizaka T, Ishizaka K (1978): Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE-receptors. *J. Immunol.* 120:800-805.

Ishizaka T, Okudaira H, Mauser LE, Ishizaka K (1976): Development of rat mast cells in vitro. I. Differentiation of mast cells from thymus cells. *J. Immunol.* 116:747-754.

Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM (2003): Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130:2779-2791.

Jahanyar J, Koerner MM, Loebe M, Youker KA, Torre-Amione G, Noon GP (2008): The role of mast cells after solid organ transplantation. *Transplantation* 85:1365-1371.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002): Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Jensen F, Woudwyk M, Teles A, Woidacki K, Taran F, Costa S, Malfertheiner SF, Zenclussen AC (2010): Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS One* 5:e14409.

Jeschke U, Karsten U, Wiest I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H (2006): Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody. *Histochem. Cell. Biol.* 126:437-444.

Jeschke U, Toth B, Scholz C, Friese K, Makrigiannakis A (2010): Glycoprotein and carbohydrate binding protein expression in the placenta in early pregnancy loss. *J. Reprod. Immunol.* 85:99-105.

Jeziorska M, Salamonsen LA, Woolley DE (1995): Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 53(2):312-320.

Jones RE, Duvall D, Guillette LJ Jr (1980): Rat ovarian mast cells: distribution and cyclic changes. *Anat. Rec.* 197:489-493.

Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H (1999): Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur. J. Immunol.* 29:2645-2649.

Kanno Y, Ishisaki A, Yoshida M, Tokuda H, Numata O, Kozawa O (2005): SAPK/JNK plays a role in transforming growth factor-beta-induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* 37:140-145.

Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, Shlomchik MJ (2007): Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 204:2545-2552.

Karaca T, Arikan S, Kalender H, Yoruk M (2008): Distribution and heterogeneity of mast cells in female reproductive tract and ovary on different days of the oestrus cycle in Angora goats. *Reprod. Domest. Anim.* 43:451-456.

Karsten CM, Behrends J, Wagner AK, Fuchs F, Figge J, Schmutte I, Hellberg L, Kruse A (2009): DC within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells. *Eur. J. Immunol.* 39:2203-2214.

Kauma S, Huff T, Krystal G, Ryan J, Takacs P, Turner T (1996): The expression of stem cell factor and its receptor, c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:1261-1266.

Khosrotehrani K, Johnson KL, Guégan S, Stroh H, Bianchi DW (2005): Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 66:1-12.

Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H (1975): Natural killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* 5:117-121.

Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993): Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9:413-421.

Kinashi T, Springer TA (1994): Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood* 83:1033-1038.

Kitamura Y (1989): Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu. Rev. Immunol.* 7:59-76.

Kitamura Y, Go S (1979): Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood* 53:492-497.

Kitamura Y, Go S, Hatanaka K (1978): Decrease of mast cells in W/W<sup>v</sup> mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 52:447-452.

Kitamura Y, Shimada M, Hatanaka K, Miyano Y (1977): Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature* 268:442-443.

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.* 198:1201-1212.

Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, Strominger JL (2008): T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *PNAS* 105:18472-18477.

Kovach NL, Lin N, Yednock T, Harlan JM, Broudy VC (1995): Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood* 85:159-167.

Kraft S, Kinet JP (2007): New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 7:365-378.

Krishna A, Terranova PF (1991): Compartmentalized mast cell degranulations in the ovarian hilum, fat pad, bursa and blood vessel regions of the cyclic hamster: relationships to ovarian histamine and blood flow. *Acta Anat. (Basel).* 141:18-25.

Kruihof EK (1988): Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme* 40:113-121.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S (1993): Transforming growth factor β1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:770-774.

Labied S, Blacher S, Carmeliet P, Noël A, Frankenne F, Foidart JM, Munaut C (2011): Transient reduction of placental angiogenesis in PAI-1-deficient mice. *Physiol. Genomics* 43:188-198.

Lang G (2006): Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer-Verlag/Wien.

Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ (1998): Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392: 90-93.

Lash GE, Bulmer JN (2011): Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? *J. Reprod. Immunol.* 88:156-64.

Leonard S, Murrant C, Tayade C, van den Heuvel M, Watering R, Croy BA (2006): Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification -- facts and hypotheses -- a review. *Placenta* 27 Suppl A:S40-46.

Levi-Schaffer F, Austen KF, Gravallesse PM, Stevens RL (1986): Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6485-6488.

Likar IN, Likar LJ (1964): Acid mucopolysaccharides and mast cells in the bovine uterus at different stages of the sexual cycle. *Acta Endocrinol.* 46:493-506.

Lindstedt KA, Kovanen PT (2004): Proteolysis of pericellular matrix: a process linking inflammation to plaque destabilization and rupture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 2205-2206.

Lindstedt KA, Wang Y, Shiota N, Saarinen J, Hyytiäinen M, Kokkonen JO, Keski-Oja J, Kovanen PT (2001): Activation of paracrine TGF-beta1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *FASEB J.* 15:1377-1388.

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Springer

Loutit JF, Peters J, Stevens J (1981): Spleen colony-forming cell as common precursor of tissue mast cells and granulocytes. *Nature* 294:290.

Louwrens HD, Kwaan HC, Pearce WH, Yao JS, Verrusio E (1995): Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression by normal and aneurysmal human aortic smooth muscle cells in culture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 10:289-293.

Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ (2006): Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442:997-1002.

Lundgren CH, Sawa H, Sobel BE, Fujii S (1994): Modulation of expression of monocyte/macrophage plasminogen activator activity and its implications for attenuation of vasculopathy. *Circulation* 90:1927-1934.

Luther C, Warner K, Takei F (2011): Unique progenitors in mouse lymph node develop into CD127+ NK cells: thymus-dependent and thymus-independent pathways. *Blood* 117:4012-4021.

Lützelshwab C, Huang MR, Kullberg MC, Aveskogh M, Hellman L (1998): Characterization of mouse mast cell protease-8, the first member of a novel subfamily of mouse mast cell serine proteases, distinct from both the classical chymases and tryptases. *Eur. J. Immunol.* 28:1022-1033.

Lyon MF, Glenister PH (1982): A new allele *sash* (*Wsh*) at the *W*-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet. Res.* 39:315-322.

Macey MR, Sturgill JL, Morales JK, Falanga YT, Morales J, Norton SK, Yerram N, Shim H, Fernando J, Gifillan AM, Gomez G, Schwartz L, Oskeritzian C, Spiegel S, Conrad D, Ryan JJ (2010): IL-4 and TGF-beta 1 counterbalance one another while regulating mast cell homeostasis. *J. Immunol.* 184:4688-4695.

Madamanchi NR, Runge MS (2001): *Methods in Molecular Medicine*, 51: Angiotensin Protocols, edited by: D.H. Wang, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Madeja Z, Yadi H, Apps R, Boulenouar S, Roper SJ, Gardner L, Moffett A, Colucci F, Hemberger M (2011): Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:4012-4017.

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN (1996): Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381:77-80.

Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, Abraham SN (1994): Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J. Immunol.* 152:1907-1914.

Malaviya R, Twesten NJ, Ross EA, Abraham SN, Pfeifer JD (1996): Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J. Immunol.* 156:1490-1496.

McMaster MT, Newton RC, Dey SK, Andrews GK (1992): Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. *J. Immunol.* 148:1699-1705.

Medawar PB (1953): Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. In: Symposia of the society for experimental biology, vol 7, Evolution, R. Brown and JF Danielli, Eds. Syndics of the Cambridge University Press, London: 320-338.

Meinhardt K, Kroeger I, Abendroth A, Müller S, Mackensen A, Ullrich E (2012): Influence of NK cell magnetic bead isolation methods on phenotype and function of murine NK cells. *J. Immunol. Methods* 378:1-10.

Menzies FM, Higgins CA, Shepherd MC, Nibbs RJ, Nelson SM (2011): Mast cells reside in myometrium and cervix, but are dispensable in mice for successful pregnancy and labor. *Immunol. Cell Biol.* doi:10.1038.

Metcalf DD, Baram D, Mekori YA (1997): Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033-1079.

Metz M, Maurer M (2007): Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 28:234-241.

Michaloudi HC, Papadopoulos GC (1999): Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. *J. Anat.* 195:577-586.

Miller DA, Lee A, Pelton RW, Chen EY, Moses HL, Derynck R (1989): Murine transforming growth factor-beta 2 cDNA sequence and expression in adult tissues and embryos. *Mol. Endocrinol.* 3:1108-1114.

Miller JS, Schwartz LB (1989): Human mast cell proteases and mast cell heterogeneity. *Curr. Opin. Immunol.* 1:637-642.

Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee TH, Nixon DF, McCune JM (2008): Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322:1562-1565.

Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD (2010): Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 3:111-128.

Mor G, Abrahams VM (2003): Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:119.

Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S (2011): Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann. NY Acad. Sci.* 1221:80-87.

Mori A, Nakayama K, Suzuki J, Nikaido T, Isobe M, Fujii S (1997b): Analysis of stem cell factor for mast cell proliferation in the human myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 3:411-418.

Mori A, Zhai YL, Toki T, Nikaido T, Fujii S (1997): Distribution and heterogeneity of mast cells in the human uterus. *Hum. Reprod.* 12:368-372.

Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Takehashi M, Shinohara T (2009): Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One* 4:e7909.

Mota I, Vugman I (1956): Effects of anaphylactic shock and compound 48/80 on the mast cells of the guinea pig lung. *Nature* 177:427-429.

Moussad EE, Brigstock DR (2000): Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol. Genet. Metab.* 71:276-292.

Mulisch M, Welsch U (2010): Romeis Mikroskopische Technik, 18. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG (2011): Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol. Rev.* 241:20-38.

Murphy ED (1977): Effects of mutant steel alleles on leukemogenesis and life-span in the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:107-110.

Murphy SP, Fast LD, Hanna NN, Sharma S (2005): Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *J. Immunol.* 175:4084-4090.

Nagao K, Yokoro K, Aaronson SA (1981): Continuous lines of basophil/mast cells derived from normal mouse bone marrow. *Science* 212:333-335.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003): Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Nakayama T, Yao L, Tosato G (2004): Mast cell-derived angiopoietin-1 plays a critical role in the growth of plasma cell tumors. *J. Clin. Invest.* 114:1317-1325.

National Institutes of Health. Stem Cells (2001): Scientific Progress and Future Research Directions. *Stem Cell Information* (online), <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>.

Neuhaus KL, Tebbe U, Gottwik M, Weber MA, Feuerer W, Niederer W, Haerer W, Praetorius F, Grosser KD, Huhmann W, *et al.* (1988): Intravenous recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) and urokinase in acute myocardial infarction: results of the German Activator Urokinase Study (GAUS). *J. Am. Coll. Cardiol.* 12:581-587.

Nigrovic PA, Gray DH, Jones T, Hallgren J, Kuo FC, Chaletzky B, Gurish M, Mathis D, Benoist C, Lee DM (2008): Genetic inversion in mast cell-deficient (Wsh) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. *Am. J. Pathol.* 173:1693-1701.

Norrby K (2002): Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 110:355-371.

Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, Kina T, Nakauchi H, Nishikawa S (1991): Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 174:63-71.

Ohta H, Yomogida K, Dohmae K, Nishimune Y (2000): Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 127:2125-2131.

Ottersbach K, Dzierzak E (2010): The placenta as a haematopoietic organ. *Int. J. Dev. Biol.* 54:1099-1106.

Ozaki S, Sato Y, Yasoshima M, Harada K, Nakanuma Y (2005): Diffuse expression of heparan sulfate proteoglycan and connective tissue growth factor in fibrous septa with many mast cells relate to unresolving hepatic fibrosis of congenital hepatic fibrosis. *Liver Int.* 25:817-828.

Paffaro VA Jr, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT (2003): Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* 24:479-488.

Pardi G, Marconi AM, Cetin I (2002): Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses--a review. *Placenta* 23:S136-141.

Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK (2000): Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:67-76.

Paria BC, Song H, Dey SK (2001): Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 597-605.

Parish CR (1999): Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* 77: 499-508.

Parkening TA, Collins TJ, Smith ER (1982): Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol. Aging* 3:31-35.#

Parshad RK, Kathpalia K (1993): Distribution and characteristics of mast cells in the chick ovary. *Br. Poult. Sci.* 34:65-71.

Pearce FL (1986): On the heterogeneity of mast cells. *Pharmacology* 32: 61-71.

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K (1994): Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269:6271-6274.

Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL (2007): The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat. Rev. Genet.* 8:58-69.

Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD, Dorsett J, Lee V, Weitlauf H (1996): Differential expression of two beta-galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol. Reprod.* 55:548-558.

Piotrowski P, Croy BA (1996): Maternal cells are widely distributed in murine fetuses in utero. *Biol. Reprod.* 54:1103-1110.

Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Jung S (2008): Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J. Clin. Invest.* 118:3954-3965.

Poirier F, Robertson EJ (1993): Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 119:1229-1236.

Poon RY, Bagwell B (2000) in: In Living Color: Flow Cytometry and Cell Sorting Protocols. Diamond RA and DeMaggio S (eds.), Springer-Verlag (New York, NY): 302-352.

Psychoyos A (1973) in: Handbook of Physiology, eds. Greep RO & Astwood EG (Am. Physiol. Soc., Washington, DC):187-215.

Pusey A, Wolf M (1996): Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* 11:201-206.

Rabbani ML, Rogers PA (2001): Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 122:85-90.

Rabinovich GA, Illarregui JM (2009): Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol. Rev.* 230:144-159.

Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A (2007): An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand. J. Immunol.* 66:143-158.

Ramhorst RE, Giribaldi L, Fraccaroli L, Toscano MA, Stupirski JC, Romero MD, Durand ES, Rubinstein N, Blaschitz A, Sedlmayr P, Genti-Raimondi S, Fainboim L, Rabinovich GA (2012): Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology* doi: 10.1093.

Razin E, Cordon-Cardo C, Good RA (1981): Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:2559-2561.

Razin E, Ihle JN, Seldin D, Mencia-Huerta JM, Katz HR, LeBlanc PA, Hein A, Caulfield JP, Austen KF, Stevens RL (1984): Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J. Immunol.* 132:1479-1486.

Redecha P, van Rooijen N, Torry D, Girardi G (2009): Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood* 113:4101-4109.

Reibiger I, Spanel-Borowski K (2000): Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 118:243-249.

Reynolds DS, Serafin WE, Faller DV, Wall DA, Abbas AK, Dvorak AM, Austen KF, Stevens RL (1988): Immortalization of murine connective tissue-type mast cells at multiple stages of their differentiation by coculture of splenocytes with fibroblasts that produce Kirsten sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 263:12783-12791.

Reynolds DS, Stevens RL, Gurley DS, Lane WS, Austen KF, Serafin WE (1989): Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 264:20094-20099.

Riley JF (1953): The effects of histamine-liberators on the mast cells of the rat. *J. Pathol. Bacteriol.* 65:471-479.

Rockwell LC, Pillai S, Olson CE, Koos RD (2002): Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol. Reprod.* 67:1804-1810.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS (1986): Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:4167-4171.

Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlström AC, Care AS (2009): Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol. Reprod.* 80:1036-1045.

Robertson SA, Mau VJ, Tremellen KP, Seamark RF (1996): Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *J. Reprod. Fertil.* 107:265-277.

Robinson-White A, Beaven MA (1982): Presence of histamine and histamine-metabolizing enzyme in rat and guinea-pig microvascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223:440-445.

Rocha e Silva M, Scroggie AE, Fidler E, Jacques LB (1947): Liberation of histamine and heparin by peptone from the isolated dog's liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 64:141-146.

Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ (1996): Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 271:818-822.

Rossant J, Cross JC (2001): Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2:538-548.

Roth J (2011): Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem. Cell Biol.* 136:117-130.

Rudolph MI, Rojas IG, Penissi AB (2004): Uterine mast cells: a new hypothesis to understand how we are born. *Biocell* 28:1-11.

Rugh R (1990): *The Mouse – Its Reproduction and Development*. Oxford University Press.

Russell ES (1979): Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv. Genet.* 20:357-459.

Russell ES, Bernstein SE (1966): Blood and blood formation. *In: Green EL: Biology of the laboratory mouse*. Mc-Graw-Hill, New York.

Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattéi MG, Bravo R (1991): Structure, mapping and expression of fisp-12, a growthfactor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell Growth Differ.* 2:225–233.

Sack U, Tárnok A, Rothe G (2007): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger: 27–70.

Sainte-Marie G (1962): A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 250-256.

Sakaguchi S. (2000): Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164.

Salamonsen LA (1999): Role of proteases in Implantation. *Rev. Reprod.* 4:11-22.

Salamonsen LA, Jeziorska M, Newlands GF, Dey SK, Woolley DE (1996): Evidence against a significant role for mast cells in blastocyst implantation in the rat and mouse. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:1157-1164.

Schenkel J (2006): *Transgene Tiere*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Scholten J, Hartmann K, Gerbaulet A, Krieg T, Müller W, Testa G, Roers A (2008): Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Res.* 17:307-315.

Schrey MP, Hare AL, Ilson SL, Walters MP (1995): Decidual histamine release and amplification of prostaglandin F2 alpha production by histamine in interleukin-1 beta-primed decidual cells: potential interactive role for inflammatory mediators in uterine function at term. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:648-653.

Schrimpf G (2002): *Gentechnische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Schütt C, Bröker B (2006): *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Shapiro HM (2004): *Practical Flow Cytometry*, Wiley & Sons.

Sharkey AM, Jokhi PP, King A, Loke YW, Brown KD, Smith SK (1994): Expression of c-kit and kit ligand at the human maternofetal interface. *Cytokine* 6:195-205.

Sharma BB, Apgar JR, Liu FT (2002): Mast cells. Receptors, secretagogues, and signaling. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 22:119-148.

Sharma RK (1998): Mouse trophoblastic cell lines: I-Relationship between invasive potential and TGF-beta 1. *In Vivo* 12: 431-440.

Shelesnyak MC (1957): Some experimental studies on the mechanism of ova-implantation in the rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 13:269-317.

Shelesnyak MC (1959): Fall in uterine histamine associated with ovum implantation in pregnant rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100:380-381.

Shin K, Watts GF, Oettgen HC, Friend DS, Pemberton AD, Gurish MF, Lee DM (2008): Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. *J. Immunol.* 180:4885-4891.

Shinohara H, Nakatani T, Morisawa S, Matsuda T, Naruse Y (1987): Mast cells in the ovarian bursa of the golden hamster. *Biol. Reprod.* 36:445-450.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N., Doetschman T (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693–699.

Skalko RG, Ruby JR, Dyer RF (1968): Demonstration of mast cells in the postnatal mouse ovary. *Anat. Rec.* 161:459-463.

Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK (2002): Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 129:2879-2889.

Spicer SS (1960): A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* 8:18-35.

Spicer SS (1960): Siderosis Associated with Increased Lipofuscins and Mast Cells in Aging Mice. *Am. J. Pathol.* 37:457-475.

Starkey JR, Crowle PK, Taubenberger S (1988): Mast-cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 42:48-52.

Stevens J, Loutit JF (1982): Mast cells in spotted mutant mice (W Ph mi). *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 215:405-409.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ (1992): Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76-79.

Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG (2006): Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J. Immunol.* 176:778-789.

Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007): The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28:117-149.

Surveyor GA, Brigstock DR (1999): Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor (CTGF) in the mouse embryo between days 7.5 and 14.5 of gestation. *Growth Factors* 17:115-124.

Surveyor GA, Wilson AK, Brigstock DR (1998): Localization of connective tissue growth factor during the period of embryo implantation in the mouse. *Biol. Reprod.* 59:1207-1213.

Tafari A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ, Arnold B (1995): T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270:630-633.

Tan XW, Liao H, Sun L, Okabe M, Xiao ZC, Dawe GS (2005): Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross the bloodbrain barrier?. *Stem Cells* 23:1443–1452

Teesalu T, Blasi F, Talarico D (1998): Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev. Dyn.* 213:27-38.

Thakurdas SM, Melicoff E, Sansores-Garcia L, Moreira DC, Petrova Y, Stevens RL, Adachi R (2007): The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections. *J. Biol. Chem.* 282:20809-20815.

Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D (2010): Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1822:21-33.

Thomas FH, Vanderhyden BC (2006): Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:4-19.

Tobar N, Villar V, Santibanez JF (2010): ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol. Cell. Biochem.* 340:195-202.

Tokuda H, Hatakeyama D, Akamatsu S, Tanabe K, Yoshida M, Shibata T, Kozawa O (2003): Involvement of MAP kinases in TGF-beta-stimulated vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 415:117-125.

Tono T, Tsujimura T, Koshimizu U, Kasugai T, Adachi S, Isozaki K, Nishikawa S, Morimoto M, Nishimune Y, Nomura S (1992): c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient *Wsh/Wsh* mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood* 80:1448-1453.

Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA (1998): Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol. Reprod.* 58:1217-1225.

Tsai M, Grimbaldston M, Galli SJ (2011): Mast cells and immunoregulation/immunomodulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 716:186-211.

Tsai M, Shih LS, Newlands GF, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, Miller HR, Geissler EN, Galli SJ (1991): The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J. Exp. Med.* 174:125-131.

Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ (1991): Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:6382-6386.

Tsuji K, Nakahata T, Takagi M, Kobayashi T, Ishiguro A, Kikuchi T, Naganuma K, Koike K, Miyajima A, Arai K, Akabane T (1990): Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *Blood* 75:421-427.

Valent P, Sillaber C, Baghestanian M, Bankl HC, Kiener HP, Lechner K, Binder BR (1998): What have mast cells to do with edema formation, the consecutive repair and fibrinolysis? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115:2-8.

van Hinsbergh VW (1988): Regulation of the synthesis and secretion of plasminogen activators by endothelial cells. *Haemostasis* 18:307-327.

van Overveld FJ (1990): Some aspects of mast cell subtypes from human lung tissue. *Agents Actions* 30:24-29.

Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH (2004): Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. *Reproduction* 127:379-387.

Vassalli JD, Sappino AP, Belin D (1991): The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88:1067-1072.

Wada T, Ishiwata K, Koseki H, Ishikura T, Ugajin T, Ohnuma N, Obata K, Ishikawa R, Yoshikawa S, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Yokozeki H, Watanabe N, Karasuyama H (2010): Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J. Clin. Invest.* 120:2867-2875.

Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG (1992): Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131:1458-1466.

Wang H, Dey SK (2006): Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* :185-199.

Warburton D, Fraser FC (1964): Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am. J. Hum. Genet.* 16:1-25.

Watson ED, Cross JC (2005): Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology* 20:180-193.

Wojta J, Gallicchio M, Zoellner H, Hufnagl P, Last K, Filonzi EL, Binder BR, Hamilton JA, McGrath K (1993): Thrombin stimulates expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured human vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* 70:469-474.

Wolters PJ, Mallen-St Clair J, Lewis CC, Villalta SA, Baluk P, Erle DJ, Caughey GH (2005): Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit(W-sh)/Kit(W-sh) sash mice. *Clin. Exp. Allergy* 35: 82-88.

Wood GA, Fata JE, Watson KL, Khokha R (2007): Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* 133:1035-1044.

Wordinger RJ, Jackson FL, Morrill A (1986): Implantation, deciduoma formation and live births in mast cell-deficient mice (W/W<sup>v</sup>). *J. Reprod. Fertil.* 77:471-476.

Wordinger RJ, Orr EL, Pace K, Oakford L, Morrill A (1985): An assessment of mast-cell deficient mice (W/W<sup>v</sup>) as a model system to study the role of histamine in implantation and deciduoma formation. *J. Reprod. Fertil.* 73:451-456.

Yamamoto T, Roby KF, Kwok SC, Soares MJ (1994): Transcriptional activation of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme expression during trophoblast cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 269:6517-6523.

Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ (2006): Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J. Clin. Invest.* 116:1633-1641.

Yung YP, Eger R, Tertian G, Moore MA (1981): Long-term in vitro culture of murine mast cells. II. Purification of a mast cell growth factor and its dissociation from TCGF. *J. Immunol.* 127:794-799.

Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD (2005): Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am. J. Pathol.* 166:811-822.

Zenclussen AC, Olivieri DN, Dustin ML, Tadokoro CE (2012): In vivo Multiphoton Microscopy Technique to Reveal the Physiology of the Mouse Placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24. doi: 10.1111.

Zenclussen ML, Casalis PA, El-Mousleh T, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC. (2011): Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J. Pathol.* 225:293-304.

Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, Wafula PO, Fest S, Teles A, Leber A, Casalis PA, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC (2010): The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63:200-208.

Zhao XJ, McKerr G, Dong Z, Higgins CA, Carson J, Yang ZQ, Hannigan BM (2001): Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax* 56:205-211.

Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA (2011): Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell. Mol. Immunol.* 8:1-11.

Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG (1997): Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab. Invest.* 76:517-531.

Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC, Jacobsen FW, Langley KE, Smith KA, Takeish T, Cattanaach BM, Galli SJ, Suggs SV (1990): Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63:213-224.

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei einigen Personen zu bedanken:

Liebe Ana,

Du hast mir dieses spannende und interessante Thema anvertraut. Für dieses Vertrauen möchte ich Dir von Herzen danken! Stets hast Du dir die Zeit für Gespräche und Diskussionen genommen, mich verständnisvoll, geduldig und kompetent betreut und mir den Freiraum für die Entwicklung und Umsetzung eigener Ideen geschaffen. Ich freue mich und bin dankbar, weiterhin bei Dir und in diesem Projekt arbeiten zu können.

Lieber Marcus, liebe Sina,

ich danke Euch herzlichst für die angenehme Zusammenarbeit und die Bereitstellung der W-sh-Mäuse.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes möchte ich der Fritz Thyssen Stiftung und der DFG (SPP 1394) danken.

Liebe Anne, liebe Nadja, liebe Alex,

ohne Eure Hilfe, Unterstützung und Geduld, besonders in der Anfangszeit, wäre mir oftmals die Decke auf den Kopf gefallen. Ihr habt Euch stets die Zeit genommen, Ergebnisse und Experimente zu diskutieren und mich in so manchen Situationen wieder aufzubauen. Darüber hinaus gab es viele schöne und lustige Momente, auch außerhalb der Laborräume, an die ich mich sehr gerne erinnere. Für all dies möchte ich Euch von Herzen danken!

Liebe Kollegen,

ich danke Euch für das angenehme Arbeitsklima, für Eure theoretische und praktische Hilfe, für die unterhaltsamen Gespräche zwischendurch sowie für Eure Geduld und Euer Verständnis während der Schreibphase. Insbesondere möchte ich Markus für seine Hilfe und Unterstützung, vor allem bei der Verarbeitung der Proben, danken.

Lieber Willi,

ich danke Dir von Herzen für Deine Unterstützung sowie für Dein mehr oder weniger stark ausgeprägtes Verständnis für meine Passionen. Dies gilt insbesondere für Yodi und die Pflanzen sowie im Voraus schon mal für die ein oder andere Langnase, die sich auf unserem Sofa platzieren wird.

Liebe Mama, lieber Papa,

ich möchte Euch diese Arbeit widmen, denn ohne Eure Unterstützung hätte ich es bis hierhin wahrscheinlich nicht geschafft. Nicht nur für den finanziellen Rückhalt, insbesondere während der Studienzeiten, möchte ich mich bei Euch bedanken. Selbstlos habt ihr mich auf meinem teilweise sehr steinigen Weg begleitet. Dabei habt ihr den ein oder anderen Stein aus dem Weg geräumt und mich nach jedem Sturz wieder aufgefangen und aufgerichtet; getreu dem Motto „Kleine Kinder kleine Sorgen, große Kinder große Sorgen“.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse zu Versuchszwecken verwendet. Ihnen gebührt mein höchster Respekt und meine tiefste Dankbarkeit.

*„Ganze Weltalter von Liebe werden notwendig sein, um den Tieren  
ihre Dienste und Verdienste an uns zu vergelten.“*

*Christian Morgenstern*

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

„Der Einfluss von Mastzellen auf reproduktive Prozesse und die zugrunde  
liegenden Mechanismen“

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die  
benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung  
des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) an anderen  
Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 27. September 2012

Katja Woidacki

## **10 Publikationen**

**Woidacki K**, Jensen F, Zenclussen AC (2013) *Mast cells as novel mediators of reproductive processes*. Front Immunol 4:29. doi: 10.3389/fimmu.2013.00029.

Schumacher A, Heinze K, Witte J, Poloski E, Linzke N, **Woidacki K**, Zenclussen AC (2013) *Human Chorionic Gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance*. J Immunol Feb 8. [Epub ahead of print]

**Woidacki K**, Popovic M, Metz M, Schumacher A, Linzke N, Teles A, Poirier F, Fest S, Jensen F, Rabinovich GA, Maurer M, Zenclussen AC (2013) *Mast cells rescue implantation defects caused by c-Kit deficiency*. Cell Death Dis 17;4:e462. doi: 10.1038/cddis.2012.214.

Leber A, Zenclussen ML, Teles A, Brachwitz N, Casalis P, El-Mousleh T, Jensen F, **Woidacki K**, Zenclussen AC (2011) *Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses*. Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 677: 397-417.

Jensen F, Woudwyk M, Teles A, **Woidacki K**, Taran F, Costa S, Malfertheiner SF, Zenclussen AC (2010) *Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation*. PLoS One 5 (12): e14409.