

Die regulatorische Funktion von HO-1 auf uterine NK Zellen an der feto-maternalen Grenzfläche

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. – Biochem. Nadja Linzke

geb. am 02.05.1981 in Magdeburg

Gutachter: Frau Prof. Dr. Ana C. Zenclussen
Frau Prof. Dr. Andrea Steinborn-Kröhl

eingereicht am: 21.06.2016

verteidigt am: 27.10.2016

Für meine Eltern

1 EINLEITUNG	7
1.1 Die Schwangerschaft	7
1.1.1 Die Schwangerschaft im Menschen	7
1.1.2 Die Schwangerschaft in der Maus	9
1.1.3 Vergleich von humaner und muriner Schwangerschaft	13
1.1.4 Präeklampsie	14
1.2 Das Enzym Hämoxygenase-1	18
1.2.1 Die Produkte der Hämoxygenase – 1	20
1.2.3 Hämoxygenase-1 in der Schwangerschaft	22
1.3 Die natürlichen Killerzellen	26
1.3.1 Die natürlichen Killerzellen im Menschen	26
1.3.2 Die natürlichen Killerzellen in der Maus	28
1.4 Uterine natürliche Killerzellen	31
1.4.1 Uterine natürliche Killerzellen in der humanen Schwangerschaft	31
1.4.2 Uterine natürliche Killerzellen in der Mausschwangerschaft	34
2 MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 Material	39
2.1.1 Allgemeine Laborausstattung und Verbrauchswaren	39
2.1.2 Computerprogramme	41
2.1.3 Chemikalien und Lösungen	42
2.1.4 Angesetzte Medien, Lösungen, Pufferlösungen	44
2.1.5 Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren	45
2.1.6 Antikörper	45
2.1.7 Primer	46
2.1.8 Kits	46
2.1.9 Tierhaltung	47
2.2 Methoden	48

2.2.1 Verpaarung der Mäuse	48
2.2.2 Behandlung der trächtigen Mäuse mit Kohlenmonoxid	51
2.2.3 Blutdruckmessung	53
2.2.4 Präparation der Mäuse	54
2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus MLAp und <i>Decidua basalis</i>	54
2.2.6 Durchflusszytometrie	55
2.2.7 Histologische Färbetechniken	58
2.2.8 Immunfluoreszenz	63
2.2.9 Echtzeit RT (reverse transcription) – PCR	64
2.2.10 Western – Blot	70
2.2.11 Statistik	74
3 ERGEBNISSE	75
3.1 Die Anzahl der uNK – Zellen ist an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen reduziert im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen	75
3.2 Die IL-15 mRNA Expression ist in HO-1 – defizienten Implantationen mit verringerten Anzahl an uNK – Zellen vermindert im Vergleich zu HO-1 –kompetenten Implantationen	78
3.3 Die Umwandlung der Spiralarterien ist in HO-1 – defizienten Implantationen negativ beeinträchtigt	80
3.4 Die PGF Expression ist im MLAp und der Decidua basalis von HO-1 – defizienten Implantationen im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen erniedrigt	82
3.5 Die VEGF Expression ist im MLAp und der Decidua basalis von HO-1 – defizienten Implantationen im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen erniedrigt	84
3.6 Die IFN- γ Expression ist an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen am Tag 12 der Schwangerschaft tendenziell erniedrigt im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen	86
3.7 Die Feten in HO-1 – defizienten Implantationen weisen im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Feten eine intrauterine Wachstumsretardierung auf	87

-
- 3.8** Die Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid von Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft führt zu keiner Veränderung in der Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche **90**
- 3.9** Die Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid von Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft führt zu einer Erhöhung an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche **91**
- 3.10** Die Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid hat keinen Einfluss auf die IL-15 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche **93**
- 3.11** Die Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche **94**
- 3.12** Die Umwandlung der Spiralarterien bleibt nach der Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft eingeschränkt **96**
- 3.13** Die frühere Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft führt zu einer Verbesserung der Spiralarterienumwandlung **97**
- 3.14** Die PGF und VEGF mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von Hmox1^{+/-} Weibchen ist nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft unverändert **98**
- 3.15** Die PGF mRNA, VEGF mRNA und Proteinexpression an der feto – maternalen Grenzfläche von Hmox1^{+/-} Weibchen ist nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft erhöht im Vergleich zu mit einem Kontrollluftgemisch behandelten Hmox1^{+/-} Weibchen **99**
- 3.16** Die Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid hat keinen Einfluss auf die IFN- γ mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche **102**
- 3.17** Die Behandlung von Hmox1^{+/-} Weibchen vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid führt zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche **103**

3.18	Die Behandlung von Hmox1 ^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft, aber nicht vom Tag 5 bis Tag 8 verhindert die intrauterine Wachstumsretardierung der Feten	104
3.19	Die Behandlung von Hmox1 ^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft unterstützt das fötale Wachstum der Implantationen bis in die späte Schwangerschaft	106
3.20	Hmox1 ^{+/-} Weibchen entwickeln in der späten Schwangerschaft Bluthochdruck, während Hmox1 ^{+/+} Weibchen einen normalen Blutdruck zeigen	108
3.21	Die Behandlung von Hmox1 ^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft verhindert die Entstehung von Bluthochdruck in der späten Schwangerschaft	109
3.22	Die Behandlung von Hmox1 ^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft hat keinen Einfluss auf die systemischen Level von sFlt-1 und sEndoglin	111
3.23	Die Behandlung von Hmox1 ^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft verhindert die Schädigung der Nierenstrukturen	112
4	DISKUSSION	114
5	ZUSAMMENFASSUNG	124
6	SUMMARY	124
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	DANKSAGUNG	138
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	139
10	PUBLIKATIONEN	140

1 Einleitung

1.1 Die Schwangerschaft

1.1.1 Die Schwangerschaft im Menschen

1.1.1.1 Befruchtung und Entstehung der Blastozyste

Am Anfang der Schwangerschaft im Menschen steht die Befruchtung der Eizelle im Eileiter 24 bis 48 Stunden nach dem Eisprung. Auf dem Weg durch den Eileiter zur Gebärmutter (Uterus) entwickelt sich die befruchtete Eizelle (Zygote) zu einer verdichteten Zellmasse, der Morula. Diese Entwicklung findet innerhalb einer schützenden, nicht anhaftenden Schale, der *Zona pellucida*, statt. Am zweiten bis dritten Tag nach der Befruchtung der Eizelle erreicht die Morula den Uterus. Das Auftreten eines mit Flüssigkeit gefüllten Hohlraums innerhalb der Morula kennzeichnet den Übergang zur Blastozyste. Während dieses Vorgangs beginnt die Zelldifferenzierung. Aus der äußeren Zellschicht der Blastozyste entwickelt sich der Trophoektoderm, wohingegen aus den inneren Zellen die innere Zellmasse entsteht (Johnson *et al* 1981).

1.1.1.2 Implantation und Plazentation

Etwa 6 Tage nach der Befruchtung der Eizelle befreit sich die Blastozyste von der *Zona pellucida*, wodurch die Trophoektodermzellen der Blastozyste und die Epithel- und Stromazellen des Endometriums an der feto – maternalen Grenzfläche miteinander in Kontakt treten können. Der komplexe Dialog zwischen den embryonalen und mütterlichen Zellen ermöglicht die Einnistung der Blastozyste, ein Prozess der zur kompletten Einbettung dieser in das Endometrium führt. Während der Implantation der Blastozyste findet die Dezidualisierung, der strukturelle und funktionelle Umbau der Epithel – und Stromazellen des Endometriums, statt. Die Dezidualisierung wird grundsätzlich sowohl durch die Hormone Östrogen und Progesteron als auch durch Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert (Hearn, 1986).

Für eine erfolgreiche Plazentation sind drei grundlegende Entwicklungsschritte notwendig, das Eindringen der Trophoblastzellen in das mütterliche Endometrium, die Neubildung von fetoplazentären Blutgefäßen durch den Trophoblasten und die Umwandlung der mütterlichen Blutgefäße, den sogenannten Spiralarterien, für eine optimierte uteroplazentäre Zirkulation. Während der frühen Plazentation differenzieren die Trophoektodermzellen in zwei unterschiedliche Zellpopulationen, den Synzytiotrophoblastzellen und den Zytotrophoblastzellen. Die Synzytiotrophoblastzellen dringen zunächst in das mütterliche Endometrium ein und werden im weiteren Verlauf der Entwicklung durch Zytotrophoblastzellen ersetzt. Nachdem sich erste Hohlräume zwischen den

Synzytiotrophoblastzellen gebildet haben, führen Wachstums- und Differenzierungsprozesse zu einer Verzweigung der Trophoblastenzotten und ermöglichen die Entstehung des Labyrinths in der Plazenta. Die Formierung der baumförmigen Trophoblastzotten, durch die wiederholte Verzweigung von Primärzotten in Sekundär- und Tertiärzotten, garantiert eine vergrößerte Oberflächenstruktur und somit einen effizienten Nähr- und Sauerstoffaustausch (Kaufmann und Burton, 1994). Bei der Ausbildung der uteroplazentären Zirkulation in der Plazenta sind zwei unterschiedliche Prozesse involviert, die Vaskulogenese und Angiogenese. Während die Vaskulogenese durch die Ausbildung neuer Blutgefäße aus Vorläuferzellen gekennzeichnet ist, entwickeln sich bei der Angiogenese neue Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen. Die fötalen Blutgefäße der Plazenta entstehen vorrangig durch Vaskulogenese und formen sich aus Endothelgewebe, welches seinen Ursprung in den Zellen des extraembryonalen Mesenchyms hat. Dabei wandern die ausdifferenzierten Mesenchymzellen in den Zytotrophoblasten der Plazentazotten ein und wandeln sich dort in das Epithelgewebe der fötalen Blutgefäße um. Zur gleichen Zeit findet die Angiogenese der mütterlichen Spiralarterien statt. Bei der Umwandlung der mütterlichen Spiralarterien dringen die Trophoblastzellen tief in das mütterliche Uterusgewebe ein und ersetzen nach und nach die Endothelzellen der Blutgefäße. Durch die erweiterten Enden der Spiralarterien fließt das mütterliche Blut in das Labyrinth der Plazenta und umspült die Trophoblastenzotten (Wulff *et al.* 2003) (siehe Abb.1).

1.1.1.3 Die reife Plazenta

Eine reife, voll entwickelte Plazenta im Menschen ist etwa 500 g schwer und hat einen Durchmesser von ungefähr 15 – 20 cm. Die Plazenta setzt sich zum einen aus dem mütterlichen Anteil, der *Decidua basalis*, und zum anderen aus dem fötalem Anteil, dem *Chorion frondosum*, zusammen. Zwischen der mütterlichen Seite und der fötalen Seite befindet sich der mit mütterlichem Blut gefüllte intervillöse Raum. Über die Nabelschnur ist der Fötus mit der Plazenta verbunden.

Bei der menschlichen Plazenta handelt sich um eine *Placenta discoidales*, die auch als hämochoriale Plazenta bezeichnet wird. Die hämochoriale Plazenta ist durch das sehr tiefe Eindringen der Trophoblastzellen in das mütterliche Endometrium gekennzeichnet. Dadurch entsteht ein Plazentatyp mit einer sehr dünnen Grenzschicht zwischen fötalem und mütterlichem Gewebe. Die Plazentaschranke im Menschen besteht daher lediglich aus der fötalen Kapillarwand, interstitielles Gewebe und einer einschichtigen Trophoblastzellschicht. Dies ermöglicht einen effektiven Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen zwischen Fötus und Mutter (Diedrich 2007).

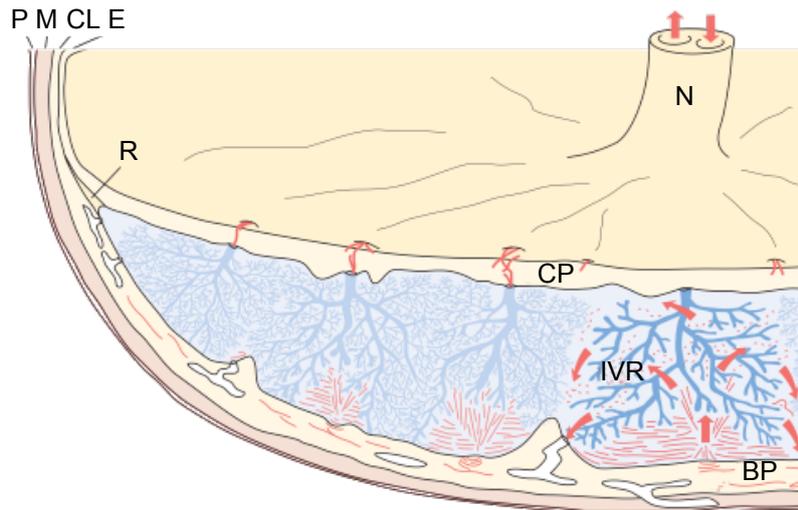


Abb. 1: Darstellung einer reifen, humanen Plazenta im Querschnitt. P, Perimetrium; M, Myometrium; CL, Chorion leave; E, Embryonalhülle; N, Nabelschnur; R, Randzone; CP, Chorionalplatte; IVR, Intervillöser Raum; BP, Basalplatte. (Adaptiert nach Wulff *et al.* 2003)

1.1.2 Die Schwangerschaft in der Maus

Die Dauer der Schwangerschaft in der Maus beträgt in Abhängigkeit vom Mausstamm im Durchschnitt 19 – 21 Tage.

An Hand des Zeitpunktes der Einnistung der Blastozyste lässt sich die Mausschwangerschaft in drei Phasen einteilen. So wird der Zeitraum vor der Nidation der Blastozyste in die Gebärmutterwand als Präimplantation bezeichnet. Es folgt die Implantation, Einnistung der Blastozyste, und die Phase der Postimplantation (Manipulating the Mouse Embryo, 3. Auflage).

1.1.2.1 Präimplantation in der Maus

Im Verlauf der Präimplantation entwickelt sich der Embryo innerhalb der *Zona pellucida* von der befruchteten Eizelle zum reifen Blastozysten. Dieser Abschnitt unterteilt sich in drei wesentliche Übergangsphasen, die jeweils mit einer genetischen Reprogrammierung einhergehen. Dazu zählt zunächst die Fertilisation und erste Zellteilung, die Schaffung der Zellpolarität und –verdichtung zur Morula und die Differenzierung der Stammzellen zur Blastozyste (siehe Abb. 2) (Wang *et al.* 2006).

Während der Befruchtung lagert sich das Spermium an die *Zona pellucida* an und durchdringt diese. Hat das Spermium die Oozyte erreicht, kommt es zur Verschmelzung der beiden haploiden Gameten zu einer diploiden Eizelle. Das Eindringen des Spermiums in die *Zona pellucida* setzt eine Reihe von Mechanismen in Gang, die eine weitere Penetration von Spermien unterbinden soll. Dabei kommt es zu einer Vernetzung der Glykoproteine der *Zona*

pellucida. Durch die veränderte Oberflächenstruktur wird ein Eindringen weiterer Spermien verhindert (Manipulating the Mouse Embryo, 3. Auflage).

Bereits 21 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle (Zygote) findet während des Transports durch den Eileiter Richtung Gebärmutter die erste mitotische Teilung, auch Furchung genannt, statt. Dieser Vorgang wiederholt sich alle 12 Stunden. Nach der vierten Teilung liegt eine kompakte Zellkugel, die sogenannte Morula (16 – Zell – Stadium), vor. Bereits zu diesem Zeitpunkt lässt sich die innere Zellmasse von einer äußeren Zellschicht unterscheiden. Die äußere Schicht, das Trophoektoderm, bildet später extraembryonale Strukturen wie die Plazenta. Aus der inneren Zellmasse, dem Blastomer, entsteht der Embryo (Lehrbuch der Entwicklungsbiologie, 1999).

Am 3. Tag der Schwangerschaft beginnt die Ausbildung der Blastozyste. Hierzu leitet das Trophoektoderm Flüssigkeit in das Innere der Blastozyste. Das entstehende Blastozöel bietet dem Embryo ausreichend Platz zum Wachsen. Die pluripotente, innere Zellmasse befindet sich an einer Seite der Blastozyste und wird von dem embryonalen Endoderm zum Blastozöel hin abgegrenzt (Lehrbuch der Entwicklungsbiologie, 1999).

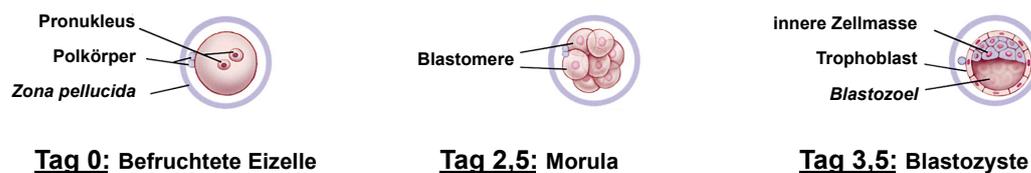


Abb. 2: Die drei Übergangsphasen der Präimplantation in der Maus. Am Tag 0 der Schwangerschaft verschmelzen die beiden haploiden Gameten zu einer diploiden Eizelle. In den folgenden zwei Tagen der Schwangerschaft entsteht die sogenannte Morula (16 – Zell – Stadium). Die Präimplantationsphase in der Maus findet ihren Abschluss in der Bildung der reifen Blastozyste. (Adaptiert von Zhao *et al.* 2002)

1.1.2.2 Implantation in der Maus

Das erste wahrnehmbare Zeichen einer stattfindenden Implantation ist die gesteigerte Gefäßpermeabilität in der Uterus (Psychoyos *et al.* 1986). Am 4. Tag der Schwangerschaft befreit sich die Blastozyste von der *Zona pellucida* und ist dadurch bereit für die Implantation. Die Anlagerung der Blastozyste findet dann am 4. Tag der Schwangerschaft statt (Das *et al.* 1995). Zuvor kommt es zu einem allgemeinen Anschwellen des Uterus und folglich zu einer Verengung des Lumens. Dies führt zu einem ersten Kontakt zwischen dem Trophoektoderm der Blastozyste und dem laminaren Gewebe (Parr *et al.* 1989). Die Blastozyste lagert sich mit dem am weitesten von der inneren Zellmasse gelegenen

Abschnitt des Trophoektoderms an die anti-mesometriale Wand des Uterus an. Im Uterus der Maus existieren keine festgelegten Implantationsstellen. Man geht davon aus, dass die Implantationsstellen durch die Eigenbewegungen des Uterus festgelegt wird (Manipulating the Mouse Embryo, 3. Auflage). Nach der Anheftung der Blastozyste dringen die Trophoblastzellen durch das laminaire Epithelium und die Basallamina bis zu den Stromazellen (siehe Abb. 3). Das aufgelockerte laminaire Epithelium löst sich und wird von den Trophoblastzellen phagozytiert. Gleichzeitig beginnen die Stromazellen zu proliferieren und sich in Deziduazellen zu differenzieren (Dezidualisierung). Von diesem Zeitpunkt an wird der Uterus als Dezidua bezeichnet (Wang *et al.* 2006).

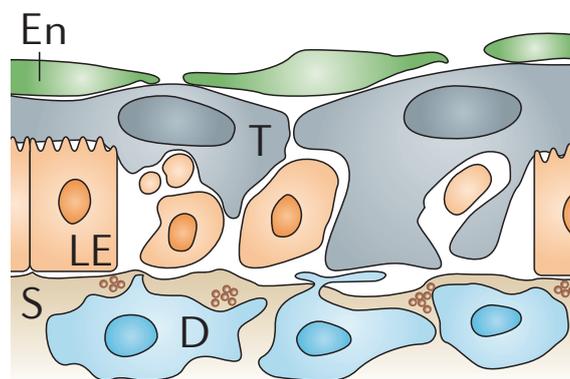


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Implantationsstelle in der Maus. Die Trophoblastzellen des Trophoektoderms dringen durch das laminaire Epithelium bis in das Stroma. Die aufgelockerten Epithelzellen werden von den invadierenden Trophoblastzellen phagozytiert, während die Stromazellen dezidualisieren. **En**, embryonales Endoderm; **T**, Trophoblast; **LE**, laminaire Epithelium; **S**, Stroma; **D**, Deziduazellen. (Adaptiert von Wang *et al.* 2006)

1.1.2.3 Postimplantation in der Maus

Die Phase der Postimplantation beginnt am Tag 5 der Schwangerschaft und umfasst den letzten Abschnitt der Embryonalentwicklung. Diese Phase ist durch die Gastrulation, Organogenese und Wachstum des Fötus charakterisiert und findet ihren Abschluss in der Geburt.

Voraussetzung für das gesunde Wachstum des Fötus ist die Entwicklung der Plazenta, ohne die der Embryo in der uterinen Umgebung nicht überleben kann. Die Plazenta bildet die Schnittstelle zwischen dem Fötus und der Mutter an der feto – maternalen Grenzfläche und ermöglicht den Austausch von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten. Darüber hinaus handelt es sich bei der Plazenta um ein endokrines Organ, welches eine Vielzahl an Hormonen und Wachstumsfaktoren produziert. Die Riesenzellen und die Zellen des Spongiotrophoblast (siehe Abb. 3) produzieren unter anderem die Hormone Progesteron und Plazentalaktogen (Soares *et al.* 1996), die Angiogenesefaktoren VEGF (*vascular endothelial*

growth factor) und PGF (*placental growth factor*) (Vuorela *et al.* 1997, Achen *et al.* 1997) und Faktoren des Gewebeumbaus, wie zum Beispiel Matrix – Metalloproteasen (MMPs) und Urokinase – Typ Plasminogen Aktivator (uPA) (Teesalu *et al.* 1998, Teesalu *et al.* 1999). Bereits vor dem Beginn der Postimplantation zum Zeitpunkt der Implantation am Tag 4 der Schwangerschaft differenzieren sich die Trophoektodermzellen an der inneren Zellmasse zum Einen in das extraembryonale Ektoderm und zum Anderen in den ekto-plazentalen Kegel (siehe Abb. 4) (Copp 1979). Zum Beginn der Postimplantation entstehen dann aus dem ekto-plazentalen Kegel die ersten Riesenzellen, die den gesamten Fötus umgeben. Im weiteren Entwicklungsprozess vergrößert sich das extraembryonale Ektoderm zum Chorionepithelium mit einer dünnen Zellschicht des Mesothelium. Aus dem Mesoderm entwickelt sich die Allantois, die sich anschließend mit dem Chorion verbindet. Nach der Anlagerung der Allantois bilden sich im Chorion Faltungen die den Ort des fötalen Gefäßwachstums kennzeichnen. Gleichzeitig bilden sich aus den Trophoblastzellen des Chorions die diversen Schichten der Trophoblastzellen des Labyrinths. Der Spongiotrophoblast hat seinen Ursprung im ekto-plazentalen Kegel und formt eine kompakte Zellschicht zwischen dem Labyrinth und den äußeren Riesenzellen. Das mütterliche Blut passiert den Spongiotrophoblast, ein arterieller Hohlraum in denen die Endothelzellen von Trophoblastzellen ersetzt wurden. Anschließend fließt das mütterliche Blut in die schmalen, gewundenen Zwischenräume des Labyrinths. Dort kommt es zu einem direkten Kontakt mit den fötalen Trophoblastenzotten und zum Stoffaustausch zwischen den beiden Blutsystemen (Rossant *et al.* 2001).

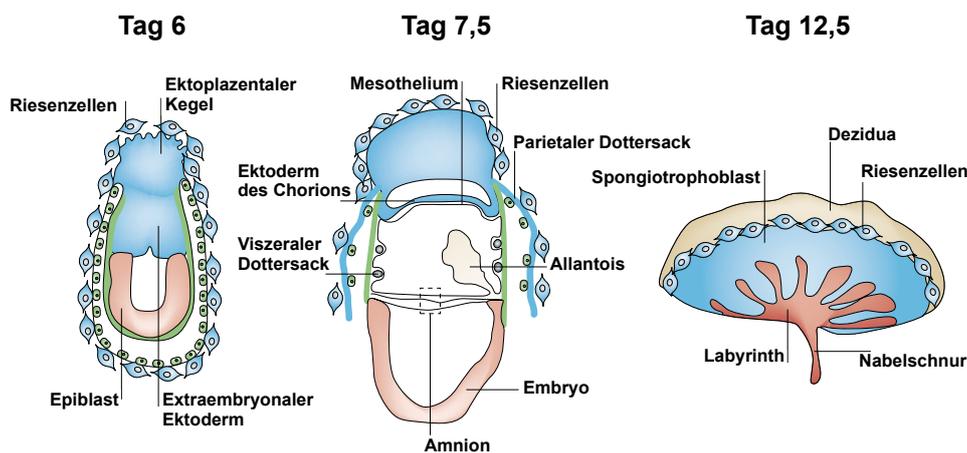


Abb. 4: Entwicklung der Plazenta in der Maus vom Tag 6 bis Tag 12,5 der Schwangerschaft. Dargestellt sind die Herkunft des extra – embryonalen Gewebes und der Plazenta von Tag 6 bis Tag 12,5 der Schwangerschaft. (Adaptiert nach Rossant *et al.* 2001)

1.1.3 Vergleich von humaner und muriner Schwangerschaft

Untersuchungen im Menschen sind angesichts ethischer Gründe schwer zu realisieren und in ihrer Durchführung beschränkt. Daher sind Studien in Tiermodellen wie der Maus unerlässlich, um neue Erkenntnisse über Schwangerschaftskomplikationen zu erhalten. Hierbei stellt sich die Frage, in wieweit können Daten aus der Maus mit denen aus Menschen in Verbindung gebracht werden.

Auf den ersten Blick scheinen die Plazenten von Maus und Mensch grundlegend verschieden. So handelt es sich bei der Maus um eine Labyrinthplazenta, wohingegen der Mensch über eine Zotten – beziehungsweise Topfplazenta verfügt. Dennoch gibt es Ähnlichkeiten im Aufbau und Funktion beider Plazenten. Dementsprechend ist es möglich Rückschlüsse aus Daten, die in Mausmodellen gewonnen wurden, auf die humane Schwangerschaft zu übertragen (siehe Abb. 5). In der Maus setzt sich die äußere Schicht der Plazenta aus den Riesenzellen zusammen. Ähnlich dem invasiven extravillösen Zytotrophoblasten im Menschen vermitteln diese die Implantation und Invasion in den Uterus. Auf Grund der Endoreduplikation während der Plazentaentwicklung in der Maus sind die Riesenzellen an der feto – maternalen Grenzfläche polyploid (Zybina *et al.* 1996, MacAuley *et al.* 1998). Auch im Menschen sind die Zellkerne der invasiven extravillösen Zytotrophoblasten polyploid (Berezowsky *et al.* 1995). Das Labyrinth in der Mausplazenta entspricht in seiner Funktion vollständig der Funktion der Chorionzotten in der humanen Plazenta. Sowohl in der Mausplazenta als auch in der humanen Plazenta ist der Villus mit Synzytiotrophoblastzellen überzogen und hat so direkten Kontakt mit dem mütterlichen Blut. Die starke Reduktion der Diffusionsstrecke zwischen fötalem und mütterlichem Blut führt zu einer erheblichen Verbesserung der Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten (Becker 1981, Drews 1993).

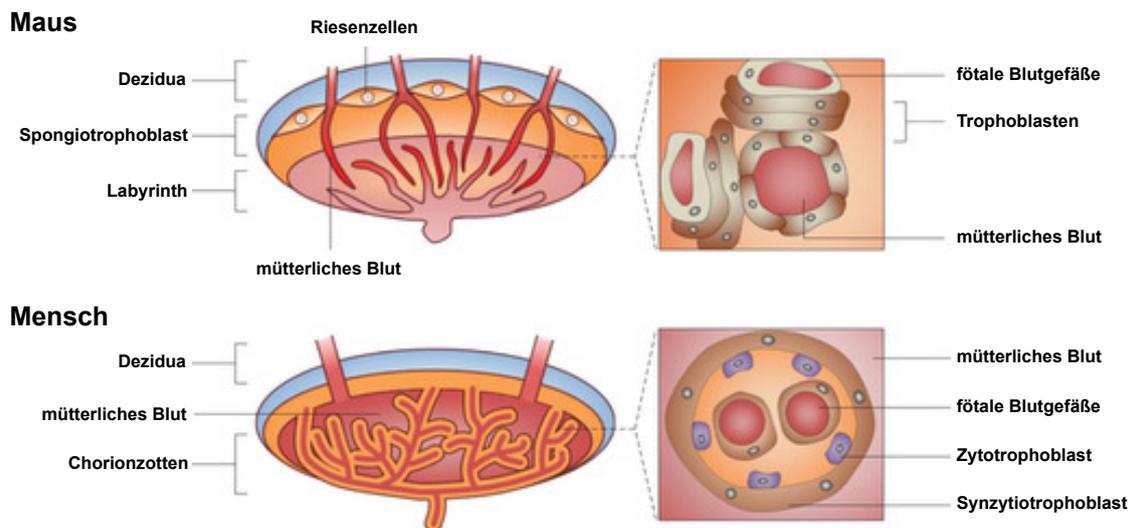


Abb. 5: Schematische Darstellung der Plazenta in Maus (A) und im Menschen (B). Die Plazenta der Maus ist eine sogenannte Labyrinthplazenta (A), bei der Plazenta des Menschen dagegen handelt es sich um eine Zotten – beziehungsweise Topfplazenta (B). Trotz der augenscheinlichen Unterschiede zwischen beiden Plazentatypen, zeigt ein genauerer Vergleich Ähnlichkeiten in Aufbau und Funktion beider Plazenten. (Adaptiert nach Yamashita *et al.* 2011)

1.1.4 Präeklampsie

Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Erkrankung, die bei 3 – 5 % aller Schwangeren weltweit auftritt. Die Krankheit ist klinisch durch das Auftreten von Bluthochdruck und Proteinurie nach der 20. Schwangerschaftswoche gekennzeichnet. In den Entwicklungsländern mit einer eingeschränkten medizinischen Versorgung ist die Präeklampsie die Hauptursache der Müttersterblichkeit mit geschätzten 60000 Todesfällen im Jahr (*World Health Organization* 2005). Aber auch in den westlichen Ländern stellt die Präeklampsie die häufigste Ursache von Morbidität und Mortalität von sowohl Mutter als auch Kind während einer Schwangerschaft dar. Die Neugeborenensterblichkeit auf Grund einer Präeklampsie liegt weltweit bei 10 % (*Altman et al.* 2002). Nach wie vor ist die Einleitung der Geburt mit Ausstoßung der Plazenta die einzige Möglichkeit der Therapie einer Präeklampsie. Dies unterstreicht die zentrale Rolle der Plazenta bei der Entstehung und Entwicklung von Präeklampsie. Man geht davon aus, dass die Erkrankung ihren Ursprung in der Plazentaentwicklung hat und es im weiteren Verlauf der Schwangerschaft zu systemischen Störungen der Endothelfunktionen in der Mutter kommt (*Walsh et al.* 2000). Die meisten Fälle von Präeklampsie treten mit einer Häufigkeit von 7,5 % bei Erstgebärenden auf. Dennoch haben auch Mehrgebärende mit einem neuen Partner ein erhöhtes Risiko während einer erneuten Schwangerschaft an Präeklampsie zu erkranken (*Tufnell et al.* 2005). Obwohl die meisten Fälle von Präeklampsie bei Frauen ohne

Familienanamnese auftreten, erhöht das Vorkommen der Krankheit bei einem Verwandten ersten Grades das Risiko zu erkranken um das zwei – bis vierfache (Carr *et al.* 2005). Erstaunlicherweise führt das Auftreten von Präeklampsie bei der Mutter des Kindsvaters ebenfalls zu einem gesteigerten Risiko für die Mutter zu erkranken (Esplin *et al.* 2001). Eine Krankenvorgeschichte der Mutter mit Gesundheitsbeschwerden, wie chronischen Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen, Adipositas, Gerinnungsstörungen und ein erhöhtes mütterliches Alter sind gleichermaßen Risikofaktoren an Präeklampsie zu erkranken (Duckitt *et al.* 2005).

Die klinischen Symptome der Präeklampsie sind das erstmalige Auftreten von Bluthochdruck mit einem systolischen Blutdruck von über 140 mmHg oder einem diastolischen Blutdruck von über 90 mmHg und Proteinurie mit 0,3 g Protein in einer 24 Stunden Urinprobe. Lange Zeit wurden Ödeme mit in die Diagnostik einbezogen, erwiesen sich aber als zu unspezifisch. Da der Krankheitsverlauf stark variiert, ist man dazu übergegangen die Präeklampsie in eine leichte oder akute Form zu unterteilen. In diesem Zusammenhang hat es sich bewährt das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Diagnostik einzubeziehen (von Dadelszen *et al.* 2003).

Die Menge an Proteinurie scheint keinen Einfluß auf das mütterliche oder fetale Wohlergehen während einer Präeklampsie zu haben (Waugh *et al.* 2005). Schwangere, die Bluthochdruck ohne nachweisbare Proteinurie im Verlauf der Schwangerschaft entwickeln, sollten ebenfalls engmaschig kontrolliert werden. Bei 10 % der Frauen mit präeklampsischen Symptomen und bei 20 % der Frauen, die eine Eklampsie mit Krampfanfällen entwickeln, ist Proteinurie nicht feststellbar. Selten kommt es im Verlauf einer Präeklampsie zu schweren Komplikationen wie Nierenversagen, Plazentaablösungen, Leberschädigungen und Lungenödemen (Sibai *et al.* 2005).

Gesundheitliche Schwierigkeiten, die den Fötus betreffen, sind sowohl die therapeutische als auch die spontane Frühgeburt, intrauterine Wachstumsretardierung (*intrauterine fetal growth restriction*; IUGR), Oligohydramnion und ein erhöhtes Risiko der Neugeborenensterblichkeit (Zhang *et al.* 2007). Die Erhöhung des Blutdrucks ist der Versuch des mütterlichen Körpers den Blutfluss in der Plazenta zu steigern und somit den Föten mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Die gesundheitlichen Komplikationen ergeben sich aus der Tatsache, dass der Fötus auf Grund der schlechten Blutzufuhr unzureichend versorgt ist. Daher ist eine engmaschige Kontrolle des Blutflusses in der *Arteria uterina* im weiteren Verlauf der Schwangerschaft unerlässlich.

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der Präeklampsie spielt die Plazenta. Nur in Anwesenheit einer Plazenta kommt es zur Entstehung der Krankheit und ausschließlich die Geburt der Plazenta beendet eine Präeklampsie (Shembrey *et al.* 1995). Bei der frühen Plazentaentwicklung einer gesunden Schwangerschaft dringen

Zytotrophoblastzellen in die uterinen Spiralarterien der *Decidua basalis* und des Myometriums ein. Die invasiven Zytotrophoblastenzellen ersetzen dabei die Endothelzellen der mütterlichen Spiralarterien, wodurch sich diese in Gefäße mit geringem Gefäßwiderstand und aufgeweiteten Gefäßenden umwandeln (siehe Abb. 6A). Nur so ist eine ausreichende Durchblutung der Plazenta und Versorgung des Föten gewährleistet. Für ein adäquates Eindringen der Zytotrophoblastzellen nehmen diese den Phänotyp von Endothelzellen mit den entsprechenden Oberflächenmarkern für Adhesion an (Zhou *et al.* 1997a). Bei einer Erkrankung an Präeklampsie findet dieser Wechsel im Phänotyp nicht ausreichend oder gar nicht statt (Zhou *et al.* 1997b). Demzufolge ist die Invasion der Zytotrophoblastzellen unvollständig und beschränkt sich auf die *Decidua basalis*. Die Gefäßenden der Spiralarterien im Myometrium bleiben eng und die Durchblutung der Plazenta ist unzureichend (siehe Abb. 6B) (Meekins *et al.* 1994).

Eine wichtige Funktion in der plazentaren Gefäßentwicklung übernehmen Angiogenesefaktoren wie Flt-1/VEGFR-1 (*fms-related tyrosine kinase-1/vascular endothelial growth factor receptor-1*), VEGFR-2, VEGF und PGF. Veränderungen in der Expression dieser Angiogenesefaktoren in der frühen Schwangerschaft tragen zu der unzureichenden Zytotrophoblasteninvasion in präeklampsischen Plazenten bei (Venkatesha *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2002). Neben einer beeinträchtigten Expression der Angiogenesefaktoren, konnte auch eine veränderte Expression der Antiangiogenesefaktoren sFlt-1 (*soluble fms-related tyrosine kinase-1*) und löslichen Endoglins (sEng) festgestellt werden. Patienten mit Präeklampsie haben bereits in der frühen Schwangerschaft erhöhte sFlt-1 und sEng Werte im Serum. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sFlt-1 die Invasivität von Zytotrophoblastzellen reduziert (Zhou *et al.* 2002). Die Stimulation des Oberflächenmarkers Endoglin (CD105) durch seinen Liganden TGF- β blockiert ebenfalls die Migration und das Eindringen von Zytotrophoblastzellen (Caniggia *et al.* 1994). Während einer Präeklampsie bewirkt die übermäßige Endoglinexpression in der Plazenta die Produktion von sEng, welches die Effekte des membrangebunden Endoglins einschränkt. Die erhöhten sFlt-1 und sEng Werte im Serum der Patienten lösen eine systemische Störung der Endothelfunktionen aus, die sich in Bluthochdruck, Proteinurie und weiteren schwerwiegenden klinischen Erscheinungsformen äußern (Maynard *et al.* 2003, Venkatesha *et al.* 2006).

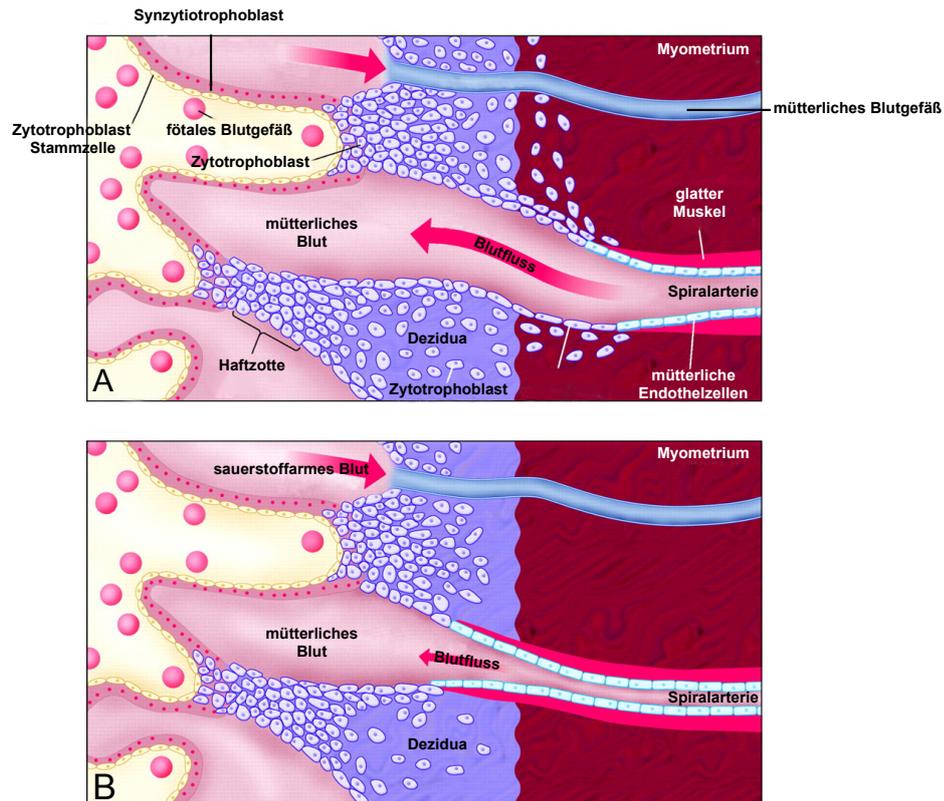


Abb. 6: Schematische Darstellung der feto – maternalen Grenzfläche in der frühen Schwangerschaft einer gesunden (A) und einer präeklampsischen (B) Plazenta. Bei einer normalen Schwangerschaft dringt der Zytotrophoblast in die uterinen Spiralarterien der *Decidua basalis* und des Myometriums ein und ersetzt dabei die Endothelzellen der mütterlichen Spiralarterien. Die Spiralarterien weiten sich und der Gefäßwiderstand nimmt ab (A). Bei einer präeklampsischen Plazenta ist die Invasion der Trophoblastzellen in die *Decidua basalis* und demnach auch die Umwandlung der Spiralarterien gestört. (B) (Adaptiert nach Wang *et al.* 2009).

1.2 Das Enzym Hämoxxygenase-1

Im Jahre 1968 beschrieben Tenhunen und Mitarbeiter erstmals den katalytischen Abbau von freiem Häm unter Freisetzung von Kohlenmonoxid (CO) durch das Enzym Hämoxxygenase (HO). Die HO gehört zu der Gruppe der Monooxidasen und katalysiert den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Hämabbaus (Maines et al. 1988). Dabei wird das freie Häm, bestehend aus einem Eisen-Ion als Zentralatom und einem Porphyrin – Molekül als Ligand, unter Freisetzung von äquimolaren Mengen an Kohlenmonoxid (CO) und instabilen Fe^{2+} oxidativ in Biliverdin degradiert. Anschließend wird das entstandene Biliverdin durch die Biliverdin – Reduktase zum antioxidativen Bilirubin konvertiert (Bainbridge und Smith 2005) (siehe Abb. 7).

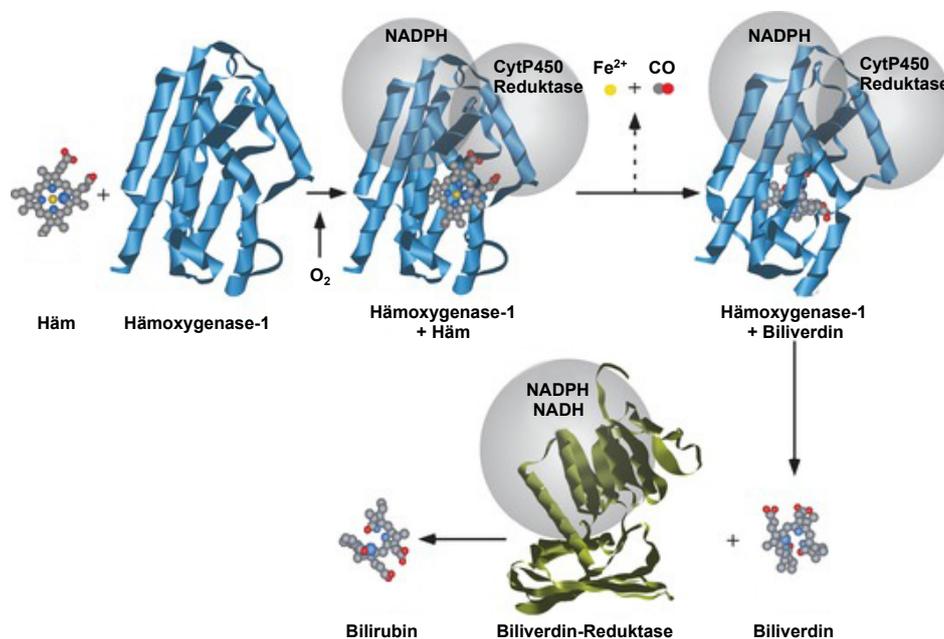


Abb. 7: Der katalytische Abbau von freiem Häm durch das Enzym Hämoxxygenase-1. Mit Hilfe der HO-1 wird freies Häm zu gleichen Teilen in Biliverdin, Fe^{2+} und Kohlenmonoxid abgebaut. Das gebildete Biliverdin wird durch die Biliverdin – Reduktase zu Bilirubin umgewandelt. (Adaptiert nach Ferreira *et al.* 2003)

Bislang wurden drei Isoformen in der Gruppe der Häm – abbauenden Enzyme beschrieben: HO-1, HO-2 und HO-3 (Montellano et al. 2000; Otterbein und Choi 2000; Morse und Choi 2002).

Die Hämoxxygenase Typ1 (HO-1), auf Grund seines Molekulargewichts von 32 kDa auch als Hitzeschockprotein (Hsp) – 32 bezeichnet, ist ubiquitär im Organismus verteilt und durch eine Vielzahl von oxidativen Stressoren induzierbar (Maines et al. 1986). Dazu gehören unter anderem Wasserstoffperoxid, Natriumarsenit, UVA – Strahlung, Schwermetalle oder Toxine.

Eine hohe HO-1 Aktivität wurde vorrangig in Organen wie der Milz, Knochenmark, Leber, Gehirn, Nieren und Lungen gemessen (Tenhunen *et al.*, 1969). Auch in anderen Geweben, die nicht direkt am Hämoglobin Stoffwechsel beteiligt sind, ist das Enzym HO-1 zu finden, wenn auch in geringen Mengen (Ryter *et al.*, 2006). Unter anderem stellt die Plazenta mit ihrer hohen HO-1 Expression im Verlauf der Schwangerschaft eine Ausnahme dar (McLean *et al.* 2000).

Das später entdeckte Isoenzym HO-2 hat ein Molekulargewicht von 36 kDa und ist hauptsächlich im Gehirn, der Leber, der Milz und dem Hoden exprimiert (Trakshel *et al.* 1989). Im Gegensatz zur HO-1 ist diese Isoform konstitutiv exprimiert und somit nicht induzierbar. Obwohl die Gene für HO-1 und HO-2 (*hmox1* und *hmox2*) auf verschiedenen Chromosomen zu finden sind, ist bei beiden Isoformen der Genaufbau mit fünf Exons und vier Introns vergleichbar (Alam *et al.* 1994, McCoubrey *et al.* 1994). Neben einer 43 %igen Homologie in ihren Aminosäuren besitzen sowohl die HO-1 in Ratte, Maus und Mensch als auch die HO-2 in Ratte und Kaninchen eine gemeinsame hochkonservierte Sequenz von 24 Aminosäuren (Rotenberg *et al.* 1990 und 1991). Beide Enzyme katalysieren die identische, biochemische Reaktion des Hämabbaus mit einer vergleichbaren Substratspezifität und einem identischen Bedarf an Kofaktoren, (Maines *et al.* 1986, Maines 1992). Beide Isoformen der HO, HO-1 und HO-2, besitzen eine hydrophobe Domäne am Carboxy – Terminus. Dieser ermöglicht eine Kompartimentierung der Enzyme auf zellulärer Ebene (Shibahara *et al.* 1985). Die HO-1 gilt, auf Grund der starken Expression in der mikrosomalen Fraktion, als Endoplasmatisches Retikulum (ER) – assoziiertes Enzym (Ryter *et al.* 2006). Studien in den letzten Jahren zeigten darüber hinaus eine Expression der HO-1 in weiteren Zellkompartimenten, wie dem Nukleus (Lin *et al.* 2007), den Mitochondrien (Converso *et al.* 2006) und den Caveolae (Kim *et al.*, 2004). Auch die HO-2 konnte sowohl im ER als auch in der äußeren Kernmembran des Nukleus und den Caveolae nachgewiesen werden (Ma *et al.* 2004).

Eine weitere nicht-induzierbare Isoform der HO, die HO-3, wurde 1997 von McCoubrey und Kollegen beschrieben. Dieses Enzym hat ein Molekulargewicht von 33 kDa und weist in seiner Aminosäuresequenz eine 90 %ige Homologie mit der von HO-2 auf. Die HO-3 verfügt über eine sehr geringe Aktivität in der Degradierung von Häm, womit die genaue Funktion dieser Isoform bis heute umstritten bleibt (McCoubrey *et al.* 1997b).

1.2.1 Die Produkte der Hämoxxygenase – 1

Neben der Hauptfunktion der HO-1 freies toxisches Häm im Gewebe abzubauen, spielt es eine weitere wichtige physiologische Rolle in antioxidativen und zytotoxischen Prozessen. Dabei steht nicht nur der Abbau des zytotoxischen freien Häms im Vordergrund, sondern auch die zytoprotektiven Eigenschaften der Produkte Fe^{2+} , Biliverdin/Bilirubin und CO (siehe Abb. 8).

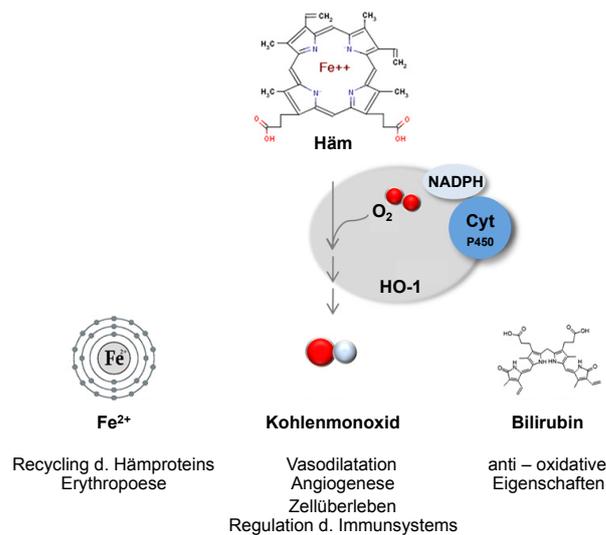


Abb. 8: Schematische Darstellung des enzymatischen Abbaus von freiem Häm durch die HO-1. Die Stoffwechselprodukte des enzymatischen Abbaus von freiem Häm sind für die vasodilatatorischen, anti – oxidativen und zytoprotektiven Eigenschaften der HO-1 verantwortlich. (Adaptiert nach Levytska *et al.* 2013)

1.2.1.1 Freies Eisen (Fe^{2+}) und Ferritin

Freies Fe^{2+} ist äußerst instabil und bildet in der sogenannten Fenton – Reaktion zytotoxische, freie Radikale (Fenton *et al.* 1894). Dies widerspricht zunächst dem Bild der zytoprotektiven Eigenschaften der HO-1. Allerdings führt die Freisetzung von freiem Fe^{2+} zur Initialisierung diverser Stoffwechselwege, die das zytotoxische Fe^{2+} entfernen oder zu Produkten mit zytoprotektiven Eigenschaften führen. Dazu gehört unter anderem die Initialisierung einer ATPase Pumpe, die mit HO-1 auf den mikrosomalen Membranen ko – lokalisiert ist (Baranano *et al.* 2000). Durch die Aktivierung der ATPase Pumpe wird das Fe^{2+} aktiv aus der Zelle abtransportiert und der intrazelluläre Eisenpool reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität und der zytoprotektive Effekt von HO-1 mit der intrazellulären Fe^{2+} Anreicherung negativ korreliert (Ferris *et al.* 1999). Des Weiteren hat freies Fe^{2+} in den Zellen die vermehrte Bildung des Eisenspeicherproteins Ferritin zur Folge

(Eisenstein *et al.* 1991). Unabhängig von der HO-1 – Expression hat Ferritin antioxidative Eigenschaften und ist somit zytoprotektiv (Balla *et al.* 1992).

1.2.1.2 Biliverdin und Bilirubin

Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin gelten als leistungsfähige Antioxidanten und kettenbrechende Inaktivatoren freier Sauerstoffradikale (Stocker *et al.* 1987). Das Biliverdin – Bilirubin System ruft während einer Nekrose durch entweder Stickstoffmonoxid (NO), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Sauerstoffmangel zytoprotektive Eigenschaften hervor (143, 134, 145). Der antioxidativen und zytoprotektiven Wirkung des Biliverdin – Bilirubin Systems liegt ein Stoffwechselkreislauf zugrunde. Dabei wird das entstandene Bilirubin durch freie Radikale zurück zu Biliverdin oxidiert. Anschließend wird das Biliverdin durch die Biliverdin – Reduktase wieder zu Bilirubin reduziert und steht erneut als Antioxidant zur Verfügung (Baranano *et al.* 2002). Zudem liegt die Vermutung nahe, dass die Biliverdin – Reduktase unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität zytoprotektive Eigenschaften hat (Kapitulnik *et al.* 2009).

Gegen eine Vielzahl von entzündlichen Krankheiten spielen Biliverdin und Bilirubin mit hoher Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle in der Vermittlung der zytoprotektiven Effekte von HO-1. Ähnlich einer erhöhten HO-1 – Expression hat die exogene Verabreichung von Biliverdin und Bilirubin einen heilsamen Effekt auf den Krankheitsverlauf von IRI (Fondevila *et al.* 2004), Organtransplantaten (Yamashita *et al.* 2004) und schwerer Sepsis (Sarady-Andrews *et al.* 2005).

1.2.1.3 Kohlenmonoxid (CO)

Neben seinen zytoprotektiven Eigenschaften schützt der Gasotransmitter CO vor Lungenschädigungen und vor Abstossungen von Herztransplantaten (Otterbein *et al.* 1999, Fujita *et al.* 2001). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass CO die zytoprotektiven Eigenschaften der HO-1 vermittelt (Brouard *et al.* 2000, Sato *et al.* 2001, Akamatsu *et al.* 2004). Des Weiteren wirkt CO in den verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten anti – apoptotisch (Petrache *et al.* 2000).

Die zytoprotektiven Eigenschaften von CO begründen sich hauptsächlich auf die Fähigkeit mit zweiwertigen Metallen wie Fe²⁺ in Hämproteinen wechselzuwirken (Piantadosi 2008, Mustafa *et al.* 2009, Kim *et al.* 2006). Eines dieser Hämproteine ist vermutlich die Cytochrom – c – Oxidase (COX) der mitochondrialen Atmungskette (Zuckerbraun *et al.* 2007). Das CO bindet zunächst in den Zellen an die Hämgruppe der Cytochrom – c – Oxidase. Anschließend kommt es zur Freisetzung von kleinen Mengen an Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) (Zuckerbraun *et al.* 2007, Bilban *et al.* 2006). Die freigesetzten Sauerstoffradikale aktivieren den p38 – mitogenaktivierte

Proteinkinasen (p38 MAPK) – Signaltransduktionsweg und übermitteln so die zytoprotektiven Eigenschaften von CO und HO-1 (Brouard *et al.* 2000). Weiterhin aktivieren die Sauerstoffradikale den Transkriptionsfaktor HIF1 – α , was zu einer erhöhten Expression an zytoprotektiven TGF – β führt (Chin *et al.* 2007). Die Behandlung von Endothelzellen mit CO oder CO – freisetzenden Molekülen (*carbon monoxide releasing molecule*, CORM) stimuliert die Transkription des *hmx1* Gens mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Nrf2. Dies bedeutet, dass der zytoprotektive Effekt von CO auch auf einer Aktivierung der HO-1 basiert (Kim *et al.* 2007).

Schon frühzeitig konnte gezeigt werden, dass CO die lösliche Guanylatcyclase (sGC) mit einer gesteigerten cGMP – Bildung aktiviert und somit als *second messenger* an einer Reihe von zellulären Funktionen beteiligt ist (Brüne *et al.* 1987). Unter anderem bewirkt CO auf diese Weise die Relaxation von glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden und ist demnach ein fähiger Vasodilator (Sammut *et al.* 1998).

1.2.3 Hämoxygenase-1 in der Schwangerschaft

Bereits frühzeitig konnte auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie gezeigt werden, dass eine ausreichende Expression an HO-1 wichtig für das Transplantatüberleben ist. In Mäusen und Ratten führte die Hochregulation von HO-1 zu einer verbesserten Akzeptanz des Transplantats, wogegen eine verringerte Expression oder die Abwesenheit von HO-1 die Abstoßung des Transplantats zur Folge hatte (Soares *et al.* 1998). Auf Grund der Vergleichbarkeit in immunologischen Reaktionen gegenüber Transplantaten und fötalem Gewebe lag der Verdacht nahe, dass HO-1 während der Schwangerschaft eine tragende Rolle spielt. Erste Beobachtungen in HO-1 *knock out* Mäusen führten zudem zu der Annahme, dass *Hmx1*^{-/-} Mäuse unfruchtbar sind (Poss *et al.* 1997). Umfassendere Studien konnten jedoch belegen, dass *Hmx1*^{-/-} Mäuse durchaus schwanger werden, aber die Schwangerschaft nicht erfolgreich beendet wird (Zenclussen *et al.* 2011).

1.2.3.1 Hämoxygenase-1 in der humanen Schwangerschaft

McLean und Mitarbeiter waren die Ersten, die sowohl das HO-1 als auch das HO-2 Protein in Gewebeproben von humanen Plazenten nachgewiesen haben (McLean *et al.* 2000). Das Enzym wird nicht nur in den Synzytiotrophoblastzellen und im Endothelium der Blutgefäße (Yoshiki *et al.* 2000), sondern auch in den distalen Schichten des invadierenden Zytotrophoblasten exprimiert (Lyll *et al.* 2000). Im Verlauf der humanen Schwangerschaft wird die HO-1 Expression zur Geburt hin an der feto – maternalen Grenzfläche hochreguliert (Acevedo *et al.* 1998, Ahmed *et al.* 2000).

Die beeinträchtigte Expression der HO-1 in humanen Schwangerschaftskomplikationen ist ein weiteres Indiz für die elementare Rolle des Enzyms für eine erfolgreiche Schwangerschaft. Sowohl in Probenmaterial von spontanen Aborten als auch von Präeklampsien konnte eine verringerte HO-1 Expression an der feto-maternalen Grenzfläche festgestellt werden (Barber *et al.* 2001, Zenclussen *et al.* 2003). Darüber hinaus wurde in den Infarktregionen von präeklampsischen Plazenten eine reduzierte HO-1 Aktivität nachgewiesen (Lash *et al.* 2008). Frauen, die an spontanen Aborten leiden, weisen häufig einen Polymorphismus in der *hmox-1* Promoterregion auf. Dieser hat sowohl systemisch als auch lokal eine verringerte HO-1 Expression zur Folge (Denschlag *et al.* 2004).

1.2.3.2 Hämoxxygenase-1 in der murinen Schwangerschaft

Immunhistochemische Untersuchungen in der Maus zeigten eine starke Expression des HO-1 Proteins am Tag 6,5 in den Ektoplazentazapfen und am Tag 10,5 in den Riesenzellen. Aus beiden Zelltypen bildet sich im weiteren Verlauf der Schwangerschaft die Plazenta. Diese Ergebnisse wurden durch spätere Messungen der HO-1 Aktivität in der Plazenta und in der Decidua am Tag 14,5 der Mausschwangerschaft bestätigt, wobei die HO-1 Aktivität in der Plazenta deutlich höher war als in der Decidua (Watanabe *et al.* 2004). In einem durch IL – 12 – Gabe induzierten Abortmodell wurde erstmals die reduzierte HO-1 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von Abortmäusen nachgewiesen (Zenclussen *et al.* 2002). Studien in einem alternativen Mausabortmodell ergaben, dass die HO-1 Expression an der feto-maternalen Grenzfläche von Mäusen mit erhöhter Abortrate im Vergleich zu normal schwangeren Mäusen herunterreguliert ist (Zenclussen *et al.* 2005). Mit Hilfe einer systemischen Hochregulation von HO-1 in Mäusen mit erhöhter Abortrate sollte die Frage, ob HO-1 in der Lage ist vor Aborten zu schützen, geklärt werden. In einer ersten Studie wurde durch die pharmakologische Gabe von Cobalt – Protoporphyrin (CoPPIX) ein Anstieg in der HO-1 Aktivität herbeigeführt. Die erhöhte HO-1 Expression verursachte eine verstärkte Expression des anti – apoptotischen Proteins Bag – 1 und die Aktivierung von regulatorischen T – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche, was eine verminderte Abortrate zur Folge hatte (Sollwedel *et al.* 2005). In einer weiteren Studie wurde die HO-1 Expression mittels einer spezifischen adenoviralen Gentherapie systemisch erhöht. In diesem Fall war ebenfalls die Abortrate und die Apoptose an der feto – maternalen Grenzfläche reduziert (Zenclussen *et al.* 2006). Die pharmakologische Blockierung der HO-1 Aktivität mit Zink – Protoporphyrin (ZnPPIX) wiederum führte zu einer erhöhten Abortrate sowohl in normal schwangeren Mäusen als auch in Abortmäusen. Dabei waren die schützenden Effekte durch die regulatorische T – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche aufgehoben (Schumacher *et al.* 2012).

Die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnen Erkenntnisse über die HO-1 – Expression und Aktivität in der Schwangerschaft von Mäusen lässt sich in einem hypothetischen Szenario über die Wirkungsweise von HO-1 an der feto-maternalen Grenzfläche zusammenfassen (siehe Abb. 9) (Zenclussen *et al.* 2002). In einer normalen Schwangerschaft verhindert eine ausreichende Expression von HO-1 die Anreicherung von freiem toxischem Häm an der feto – maternalen Grenzfläche. Die Produkte des Hämabbaus, Kohlenmonoxid, Fe^{2+} und Biliverdin, haben auf Grund ihrer antioxidativen Eigenschaften einen positiven Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf. Bei Mäusen mit Schwangerschaftskomplikationen hingegen ist die HO-1 Expression an der feto-maternalen Grenzfläche verringert. Dies führt unter anderem zu einer Akkumulation von freiem toxischem Häm an der feto – maternalen Grenzfläche und somit zu einer Schädigung der Endothelzellen (Mantovani *et al.* 1997). Der daraus resultierende oxidative Stress bewirkt eine vermehrte Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen (Balla *et al.* 1991), die den Einstrom von inflammatorischen Lymphozyten ermöglichen und weitere Schädigungen des umliegenden Gewebes bewirken (Balla *et al.* 1993).

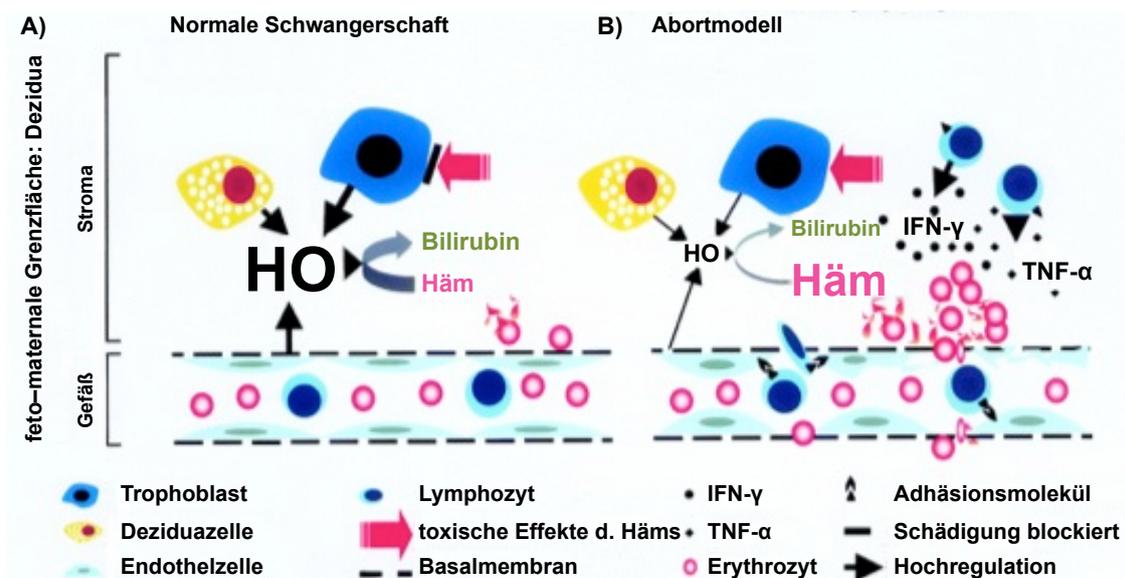


Abb. 9: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von HO-1 an der feto – maternalen Grenzfläche. Die ausreichende HO-1 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche verhindert die Akkumulation von freiem toxischem Häm. (A) (Adaptiert nach Zenclussen *et al.* 2002)

Aktuelle Studien in HO-1 defizienten Mäusen bestärken die tragende Rolle von HO-1 in einer erfolgreichen Schwangerschaft, die nicht nur auf die immunologische Wirkungsweise von HO-1 beschränkt ist. Die Verpaarung von *Hmox1*^{-/-} Mäusen erzeugt keine Nachkommen. Die bisherige Annahme, dass *Hmox1*^{-/-} Mäuse unfruchtbar sind, konnte jedoch durch gegenwärtige Studien widerlegt werden. *Hmox1*^{-/-} Mäuse sind durchaus fruchtbar, sind aber

nicht in der Lage die Schwangerschaft erfolgreich zu beenden. Durch eine mangelhafte Plazentation in *Hmox1*^{-/-} Implantationen kommt es zu einem unzureichenden Wachstum des Föten, was schließlich zum Absterben der *Hmox1*^{-/-} Föten führte (Zenclussen *et al.* 2011). Bei einer Verpaarung von *Hmox1*^{+/-} Mäusen liegt die Geburtenrate von *Hmox1*^{-/-} Nachkommen bei 1 – 8 % und entspricht somit nicht der nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Geburtenrate von 25 % (Poss *et al.* 1997, Yet *et al.* 1999, Zenclussen *et al.* 2011). Darüber hinaus ist in HO-1 defizienten Mäusen die Ovulation der Oocyten und deren Befruchtung eingeschränkt (Zenclussen *et al.* 2012). Mit Hilfe eines *in vitro* Implantationsmodells konnte gezeigt werden, dass isolierte *Hmox1*^{+/-} Blastozysten vom Tag 3,5 der Schwangerschaft im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Blastozysten sich langsamer anheften. Bei *Hmox1*^{-/-} Blastozysten versagte die Anheftung vollständig. Die therapeutische Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Mäusen und Abortmäusen mit dem HO-1 Metaboliten CO während des Implantationsfensters führte zu einer verbesserten Plazentaentwicklung und verhinderte die fötale Sterblichkeit in der Schwangerschaft (Zenclussen *et al.* 2011, El-Mousleh *et al.* 2012). Neueste Studien zeigten den hormonellen Einfluss von Östrogen und Progesteron auf die HO-1 Expression während der rezeptiven Phase des murinen Östruszykluses (Zenclussen *et al.* 2014).

1.3 Die natürlichen Killerzellen

1.3.1 Die natürlichen Killerzellen im Menschen

Natürliche Killerzellen (NK – Zellen) sind große, granulare Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie werden im Knochenmark gebildet und umfassen 10 – 15 % aller peripheren Lymphozyten im Blut. Im Menschen werden die reifen NK – Zellen phänotypisch über ihre Expression der Oberflächenmarker CD56, CD16 und das gleichzeitige Fehlen des Oberflächenmarkers CD3 definiert. Die primäre Funktion der NK – Zellen liegt im frühzeitigen Erkennen von eindringenden Pathogenen und infizierten Zellen (Robertson *et al.* 1990). Neben der Fähigkeit die Zielzellen direkt zu töten, vermitteln NK – Zellen die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Dabei binden die NK – Zellen mit Hilfe ihrer Fc-Rezeptoren (FcγRIII, CD16) an die mit spezifischen IgG-Molekülen markierten Zielzellen. Wird eine Zelle als infiziert erkannt, setzen die NK – Zellen sogenannte Effektorproteine (z.B. Perforin und Granzyme) aus ihren zytotoxischen Granula frei, welche den programmierten Zelltod der Zielzelle bewirken (Janeway 2002). Darüber hinaus sind NK – Zellen eine wichtige Quelle von Zytokinen und in der Lage mit anderen Immunzellen zu interagieren, um eine antigenspezifische Immunantwort des adaptiven Immunsystems einzuleiten (Trinchieri *et al.* 1989).

Studien von NK – Zellen belegen die Existenz von zwei verschiedenen Subpopulationen, die sich vorrangig in ihrer CD56 Expression unterscheiden. Die Mehrheit der menschlichen NK – Zellen (90 %) haben eine geringe CD56 Expression (CD56^{dim}) und eine starke CD16 Expression (CD16^{bright}), während der kleinere Anteil (etwa 10 %) der NK – Zellen CD56^{bright}CD16^{dim/neg} ist. Beide Subpopulationen unterscheiden sich stark in der Expression zahlreicher weiterer Oberflächenmarker und somit in ihren funktionalen Eigenschaften (Cooper *et al.* 2001a) (siehe Abb. 10). Die Unterschiede machen sich in ihrem zytotoxischen Potential, in ihrer Fähigkeit Zytokine zu produzieren und ihrer Reaktion auf eine Aktivierung durch Zytokine bemerkbar (Cooper *et al.* 2001b, Caligiuri *et al.* 1990, Baume *et al.* 1992).

Die CD56^{dim} NK – Zellen sind im Vergleich zu den CD56^{bright} NK – Zellen naturgemäß zytotoxischer und reagieren auch auf die Stimulation durch Interleukin (IL) – 2 mit einer gesteigerten Zytotoxizität. Während nahezu alle CD56^{dim} NK – Zellen den Rezeptor FcγRIII exprimieren und somit in der Lage sind die ADCC zu vermitteln, fehlt der Mehrheit der CD56^{bright} NK – Zellen der FcγRIII Rezeptor und die Fähigkeit der ADCC (Nagler *et al.* 1989). Die Produktion von Zytokinen durch CD56^{dim} NK – Zellen ist selbst nach der Stimulation mit den entsprechenden Monokinen vernachlässigbar (Cooper *et al.* 2001b). Dagegen haben die CD56^{bright} NK – Zellen eine wichtige immunregulatorische Funktion. Sie sind die primäre Population der NK – Zellen, die nach der Stimulation mit Monokinen immunregulatorische Zytokine wie Interferon (IFN) – γ, Tumornekrosefaktor (TNF) – α, TNF – β, IL – 10 und IL – 13 produzieren (Cooper *et al.* 2001b, Perussia *et al.* 2005).

Ruhende CD56^{dim} NK – Zellen exprimieren ausschließlich den *intermediate – affinity* IL – 2 Rezeptor (IL-2R $\beta\gamma$) und sind zudem *c-kit*^{negativ}. Dementsprechend proliferieren CD56^{dim} NK – Zellen auch nach Gabe von IL – 2 in hohen Dosen nur gering. Im Gegensatz dazu exprimieren CD56^{bright} NK – Zellen zusätzlich den *high – affinity* IL – 2 Rezeptor (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) und expandieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits bei geringen IL – 2 Mengen. Zusätzlich haben CD56^{bright} NK – Zellen den *c-kit* Rezeptor, dessen Ligand die IL – 2 induzierte Proliferation verstärkt (Nagler *et al.* 1990, Robertson *et al.* 1992, Caligiuri *et al.* 1993).

NK – Zellen sind in der Lage über eine einzigartige Gruppe an Oberflächenrezeptoren sowohl klassische als auch nicht – klassische MHC-Klasse-I-Moleküle zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Erkennen von MHC-Klasse-I-Molekülen essentiell für das Unterscheiden von körpereigenen/gesunden und fremden/infizierten Zellen ist. Die Oberflächenrezeptoren von NK – Zellen werden in hemmende oder aktivierende NK – Zellrezeptoren aufgeteilt. Jede NK – Zelle exprimiert ihr individuelles Repertoire an NK – Zellrezeptoren. Demnach ist die Aktivierung von NK – Zellen durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht an Signalen von hemmenden und aktivierenden Rezeptoren geregelt. Die Abwesenheit einer aktivierenden Rezeptor/Liganden Wechselwirkung mit einer begleitenden Stimulation eines hemmenden NK – Zellrezeptoren oder ein Übergewicht an hemmenden NK – Zellrezeptoren verhindert die Lyse körpereigener, gesunder Zellen. Zur Lyse von körperfremden oder infizierten Zellen durch NK – Zellen kommt es dagegen wenn die Summe an Signalen von aktivierenden Rezeptoren die von inhibierenden Rezeptoren überwiegt.

Auf menschlichen NK – Zellen wurden bisher drei Klassen an NK – Zellrezeptoren beschrieben: Zu den bekanntesten und am besten charakterisierten NK – Zellrezeptoren gehören die *killer immunoglobulin like receptor* (KIR) – Rezeptoren, welche die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen. Die Superfamilie der C – Typ – Lektine erkennt sowohl klassische als auch nicht – klassische MHC-Klasse-I-Moleküle. Die Liganden der Natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (NCR) sind nach wie vor unzureichend definiert.

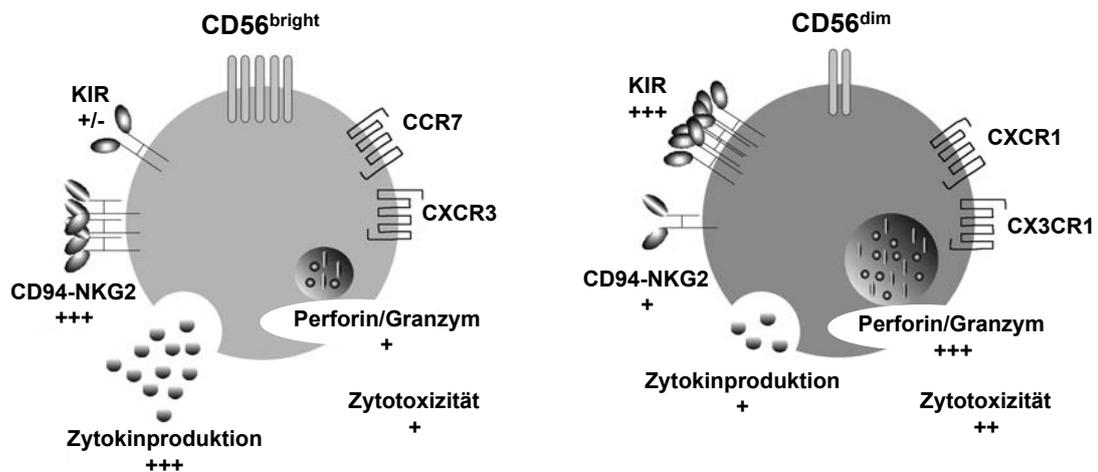


Abb. 10: Schematische Darstellung von humanen CD56^{bright} und CD56^{dim} NK – Zellen. Dargestellt ist das Expressionsmuster der Oberflächenrezeptoren, das zytotoxische Potential und die Zytokinproduktion der beiden NK – Zellsubpopulationen im Menschen. (Adaptiert nach Hayakawa *et al.* 2006)

1.3.2 Die natürlichen Killerzellen in der Maus

Die Entwicklung der NK – Zellen im Knochenmark der Maus wird in Abhängigkeit der Funktion, des Phänotyps und der Proliferationskapazität der NK – Zellen in mehrere Phasen eingeteilt (Colucci *et al.* 2003). Die ersten NK – Vorläuferzellen im Knochenmark exprimieren die IL – 2 und IL – 15 Rezeptor Untereinheit β (CD122) (Ikawa *et al.* 2001, Rosmaraki *et al.* 2001). Im weiteren Verlauf der NK – Zellreifung kommt es zu einem sequentiellen Erwerb des Oberflächenmarkers NK1.1 und des Rezeptors CD94 – NKG2. Als nächstes beginnen die NK – Zellen den Rezeptor Ly49 zu exprimieren, gefolgt von einer Wachstumsphase, die mit der Hochregulation des Oberflächenmarkers DX5 (CD49b) einhergeht. Während des letzten Schrittes der NK – Zellreifung migrieren die Zellen in das periphere Gewebe, regulieren die CD11b und CD43 Expression hoch und erwerben ihre vollen Effektorfunktionen (Kim *et al.* 2002). Vergleichbar mit den CD56^{dim} und CD56^{bright} NK – Zellen im Menschen können reife CD3⁺CD122⁺NK1.1⁺CD49b⁺ NK – Zellen in der Maus auf Grund ihrer CD27 Expression in zwei Subpopulationen unterteilt werden (CD27^{low} und CD27^{hi}). Beide Subpopulationen weisen die typischen Funktionen von NK – Zellen auf, unterscheiden sich aber in ihrer Zytotoxizität, Zytokinproduktion und ihrem Aktivierungspotential (Hayakawa *et al.* 2006) (siehe Abb. 11).

Die Fähigkeit Zielzellen mit Hilfe der Granula – vermittelten Zytotoxizität zu töten, ist bei beiden Subpopulation gleichermaßen ausgeprägt. Jedoch nur die Zellen der CD27^{hi} Population haben eine zytotoxische Kapazität gegenüber Tumorzellen, die sowohl

MHC-Klasse-I-Moleküle und den NKG2D Liganden exprimieren. Darüber hinaus haben CD27^{hi} NK – Zellen die Möglichkeit Zielzellen unabhängig von der NKG2D Rezeptorexpression zu töten (Hayakawa *et al.* 2006).

Ähnlich den NK – Zellen im Menschen produzieren NK – Zellen in der Maus eine Vielzahl an Zytokinen. Dazu gehören unter anderem die Zytokine IFN – γ , TNF – α , IL – 13 und IL – 10. Nach der Stimulation mit IL – 12 oder IL – 18 sind ausschließlich die CD27^{hi} NK – Zellen in der Lage nachweisbare Mengen an IFN – γ zu produzieren. Die CD27^{low} NK – Zellen sezernieren geringere Mengen an IFN – γ nach der kombinierten Stimulation mit IL – 12 und IL – 18 (Hayakawa *et al.* 2006). Generell konnte gezeigt werden, dass CD27^{hi} NK – Zellen im Vergleich zu den CD27^{low} NK – Zellen eine wesentlich höhere Kapazität haben Zytokine zu produzieren.

Entsprechend den humanen NK – Zellen wird die Funktion von NK – Zellen in der Maus durch ein Gleichgewicht an hemmenden oder aktivierenden Signalen von spezialisierten NK – Zelloberflächenrezeptoren reguliert (Lanier *et al.* 2005). Auch in der Maus erkennen die inhibitorischen Rezeptoren klassische MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche körpereigener Zellen, welche somit vor der lytischen Aktivität der NK – Zellen geschützt werden (Ljunggren *et al.* 1990). Wohingegen für die Aktivierung der NK – Zellen ein positives Signal von Zielzellen, welche die Liganden der aktivierenden NK – Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, benötigt wird. Derartige aktivierende NK – Zellrezeptoren in der Maus sind NKG2D, Ly49D und Ly49H oder der CD94 – NKG2C Komplex. Obgleich die Expression an aktivierenden Rezeptoren unter den CD27^{low} und CD27^{hi} NK – Zellsubpopulationen vergleichbar ist, ist die Expression an hemmenden Rezeptoren zwischen den Subpopulationen verschieden (Hayakawa *et al.* 2006). Ein größerer Anteil der CD27^{low} NK – Zellen exprimierten die inhibitorischen Rezeptoren Ly49C und Ly49I. Auch der inhibitorische *killer cell lectin-like receptor G1* (KLRG1) wird exklusiv auf der Oberfläche von CD27^{low} NK – Zellen exprimiert.

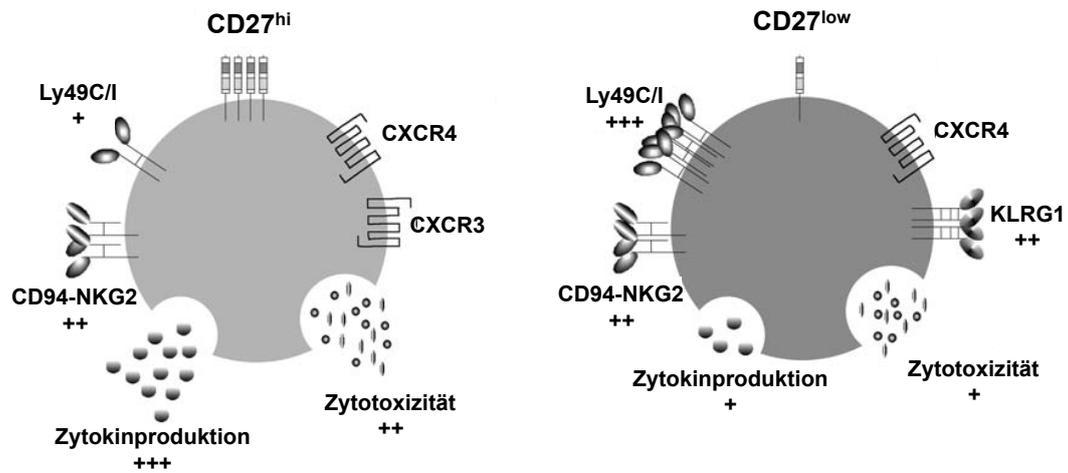


Abb. 11: Schematische Darstellung von murinen $CD27^{hi}$ und $CD27^{low}$ NK – Zellen. Veranschaulicht ist das Expressionsmuster der Oberflächenrezeptoren, das zytotoxische Potential und die Zytokinproduktion der beiden NK – Zellsubpopulationen in der Maus. (Adaptiert nach Hayakawa *et al.* 2006)

1.4 Uterine natürliche Killerzellen

1.4.1 Uterine natürliche Killerzellen in der humanen Schwangerschaft

Ein Hauptmerkmal des Endometriums im weiblichen Zyklus und des Decidualisierten Endometriums in der Schwangerschaft ist ein hohes Aufkommen an Lymphozyten. Dazu gehören die uterine natürliche Killerzellen (uNK – Zellen), eine eigenständige Subpopulation der NK – Zellen, die so in ihrem Phänotyp und ihrer Funktion nur im Uterus zu finden sind (siehe Tabelle 1). Mit 70 % aller Decidualen CD45⁺ Stromazellen sind uNK – Zellen die größte Zellpopulation an der feto – maternalen Grenzfläche (King *et al.* 1995). Die Zellen weisen eine starke Expression des Oberflächenmarkers CD56 (CD56^{bright}) auf und unterscheiden sich demzufolge in ihrem Phänotyp von den überwiegend im Blut vorkommenden NK – Zellen. Jedoch besteht eine Ähnlichkeit in der Charakteristik zu den kleinen, agranulären CD56^{bright}CD16^{dim} NK – Zellen im Blut. Diese Tatsache lässt vermuten, dass diese periphere NK – Zellsubpopulation in den Uterus wandert und dort proliferiert, sich differenziert und Granula akkumuliert (King *et al.* 1991). Die Herkunft der uNK – Zellen im Endometrium wird stark kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Hinweise für das Einwandern von differenzierten uNK – Zellen aus der Peripherie als auch für die *in situ* Differenzierung und Proliferation aus Vorläuferzellen lokal im Endometrium (Bilinski *et al.* 2008).

Tabelle 1: Charakteristik der humanen NK – Zellsubpopulationen im Blut und der Decidua.

	CD56 ^{dim} (Blut)	CD56 ^{bright} (Blut)	CD56 ^{bright} (Decidua)
CD16	++	+/-	-
CD94	+/-	++	++
KIR	+	-	+
CD3	-	-	+
c-Kit	-	+	+/-
CD69	-	-	+
CD45RA	+	+	-
CD45RO	-	-	+
CD62L	+/-	++	-
CD49a	-	-	+
CD49f	+	+	-
lytische Aktivität	hoch	niedrig	niedrig
Morphologie	groß, viele Granula	klein, wenige Granula	sowohl kleine agranuläre als auch große granuläre Lymphozyten

Die Anzahl an CD56^{bright} uNK – Zellen variiert beim Menschen bereits im Verlauf des Menstruationszykluses. In der Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase sind nur wenige kleine, agranuläre uNK – Zellen vorhanden (Bulmer *et al.* 1991, King *et al.* 1989). Während der späten Sekretionsphase steigt die Anzahl an uNK – Zellen im Endometrium an (Williams *et al.* 2009). Bei dem Ausbleiben einer Schwangerschaft führt das Absinken des Progesteronspiegels zwei Tage vor dem Einsetzen der Menstruation zur Apoptose der uNK – Zellen (Spornitz *et al.* 1992). Kommt es jedoch zur Befruchtung und zu einer erfolgreichen Implantation der Blastozyste kann man im frühen Schwangerschaftsverlauf eine massive Anreicherung von uNK-Zellen in der Nähe der invasiven Trophoblasten beobachten. Die Anzahl der uNK – Zellen bleibt im ersten (8. bis 12. Schwangerschaftswoche) und im frühen zweiten Trimester (13. bis 20. Schwangerschaftswoche) (Williams *et al.* 2009b) unverändert. Während der Schwangerschaft weisen die uNK-Zellen große Granula auf, welche an der Zellmembran gebunden sind (King *et al.* 1991). Diese speichern sowohl Perforin als auch Granzyme (King *et al.* 1993) und lassen auf eine zytolytische Aktivität schließen. Nach der 20. Schwangerschaftswoche beginnt die Apoptose der uNK – Zellen und die Anzahl nimmt stetig

ab. Am Ende der Schwangerschaft zur Geburt hin sind somit keine uNK – Zellen mehr an der feto – maternalen Grenzfläche nachweisbar (Moffett-King 2002).

Alle uNK-Zellen weisen auf ihrer Oberfläche eine hohe Expression des inhibitorischen Rezeptors CD94 – NKG2A auf (King *et al.* 2000). Das umliegende, mütterliche Gewebe und die fötalen Trophoblasten exprimieren den entsprechenden Liganden HLA-E (Ellis *et al.* 1990). Die Wechselwirkung des inhibitorischen Rezeptors CD94 – NKG2A mit seinem Liganden HLA – E verhindert sowohl die Lyse von maternalen Zellen als auch von fötalen Trophoblasten in der näheren Umgebung der uNK – Zellen. Auch das MHC-Klasse-I-Molekül HLA – C wurde auf Trophoblasten nachgewiesen. Die entsprechenden inhibitorischen KIRs werden vermehrt von uNK – Zellen in schwangeren Frauen synthetisiert (Chumbly *et al.* 1994, Rouas-Freiss *et al.* 1997, Chen *et al.* 2010). Aufgrund des Polymorphismus von HLA – C ist jede Schwangerschaft durch eine individuelle Kombination von väterlich gereiften fetalen HLA – C und mütterlichen KIRs charakterisiert. Eine „ungünstige“ Kombination von NK – Zellrezeptoren und Liganden kann möglicherweise die erfolgreiche Implantation beeinträchtigen und zu Schwangerschaftskomplikationen wie Fehlgeburten, Präeklampsie und IUGR führen (Moffett-King 2002).

uNK – Zellen treten vorwiegend während der späten Sekretionsphase im *Stratum funktionales* des Endometriums und in der *Decidua basalis* der frühen Schwangerschaft auf. Oft formen sie in der *Decidua basalis* Aggregate um die Spiralarterien und Drüsen (Bulmer *et al.* 1991). Zusätzlich stehen uNK – Zellen im engen Kontakt mit dem invadierenden Zytotrophoblast. Sowohl die starke Präsenz der uNK – Zellen während der Implantationsphase als auch die enge räumliche Beziehung zu den Trophoblasten legen nahe, dass uNK – Zellen eine wesentliche Rolle bei der Trophoblasteninvasion und bei der Ausbildung der Spiralarterien spielen (Moffett-King 2002).

Ähnlich den CD56^{bright}CD16^{dim/neg} NK – Zellen im Blut produzieren uNK – Zellen zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren. In der *Decidua basalis* sind somit die uNK – Zellen die bedeutendste Quelle der Angiogenesefaktoren Angiopoitin (Ang) – 1, Ang – 2, VEGF – C, PlGF und TGF – β 1, wobei die Sekretion von Ang – 2 und VEGF – C in der 12. bis 14. Schwangerschaftswoche gegenüber der 8. bis 10. Schwangerschaftswoche reduziert war. Im Gegensatz zu den Angiogenesefaktoren werden die Zytokine TNF – α , IL – 6, IL – 8 und IFN – γ vorrangig in der 12. bis 14. Schwangerschaftswoche von den uNK – Zellen produziert (Lash *et al.* 2006b). Die Daten deuten darauf hin, dass uNK – Zellen in der 8. bis 10. Schwangerschaftswoche hauptsächlich Angiogenesefaktoren produzieren, während sie in der 12. bis 14. Schwangerschaftswoche vermehrt Zytokine sekretieren. Der Wechsel in der Produktion von Angiogenesefaktoren zu Zytokinen spiegelt die *in vivo* Funktion der uNK – Zellen zum jeweiligen Schwangerschaftszeitpunkt wider.

Bei einer Vielzahl von Schwangerschaftskomplikationen wurde im Endometrium oder in der *Decidua basalis* von frühen Schwangerschaften eine veränderte Anzahl an uNK – Zellen festgestellt. Zu den untersuchten Schwangerschaftskomplikationen zählen wiederkehrende Fehlgeburten, Präeklampsie und IUGR. Dabei führten Untersuchungen über die Anzahl der uNK – Zellen im Endometrium von Frauen mit wiederkehrenden Fehlgeburten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Mehrere Studien verschiedenster Gruppen berichteten von einer erhöhten Anzahl an uNK – Zellen in Frauen mit wiederkehrenden Fehlgeburten im Vergleich zu Frauen ohne bekannte Fehlgeburten (Quenby *et al.* 1999, Clifford *et al.* 1999, Laird *et al.* 2005). Demgegenüber existieren Berichte in denen keine Unterschiede in der Anzahl an uNK – Zellen zwischen gesunden Frauen und Frauen mit wiederholten Fehlgeburten festgestellt wurden (Lachapelle *et al.* 1996, Shimada *et al.* 2004). Lange Zeit ging man davon aus, dass die erhöhte Anzahl an uNK – Zellen im Endometrium von Frauen mit wiederholten Fehlgeburten zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität gegenüber dem implantierenden Föten führt. Allerdings gibt es keine eindeutigen Belege für zytotoxische Aktivitäten von uNK – Zellen gegenüber Trophoblastzellen (Laird *et al.* 2003). Vielmehr geht man davon aus, dass Veränderungen in der Zellzahl von uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von Fehlgeburten eine Konsequenz und nicht die Ursache sind (Emmer *et al.* 2002).

Die Schwangerschaftskomplikationen Präeklampsie und IUGR sind beide durch eine unvollständige Umwandlung der Spiralarterien gekennzeichnet (Pijnenborg *et al.* 1998). Da die uNK – Zellen eine zentrale Rolle in der Umwandlung der Spiralarterien spielen, geht man bei den Schwangerschaftskomplikation Präeklampsie und IUGR von einer veränderten uNK – Zellzahl aus. Demgemäß stellte die Arbeitsgruppe um Williams eine Reduzierung in der Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von Patienten mit Präeklampsie oder IUGR fest (Williams *et al.* 2009a). In einer weiteren Studie wurde eine verringerte Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche in der An – als auch in der Abwesenheit einer Erkrankung an Präeklampsie ermittelt, wenngleich in der gleichen Studie keine Unterschiede in der Anzahl an uNK-Zellen bei Frauen mit einer Präeklampsie ohne IUGR festgestellt wurden (Eide *et al.* 2006).

1.4.2 Uterine natürliche Killerzellen in der Mausschwangerschaft

Auch in der Maus unterscheiden sich die uNK – Zellen in ihrem Phänotyp und in ihrer Funktion stark von den klassischen peripheren NK – Zellen. Die CD3⁺CD122⁺ uNK – Zellen exprimieren weder den gängigen Oberflächenmarker NK1.1 noch den Marker CD49b, binden aber gezielt das Lektin *Dolichus biflorus* agglutin (DBA). DBA – Lektin bindet auf eine einzigartigen Weise an die Membranen des Zytoplasmas und der Granula in den uNK – Zellen. Diese zweifache Anfärbung der Zellkompartimente konnte nicht in NK – Zellen

des Blutes oder anderer Organe festgestellt werden. Aus diesem Grund ist DBA – Lektin ein nützlicher und einzigartiger Marker für uNK – Zellen (Paffaro *et al.* 2003). Neueste Studien offenbarten die Existenz von drei verschiedenen uNK – Zellsubpopulationen. Demnach haben uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von Mäusen die Oberflächenmarkerexpression $CD3^+CD122^+DBA^-$ oder $CD3^+CD122^+DBA^+$. Die DBA – Lektin positive Subpopulation beginnt im Verlauf der Schwangerschaft stark zu proliferieren und kann an Hand ihrer VEGF Produktion in zwei Population aufgeteilt werden (Chen *et al.* 2012). Ausdifferenzierte, reife uNK – Zellen sind mit einer Größe von 40 bis 100 μm wesentlich größer als jede andere murine NK – Zelle (Croy *et al.* 2006).

Bereits zwei Wochen nach der Geburt findet man im Uterus von weiblichen Mäusen kleine, agranuläre Zellen mit dem Phänotyp einer NK – Zelle, den sogenannten uNK – Zellen (Kiso *et al.* 1992). Im Gegensatz zum Menstruationszyklus im Menschen konnten im Östruszyklus der Maus keine Veränderungen in der Anzahl der uNK – Zellen festgestellt werden. Selbst wenn eine Schwangerschaft eintritt, behalten die uNK – Zellen während der Präimplantationsphase ihre Größe, Struktur und Aussehen. Erst mit der Implantation der Blastozyste und dem Einsetzen der Decidualisierung wird die Differenzierung der uNK – Zellen ausgelöst (Peel *et al.* 1989) (siehe Abb. 12B). Darüber hinaus haben auch die Hormone Östrogen und Progesteron einen indirekten Einfluss auf die Differenzierung der uNK-Zellen (Sharma *et al.* 1986 und Peel 1989).

Am Tag 5 der Schwangerschaft sind die ersten DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen in der mesometrialen Decidua nachweisbar. Bereits am Tag 6 der Schwangerschaft sind sie in großer Anzahl vorhanden und in ihrer räumlichen Verteilung streng festgelegt. Neben der massiven Proliferation gewinnen die uNK – Zellen an Größe und akkumulieren große zytoplasmatische Granula. Die zytoplasmatischen Granula der uNK – Zellen enthalten unter anderem Mukine, Perforin, Phosphatasen und Serinproteasen (Kiso *et al.* 1992, Parr *et al.* 1990, Peel 1989, Zheng *et al.* 1991). Die Anzahl der zytoplasmatischen Granula in den uNK – Zellen dienen zur Charakterisierung des Reifegrades der Zellen (Paffaro *et al.* 2003). Des Weiteren beginnen die uNK – Zellen mit der Produktion zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren. Dazu gehören die pro – inflammatorischen Zytokine IFN – γ und IL – 18 (Ashkar *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2003) und die Angiogenesefaktoren PlGF und VEGF (Tayade *et al.* 2007, Wang *et al.* 2000).

Am Tag 8 der Schwangerschaft ist die überwiegende Anzahl der proliferierenden uNK – Zellen im sogenannten *mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy* (MLAp) nachweisbar. Das MLAp ist ein lymphatisches Organ in der uterinen Wand, das in dieser Form nur während einer Schwangerschaft vorhanden ist (Croy *et al.* 2006). Die ausdifferenzierten uNK – Zellen zwischen Tag 10 und 12 der Schwangerschaft sind in großen Mengen in der *Decidua basalis* zu finden (Paffaro *et al.* 2003) (siehe Abb. 12A). Zum

Ende der Schwangerschaft nimmt die Anzahl der uNK – Zellen stetig ab, wobei die letzten Zellen bei der Geburt verloren gehen (Peel 1989, Delgado *et al.* 1996) .

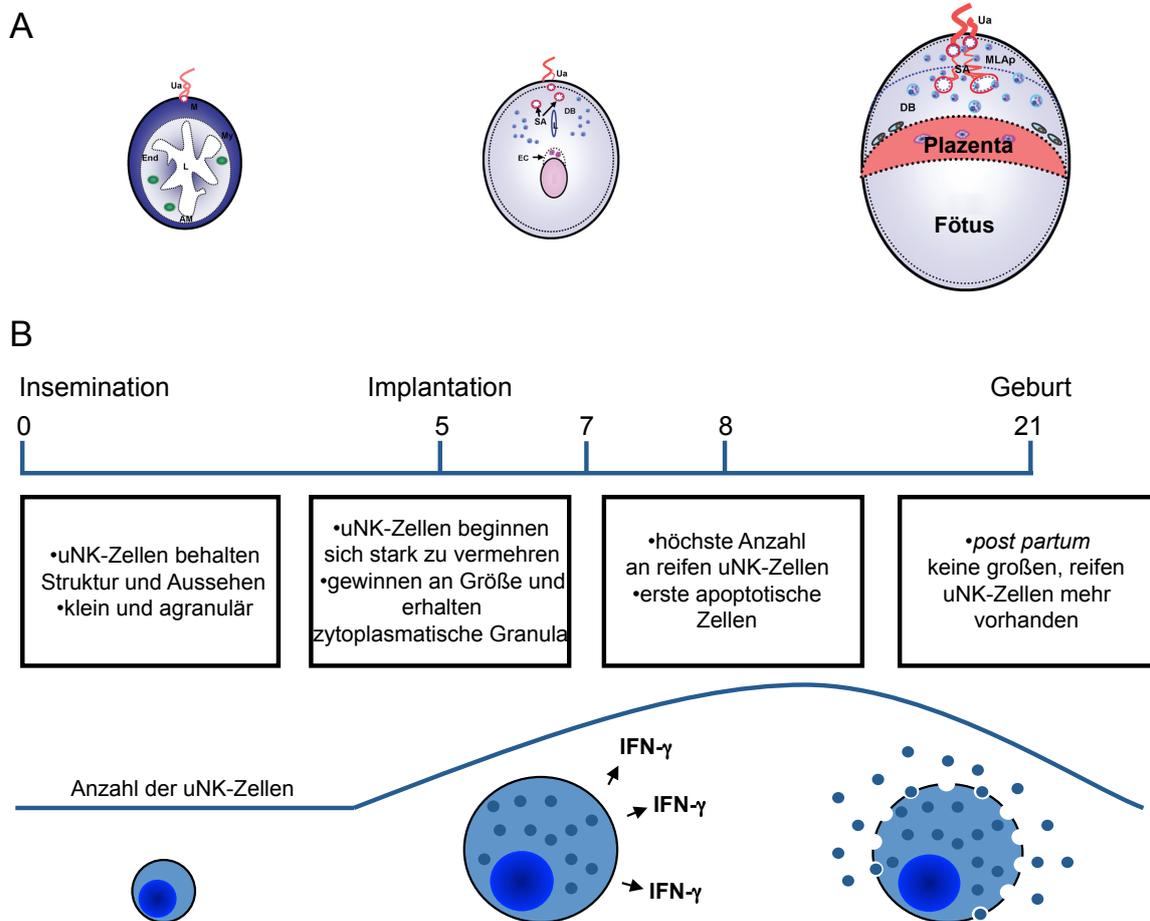


Abb. 12: Erscheinungsbild und Lokalisation von murinen uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche. (Abb. 12A adaptiert nach Croy *et al.* 2006; Abb. 12B eigenes Schema)

Auch wenn uNK – Zellen *in situ* stark proliferieren, bleibt die Frage in welchen Organen die Vorläuferzellen der uNK – Zellen zu finden sind. Transplantationen von Teilen aus Thymus, Knochenmark, Leber, Milz und Lymphknoten bewiesen, dass in allen Geweben Vorläuferzellen vorlagen, die in der Lage waren sich in uNK – Zellen zu differenzieren. Dabei hatte das Milzgewebe die höchste Dichte an Vorläuferzellen, die sich in uNK – Zellen umwandelten (Chantakru *et al.* 2002).

Ähnlich den peripheren NK – Zellen benötigen uNK – Zellen das Zytokin IL – 15 für die Reifung und Differenzierung (Waldmann *et al.* 1999). In Mäusen ohne uNK – Zellen erinnert das histopathologische Bild der Spiralarterien an das von präeklampsischen Frauen. Die Spiralarterien behalten die glatte Muskulatur bei und sowohl die Erweiterung als auch die Verlängerung der Arterien bleibt aus (Greenwood *et al.* 2000). Die tägliche Gabe von rekombinanten IFN – γ verbesserte nicht nur die Reifung der *Decidua basalis* sondern auch die Morphologie der Spiralarterien (Ashkar *et al.* 2000). Im Uterus der Maus werden in der

ersten Schwangerschaftshälfte ungefähr 90 % des IFN – γ von den uNK – Zellen, die sich vorwiegend in der Nähe von Gefäßen befinden, produziert (Ashkar *et al.* 2001, Chantakura *et al.* 2003). Die Regulierung der IFN – γ – Produktion durch uNK-Zellen wird im Wesentlichen über das Zytokin IL-12 gesteuert. Zusätzlich steigert das Zytokin IL-18 die IL-12 geförderte IFN – γ – Produktion (Trinchieri 1998). Fehlt eines der Zytokine oder sogar beide, ist in diesen Mäusen gleichermaßen eine eingeschränkte Umwandlung der Spiralarterien zu beobachten (Zhang *et al.* 2003).

Alle bisher erlangten Erkenntnisse über die Differenzierung und Funktion von uNK – Zellen in der murinen Schwangerschaft lassen sich in einem Konzept zusammenfassen (siehe Abb. 13). Die kleinen agranulären Lymphozyten, Vorläuferzellen der uNK – Zellen, sind vorrangig in der Milz zu finden. Die uNK – Vorläuferzellen sind in der Lage aus der Milz über den Blutstrom bis zum Uterus zu wandern, wo sie anschließend das Endothelium der Blutgefäße durchqueren. Auf diese Weise findet im Uterus ein konstanter Austausch von reifen, aber nicht aktivierten uNK – Vorläuferzellen statt.

Mit Beginn der Decidualisierung während der Schwangerschaft kommt es zur Erhöhung der IL – 15 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche. Diese Erhöhung garantiert das Überleben der bereits vorhandenen uNK – Zellen und sorgt gleichzeitig für eine weitere Rekrutierung von uNK – Zellen aus der Peripherie. Darüber hinaus bewirkt die Decidualisierung des Uterus eine gesteigerte Produktion an IL – 18 und eine Vielzahl zusätzlicher pro – inflammatorischer Signale. Dieses pro – inflammatorische Umfeld ermöglicht den uNK – Zellen im Laufe ihrer Differenzierung die maximale Expression an KIR zu erwerben. Zusätzlich aktiviert das pro – inflammatorische Umfeld die IFN – γ Produktion in den uNK – Zellen. Das IFN – γ reguliert in den Stromazellen, den glatten Muskelzellen und den Epithelzellen der Spiralarterien die Transkription verschiedener Gene, die unter anderem für die Trophoblasteninvasion oder die Proliferation der uNK – Zellen verantwortlich sind (siehe Abb. 13) (Croy *et al.* 2003).

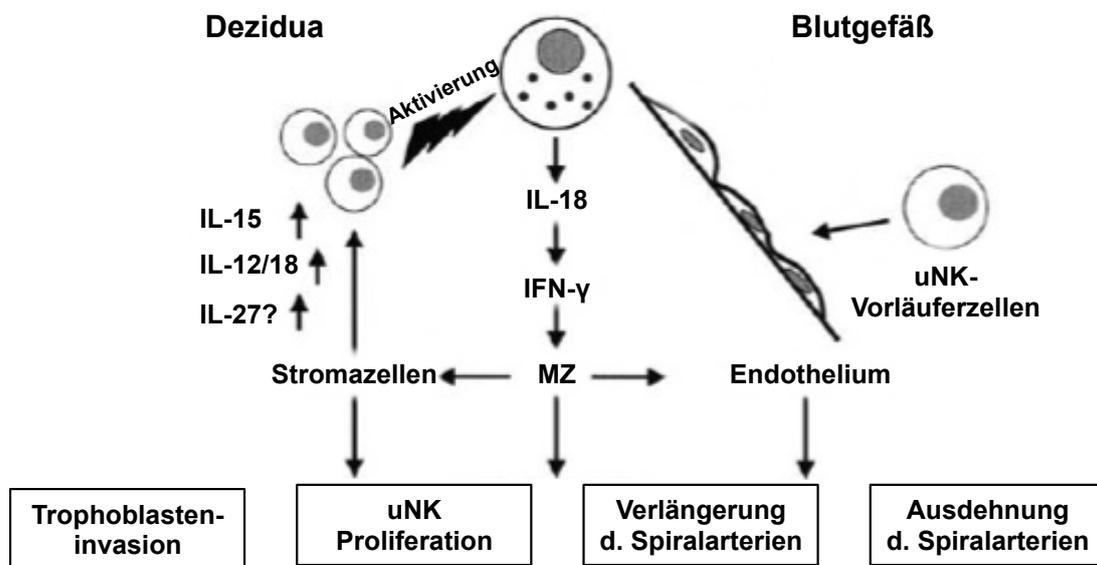


Abb. 13: Modell der Differenzierung, Aktivierung und Funktion der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche in normal schwangeren Mäusen. MZ: glatte Muskelzellen.
(Adaptiert nach Croy *et al.* 2003)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Laborausstattung und Verbrauchswaren

BD FACS Calibur TM 4CA	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Blutgaskapillaren (heparinisiert)	Kabe Labortechnik, Nümbrecht – Eisenroth, Deutschland
CO ₂ – Inkubator HERACELL	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
CO ₂ – Inkubator NU – 5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Deckgläser	Paul – Marienfeld, Lauda – Königshofen, Deutschland
Descosept	Dr. Schumacher, Melsungen, Deutschland
Digitalkamera Canon IXUS 80 IS	Bauer Electronics, Magdeburg, Deutschland
Eisbad	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine ZBE 70 – 35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS (Rinse, Clean)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fettstift (Dako – Pen)	Dako, Glostrup, Dänemark
Filterspitzen RNase – / DNase – frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greinder Bio – one, Frickenhausen, Deutschland
Gene Pulser Xcell™	Bio – Rad Laboratories, München, Deutschland
Glasmaterial	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
iQ5 Real – time PCR System	Bio – Rad Laboratories, München, Deutschland
Kapillarpipetten	Servoprax®, Wesel, Deutschland
Kryo – Einfriergerät	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
KryoSystem 4000	German Cryo Jutta Ohst, Jüchen, Deutschland
Kühlschrank Liebherr FKEX 3600	Rexel Deutschland, Hannover, Deutschland
Kühlschrank Liebherr KTP 1810 – 20	Unielektro, Eschborn, Deutschland
Laboklav 80 – V	SHP AG, Magdeburg, Deutschland
Magnetrührer RH Basic 2 IKAM	Windaus – Labortechnik,

Mikroskop Axiovert 40C	Clausthal – Zellerfeld, Deutschland
Mikroskop Axio Observer A1	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikrotestplatte	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Minishaker MS 3 Basic	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Mini Spin	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Mobiler UV – C Strahler	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrick, Teningen, Deutschland
Omnifix® – 1 ml Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Parafilm M	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Paraffin – Ausgießstation	Thermo Fischer, Dreieich, Deutschland
Paraffin – Streckbad 1052	Omnilab – Laborzentrum, Bremen, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH – Meter	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb, Wessling – Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen (Typ A – C)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polystyren – Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Falcon, Erembodegem, Belgien
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage LA 620	Sartorius, Berlin, Deutschland
Probenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Puradisc Syringe Filter (0,2 µm)	Whatmann, Dassel, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wessling – Berzdorf, Deutschland
Reinigungs – und Desinfektionsautomat	Eppendorf Vertrieb, Wesseling – Berzdorf, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 355 S	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Rotilab – PCR Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Safe Lock Röhrchen	Eppendorf Vertrieb, Wesseling – Berzdorf,

(0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml)	Deutschland
Schüttelwasserbad SWB 25	Windaus – Labortechnik, Clausthal – Zellerfeld, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank NU – 437 – 400E	Integra Biosciences, Fernwald, Japan
Skalpell	Feather [®] , Osaka, Japan
Sterile Einwegspritzen (30 ml)	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Synergy HAT	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Thermocycler	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Thermo – Fast 96 PCR – Platten	ABgene, Epsom, England
Trockenschrank	Novodirect Labortechnik, Kehl, Deutschland
TSE Blood Pressure Monitor System	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland
Ultra Clear Cap Strips	ABgene, Epsom, England
Ultra – Tiefkühlschrank MDF – U53V	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Ultra Turrax T25 Homogenisator	Kanke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
UV – Star Microplatte (96 – Loch)	Greinder Bio – One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6 –, 24 –, 96 – Loch)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsiebe (40 µm, 70 µm, 100 µm)	BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf Vertrieb, Wessling – Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb, Wessling – Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

2.1.2 Computerprogramme

Adobe Photoshop CS3	Adobe system GmbH, München Deutschland
Axio Vision Rel. 4.6	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Cell Quest Pro 4.bf4b	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gen 5 TM Data Analysis Software	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland

GraphPad Prism 5.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
iQ5 Software	Bio – Rad Laboratories, München, Deutschland
Microsoft Excel 2003, 2011	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Power Point 2003, 2011	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2003, 2011	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

3 – Amino – 9 Ethyl – Carbazol (AEC)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Accustain [®] Eosin – Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Amoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aquatex Einbettmedium	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Sigma, Steinheim, Deutschland
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA) – Lektin, biotinyliert	Sigma, Steinheim, Deutschland
DBA – Lektin – FITC	USBiological, Salem, USA
Di – Methyl – Sulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di – Natriumhydrogenphosphat – Heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,4 – Dithio – DL – Threitol (DTT)	Fluka Biochemika, St. Louis, USA
D – Saccharaose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 Vol – %	Otto Fischer, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Callbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ficoll – Paque™ Research Grade	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Fluorescein	Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland
Glycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin (nach Meyer)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Heparin – Natrium	Zentralapotheke (UFK), Magdeburg, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	Biochrom, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Pharma Partner, Hamburg, Deutschland
Lympholyte M [®]	Linaris, Bettingen am Main, Deutschland
Lymphozyten Separationsmedium (LSM)	MP Biochemicals, Illkrich, Frankreich
Magermilchpulver	Fluka Biochemika, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
β – Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
M – MLV RT 5x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Normocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Paraffin (Paraplast Plus)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S) – Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat – gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Restor Plus Western – Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Roti [®] – Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese NF – Acrylamid/Bis – Lösung 30 % (29:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trisbase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trishydrochlorid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau – Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween [®] 20 (Polysorbat 20)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vectashield [®] Einbettmedium für Fluoreszenz mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Wasserstoffperoxide (39 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Rompun)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Angesetzte Medien, Lösungen, Pufferlösungen

APS – Lösung 10 % (w/v)

10 ml PBS mit 1 g APS

Elektrodenpuffer (10x)

Destilliertes Wasser (1 L) mit 30,25 g Trisbase
(pH 8,3) 144 g Glycin
10 g SDS

FACS – Puffer

PBS mit 1 % BSA
0,1 % NaN₃

Fixierungslösung für Histochemie

PBS (pH 7,4) mit 4 % PFA
6,846 g Saccharose

Lysis – Puffer

Destilliertes Wasser mit 1,5 M NH₄Cl
10 mM KHCO₃
100 mM EDTA

PBS (10x)

Destilliertes Wasser mit 1,37 M NaCl
14,7 mM KH₂PO₄
78,1 mM Na₂HPO₄
26,8 mM KCl

Probenpuffer für Western Blot

60 % (w/v) Glycerol mit 15 % (w/v) β – Mercaptoethanol
6 % (w/v) SDS
0,006 % (w/v) Bromphenolblau
0,18 M Tris (pH 6,8)

Transferpuffer (10x)

Destilliertes Wasser (1 L) mit 30,3 g Trisbase
144,15 g Glycin

Tris – gepufferte Salzlösung

Destilliertes Wasser (pH7,6) mit 200 mM Trisbase

80 g/L NaCl
10 % SDS

2.1.5 Enzyme, Proteine und Nucleinsäuren

Desoxy – Nucleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNase	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
DNaseI	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
M – MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
Oligo – Desoxy – Thymidin – Nucleotide (odTs)	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase – Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
Silencer [®] siRNA GAPDH – Kontrolle	Ambion Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silencer [®] siRNA HO-1 (#1)	Ambion Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silencer [®] siRNA HO-1 (#2)	Ambion Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silencer [®] siRNA Negativkontrolle	Ambion Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SYBR [®] – Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan [®] – Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Fluoresceinisothyocyanat Ratte anti – Maus CD122	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Peridinin – Chlorophyll Streptavidin	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Phycoerythrin Ratte anti – Maus CD3	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Allophycocyanin anti – Maus CD49b	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Ratte anti – Maus Ki-67	eBioscience, San Diego, USA
Alexa Flour 555 Ziege anti – Ratte igG	life technologies, Darmstadt, Deutschland

Ratte anti – Maus IFN- γ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Ziege anti – Maus VEGF	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Kaninchen anti – Maus GAPDH	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HRP Ziege anti – Ratte IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HRP Esel anti – Ziege IgG	Jackson Immunoresearch, Suffolk, United Kingdom
HRP Ziege anti – Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

2.1.7 Primer

		Primer und Sonden (5' – 3')
β – actin (Maus)	fwd:	GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT T
	rev:	GTT GTC GAC GAC CAG CGC
	Sonde:	CGC CAC CAG TTC GCC ATG GAT
IFN- γ (Maus)	fwd:	AGC AAC AGC AAG GCG AAA AA
	rev:	AGC TCA TTG AAT GCT TGG CG
	Sonde:	ATT GCC AAG TTT GAG GTC AAC AAC CA
IL-15 (Maus)	fwd:	TGC TGT GTT TGG AAG GCT G
	rev:	TAG GCT GGT TAT CTG CTG AC
PGF (Maus)	fwd:	TGT GTC CTT CTG AGT CGC TG
	rev:	TCT GCC TTT GTC GTC TCC AG
VEGF (Maus)	fwd:	ATG GAC GTC TAC CAG CGA A
	rev:	ACT GTT CTG TCA ACG GTG A

2.1.8 Kits

Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories LTD., Peterborough, Großbritannien
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Maus Endoglin/CD105	R&D Systems, Wiesbaden – Nordenstadt, Deutschland
Maus VEGF R1 (Flt-1)	R&D Systems, Wiesbaden – Nordenstadt, Deutschland

2.1.9 Tierhaltung

Balb/c

Hmox1^{+/+}, *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* aus eigener Züchtung, ursprünglich generiert von Dr. Yet (Harvard Medical School, Boston, USA) und freundlicherweise bereit gestellt von Miguel Soares (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal)

C57BL/6J

Charles River, Sulzfeld, Germany

Alle, im Rahmen der Doktorarbeit, durchgeführten Tierexperimente sowie die Tierhaltung entsprachen den Institutsrichtlinien gemäß den Anforderungen der leitenden staatlichen Tierforschungsbehörde in Halle (LVwA, Referat Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten, AZ: A2-203.h-42502-2-868). Die Tierversuche wurden ausschließlich von autorisierten Mitarbeitern des Institutes durchgeführt. Die Tiere waren im Verlauf der Experimente artgerecht in der Tierhaltung der Experimentellen Gynäkologie untergebracht. Die Züchtung der *Hmox1^{+/+}*, *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Tiere erfolgte in einer eigenen Kolonie im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg. Die Tiere waren in Käfigen mit eingeschobenen Draht-Spanndeckeln untergebracht und waren einen 12 – stündigen Licht –/Dunkelrhythmus ausgesetzt. Die Reinigung der Käfige erfolgte wöchentlich durch das Pflegepersonal. Über Trinkflaschen erhielten die Mäuse täglich frisches Wasser und über Futterraufen hatten sie jederzeit nach Bedarf (*ad libitum*) Zugriff auf das Futter.

2.2 Methoden

2.2.1 Verpaarung der Mäuse

Die Verpaarung der Mäuse erfolgte in mehreren Versuchsreihen, um den Einfluss des schwangerschaftsfördernden Enzyms HO-1 auf die uNK – Zellen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Zum Zeitpunkt der Verpaarung waren die weiblichen Tiere zwei und die männlichen Tiere vier bis sechs Monate alt. Die Mäuse wurden in einem Verhältnis von maximal drei Weibchen mit einem Männchen verpaart. Während der Verpaarung wurden die weiblichen Tiere zweimal täglich, morgens und abends, auf einen vaginalen Inseminationsfleck hin untersucht. Bei Auftreten eines Inseminationsflecks wurden die Weibchen von den Männchen getrennt und dieser Zeitpunkt als Tag 0 der Schwangerschaft definiert.

Für die Bestimmung der Anzahl der uNK – Zellen, der Spiralarterienumwandlung und der Embryonalentwicklung in HO-1 – defizienten Mäusen wurden *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Weibchen mit *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} oder *Hmox1*^{-/-} Männchen verpaart. Die Tötung der schwangeren Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation am Tag 8, 10 oder 12 der Schwangerschaft (siehe Abb. 14).

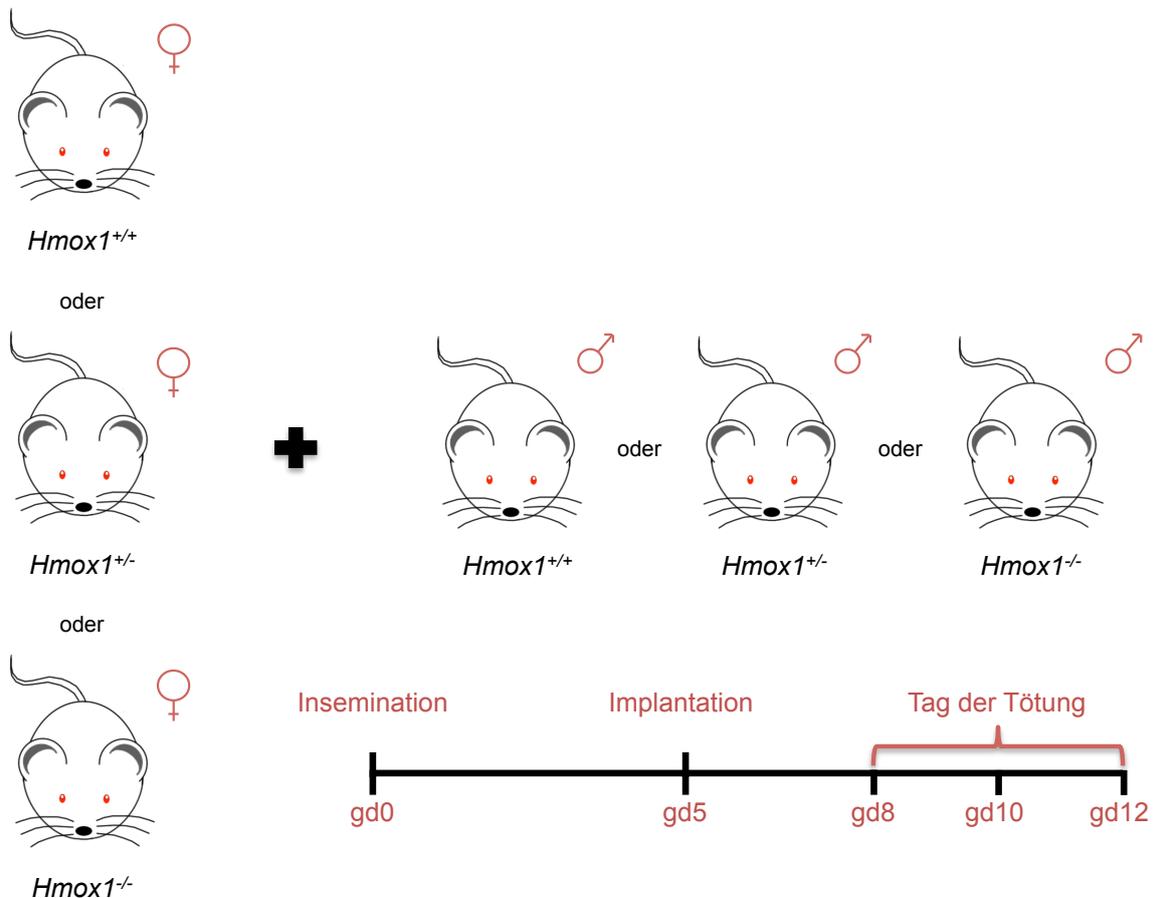
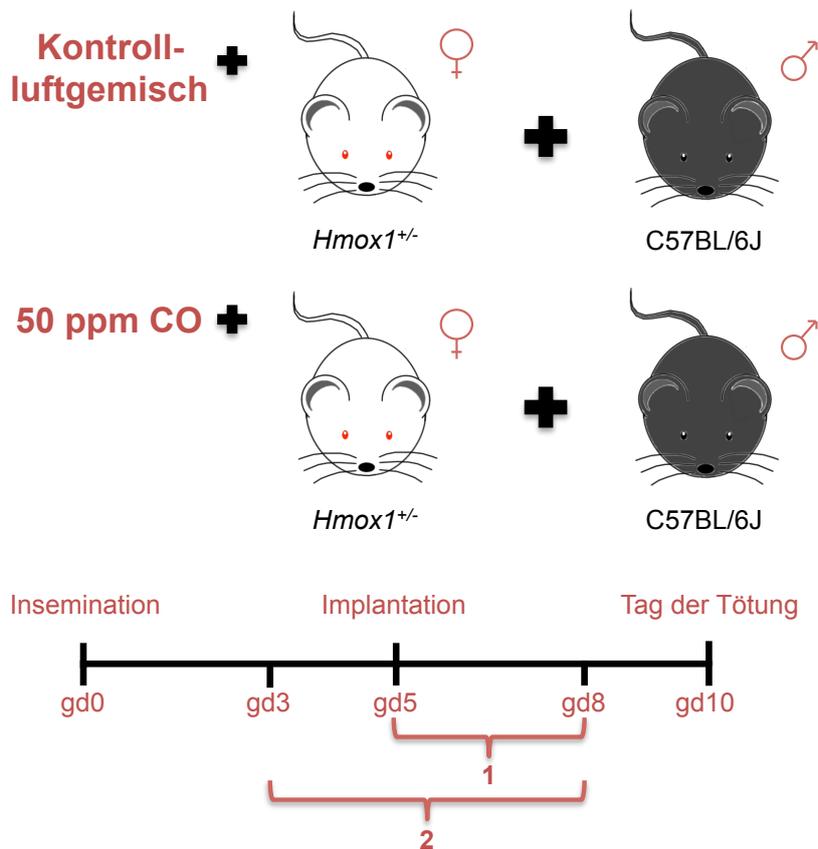


Abb. 14: Verpaarungsschema für die Charakterisierung der Anzahl und Funktion der uNK – Zellen in HO-1 – defizienten Tieren. $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Weibchen wurden mit $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ oder $Hmox1^{-/-}$ Männchen verpaart und am Schwangerschaftstag 8, 10 oder 12 für die Organentnahme getötet.

Zur Untersuchung des Effektes von Kohlenmonoxid (ein Abbauprodukt von HO-1) auf die uNK – Zellen während der frühen Trächtigkeit wurden $Hmox1^{+/-}$ Weibchen allogenen mit C57BL/6J Männchen verpaart. Die trächtigen Weibchen wurden vom Tag 3 oder Tag 5 der Schwangerschaft bis zum Tag 8 der Schwangerschaft entweder zur Kontrolle mit einem reinem Luftgemisch oder mit 50 parts per million (ppm, Teile pro Million) Kohlenmonoxid behandelt (siehe 2.2.2). Am Schwangerschaftstag 10 wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation für die Organentnahme getötet (siehe Abb. 15).



Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid 1 = gd5 - gd8, 2 = gd3 - gd8

Abb. 15: Verpaarungsschema zur Untersuchung des Effektes von Kohlenmonoxid auf uNK – Zellen in der frühen Trächtigkeit von HO-1 – defizienten Mäusen. $Hmox1^{+/-}$ Weibchen wurden allogot mit C57BL/6J Männchen verpaart und vom Tag 3 oder 5 der Schwangerschaft bis Tag 8 der Schwangerschaft mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid behandelt. Am Schwangerschaftstag 10 wurden die Weibchen für die Organentnahme getötet.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine verringerte HO-1 Expression in Mäusen zu pre-eclamptischen Symptomen, wie Bluthochdruck, im Verlauf der murinen Schwangerschaft führen kann. Dafür wurden $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen syngot mit $Hmox1^{+/+}$ oder $Hmox1^{-/-}$ Männchen verpaart und der systolische und diastolische Blutdruck, beginnend am Tag 0 der Schwangerschaft, jeden zweiten Tag überprüft (siehe 2.2.3). Die trächtigen Weibchen wurden vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid behandelt (siehe 2.2.2). Die Tötung der trächtigen Mäuse durch zervikale Dislokation erfolgte am Schwangerschaftstag 18 (siehe Abb. 16).

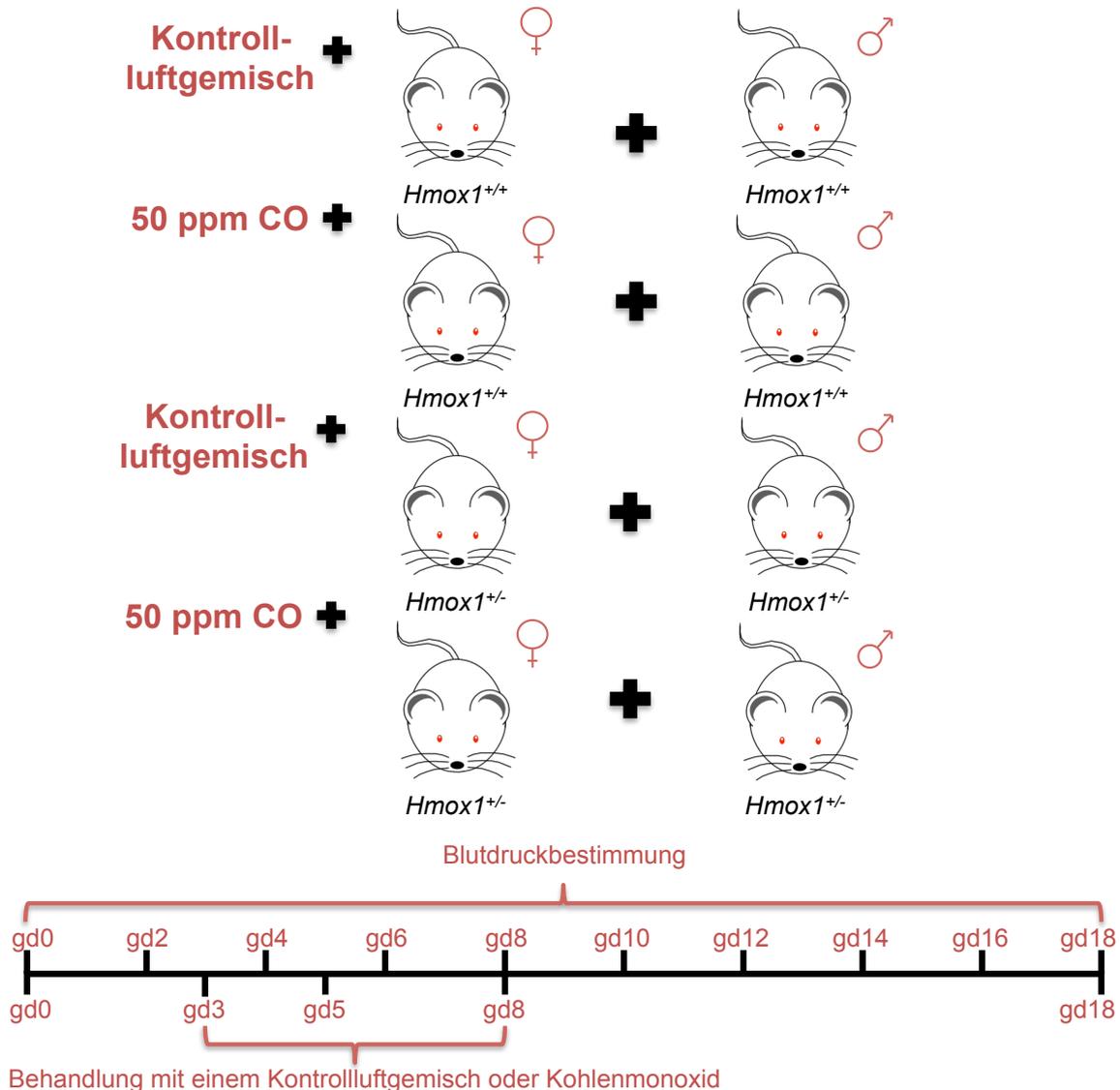


Abb. 16: Verpaarungsschema zur Bestimmung des Blutdruckes während der Schwangerschaft von HO-1 – defizienten Mäusen. $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen wurden syngen mit $Hmox1^{+/+}$ oder $Hmox1^{+/-}$ Männchen verpaart und vom Schwangerschaftstag 3 bis 8 mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid behandelt. Der systolische und diastolische Blutdruck wurde beginnend am Tag 0 der Schwangerschaft jeden zweiten Tag bis zum Zeitpunkt der Tötung am Schwangerschaftstag 18 dokumentiert.

2.2.2 Behandlung der trächtigen Mäuse mit Kohlenmonoxid

Die trächtigen Mäuse wurden für die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid in ihren Käfigen in eine 98 Liter große Kammer aus Plexiglas platziert (siehe Abb. 17). Die Behandlung der Mäuse mit Kohlenmonoxid erfolgte in Abhängigkeit des Versuchansatzes von Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft oder vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft. Für die gleichen Zeiträume wurden die Mäuse der Kontrollgruppe in einer baugleichen Kammer dem

identischen Luftgemisch, aber ohne Kohlenmonoxid, ausgesetzt. Die Gasdurchflussmenge wurde konstant auf 12 Liter pro Minute eingestellt. Kohlenmonoxid mit einer Konzentration von 5000 ppm wurde für eine Endkonzentration von 50 ppm mit 20,9 % Sauerstoff vor der Einleitung in die Behandlungskammern mit Druckluft gemischt. Die Bereitstellung des Kohlenmonoxids erfolgte über eine Hochdruckflasche, wohingegen die Druckluft selber aus einem hausinternen Zulauf mit einem Druck von 7 bar stammte. Da die Gasdurchflussmenge von 12 Litern pro Minute abhängig von der Sauerstoffkonzentration von 20,9 % war, wurde die Kohlenmonoxidkonzentration direkt über die Durchflussmenge des Kohlenmonoxids mit Hilfe eines Durchflussmessers geregelt. Regelmäßig wurde die korrekte Kohlenmonoxid- und Sauerstoffkonzentration in den Behandlungskammern mit einem Gasmessgerät überprüft. Aus sicherheitstechnischen Gründen war der Arbeitsraum zusätzlich mit einem Kohlenmonoxid-detektor ausgestattet.

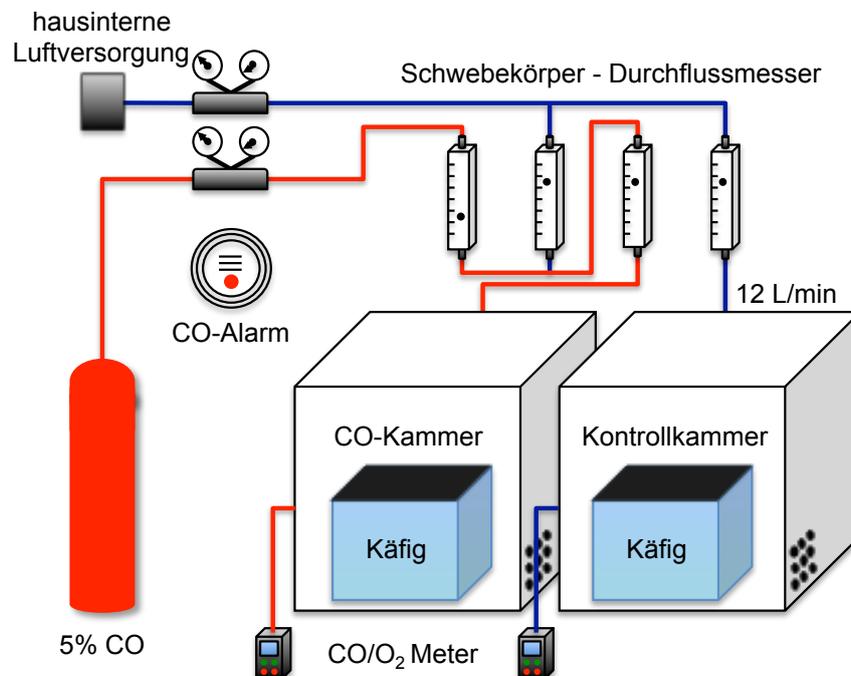


Abb. 17: Versuchsanordnung für die *in vivo* Behandlung von trächtigen Mäusen mit Kohlenmonoxid. Die schwangeren Mäuse wurden für die Behandlung in ihren Käfigen von Tag 3 oder Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft in den Plexigaskammern platziert. Beide Kammern, die Kontrollkammer und die Kohlenmonoxidkammer, wurden mit einem abgestimmten Luftgemisch mit 20,9 % Sauerstoff durch eine hausinterne Zuluft versorgt. Dem Luftgemisch der Kohlenmonoxidkammer wurde zusätzlich kontrolliert Kohlenmonoxid zugesetzt, so dass eine konstante Endkonzentration von 50 ppm gewährleistet war (Adaptiert von Zenclussen *et al.* 2011).

2.2.3 Blutdruckmessung

Der systolische und diastolische Blutdruck der trächtigen Mäuse wurde vom Tag 0 bis Tag 18 der Schwangerschaft jeden zweiten Tag mit der sogenannten „Tail – Cuff Method“ bestimmt. Die Methode ermöglicht eine indirekte, nicht invasive Blutdruckbestimmung bei vollem Bewusstsein der schwangeren Mäuse, da eine Anästhesie nicht erforderlich ist. Bei diesem System wird an dem Schwanz eine Staumanschette angelegt und der nachfolgende Blutfluss in der Schwanzarterie mit einem hochempfindlichen, optischen Pulssensor aufgenommen. Der Pulssensor misst die Lichttransmission durch den Schwanz, welche wesentlich durch den Blutfluss beeinflusst wird.

Vor der Verpaarung wurden die Weibchen täglich für mindestens eine Woche an das Gerät, die Fixierung und den eigentlichen Messvorgang gewöhnt. Für die Dauer der Messung wurden die Mäuse auf einer 37° C warmen Wärmeplatte fixiert und der Schwanz durch die Staumanschette über den Pulswellendetektor geführt (siehe Abb. 18). Die Mäuse wurden bereits 5 Minuten vor dem eigentlichen Beginn der Messung auf der Wärmeplatte platziert, um einen ausreichenden, detektierbaren Blutfluss in der Schwanzarterie zu gewährleisten. Nach dem Start der Messung kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg des Drucks in der Staumanschette bis zum kompletten Verschluss der Schwanzarterie. Durch den Verschluss ist die Pulswelle für den optischen Sensor nicht mehr wahrnehmbar und der korrespondierende Druckwert wird als systolischer Blutdruckwert bestimmt. Pro Messzeitpunkt durchlief die Maus 10 aufeinanderfolgende Einzelmessungen des Blutdrucks, aus denen ein Mittelwert für die statistische Auswertung gebildet wurde.



Abb. 18: Gerät für die nicht-invasive Bestimmung des Blutdrucks bei Mäusen. (eigenes Foto)

2.2.4 Präparation der Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben von Dezidua und Plazenta wurden aus den Tieren an den Tagen 8, 10, 12 oder 18 der Schwangerschaft gewonnen. Nach der zervikalen Dislokation der Mäuse und einer gründlichen Desinfektion des Fells wurde das Abdomen der Mäuse eröffnet. Zunächst wurde eine ganze Implantation vom freigelegten, bicornalen Uterus entfernt und für spätere histologische Untersuchungen in 4 % Paraformaldehyd mit 0,1 M Saccharose überführt. Der verbleibende Uterus wurde durch einen Längsschnitt eröffnet, so dass die Embryonen mit Plazenta sichtbar wurden. Die Embryonen wurden anschließend vorsichtig von ihren Plazenten getrennt und der Uterus von Fettgewebe befreit. Für die Untersuchung der uNK – Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden sowohl das MLAp (mesenteric lymphoid aggregate of pregnancy) als auch die *Decidua basalis* freipräpariert. Durch die sanfte Streckung des Uterus wird auf der Lumeninnenseite an den früheren Implantationsstellen das MLAp sichtbar. Die *Decidua basalis* hingegen ist eine weiche, helle Zellstruktur an der maternalen Seite der Plazenta, die sich leicht lösen lässt. Das entnommene MLAp und die *Decidua basalis* wurden für die anschließende Lymphozytenisolierung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml RPMI 1640 Medium überführt. Die für die RNA-Isolierung entnommenen Gewebeproben von MLAp und *Decidua basalis* wurden zunächst in kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus MLAp und *Decidua basalis*

Das isolierte MLAp und die *Decidua basalis* wurden zusammengeführt und in 2 ml RPMI 1640 Medium mit einem Skalpell in 1 mm² große Stücke zerkleinert. Das Gemisch wurde mit der Rückseite eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Netz gedrückt und im Anschluss für 5 Minuten bei 1200 rpm (*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Das Zellpellet mit den Lymphozyten wurde in 3 ml PBS Puffer gelöst und auf 3 ml Lympholyte[®] aufgeschichtet. Die Auftrennung der Lymphozyten erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation bei 2200 rpm für 20 Minuten ohne Bremseinwirkung bei 4 °C. Die zu isolierenden Lymphozyten setzten sich während der Zentrifugation als ein gut erkennbarer weißer Ring auf dem Lympholyte[®] ab und konnten mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Die Isolierung wurde mit einem Waschschrift der Lymphozyten mit 1 ml PBS Puffer und einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C abgeschlossen

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion von Partikeln und Zellen und deren gegebenenfalls vorhandenen fluoreszenzmarkierten Markern. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Lasers der eine charakteristische, nahezu konstante Wellenlänge (monochromatisches Licht) aussendet. Je nach Anwendungsgebiet und Aufgabenstellung besitzt ein Durchflusszytometer bis zu 6 Laser verschiedener Wellenlänge. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer ist sowohl mit einem Argonionlaser als auch mit einem Diodenlaser ausgestattet und kann bis zu 4 Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig messen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Durchflusszytometrie – Laser und die dazugehörigen Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima

Laser	Fluorochrom	Absorptions- maximum	Emission- maximum
Argonionlaser (488 nm)	FITC	495 nm	519 nm
	PE	480 + 565 nm	578 nm
	PE/Texas Red	480 + 565 nm	615 nm
	PerCP	482 nm	678 nm
	PE/Cy5	480 + 565 nm	667 nm
	PerCP/ Cy5.5	482 nm	695 nm
	Alexa Flour 488	495 nm	519 nm
Diodenlaser (635 nm)	APC	650 nm	660 nm

Die Funktionsweise eines Durchflusszytometers beruht auf einem komplexen optischen System mit einer Vielzahl an Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren (siehe Abb. 19). Dabei wird das vom Laser ausgesandte monochromatische Licht zunächst von einer Fokussierungslinse gebündelt, bevor es auf die Zellen im Probenstrom der Messküvette trifft. Die nach vorne abgelenkten Strahlen, auch als Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC) bezeichnet, geben Auskunft über die Größe der gemessenen Zellen. Das in einem 90 ° – Winkel abgestrahlte Seitwärtslicht oder der sogenannte Sidescatter (SSC) dagegen dient als Maß für die Granularität der gemessenen Zellen. Darüber hinaus bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit Zellen mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörper (AK) genau zu charakterisieren und definieren. Der besondere Vorteil dieser Methode ist der hohe Durchsatz an Zellen innerhalb kürzester Zeit und die parallele Erfassung verschiedenster Parameter einer einzelnen Zelle. Die an den spezifischen AK gebundenen Fluorochrome absorbieren einen Teil der Lichtenergie und emittieren es als Fluoreszenzlicht

einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird zunächst durch Sammellinsen des optischen Systems des Durchflusszytometers gebündelt und durch verschiedene Spiegel wieder aufgeteilt. Für die spezifische Detektion der einzelnen Fluoreszenzen spielen die optischen Filter eine wichtige Rolle. Sie müssen so gewählt und eingesetzt werden, dass das Licht einer bestimmten Wellenlänge durchgelassen und das Fluoreszenzlicht der anderen Fluorochrome herausgefiltert wird. Die Auswahl der Fluorochrome muss unter Berücksichtigung einiger Punkte mit sehr großer Sorgfalt geschehen. So dürfen die Fluorochrome keinen Einfluss auf die zu untersuchenden Zellen haben oder direkt an zelluläre Elemente binden. Bei dem gleichzeitigen Einsatz von mehreren Fluorochromen müssen die spektralen Überlappungsbereiche der einzelnen Fluorochrome untereinander möglichst gering gehalten werden.

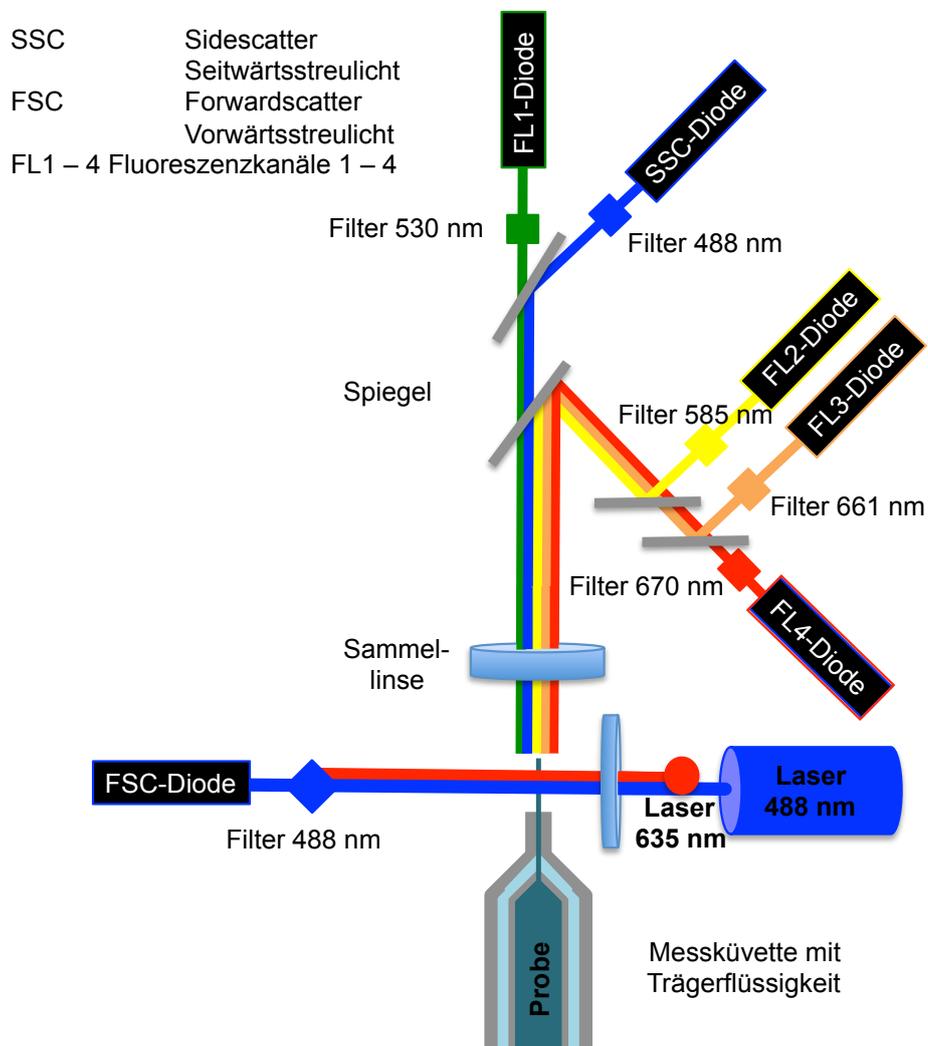


Abb. 19: Das optische System eines Durchflusszytometers mit zwei Lasern verschiedener Wellenlänge. Das von den Lasern ausgestrahlte Licht wird gebündelt und durch den Probenstrom

geleitet. Bei dem nach vorne abgeleiteten Licht handelt es sich um den sogenannten FSC (Zellgröße). Das in einem 90 ° Winkel abgestrahlte Licht ist der sogenannte SSC (Zellgranularität). Zusätzlich wird das emittierte Licht der an die Zellen gebundenen fluoreszenzgekoppelten AK durch ein System von Spiegeln und Filtern zu den jeweiligen Detektionsdioden geleitet. (adaptiert nach <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=7142>)

2.2.6.1 Extrazelluläre Färbung von Lymphozyten

Die aus der MLAp und *Decidua basalis* isolierten Lymphozyten wurden für die extrazelluläre Färbung gleichmäßig auf Rundbodenröhrchen verteilt und mit 1 ml FACS Puffer gewaschen. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgesaugt. Zunächst erfolgte die Färbung der Lymphozyten mit dem in FACS Puffer verdünnten biotinylierten *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) – Lektin (siehe Tabelle 3) für 5 Minuten bei 4 °C. Die Lymphozyten wurden mit 1 ml FACS Puffer gewaschen, für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Lymphozyten in 100 µl der entsprechenden AK – Lösung resuspendiert und sorgfältig gemischt (siehe Tab. 2). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit. Überschüssiger, nicht gebundener AK, wurde mit 1 ml FACS Puffer und 10 Minuten Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde abgesaugt und die gefärbten Lymphozyten für die Messung am Durchflusszytometer in 100 – 200 µl FACS Puffer aufgenommen.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Fluoreszenz – AK in der Durchflusszytometrie.

AK zur Charakterisierung muriner uNK – Zellen	Fluochrom
CD122	FITC
CD3	PE
CD49b	APC
DBA – Lektin biotinyliert + Streptavidin	PerCP

2.2.6.2 Auswertung der Durchflusszytometrie

Eine der gebräuchlichsten Darstellungen der Messergebnisse in der Durchflusszytometrie ist der zweidimensionale Dot – Plot. Die Dot – Plot – Darstellung ermöglicht es unter anderem den FSC dem SSC oder zwei Fluoreszenzen einander gegenüberzustellen.

Zu Beginn der Auswertung wird die Gesamtheit aller gemessenen Zellen in einem FSC/SSC Dot – Plot dargestellt. An Hand der Zellgröße und –granularität lassen sich bereits Rückschlüsse ziehen, um welche Zellpopulation (z.B. Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten) es sich handelt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit beschränkten sich die

Analysen auf die Lymphozytenpopulation. Dies ist möglich indem man ein Analysefenster (Gate) um die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC Dot – Plot setzt und die nachfolgenden Analysen auf dieses Fenster bezieht. In einem weiteren Dot – Plot, bezogen auf die Lymphozytenpopulation, wurden zwei Fluoreszenzen gegenüber gestellt, z.B. CD122 – FITC gegen CD3 – PE. Damit ist möglich Aussagen darüber zu machen, wie viele Zellen der Lymphozytenpopulation einfach- oder doppelpositiv sind, z.B. CD122⁺CD3⁻, CD122⁻CD3⁺ oder CD122⁺CD3⁺ Zellen.

2.2.7 Histologische Färbetechniken

2.2.7.1 Paraffineinbettung von ganzen Implantationen und Nieren

Die ganzen Implantationen und Nieren wurden unmittelbar nach der Entnahme für 6 Stunden in 20 ml einer 4 %igen Paraformaldehydlösung mit 0,1 M Saccharose bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurden die ganzen Implantationen vorsichtig mit einem Skalpell von der anti-mesenterialen zur mesenterialen Seite der Implantation in zwei Hälften geteilt, um eine ausreichende Entwässerung des Gewebes im weiteren Verlauf zu garantieren (siehe Abb. 20 A). Die Entwässerung des Gewebes wurde mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe in jeweils zwei 75 %igen, 80 %igen und 90 %igen Ethanolbädern und 4 abschließenden 100 %igen Ethanolbädern bei RT durchgeführt. Zum Zwecke der Alkoholextraktion und der Entfettung der Proben wurden die Implantationen anschließend zweimal für 25 Minuten in reinem Xylol gelagert. Nach der vollständigen Durchsetzung des Gewebes mit Xylol, wurden die Proben über Nacht (ü.N.) bei 56 °C in flüssigem Paraffin getränkt und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet (siehe Abb. 20 B).

Nach der Einbettung wurden von den Gewebeproben mit Hilfe eines Mikrotoms 5 µm dicke Dünnschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden in einem Wasserbad gestreckt und anschließend für die folgenden histologischen Färbemethoden auf Objektträger aufgezogen.

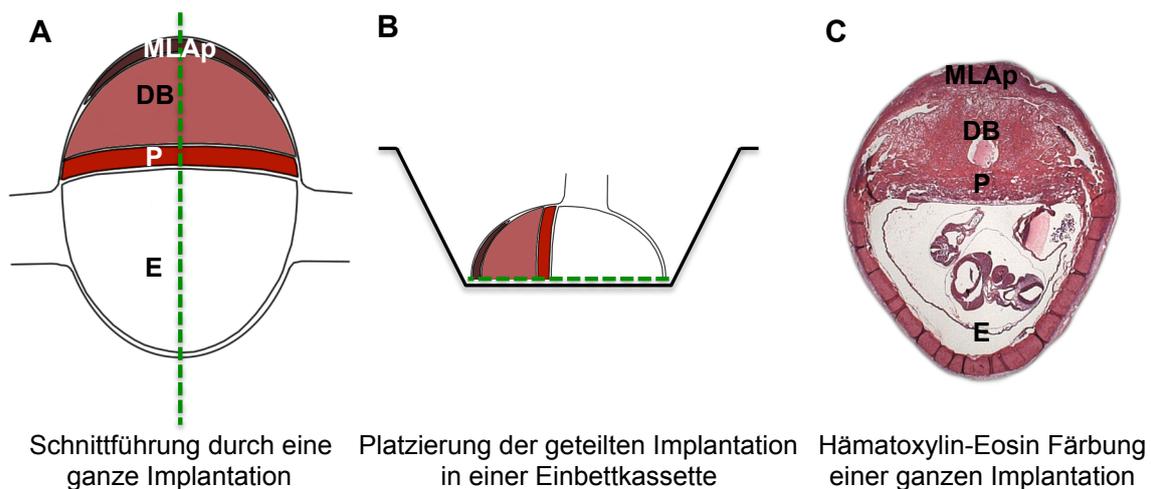


Abb. 20: Schematische Darstellung der Teilung und Einbettung einer ganzen Implantation. Die ganze Implantation wurde nach der Entnahme für 6 Stunden in 4 % Paraformaldehyd mit 0,1 M Sachharose fixiert. **(A)** Anschließend wurde die Implantation mittig geteilt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. **(B)** Die ü.N. mit Paraffin durchtränkten halben Implantationen wurden mit der Schnittfläche nach unten in Paraffin eingebettet. **(C)** Dünnschnitte der Gewebeproben ergaben das beispielhaft abgebildete Schnittbild. **MLAp**, mesenteric lymphoid aggregate of pregnancy; **DB**, Decidua basalis; **P**, Plazenta; **E**, Embryonalhöhle. (Eigenes Schema und Bilder)

2.2.7.2 Hämatoxylin – Eosin – Färbung

Die Hämatoxylin – Eosin – Färbung ist eine weit verbreitete Standardmethode für die Anfärbung von Zellstrukturen in Gewebeschnitten. Auf Grund ihrer einfachen Durchführung und Handhabung ermöglicht sie eine schnelle Aussage über die Morphologie des zu untersuchenden Gewebes. Der Farbstoff Hämalan ist basischer Natur und stammt von dem natürlichen Farbstoff Hämatoxylin ab. Die Färbung erfolgt durch die Anlagerung des positiv geladenen Hämalans an die sauren bzw. basophilen Zellstrukturen, wie zum Beispiel an die DNA in den Zellkernen.

Die Gegenfärbung erfolgt mit dem synthetischen Farbstoff Eosin. Eosin selber ist negativ geladen und färbt somit alle basischen bzw. acido-/eosinophilen Zellbestandteile. Das führt zu einer Färbung des Plasmas über die dort gelösten Eiweiße.

Wie bei jeder anderen Färbung von Paraffinschnitten ist auch bei der Hämatoxylin – Eosin – Färbung eine Entparaffinierung und Rehydrierung der Proben vor der Färbung notwendig. Die Entparaffinierung erfolgte für zweimal 20 Minuten durch Inkubation in Xylol. Die Rehydrierung wurde über eine absteigende Alkoholreihe bis hin zu einem wässrigen Milieu erreicht. Dafür wurden die Gewebeschnitte nacheinander für jeweils 10 Minuten in 100 %igen, 95 %igen und 75 %igen Ethanol und anschließend 5 Minuten in Aqua dest. inkubiert.

Danach reagierten die Gewebeschnitte mit dem Hämalaun für eine Minute bei RT. Im Anschluss wurden sie 5 Minuten in Leitungswasser gewaschen und mit Eosin für 5 Minuten gegengefärbt.

Die Dehydratation der Schnitte erfolgte durch eine Behandlung in einer ansteigenden Alkoholreihe von 75 %igem über 95 %igen bis hin zu 100 %igem Ethanol. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte zweimal je 5 Minuten in Xylol inkubiert und mit Hilfe von Histokitt eingedeckelt.

2.2.7.3 Vermessung von ganzen Implantationen

Die mit Hämatoxylin – Eosin gefärbten Paraffinschnitte von ganzen Implantationen wurden an einem konfokalen Mikroskop mit einer 10fachen Vergrößerung digital abfotografiert. Die digitale Bildanalyse Software AxioVision der Firma Zeiss ermöglicht mit Hilfe von verschiedenen konfigurierbaren Werkzeugen die Vermessung von mikroskopischen Strukturen in histologischen Paraffinschnitten. Dafür wurden in den digitalen Aufnahmen die Konturen der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle mit der Computermaus umrandet (siehe Abb. 21). Die Messergebnisse der analysierten Flächen werden von der Bildanalyse – Software in μm^2 angegeben.

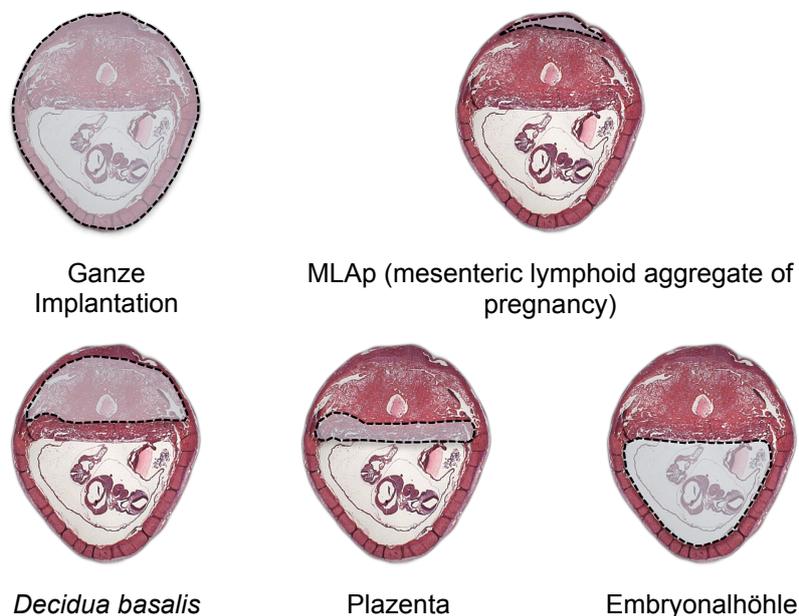


Abb. 21: Exemplarische Darstellung der zu vermessenen Bereiche in einer ganzen Implantation am Tag 10 der Schwangerschaft (X10). Von den Hämatoxylin – Eosin gefärbten ganzen Implantationen wurden an einem konfokalen Mikroskop digitale Aufnahmen in 10facher Vergrößerung angefertigt. Mit Hilfe der Bildanalyse Software AxioVision wurde die Größe der ganzen Implantation, des MLAp der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle bestimmt. (Eigene Bilder)

2.2.7.4 Analyse der Spiralarterienumwandlung

Im Verlauf der Schwangerschaft kommt es in der *Decidua basalis* zu einer morphologischen Umwandlung der Spiralarterien. Die Arterienwände der Spiralarterien werden dünner und das Lumen der Spiralarterien vergrößert sich. Somit erhalten die Spiralarterien einen venösen Charakter, der einen hohen und gleichmäßigen Blutfluss zur Versorgung des Feten ermöglicht. Zur Analyse der Spiralarterienumwandlung wurde die Wanddicke und das Wand/Lumen Verhältnis der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von ganzen Implantationen bestimmt.

Mit Hilfe der AxioVision Bildanalyse Software für Mikroskopie der Firma Zeiss wurde in 200fach vergrößerten digitalen Aufnahmen der *Decidua basalis* der Umfang der Spiralarterien und der korrespondierende Lumenumfang bestimmt (siehe Abb. 22). Mit folgenden Gleichungen konnte sowohl der Spiralarteriendurchmesser als auch der Lumendurchmesser berechnet werden:

$$\text{Spiralarteriendurchmesser}[\mu\text{m}](1) = \text{Spiralarterienumfang}[\mu\text{m}](a) \div \pi$$

$$\text{Lumendurchmesser}[\mu\text{m}](2) = \text{Lumenumfang}[\mu\text{m}](b) \div \pi$$

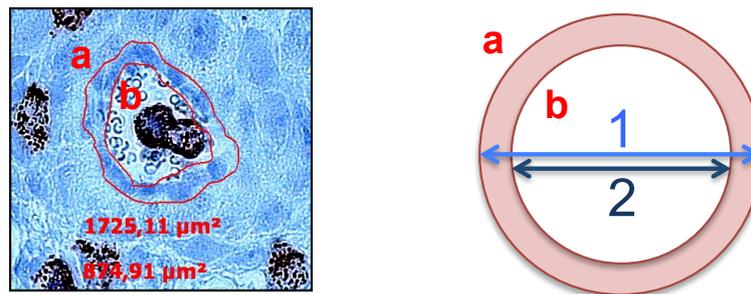
Der berechnete Spiralarteriendurchmesser und Lumendurchmesser ermöglichte die Berechnung der Wanddicke:

$$\text{Wanddicke}[\mu\text{m}] = \frac{\text{Spiralarteriendurchmesser}[\mu\text{m}](1) - \text{Lumendurchmesser}[\mu\text{m}](2)}{2}$$

und des Wand/Lumen Verhältnisses:

$$\text{Wand / Lumen - Verhältnis} = \frac{\text{Spiralarteriendurchmesser}[\mu\text{m}](1)}{\text{Lumendurchmesser}[\mu\text{m}](2)}$$

Pro Implantation wurden 5 – 10 Spiralarterien vermessen, die entsprechende Wanddicke und das Wand/Lumen Verhältnis berechnet und deren Mittelwert bestimmt.



a: Spiralarterienumfang 1: Spiralarteriendurchmesser
 b: Lumenumfang der Spiralarterie 2: Lumendurchmesser der Spiralarterie

Abb. 22: Schematische Darstellung der Vermessung von Spiralarterien in der *Decidua basalis* trächtiger Mäuse (X200). In der *Decidua basalis* der ganzen Implantationen wurde der Umfang der Spiralarterien (a) und der entsprechende Lumenumfang (b) mit Hilfe der Bildanalyse Software AxioVision in Aufnahmen mit 200facher Vergrößerung bestimmt. Über den Umfang der Spiralarterien und den Lumenumfang konnte somit der Durchmesser der Spiralarterien (1) und des Lumens (2) berechnet werden. Die Durchmesser der Spiralarterie und des Lumens waren die Grundlage zur Berechnung der Wanddicke und des Wand/Lumen Verhältnisses der Spiralarterien. (Eigenes Bild und eigenes Bild)

2.2.7.5 *Dolichos biflorus* (DBA) – Lektin Färbung von uNK – Zellen

Lektine sind Glykoproteine mit mindestens zwei Zuckerbindungsstellen, die eine hohe Spezifität aufweisen. Auf Grund dieser hohen Spezifität gegenüber bestimmten Zuckerarten lassen sich Lektine, ähnlich wie AK, in der Immunhistochemie verwenden (Brooks *et al.* 1997).

DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) ist ein Glykoprotein einer indischen Leguminose mit hoher Affinität zu N-Acetyl- α -D-Galaktosaminen. Kürzlich konnten Studien zeigen, dass DBA – Lektin ausschließlich mit der Plasmamembran von uNK – Zellen bei Mäusen reagiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass keine Bindung mit anderen Lymphozyten im Uterus stattfindet (Paffaro *et al.* 2003). Somit ist die DBA – Lektin Färbung eine adäquate und sehr spezifische Nachweismethode für uNK – Zellen.

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung (siehe 2.2.7.2) wurden für die Blockierung der endogenen Peroxidase die Gewebeschnitte mit 3 % H_2O_2 in Methanol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in 50 nM PBS gewaschen, mittels eines Avidin/Biotin – Kit blockiert und für 30 Minuten mit 5 % BSA in 50 nM PBS bei RT inkubiert. Anstelle eines Primär – AKs wurden die Schnitte mit biotinyliertem DBA – Lektin (1 : 150 in 1 % BSA/100 mM PBS) bei 4 °C ü.N. behandelt. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten mit dem ABCComplex/HRP und 2 Minuten mit der 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) – Fertiglösung inkubiert, 10 Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt und danach mit Aqua dest. zweimal 5 Minuten gewaschen und mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.7.5.1 Auswertung der DBA – Lektin Färbung

Die gefärbten Schnitte wurden am Lichtmikroskop mit Hilfe eines Okulars mit einem Zählquadrat der Größe 0,25 mm² ausgewertet. Für jede Gewebeprobe wurden 10 verschiedene Bereiche für die Zählung ausgewählt. Es wurde jeweils die Anzahl der uNK – Zellen pro 0,25 mm² bestimmt, der Mittelwert aus den 10 Zählungen gebildet, dieser mit dem Faktor 4 multipliziert. Damit wurde als Maßeinheit die Anzahl der uNK – Zellen pro mm² ermittelt.

2.2.8 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz gehört zu den immunhistochemischen Färbetechniken, die auf der Affinität eines AK zu einem definierten Epitop beruht. Als Detektionssystem sind die AK mit einem Fluorophor gekoppelt und machen somit das Epitop an seinem Ort im Gewebe sichtbar. Häufig wird zur Signalverstärkung die indirekte Immunfluoreszenz in zwei Schritten angewandt. Dabei wird zunächst ein spezifischer Primär – AK und anschließend der mit einem Fluorophor gekoppelte Sekundär – AK auf den zu untersuchenden Gewebeschnitt aufgetragen.

2.2.8.1 Die DBA – Lektin⁺Ki-67⁺ Doppelimmunfluoreszenz

Zunächst wurden Gewebeschnitte der ganzen Implantationen entparaffiniert und rehydriert (siehe 2.2.7.2). Anschließend wurden für die Antigendemaskierung die Schnitte für 10 Minuten in Citratpuffer gekocht, in 0,05 % Tween 20 in TBS gewaschen und bei 4 °C ü.N. mit einem aus Ratte gewonnen anti – Maus Ki-67 AK in 0,05 % Tween 20 in TBS (1 : 250) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 0,05 % Tween 20 in TBS erfolgte die Inkubation mit einem aus Ziege gewonnen, mit Alexa Flour 555 gekoppelten anti – Ratte Sekundär – AK. Durch die Inkubation mit DBA – Lektin FITC für 2 Stunden bei RT erfolgte nach dem Waschen mit 0,05 % Tween 20 in TBS die Markierung der uNK – Zellen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe des Einbettmediums Vectashield[®] gleichzeitig mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt und eingedeckelt.

2.2.8.2 Auswertung der DBA – Lektin⁺Ki-67⁺ Doppelimmunfluoreszenz

Die mit der DBA – Lektin⁺Ki-67⁺ Doppelimmunfluoreszenz angefärbten Schnitte wurden am Immunfluoreszenzmikroskop mit Hilfe der AxioVision Bildanalyse Software für Mikroskopie der Firma Zeiss in 100fach vergrößerten digitalen Aufnahmen ausgewertet. Für jede Gewebeprobe wurde ein Bereich im MLAp für die Zählung der DBA – Lektin⁺Ki-67⁺

uNK – Zellen ausgewählt und die Anzahl der DBA – Lektin⁺Ki-67⁺ uNK – Zellen pro mm² ermittelt.

2.2.9 Echtzeit RT (reverse transcription) – PCR

Das Ziel der klassischen PCR (Polymerase Chain Reaction) ist es, eine große Anzahl an Kopien spezifischer Sequenzen der DNA anzufertigen. Die PCR setzt sich aus drei grundlegenden Schritten, die bis zu 40-mal wiederholt werden, zusammen.

Begonnen wird mit der Denaturierung der DNA bei 94 °C. Bei dieser Temperatur trennen sich die beiden Doppelstränge der DNA und alle enzymatischen Reaktionen werden gestoppt. Der darauf folgende Annealingschritt bei 60 °C bietet den beiden spezifischen Oligonukleotid-Primern die Möglichkeit, sich an die einzelsträngige DNA anzulagern. Abgeschlossen wird die PCR mit der Verlängerung des spezifischen DNA – Abschnittes bei einer Temperatur von 72 °C unter mit Hilfe der *Taq* DNA – Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Während jedes PCR – Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA – Abschnitte verdoppeln, die im nächsten Zyklus wiederum als Template für die Amplifikationsreaktion dient. Somit nimmt die Menge der Zielsequenz während der PCR – Reaktion exponentiell zu.

Die Echtzeit RT – PCR stellt eine Weiterentwicklung der klassischen PCR dar und dient der Quantifizierung spezifischer DNA. Dabei wird zunächst die zu quantifizierende RNA mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Diese wird anschließend als Template für die PCR verwendet. Durch den Einsatz von interkalierenden Farbstoffen oder Hybridisierungs sonden ist es möglich, die PCR in Echtzeit zu verfolgen.

Ein in der Echtzeit RT – PCR gebräuchlicher interkalierender Farbstoff ist der asymmetrische Cyaninfarbstoff SYBR[®] – Green. SYBR[®] – Green hat eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA und wird während der Verlängerungsphase in die entstehende doppelsträngige DNA eingebaut. Da sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs durch die Bindung an die DNA ändert, kommt es zum Anstieg des Fluoreszenzsignals. Nach jedem abgeschlossenen Zyklus wird das entstehende Fluoreszenzsignal gemessen. Die Zunahme der doppelsträngigen DNA korreliert mit der Zunahme des Fluoreszenzsignales und ermöglicht somit Rückschlüsse auf die Menge der vorliegenden DNA (siehe Abb. 23 A). Die geringe Spezifität der interkalierenden Farbstoffe erfordert die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die Echtzeit RT – PCR. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird durch die kontinuierliche Temperaturerhöhung von 50 °C auf 95 °C die gebildete, doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, interkalierende Farbstoffe freigegeben und die Änderung des Fluoreszenzsignals bestimmt. Die doppelsträngige DNA des spezifischen PCR – Produktes hat einen höheren Schmelzpunkt im Vergleich zu den

kürzeren unspezifischen PCR – Produkten. Das ermöglicht eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten.

Die am häufigsten angewandte Hybridisierungssonde ist die TaqMan[®] – Sonde. Bei der TaqMan[®] – PCR liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotid – Primern ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, die so genannte TaqMan[®] – Sonde. Die Sonde ist am 5' – Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3' – Ende mit einem Quencher markiert. Durch die räumliche Nähe des Quenchers wird die Fluoreszenz des Reporter – Farbstoffes unterdrückt. Kommt es zum spezifischen Abbau der Sonde, löst sich der Reporter durch die 5' –, 3' – Exonukleaseaktivität der Taq – Polymerase vom Quencher und das Fluoreszenzsignal steigt an. Die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenz ist proportional der Menge des DNA – Templates (siehe Abb. 23 B).

Ein Nachteil der SYBR[®] – Green Methode ist die unspezifische Bindung des Farbstoffs an Primer – Dimere oder unspezifische PCR – Produkte. Durch die hohe Spezifität der Hybridisierungssonden ist die Wahrscheinlichkeit einer Bildung von Primer – Dimeren beim Einsatz einer TaqMan[®] – Sonde sehr gering. Da aber der Gebrauch dieser Sonden in der Echtzeit RT – PCR sehr kostenintensiv ist, wird die SYBR[®] – Green Methode meistens bevorzugt angewendet. Darüber hinaus wird durch eine gewissenhafte Auswahl der Primersequenzen das Risiko der Primer – Dimerbildung minimiert. Auch die bereits beschriebene Schmelzkurvenanalyse macht die SYBR[®] – Green Echtzeit RT – PCR zu einer zuverlässigen Methode.

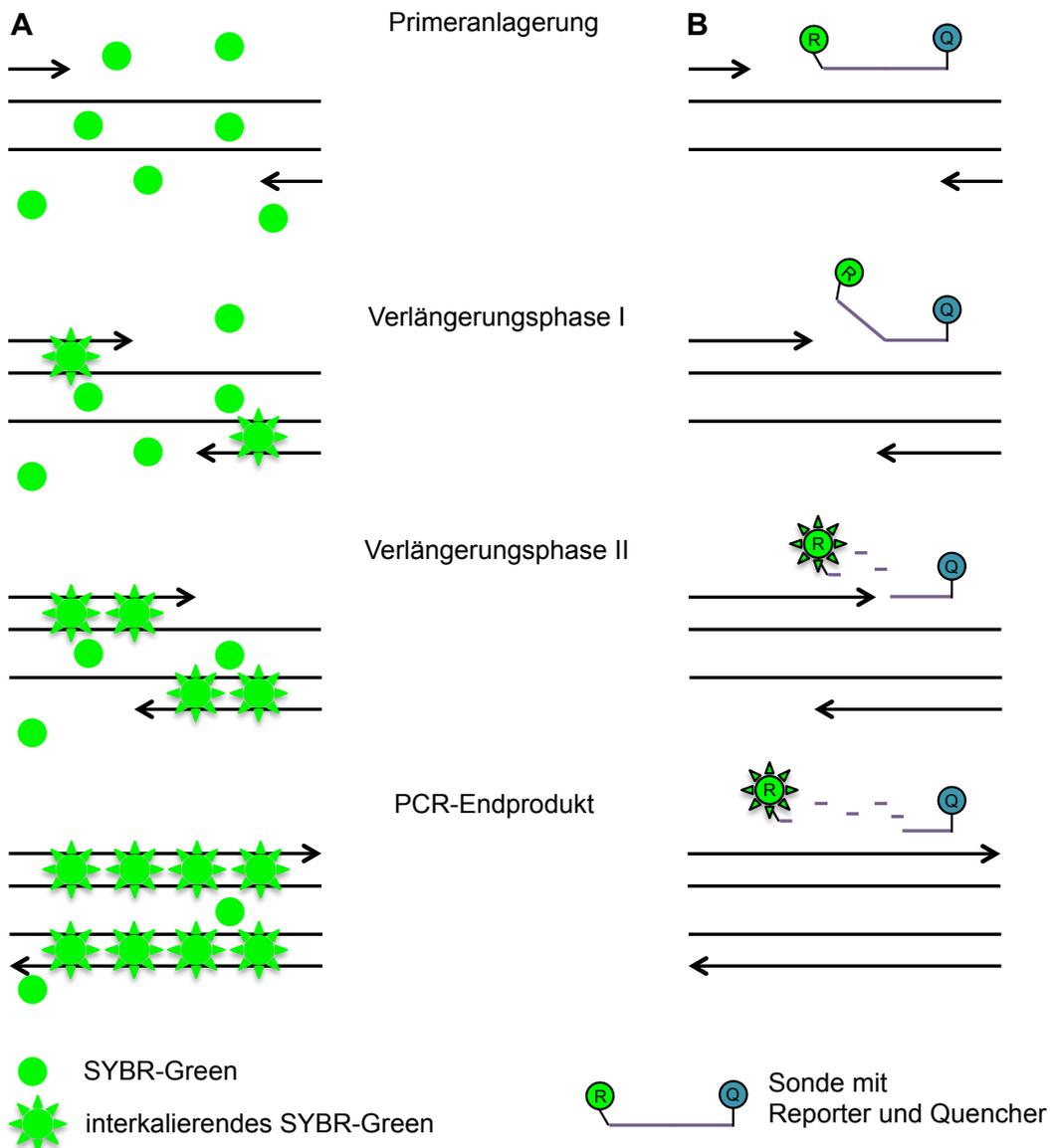


Abb. 23: Methoden der Echtzeit RT – PCR. (A) Der Einbau des inkalierenden Farbstoffes SYBR[®] – Green in die doppelsträngige DNA während der Verlängerungsphase der Echtzeit RT – PCR führt zu einem Anstieg des messbaren Fluoreszenzsignals. Das zunehmende Fluoreszenzsignal ist proportional zu der entstehenden DNA Menge. (B) Die TaqMan[®] – Sonde besteht aus einer spezifischen Oligonukleotidsequenz, einem Quencher und einem Reporter. Durch den Einbau der Hybridisierungssonde während der Verlängerungsphase wird der Reporter von dem Quencher räumlich getrennt und es kommt zu einem messbaren Anstieg des Fluoreszenzsignals. Das Signal steigt proportional mit der entstehenden DNA an. (adaptiert nach Hawrami *et al.* 1997)

Die Quantifizierung der Zielgenexpression basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, auch Threshold Cycle oder C_T – Wert genannt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf ein weiteres nicht regulierbares

Haushaltsgen (house keeping gene, HKG) bezogen. In unserem Falle wurde für diesen Zweck das β – Aktin – Gen ausgewählt.

2.2.9.1 RNA – Isolierung aus Dezidua – und Plazentagewebe

Voraussetzung für die erfolgreiche RNA – Isolierung ist die Vermeidung einer Kontamination mit RNase. Dazu wurde mit den entsprechenden Materialien RNasefrei und auf Eis gearbeitet.

Das bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde mit 1 ml Trizol pro 100 mg Gewebe versetzt und mit Hilfe des Homogenisators Ultra Turrax T25 zerkleinert. Nach jeder Homogenisierung wurde das Gerät mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung, einer 80 %igen Ethanollösung und Aqua dest. gereinigt. Die homogenisierten Gewebeproben wurden für 1 Minute mit 200 μ l Chloroform unter ständiger Bewegung vermischt. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C bildeten sich drei voneinander getrennte Phasen, eine untere rote Phenol – Chloroform – Phase, eine DNA – und Protein – enthaltende Interphase sowie eine wässrige, klare RNA – enthaltende obere Phase. Die obere klare Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein RNase-freies Reaktionsgefäß übertragen und im Verhältnis 1 : 1 mit eiskaltem Isopropanol gemischt. Bei -80 °C wurde die RNA ü.N. ausgefällt.

Nach der Inkubation wurden die Proben für 10 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA – Pellet wurde dreimal mit 500 μ l 80 %igem Ethanol gewaschen und jeweils für 5 Minuten bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zum Abschluss wurde das Pellet luftgetrocknet, in RNase – freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Vor der Weiterverarbeitung der RNA wurde deren Konzentration bestimmt und die Reinheit überprüft.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm genutzt. Die RNA wurde verdünnt und in einem Absorptionsbereich von $\lambda = 200 - 300$ nm vermessen. Anschließend konnte mit Hilfe des Absorptionsmaximums die Ausgangskonzentration der RNA – Proben berechnet werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass eine Extinktion von 1 bei 260 nm 40 μ g/ml RNA entspricht. Für die Berechnung wurde folgende Gleichung genutzt:

$$\text{Konzentration} [\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g} / \text{ml} \text{Lösungsmittel}$$

Zusätzlich liefert der Quotient OD_{260}/OD_{280} Informationen über die Qualität der RNA-Proben. Dabei zeugt ein Wert zwischen 1,7 und 2,1 von guter Qualität. Ein kleinerer Wert des

Quotienten spricht für eine Verunreinigung des Extrakts mit Proteinen und/oder Phenol, wohingegen ein größerer Wert für eine Verunreinigung mit degradierter DNA steht.

Eine weitere Methode der Qualitätskontrolle von RNA ist die Agarose – Gelchromatographie. Dabei werden mögliche Verunreinigungen durch DNA und degradierte RNA sichtbar gemacht. Auf ein 1,5% Agarosegel wurde 1 µg der RNA aufgetragen, für 1 Stunde bei 180 V die Gelelektrophorese durchgeführt und schließlich mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Bei Verunreinigungen der RNA – Proben durch DNA wird eine hochmolekulare Bande am oberen Rand des Agarosegels sichtbar. RNA – Proben von guter Qualität, die nicht degradiert sind, zeigen im Agarosegel die 28S – und 18S – Banden der ribosomalen RNA (siehe Abb. 24).



Abb. 24: Agarosegel zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA. Abgebildet ist ein Negativbild der unter UV – Licht visualisierten RNA. Das Fehlen einer oberen Bande erzeugt durch hochmolekulare DNA und die sichtbaren 28S – und 18S – Banden der ribosomalen RNA zeugen von einer guten RNA Qualität. (eigenes Bild)

2.2.9.3 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe der *reversen Transkriptase* (Moloney – Maus – Leukämie – Virus Reverse Transkriptase, MMLV – RT) in cDNA umgeschrieben. 2 µg der isolierten RNA wurden mit RNase – freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 18 µl gebracht und mit 2 µl oligo – desoxyThymidin – Ribonukleotiden (odT) versetzt. Die Proben wurden sorgfältig gemischt, anzentrifugiert und für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 18,5 µl eines Mastermixes bestehend aus 8 µl MMLV – RT Puffer, 4 µl Aqua ad inject., 4 µl dNTPs [2,5 mM], 2 µl DNase [2u/µl] und 0,5 µl RNase – Inhibitor [40 U/µl] pro Probe hinzugefügt. Danach inkubierten die Proben für 30 Minuten bei 37 °C. Die DNase Inaktivierung erfolgte anschließend für 5 Minuten bei 75 °C. Die cDNA – Synthese wurde unter Zugabe von 2 µl einer Mischung bestehend aus 1 µl MMLV – Reverse – Transkriptase [200 u/µl] und 1 µl RNase – Inhibitors [40 u/µl] und Inkubation bei 42 °C für 60 Minuten ausgeführt. Die reverse Transkriptase wurde

anschließend für 5 Minuten bei 94 °C inaktiviert. Nach Beendigung der reversen Transkription wurden die cDNA – Proben bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.9.4 Durchführung der Echtzeit RT – PCR

Jede Probe wurde in einer Doppelbestimmung auf das zu untersuchende Zielgen und das Haushaltsgen hin untersucht. Zusätzlich wurde bei jedem RT – PCR Lauf vom Ziel- und Haushaltsgen eine *no template control* (NTC) durchgeführt. Die NTCs dienten der Kontrolle von Kontaminationen oder einer möglichen Bildung von Primerdimeren.

2.2.9.4.1 Echtzeit RT – PCR unter Verwendung des Farbstoffes SYBR® – Green

1 µl der zu untersuchenden cDNA oder 1 µl H₂O für die NTCs wurden mit 6,5 µl SYBR® – Green Mastermix, 3 µl Primermix, 0,5 µl Fluoreszein und 2 µl H₂O versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden zum Abschluss mit einer PCR geeigneten selbstklebenden Folie verschlossen und mit folgendem Thermoprofil im iQ5 Real – time PCR System analysiert:

Tabelle 4: Übersicht über den Ablauf der einzelnen Zyklen einer SYBR® – Green Echtzeit RT – PCR

Anzahl der Zyklen	Zyklusdauer	Temperatur
1	3 Minuten	95 °C
45	30 Sekunden	94 °C
	30 Sekunden	60 °C
	30 Sekunden	72 °C
1	60 Sekunden	95 °C
Schmelzkurve		
1	1 Minute	50 °C
80	10 Sekunden	Je 0,5 °C Anstieg in jedem Zyklus

2.2.9.4.2 Echtzeit RT – PCR unter Verwendung einer TaqMan® – Sonde

Für die Echtzeit RT – PCR mit einer TaqMan® – Sonde wurde ein Mastermix bestehend aus 6,25 µl Taqman – Mastermix, 2,25 µl RNase – freies Wasser, 3 µl Primermix und 0,5 µl Sonde je Probe angesetzt. Danach wurden entweder 1 µl cDNA oder für die NTCs 1 µl RNase – freies Wasser in das RNase – freie Reaktionsgefäß vorgelegt.

Abschließend wurden 12 µl des Mastermixes hinzugefügt, die Reaktionsgefäße mit einer PCR geeigneten selbstklebenden Folie verschlossen und mit Hilfe des iQ5 Real – time PCR System vermessen. Das Thermoprofil der TaqMan® Echtzeit RT – PCR war wie folgt:

Tabelle 5: Übersicht über den Ablauf der einzelnen Zyklen einer TaqMan® Echtzeit RT – PCR

Anzahl der Zyklen	Zyklusdauer	Temperatur
1	3 Minuten	95 °C
40	30 Sekunden	94 °C
	30 Sekunden	60 °C
	30 Sekunden	72 °C
1	1 Minute	95 °C

2.2.9.5 Auswertung der Echtzeit RT – PCR

Die Auswertung der PCR – Daten erfolgte nach der Methode der relativen Quantifizierung. Wie bereits beschrieben wird die relative Quantifizierung auf die Expression des Zielgens in Relation zu dem Haushaltsgen bezogen. Damit ergibt sich eine Berechnung des ΔC_T – Wertes wie folgt:

$$\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_T(\text{Zielgen}) - \text{Mittelwert } C_T(\text{Haushaltsgen})$$

Unter der Annahme einer 100 %ig ablaufenden PCR kann man davon ausgehen, dass sich die DNA-Menge proportional mit jedem Zyklus verdoppelt. Auf Grund dieser Annahme lässt sich die relative Expression der mRNA mit folgender Gleichung errechnen:

$$\text{Expression der mRNA} = 2^{-\Delta C_T}$$

2.2.10 Western – Blot

Die Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) – Gel – Elektrophorese und der anschließende Western – Blot dienen dem Nachweis bestimmter Zielproteine in einer heterogenen Proteinextraktion aus Gewebe oder Zellen. Zunächst werden die Proteine des Proteinextraktes mit Hilfe eines SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) im einem Gel mit definierter Porengröße aufgetrennt. Die Auftrennung der einzelnen Proteine erfolgt dabei ausschließlich auf Grund des Molekulargewichts der Proteine. Anschließend werden die aufgetrennten Polypeptide elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose – oder Nylonmembran übertragen und mittels indirektem Nachweis immunchemisch nachgewiesen.

2.2.10.1 Proteinisolation aus Zellen

Die primären Trophoblasten wurden durch Trypsinierung vom Boden der 24 – Lochzellkulturplatte gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 30 µl Lysispuffer bestehend aus 10 % Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol (NP – 40), 0,1 mg/ml LM, 500 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriummetavanadat, 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 M Tris – aminomethan (Tris), 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und 5 M Natriumchlorid für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Zentrifugation für 20 Minuten bei 12000 rpm und 4 °C setzten sich die Zellfragmente als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der Zellüberstand mit den gelösten Proteinen wurde vorsichtig abgenommen und bei –80 °C gelagert.

2.2.10.2 SDS – Gelelektrophorese

Die extrahierten Proteine werden mittels Erhitzung und dem Detergenz (SDS) entfaltet und erhalten gleichzeitig eine einheitliche, negative Ladung. Somit beruht die anschließende Auftrennung der Proteine in einem SDS – PAGE mit definierter Porengröße auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Das Polyacrylamidgel befindet sich zwischen zwei Glasplatten und besteht aus dem weitporigeren Sammelgel und dem engmaschigeren Trenngel. Zunächst wandern die negativ geladenen Polypeptide von der Anodenseite durch das Sammelgel Richtung Kathode. In dem weitporigen Sammelgel werden die Proteine zu schmalen, scharfen Banden aufkonzentriert. Nach dem Eintreten der Proteine in das engmaschigere Trenngel kommt es zur Auftrennung der Proteine auf Grund ihres Molekulargewichts.

Mit Hilfe des PerfectBlue™ Twin Doppelgel – Elektrophoresesystems von Peqlab wurde zwischen zwei Glasplatten ein 15 %iges und 0,8 Millimeter dickes Trenngel bestehend aus 29/1 Acril/bis, 1,5 M Tris (pH 8,8), 10 % SDS, 10 % Amoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethylenediamin (TEMED) gegossen. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde dieses mit einem 5 %igem Sammelgel überschichtet und mit Hilfe eines Kammes mit Probenaschen versehen. Während der Polymerisation des SDS – PAGE wurden 30 µg des Proteinextraktes mit einem fünffach Probenpuffer (15 % β – Mercaptoethanol, 6 % SDS, 60 % Glycerol, 0,006 % Bromphenolblau und 0,18 M Tris mit pH 6,8) und Wasser verdünnt. Die Denaturierung der Proteine durch das Detergenz SDS wurde mit einer Inkubation für 5 Minuten bei 96 °C unterstützt. Anschließend wurde das Probengemisch in die Taschen des Sammelgels gegeben und bei 80 V für ca. 30 Minuten langsam im Sammelgel aufkonzentriert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgt für 1,5 – 2 Stunden bei 100 V.

2.2.10.3. Western – Blot

Während des Western – Blots werden die im SDS – Polyacrylgel aufgetrennten Proteine in einer exakten Kopie auf einen geeigneten Träger, wie zum Beispiel Nitrocellulose oder Nylon, übertragen bzw. geblottet. Der Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgt elektrophoretisch. Die letztliche Bindung der Proteine an die Membran beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken.

Zu Beginn des Western – Blots musste die Nitrocellulosemembran aktiviert werden. Hierfür wurde die Membran für 30 Sekunden in Methanol und dann für 2 Minuten in Wasser inkubiert. Nachdem die Gelelektrophorese beendet war, wurde das SDS – PAGE vorsichtig von den Glasplatten getrennt und auf die 0,2 µm Nitrocellulosemembran gebracht. Beim Zusammenbau des Blotes wurde auf die exakte Reihenfolge von Schwämmen, Filterpapier, Nitrocellulosemembran und Polyacrylgel geachtet um den Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem Gel in die Membran zu gewährleisten (siehe Abb. 25). Darüber hinaus wurde auf einen luftblasenfreien Zusammenbau des Blottes geachtet, da sonst der Transfer der Proteine auf die Membran gestört werden könnte. Die Proteine wurden im Anschluss über Nacht bei 30 V und maximal 350 mA aus dem Gel auf die Membran transferiert.

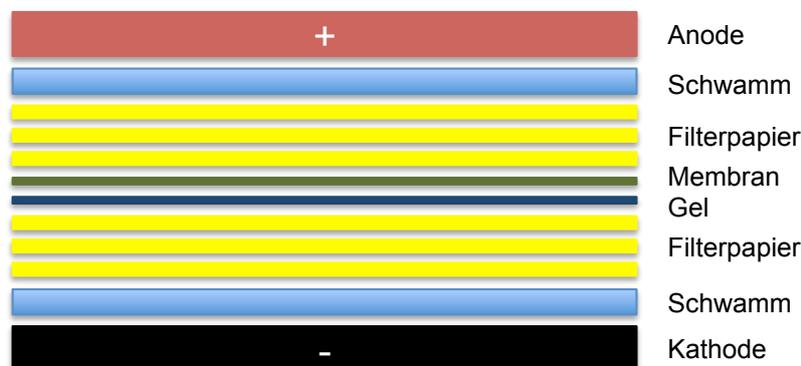


Abb. 25: Proteintransfer auf eine Nitrocellulose – Membran (Blot). Gezeigt wird die exakte Anordnung von Schwämmen, Filterpapieren, Nitrocellulosemembran und Polyacrylgel zwischen der Anode und Kathode der Blottingkammer. (Eigenes Schema)

2.2.10.4 Entwicklung und Auswertung der Western – Blot Membran

Da die Reaktivität der Proteine gegenüber Immunglobulin bei dem Transfer auf die Nitrocellulosemembran erhalten bleibt, können diese mittels eines indirekten Nachweises mit spezifischen AK nachgewiesen werden.

Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran wurden zunächst durch die Inkubation mit 5 % Milchpulver in Tris – gepufferte Salzlösung (TBS) für 1 Stunde blockiert. Ü.N. wurden die Membranen entweder mit einem aus Ratte gewonnen anti – Maus

IFN- γ AK (1 : 100) oder mit einem aus Ziege gewonnenen anti – Maus VEGF AK in 5 % Milch in TBS (1 : 100) bei 4 °C inkubiert. Überschüssige ungebundene AK wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen in 0,05 % Tween 20 in TBS für jeweils 5 Minuten entfernt. Anschließend wurden die Membranen für 2 Stunden mit einem Meerrettichperoxidase (HRP, horse radish peroxidase) gekoppelten Sekundär – AK (für IFN- γ : Ziege anti-Ratte IgG, 1 : 5000 in 5 % Milch in TBS; für VEGF: Esel anti-Ziege IgG, 1 : 5000 in 5 % BSA in TBS) bei RT inkubiert, dreimal für 5 Minuten mit 0,05 % Tween 20 in TBS gewaschen und mit Hilfe des Substrates Chemilumineszenz HRP Substrat entwickelt (siehe Abb. 26). Für die Detektion der GAPDH Banden wurden die Membranen zunächst für 10 Minuten bei RT gestrippt und für 2h mit einem aus Kaninchen gewonnenen anti – Maus GAPDH AK in 5 % Milch in TBS (1 : 10000) bei RT inkubiert. Die Membranen wurden dreimal mit 0,05 % Tween 20 in TBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und mit HRP gekoppelten anti – Kaninchen Sekundär – AK in 5 % Milch in TBS (1 : 1000) bei RT inkubiert. Die Entwicklung der Membran erfolgte ebenfalls mit dem Chemilumineszenz HRP Substrat.

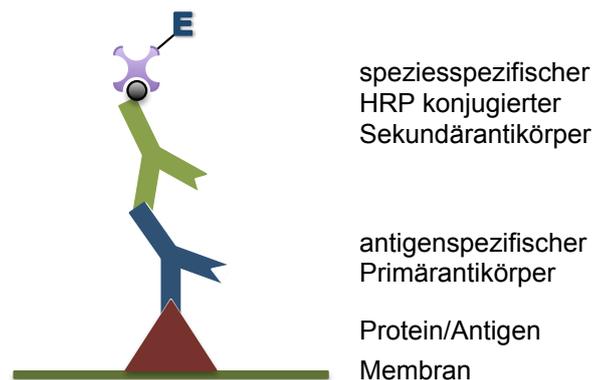


Abb. 26: Indirekte Nachweismethode von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran mittels Sekundär – AK. Der spezifische Primär – AK bindet das an die Nitrocellulosemembran gebundene Antigen. Der speziesspezifische HRP gekoppelte Sekundär – AK bindet an den Primär – AK und führt somit zu einer Verstärkung des Signals. Das Enzym HRP setzt das Chemilumineszenz HRP Substrat um und erzeugt somit ein detektierbares Signal. (Eigenes Schema)

2.2.11 Statistik

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2003 und GraphPad Prism 5 statistisch ausgewertet und dargestellt.

Für die Auswertung der Daten aus den Mausexperimenten wurde der nicht parametrische Mann – Whitney – U – Test herangezogen. Dieser Test dient dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben oder, wie in diesem Fall, zweier definierter Gruppierungen. Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ zwischen zwei Gruppen vor, galt dieser Unterschied als statistisch signifikant. Da innerhalb der Gruppierungen eine nicht normale Verteilung der einzelnen Proben vorlag, wurde als Lagemaß der Median gewählt. Der Median teilt eine sortierte Stichprobe genau in der Mitte, wobei die eine Hälfte der Werte kleiner und die andere Hälfte der Werte größer als der Median ist. Vorteil einer Verwendung des Median ist, dass dieser unempfindlich gegenüber Ausreißern ist und somit besser für eine unsymmetrische Verteilung, wie sie für Laborwerte typisch sind, geeignet ist (Lange *et al.* 2001).

Für die Bestimmung der Spiralarterienumwandlung wurden die Mittelwerte der Wanddicke und des Wand/Lumen Verhältnisses von 5 – 9 Spiralarterien in einer Implantation bestimmt. Die statistische Auswertung der Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppierungen wurde mit dem *unpaired t* – Test durchgeführt.

Die Migrations – und Konvertierungsassays mit menschlichen peripheren NK – Zellen aus Blut wurden in Duplicates ausgeführt und deren Mittelwert ermittelt. Die Assays wurden mindestens dreimal mit unterschiedlichen Patientenproben wiederholt, von denen wiederum der statistische Mittelwert dargestellt wurde. Bei den Proben innerhalb eines Assays handelt es sich um verbundene Proben, die mit Hilfe des *paired t* – Test statistisch ausgewertet wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Anzahl der uNK – Zellen ist an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen reduziert im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen

Kürzlich veröffentlichte Studien unserer Arbeitsgruppe heben die Wichtigkeit des Enzyms HO-1 für eine erfolgreiche Schwangerschaft hervor. So spielt das Enzym HO-1 unter anderem eine grundlegende Rolle bei der erfolgreichen Plazentaentwicklung und trägt auf diesem Weg zur Sicherstellung der Versorgung des Fötus bei (Zenclussen *et al.* 2011, El-Mousleh *et al.* 2012). Ein weiterer wichtiger Faktor für den erfolgreichen Ablauf einer Schwangerschaft ist die Anwesenheit der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer teilweisen oder vollständigen Abwesenheit des Enzyms HO-1 auf die Anzahl der uNK – Zellen untersucht. Für die Bestimmung der Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Mäusen wurden genotypisierte ganze *Hmox1^{+/+}* (n = 12), *Hmox1^{+/-}* (n = 12) und *Hmox1^{-/-}* (n = 2-5) Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft transversal geschnitten. Die geringe Probenzahl von *Hmox1^{-/-}* Implantationen am Tag 12 der Schwangerschaft beruht auf dem Absterben der *Hmox1^{-/-}* Föten im Verlauf der Schwangerschaft. Die Visualisierung der uNK – Zellen im MLAp und der *Decidua basalis* erfolgte mittels der spezifischen, histochemischen DBA – Lektin Färbung (Paffaro *et al.* 2003).

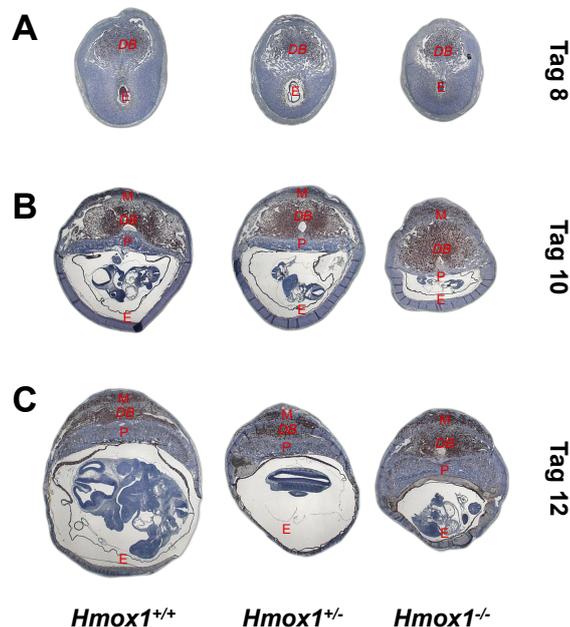


Abb. 27: Die DBA – Lektin Färbung von ganzen $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft lässt eine signifikante Reduktion der uNK – Zellen erkennen. Für die Bestimmung der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche wurden transversal geschnittene ganze $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft mit der für uNK – Zellen spezifischen DBA – Lektin Färbung angefärbt. Repräsentative mikroskopische Bilder von $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 8 (A), 10 (B) und 12 (C) der Schwangerschaft. M, MLAp; DB, Decidua basalis; P, Plazenta; E, Embryonalhöhle. Objektiv: 1X, Okular: 10X.

Bereits am Tag 8 der Schwangerschaft war die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen im Vergleich zu $Hmox1^{+/+}$ Implantationen signifikant reduziert (Abb. 27 A und 28 A). Eine signifikante Abnahme in der Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen konnte auch am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft beobachtet werden (Abb. 27 B,C und 28 B,C).

Die Analyse der DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen bestätigte die Hypothese, dass die HO-1 Expression einen Einfluss auf die Anzahl der uNK – Zellen im Verlauf der Schwangerschaft hat.

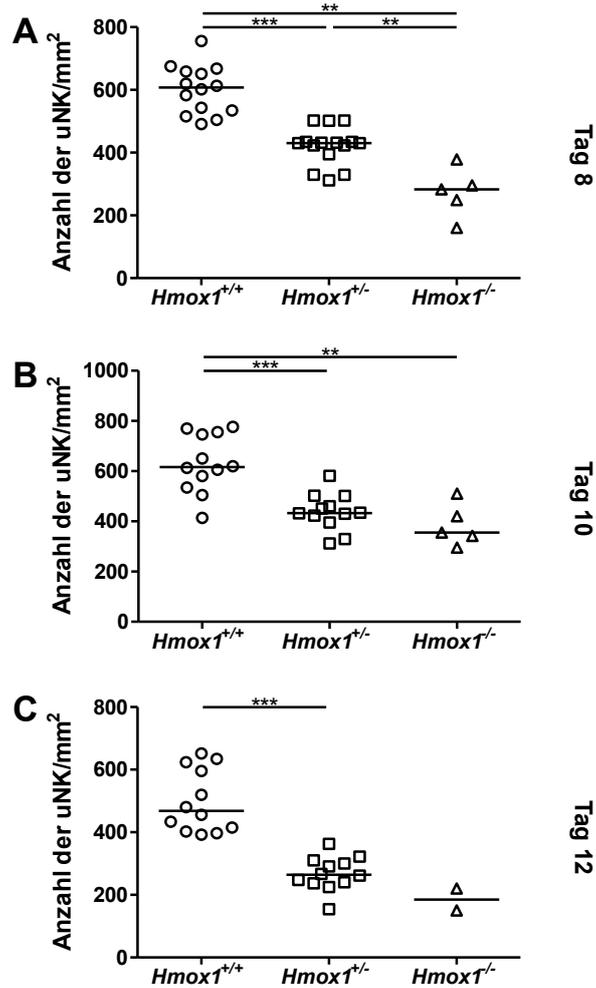


Abb. 28: Die Anzahl der uNK – Zellen in *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft signifikant reduziert. Die Anzahl der uNK – Zellen an der fetomaternalen Grenzfläche wurde mittels der uNK Zell spezifischen DBA - Lektin Färbung in ganzen *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen bestimmt. **(A)** Am Tag 8 der Schwangerschaft war die Anzahl der uNK – Zellen in *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen signifikant geringer im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen. **(B, C)** Am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft konnte weiterhin eine signifikante Reduktion der uNK – Zellen in *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen beobachtet werden. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des unpaired *t* – Tests. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 und ****P* < 0.001.

3.2 Die IL-15 mRNA Expression ist in HO-1 – defizienten Implantationen mit verringerter Anzahl an uNK – Zellen vermindert im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen

Für die Entstehung und das Überleben der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche spielt das Zytokin IL-15 eine zentrale Rolle. Die Abwesenheit von IL-15 in IL-15 – defizienten Mäusen führt zu einem vollständigen Verlust der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche (Greenwood *et al.* 2000). Daher wurde in diesem Versuchsteil untersucht, in wie weit die Anzahl an uNK – Zellen im MLAp und der *Decidua basalis* von HO-1 – defizienten Implantationen im Zusammenhang mit einer verminderten IL-15 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche steht. Die IL-15 mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/+}* (n = 5-6), *Hmox1^{+/-}* (n = 6) und *Hmox1^{-/-}* (n = 2-3) Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft wurde mit Hilfe der Echtzeit RT – PCR bestimmt. Beginnend am Tag 8 der Schwangerschaft konnte im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen im Vergleich zu *Hmox1^{+/+}* Implantationen eine signifikante Abnahme der IL-15 mRNA Expression gezeigt werden (Abb. 29 A). Diese Beobachtung konnte am Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp (Abb. 3B) und am Tag 12 der Schwangerschaft in der *Decidua basalis* (Abb. 3C) von *Hmox1^{+/-}* Implantationen im Vergleich zu *Hmox1^{+/+}* Implantationen bestätigt werden. In der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen am Tag 10 der Schwangerschaft (Abb. 29 B) und im MLAp von *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen am Tag 12 der Schwangerschaft (Abb. 29 C) war die IL-15 mRNA Expression im Vergleich zu den *Hmox1^{+/+}* Implantationen, obwohl nicht statistisch signifikant, leicht verringert.

An Hand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine verringerte HO-1 Expression mit einer verminderten IL-15 mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche assoziiert ist.

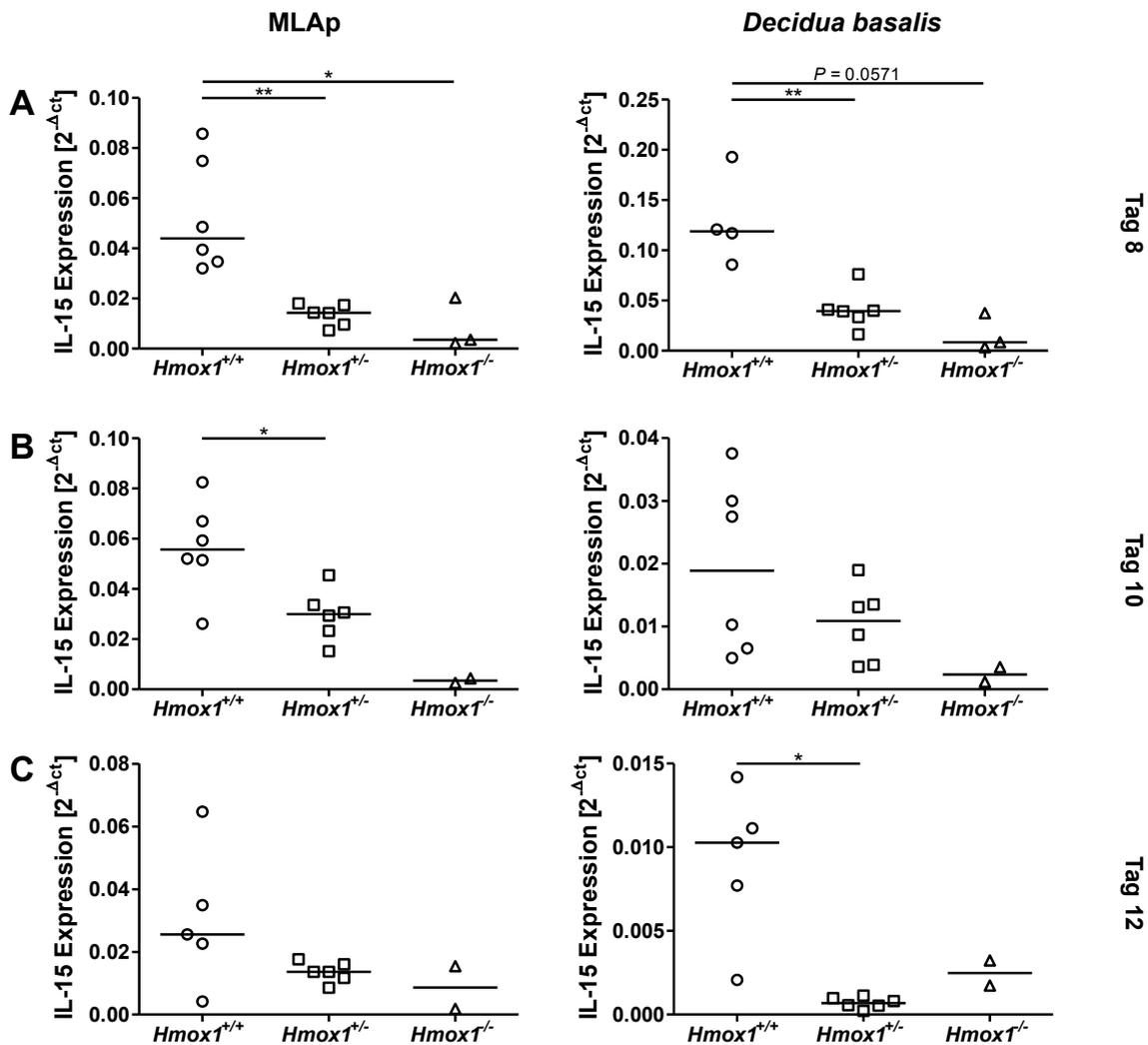


Abb. 29: An der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen die IL-15 mRNA Expression am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft verringert. Mittels Echtzeit RT – PCR wurde die IL-15 mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft bestimmt. **(A)** Am Tag 8 der Schwangerschaft war die IL-15 mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen signifikant erniedrigt. **(B)** Im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Implantationen am Tag 10 der Schwangerschaft war die IL-15 mRNA Expression im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen reduziert. **(C)** Am Tag 12 der Schwangerschaft war die IL-15 mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen und in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen verringert. In der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Implantationen war die IL-15 mRNA Expression signifikant reduziert im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. **P* < 0.05 und ***P* < 0.01.

3.3 Die Umwandlung der Spiralarterien ist in HO-1 – defizienten Implantationen negativ beeinträchtigt

Mehrere Studien konnten die Bedeutsamkeit der uNK – Zellen für die Umwandlung der Spiralarterien im Verlauf der Schwangerschaft belegen. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche zu einer Beeinträchtigung der Spiralarterienentwicklung führt (Croy *et al.* 2006). Die Umgestaltung der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/+}* (n = 12), *Hmox1^{+/-}* (n = 12) und *Hmox1^{-/-}* (n = 2-5) Implantationen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft konnte an Hand der Bestimmung der Wanddicke und des Verhältnisses des Wand/Lumen Durchmessers der Spiralarterien beurteilt werden. Eine Bestimmung der Spiralarterienentwicklung am Tag 8 der Schwangerschaft erfolgte nicht, da die Umwandlung der Spiralarterien zu diesem Zeitpunkt einsetzt (Charalambous *et al.* 2012). Im Verlauf der Schwangerschaft verändern sich die Spiralarterien in ihrer Beschaffenheit und Funktion und gewährleisten somit einen ausreichenden Blutfluss. Sie nehmen einen mehr venösen Charakter mit dünneren Arterienwänden und einem vergrößertem Lumen an. Somit zeugt eine Verdickung der Spiralarterienwand und ein erhöhtes Verhältnis des Wand/Lumen Durchmessers von einer beeinträchtigten Entwicklung der Spiralarterien. Sowohl die Wanddicke als auch das Verhältnis des Wand/Lumen Durchmessers waren am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft in der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen im Vergleich zu *Hmox1^{+/+}* Implantationen signifikant erhöht (Abb. 30 A und B). Repräsentative, mikroskopische Bilder der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/+}*, *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft lassen deutlich eine Unterentwicklung der Spiralarterien erkennen (Abb. 30 C und D).

Die Analyse der Spiralarterien bestätigte die ursprüngliche Annahme, dass in HO-1 – defizienten Implantationen auf Grund einer verringerten Anzahl an uNK – Zellen die Umwandlung der Spiralarterien beeinträchtigt ist.

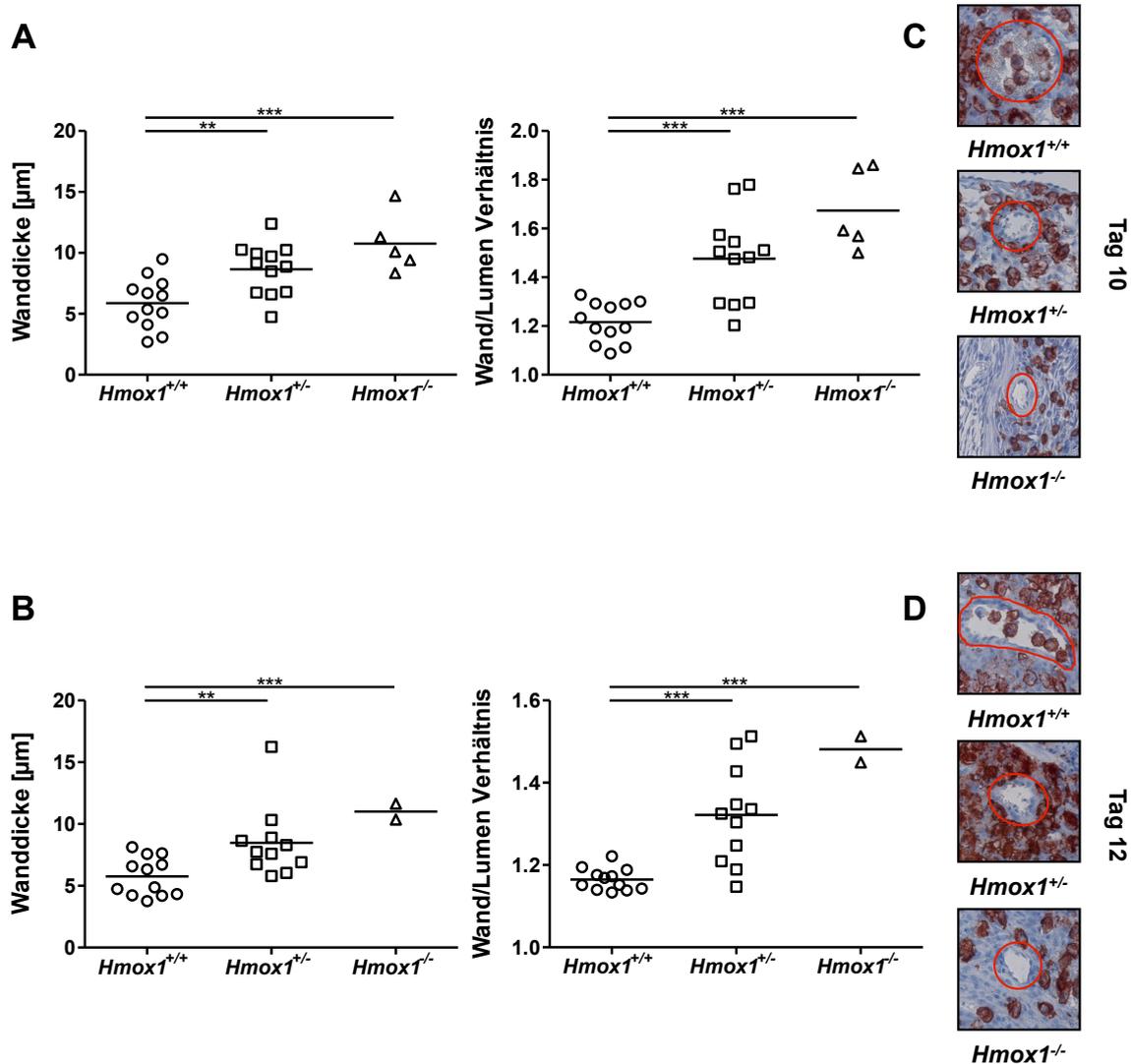


Abb. 30: Die Umwandlung der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen war im Vergleich zu $Hmox1^{+/+}$ Implantationen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft signifikant beeinträchtigt. In der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen wurde an Hand der Wanddicke und des Wand/Lumen Verhältnisses die Spiralarterienumwandlung am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft beurteilt. (**A**, **B**) In der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen war am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft die Wanddicke und das Wand/Lumen Verhältnis der Spiralarterien im Vergleich zu $Hmox1^{+/+}$ Implantationen signifikant erhöht. (**C**, **D**) Repräsentative Bilder von Spiralarterien in der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft. Objektiv: 20X, Okular: 10X. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des unpaired t – Tests. $**P < 0.01$ und $***P < 0.001$.

3.4 Die PGF Expression ist im MLAp und der Decidua basalis von HO-1 – defizienten Implantationen im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen erniedrigt

An der feto – maternalen Grenzfläche sind uNK – Zellen eine der leistungsfähigsten Zellpopulationen in der Produktion verschiedenster Angiogenesefaktoren, zu denen unter anderem PGF gehört, welches im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde (Tayade *et al.* 2007). Die PGF mRNA Expression wurde mittels Echtzeit RT – PCR im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/+} (n = 5-6), *Hmox1*^{+/-} (n = 12) und *Hmox1*^{-/-} (n = 2-3) Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft bestimmt. Am Tag 8 der Schwangerschaft konnte im Vergleich zu den *Hmox1*^{+/+} Implantationen im MLAp der *Hmox1*^{+/-} Implantationen eine signifikante Abnahme und im MLAp der *Hmox1*^{-/-} Implantationen eine verringerte PGF mRNA Expression festgestellt werden. Keine Unterschiede bezüglich der PGF mRNA Expression ließen sich in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen beobachten (Abb. 31 A). Die PGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 10 und 12 Schwangerschaft war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantation erniedrigt (Abb. 31 B und C).

Mit diesen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass die verringerte Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen mit einer verminderten mRNA Expression des Angiogenesefaktors PGF einhergeht.

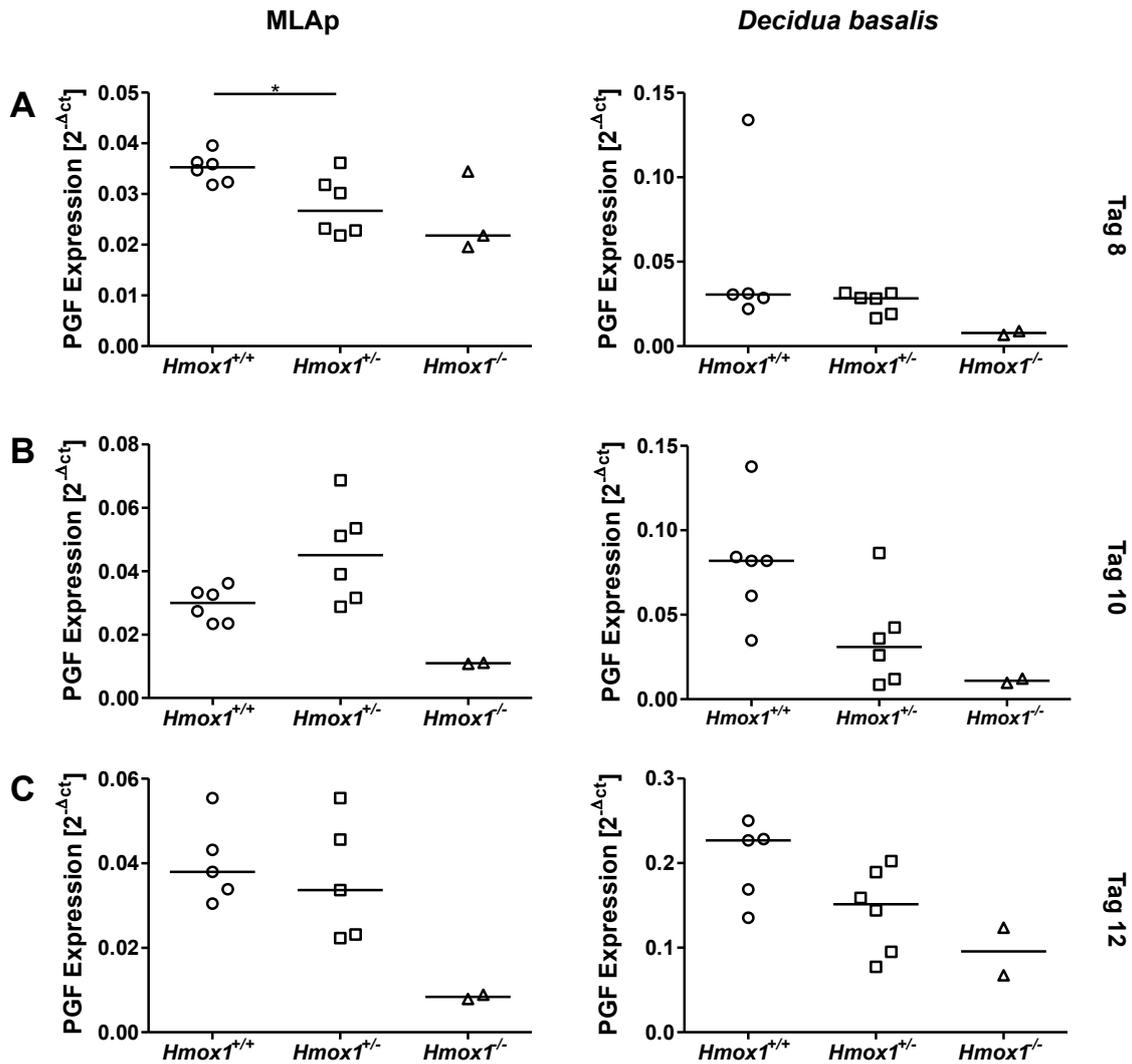


Abb. 31: An der fetomaternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen die PGF mRNA Expression am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft geringer. Mit Hilfe der Echtzeit RT-PCR wurde die PGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft bestimmt. (A) Am Tag 8 der Schwangerschaft war die PGF mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen signifikant erniedrigt. In der *Decidua basalis* hingegen konnten keine Unterschiede beobachtet werden. (B) Die PGF mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} Implantationen am Tag 10 der Schwangerschaft war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen erhöht und in *Hmox1*^{-/-} Implantationen reduziert. In der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantation war die PGF mRNA Expression im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen verringert. (C) Am Tag 12 der Schwangerschaft war die PGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantation im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen reduziert. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests. **P* < 0.05.

3.5 Die VEGF Expression ist im MLAp und der Decidua basalis von HO-1 – defizienten Implantationen im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen erniedrigt

Ein weiterer wichtiger Angiogenesefaktor, der von uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche produziert wird, ist VEGF (Wang *et al.* 2000). Mit Hilfe der Echtzeit RT – PCR wurde die VEGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/+} (n = 5-6), *Hmox1*^{+/-} (n = 12) und *Hmox1*^{-/-} (n = 2-3) Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft analysiert. Die VEGF mRNA Expression war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen am Tag 8 der Schwangerschaft im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen signifikant vermindert und in der *Decidua basalis* reduziert (Abb. 32 A). Im Gegensatz dazu konnten am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen keine Unterschiede in der VEGF mRNA Expression erfasst werden. Übereinstimmend mit den Analysen am Tag 8 der Schwangerschaft war in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft die VEGF mRNA Expression im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen vermindert (Abb. 32 B und C).

Die Ergebnisse der VEGF mRNA Expressionsbestimmung belegen, dass die verringerte Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen in einer beeinträchtigten VEGF mRNA Expression resultiert.

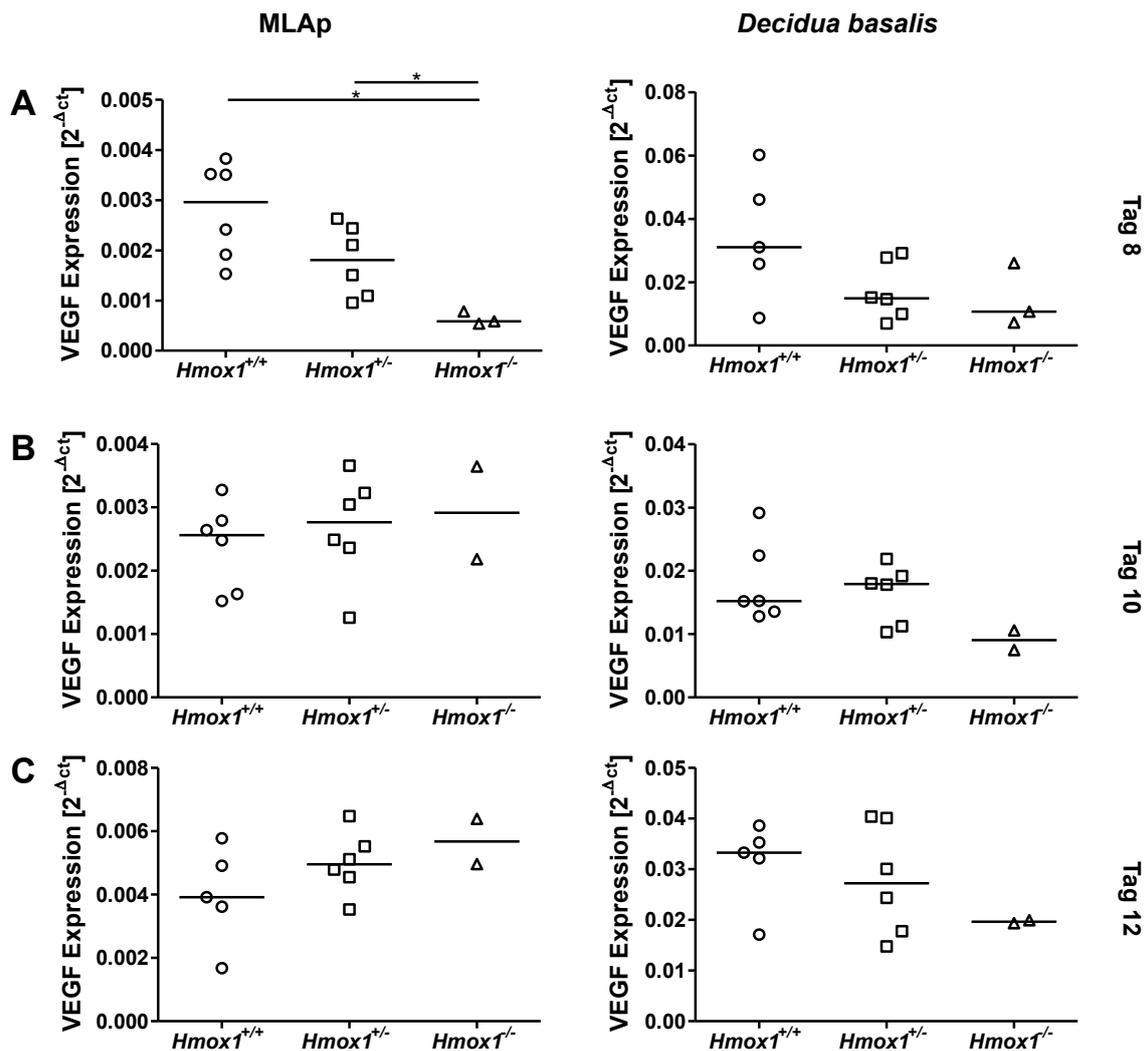


Abb. 32: Die VEGF mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft vermindert. Mittels Echtzeit RT – PCR wurde die VEGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft bestimmt. (A) Am Tag 8 der Schwangerschaft war die VEGF mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen signifikant und in der *Decidua basalis* leicht erniedrigt. (B) Im MLAp von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 10 der Schwangerschaft konnten keine Unterschiede in der VEGF mRNA Expression festgestellt werden. Die VEGF mRNA Expression in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Implantationen war im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen unverändert und in *Hmox1*^{-/-} Implantationen reduziert. (C) Am Tag 12 der Schwangerschaft war die VEGF mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen vergleichbar und in der *Decidua basalis* im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen reduziert. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. **P* < 0.05.

3.6 Die IFN- γ Expression ist an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen am Tag 12 der Schwangerschaft tendenziell erniedrigt im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Implantationen

Einer der bedeutendsten Mediatoren, durch den die uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche ihre Funktion vermitteln, ist das inflammatorische Zytokin IFN- γ . IFN- γ – defiziente Mäuse zeigen gleichermaßen wie Mäuse ohne uNK – Zellen eine Beeinträchtigung in der Spiralarterienentwicklung (Ashkar *et al.* 2000). Die IFN- γ mRNA Expression wurde unter Verwendung der Echtzeit RT – PCR im MLAp von *Hmox1*^{+/+} (n = 5-6), *Hmox1*^{+/-} (n = 12) und *Hmox1*^{-/-} (n = 2-3) Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft untersucht. An den Tagen 8 und 10 der Schwangerschaft konnten keine Unterschiede in der IFN- γ mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen festgestellt werden (Abb. 33 A und B). Im Gegensatz dazu war die IFN- γ mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 12 der Schwangerschaft im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen verringert (Abb. 33 C).

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die geringere Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Implantationen eine Abnahme in der IFN- γ Expression am Tag 12 der Schwangerschaft bewirkt.

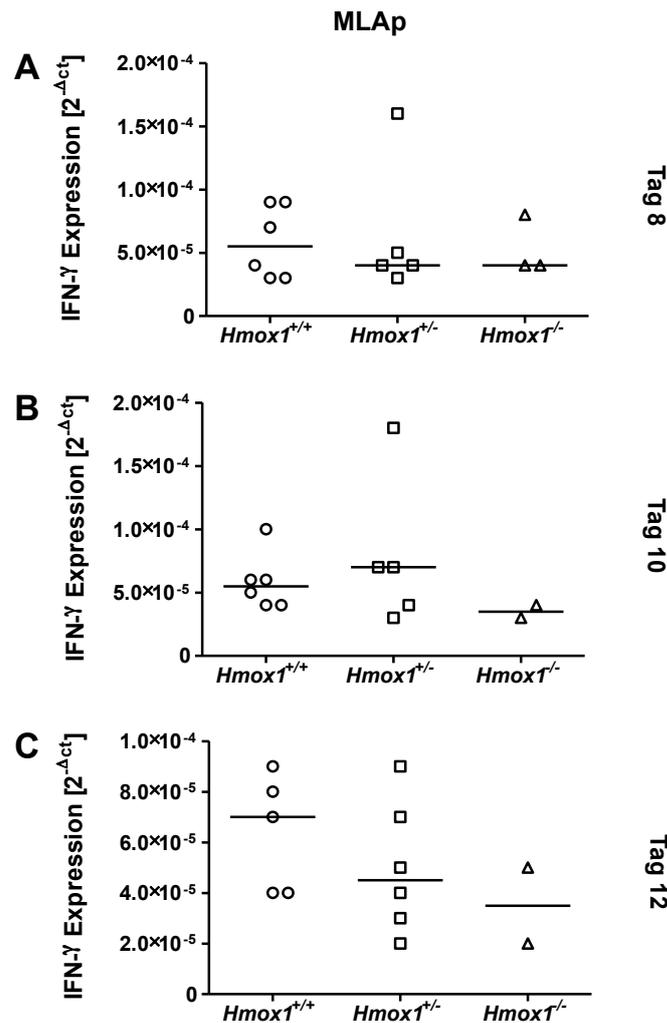


Abb. 33: Am Tag 12 der Schwangerschaft war die IFN- γ mRNA Expression in $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen im Vergleich zu $Hmox1^{+/+}$ Implantationen geringer. Mit Hilfe der Echtzeit RT-PCR wurde die IFN- γ mRNA Expression im MLAp von $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft bestimmt. **(A)** Am Tag 8 und **(B)** 10 der Schwangerschaft wurde im MLAp von $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen keine Unterschiede in der IFN- γ mRNA Expression im Vergleich zu $Hmox1^{+/+}$ Implantationen festgestellt. **(C)** Die IFN- γ mRNA Expression im MLAp von $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 12 der Schwangerschaft war im Vergleich zu $Hmox1^{+/+}$ Implantationen reduziert. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney U – Tests.

3.7 Die Feten in HO-1 – defizienten Implantationen weisen im Vergleich zu HO-1 – kompetenten Feten eine intrauterine Wachstumsretardierung auf

Nachdem wir in den HO-1 – defizienten Mäusen eine Verminderte Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche mit einer Beeinträchtigung der

Spiralarterienentwicklung assoziieren konnten, wurde zum Nachweis einer Wachstumsretardierung die Größe der *Hmox1^{+/+}*, *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen bestimmt. Hierfür wurden transversal geschnittene ganze *Hmox1^{+/+}* (n = 12), *Hmox1^{+/-}* (n = 12) und *Hmox1^{-/-}* (n = 2-5) Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft mit Hämatoxylin – Eosin angefärbt. Anschließend wurde mit Hilfe einer digitalen Bildanalyse in mikroskopischen Aufnahmen die Größe der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle bestimmt. Bereits am Tag 8 der Schwangerschaft konnte eine signifikante Reduktion in der Größe der ganzen Implantation und der *Decidua basalis* von *Hmox1^{-/-}* Implantationen im Vergleich zu *Hmox1^{+/+}* und *Hmox1^{+/-}* Implantationen festgestellt werden. Die Größe der ganzen Implantation und der *Decidua basalis* von *Hmox1^{+/-}* Implantationen war hingegen mit der Größe der *Hmox1^{+/+}* Implantationen vergleichbar (Abb. 34 A und Tabelle 6).

Tabelle 6: *Hmox1^{-/-}* Implantationen weisen im Vergleich zu *Hmox1^{+/+}* und *Hmox1^{+/-}* Implantationen am Tag 8 der Schwangerschaft ein verringertes Wachstum auf. In transversal geschnittenen, Hämatoxylin – Eosin gefärbten ganzen *Hmox1^{+/+}*, *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen am Tag 8 der Schwangerschaft wurde die Größe der ganzen Implantation und der *Decidua basalis* bestimmt. Die Größe der ganzen Implantation und der *Decidua basalis* von *Hmox1^{-/-}* Implantationen war im Vergleich zu *Hmox1^{+/+}* und *Hmox1^{+/-}* Implantationen signifikant kleiner. Die Daten sind in mm² angegeben und als Mediane dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney U – Tests. * signifikant zu *Hmox1^{+/+}* und [¶] signifikant zu *Hmox1^{+/-}*, *P < 0.05, **P < 0.01.

Genotyp	Tag 8		
	<i>Hmox1^{+/+}</i> (n = 12)	<i>Hmox1^{+/-}</i> (n = 12)	<i>Hmox1^{-/-}</i> (n = 5)
Ganze Implantation	15,37	14,87	11,12 ^{**¶¶}
<i>Decidua basalis</i>	4,66	4,66	3,49 ^{*¶¶}

Am Tag 10 der Schwangerschaft waren die ganze Implantation, das MLAp, die Plazenta und die Embryonalhöhle von *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Implantationen im Vergleich zu den *Hmox1^{+/+}* Implantationen signifikant kleiner. Im Gegensatz zu Tag 8 der Schwangerschaft konnte am Tag 10 der Schwangerschaft keine Unterschiede in der Größe der *Decidua basalis* zwischen den Implantationen festgestellt werden (Abb. 34 B und Tabelle 7).

Tabelle 7: *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen weisen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen ein eingeschränktes Wachstum auf. In transversal geschnittenen, Hämatoxylin – Eosin gefärbten ganzen *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft wurde die Größe der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle bestimmt. Am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft ist die ganze Implantation, das MLAp, die *Decidua basalis*, die Plazenta und die Embryonalhöhle der *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen signifikant kleiner. Die Daten sind in mm² angegeben und als Mediane dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. * signifikant zu *Hmox1*^{+/+} und ¶ signifikant zu *Hmox1*^{+/-}, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 und ****P* < 0.001.

Genotyp	Tag 10			Tag 12		
	<i>Hmox1</i> ^{+/+} (n = 12)	<i>Hmox1</i> ^{+/-} (n = 12)	<i>Hmox1</i> ^{-/-} (n = 5)	<i>Hmox1</i> ^{+/+} (n = 12)	<i>Hmox1</i> ^{+/-} (n = 12)	<i>Hmox1</i> ^{-/-} (n = 2)
Ganze Implantation	25,2	18,7**	12,9**,¶¶	38,20	29,40***	22,60
MLAp	1,93	1,52**	0,97**	1,85	1,50**	0,95
<i>Decidua basalis</i>	6,35	4,44*	4,31**	3,81	3,27	2,80
Plazenta	2,50	1,80**	0,80**,¶¶	5,20	4,40**	3,50
Embryonalhöhle	8,40	5,70***	2,10**,¶¶	21,90	15,50***	10,30

Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft waren am Tag 12 der Schwangerschaft die ganze Implantationen, das MLAp, die Plazenta und die Embryonalhöhle von *Hmox1*^{+/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen signifikant und von *Hmox1*^{-/-} Implantationen kleiner. Trotz des sehr deutlich ausgeprägten Größenunterschiedes von *Hmox1*^{-/-} Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Implantationen konnte auf Grund der geringen Probenanzahl keine Signifikanz erreicht werden (Abb. 34 C und Tabelle 7).

An Hand dieser Ergebnisse konnte die verringerte Anzahl an uNK – Zellen und die beeinträchtigte Spiralarterienentwicklung an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen mit einer Wachstumsretardierung in Verbindung gebracht werden.

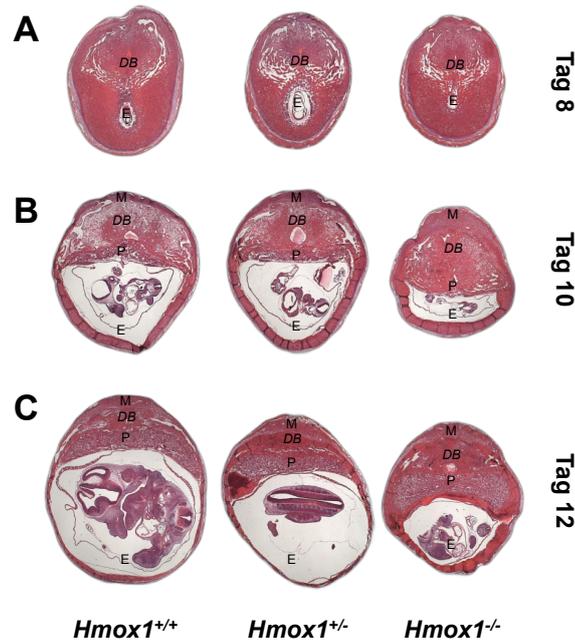


Abb. 34: Hämatoxylin – Eosin Färbung von ganzen $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft (X10). Für die Größenbestimmung der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle wurden transversal geschnittene ganze $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen am Tag 8, 10 und 12 der Schwangerschaft mit einer Hämatoxylin – Eosin Färbung histologisch angefärbt. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der ganzen Hämatoxylin – Eosin gefärbten $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Implantationen vom Tag 8 (A), 10 (B) und 12 (C) der Schwangerschaft. M, MLAp; DB, *Decidua basalis*; P, Plazenta; E, Embryonalhöhle. Objektiv: 1X, Okular: 10X.

3.8 Die Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid von Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft führt zu keiner Veränderung in der Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche

In zwei unabhängigen Tiermodellen, die beide durch eine intrauterine Wachstumsretardierung charakterisiert sind, konnte unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe der *in vivo* Behandlung mit dem HO-1 Metaboliten Kohlenmonoxid eine Verbesserung des Schwangerschaftsverlaufes bewirken (Zenclussen *et al.* 2011, El-Mousleh *et al.* 2012). Infolgedessen wurde der Einfluss der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid auf die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Weibchen untersucht. Nach der Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 4) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 5) vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde am Tag 10 der Schwangerschaft die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von allogenen verpaarten $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mittels der spezifischen DBA – Lektin Färbung

ermittelt. Die Analyse der Anzahl der uNK – Zellen am Tag 10 der Schwangerschaft ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen (Abb. 35 A und B).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid von Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft nicht ausreichend ist, um die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche zu beeinflussen. Des Weiteren konnte kein positiver Effekt auf das Wachstum der Feten festgestellt werden (Abb. 18).

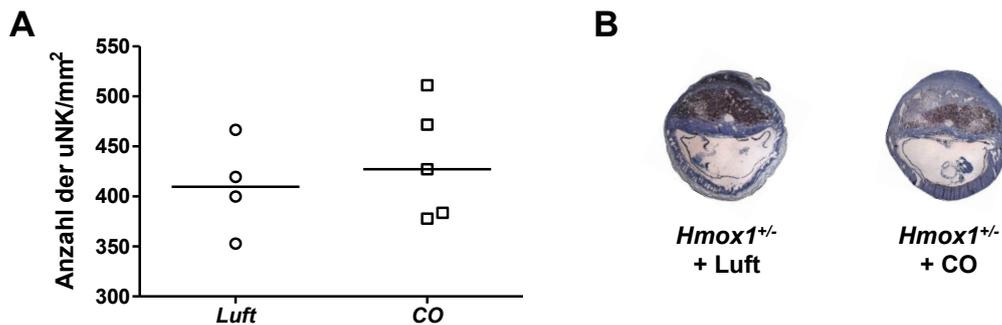


Abb. 35: Die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1^{+/-}* Weibchen war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 unverändert. Nach der *in vivo* Behandlung von *Hmox1^{+/-}* Weibchen vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid wurde in transversal geschnittenen ganzen Implantationen die Anzahl der uNK – Zellen mittels einer DBA – Lektin Färbung bestimmt. **(A)** An der feto – maternalen Grenzfläche war die Anzahl der DBA⁺ uNK – Zellen in beiden Behandlungsgruppen unverändert. **(B)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der ganzen Implantationen von *Hmox1^{+/-}* Weibchen nach der Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft. Objektiv: 1X, Okular: 10X. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des unpaired *t* – Tests.

3.9 Die Behandlung von *Hmox1^{+/-}* Weibchen mit Kohlenmonoxid von Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft führt zu einer Erhöhung an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche

Die *in vivo* Behandlung mit dem HO-1 Metaboliten Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche. Aus diesem Grund wurde in einem weiterführenden Experiment die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid zu einem früheren Zeitpunkt der Schwangerschaft, am Tag 3, untersucht. Die Anzahl der DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen wurde in den ganzen Implantationen von allogenen verpaarten *Hmox1^{+/-}* Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 5) oder 50

ppm Kohlenmonoxid (n = 5) vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft bestimmt. Weiterhin wurde der prozentuale Anteil der beiden uNK – Zellpopulationen, CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁺ und CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁻CD49b⁺, im MLAp und der *Decidua basalis* der mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Durchflusszytometer analysiert. Nach der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid war sowohl die Anzahl der DBA – Lektin⁺ uNK - Zellen in den ganzen Implantationen als auch der prozentuale Anteil an CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁺ uNK – Zellen im MLAp und der *Decidua basalis* im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 36 A, B und C). Der prozentuale Anteil an CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁻CD49b⁺ uNK – Zellen war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid unverändert (Abb. 36 D). Hiermit konnte belegt werden, dass die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 Schwangerschaft, aber nicht vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft, eine positive Auswirkung auf die Anzahl der DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche hat.

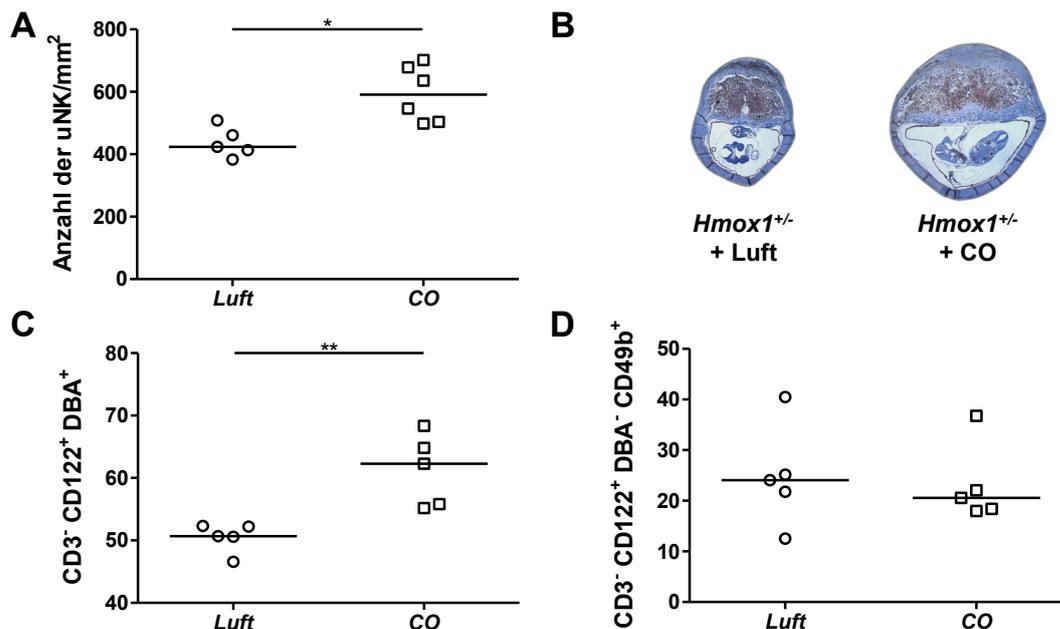


Abb. 36: Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft führte zu einem Anstieg an CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁺ Zellen am Tag 10 der Schwangerschaft. Das MLAp und die *Decidua basalis* von *in vivo* mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft wurden mit Hilfe der DBA – Lektin Färbung in ganzen Implantationen und der Durchflusszytometrie auf den prozentualen Anteil an CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁺ und CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁻CD49b⁺ Zellen hin untersucht. (A) Die Anzahl der DBA⁺ uNK Zellen war an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. (B) Repräsentative

mikroskopische Aufnahmen der ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft. Objektiv: 1X, Okular: 10X. (C) Der prozentuale Anteil an CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁺ Zellen war an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. (D) Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid hatte keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil an CD3⁺CD122⁺DBA-Lektin⁺CD49b⁺ Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

3.10 Die Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid hat keinen Einfluss auf die IL-15 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche

Entsprechend unserer Beobachtungen konnte die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft die Anzahl der uNK – Zellen erhöhen. Daher wurde in diesem Versuchsabschnitt überprüft, ob dem Anstieg der uNK – Zellanzahl eine Erhöhung des Zytokines IL-15 an der feto – maternalen Grenzfläche zu Grunde liegt. Die IL-15 mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von allogenen verpaarten *Hmox1*^{+/-} Weibchen wurde am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 4-5) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 5-6) vom Tag 3 oder 5 bis 8 Tag der Schwangerschaft mit einer Echtzeit RT – PCR gemessen. Hierbei hatte weder die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid beginnend am Tag 5 noch am Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft einen Einfluss auf die IL-15 mRNA Expression im MLAp oder der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen verglichen mit den Kontrollluftgemisch behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen (Abb. 37 A und B).

Es ist davon auszugehen, dass der Anstieg der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid unabhängig von IL-15 stattfindet.

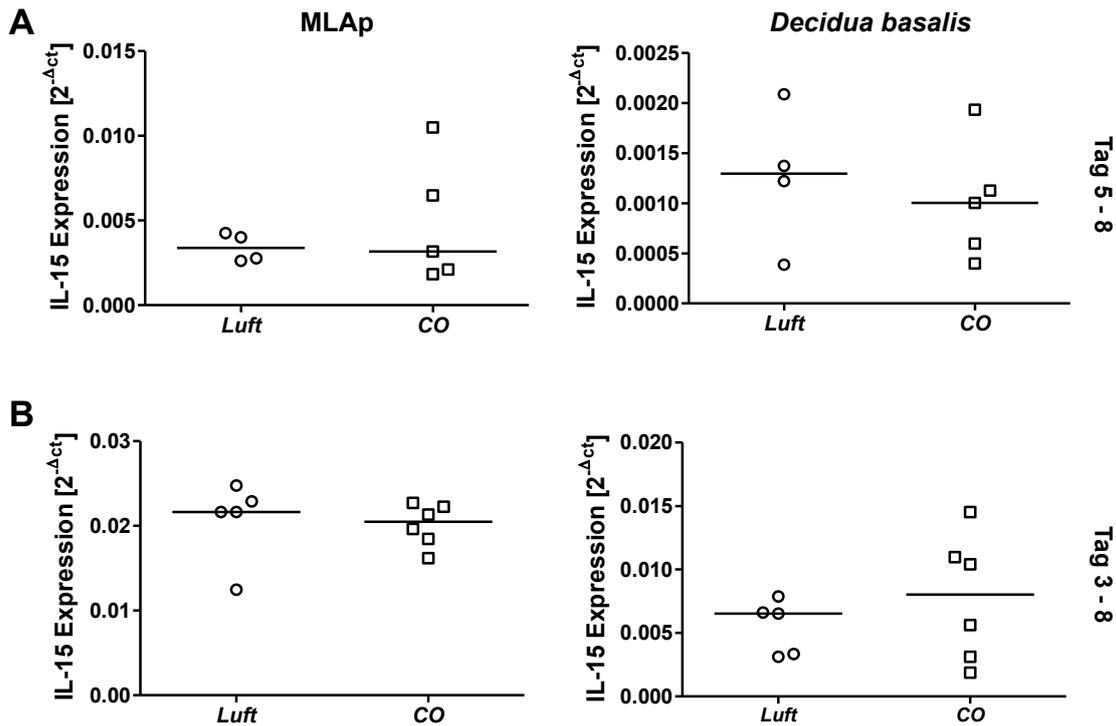


Abb. 37: Am Tag 10 der Schwangerschaft war die IL-15 mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen, die vom Tag 3 oder Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid *in vivo* behandelt wurden, unverändert. Die IL-15 mRNA Expression wurde mittels Echtzeit RT – PCR Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am, die *in vivo* mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 oder Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft behandelt wurden, bestimmt. (A) und (B) Weder die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft noch die Behandlung vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft hatte einen Einfluss auf die IL-15 mRNA Expression im MLAp oder der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests.

3.11 Die Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche

Die IL-15 mRNA Expression war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen unverändert. Da somit davon auszugehen ist, dass der Anstieg der uNK – Zellen unabhängig von IL-15 stattfindet, wurde der Effekt der Kohlenmonoxid Behandlung auf die Proliferation der Zellen untersucht. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden am Tag 10 der Schwangerschaft nach der Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 5) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 5) vom Tag 3 bis Tag

8 der Schwangerschaft in transversal geschnittenen ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen die DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt. Die Anzahl der DBA – Lektin⁺Ki-67⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen war im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 38 A). Dieser signifikante Unterschied in der Anzahl an DBA – Lektin⁺Ki-67⁺ uNK – Zellen wurde in repräsentativen Bildern der feto – maternalen Grenzfläche exemplarisch dargestellt (Abb. 38 B).

Die Behandlung der *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid, beginnend am Tag 3 der Schwangerschaft, führte zu einem signifikanten Anstieg in der Proliferation der DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche.

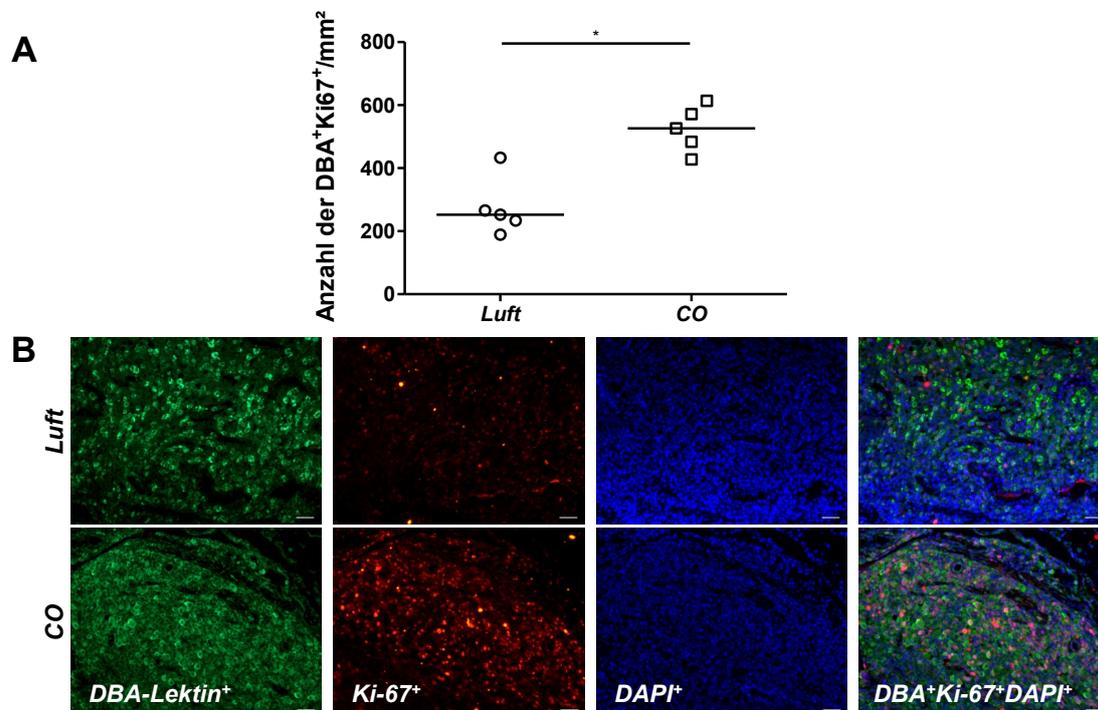


Abb. 38: Die Proliferation der DBA-Lektin⁺ uNK Zellen war in *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid signifikant erhöht. Die DBA – Lektin⁺ uNK – Zellen wurden in ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mittels Immunfluoreszenz mit dem Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt. **(A)** An der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen war die Anzahl der DBA – Lektin⁺Ki67⁺ uNK – Zellen nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. **(B)** Repräsentative Bilder von DBA – Lektin⁺Ki67⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid. Objektiv: 10X, Okular: 10X. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. **P* < 0.05.

3.12 Die Umwandlung der Spiralarterien bleibt nach der Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft eingeschränkt

Als nächstes wurde der Effekt der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft auf die Umwandlung der Spiralarterien in der *Decidua basalis* untersucht. Anhand der Wanddicke und des Verhältnisses des Durchmessers von Wand und Lumen wurde die Umwandlung der Spiralarterien am Tag 10 der Schwangerschaft in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 4) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 5) vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft bewertet. Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid zu diesem Zeitpunkt hatte keinen Effekt auf die Wanddicke und das Wand/Lumen Verhältnis der Spiralarterien (Abb. 39 A und B).

Der späte Beginn der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 5 der Schwangerschaft bewirkte keine Verbesserungen in der Spiralarterienumwandlung.

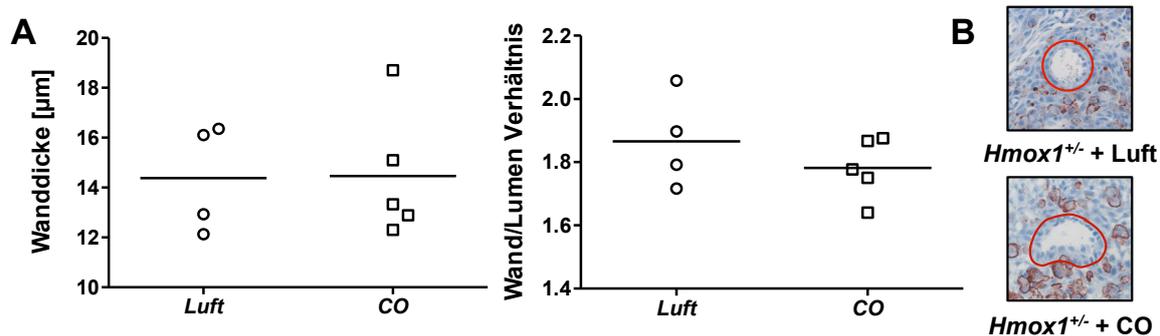


Abb. 39: Die Umwandlung der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft, die vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid *in vivo* behandelt wurden, war weiterhin beeinträchtigt. In der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen, nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft, wurde an Hand der Wanddicke und des Wand/Lumen Verhältnisses die Spiralarterienumwandlung am Tag 10 der Schwangerschaft bestimmt. **(A)** In der *Decidua basalis* von mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen war die Wanddicke und das Wand/Lumen Verhältnis der Spiralarterien vergleichbar mit den Spiralarterien der Kontrollgruppe. **(B)** Repräsentative Bilder von Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid. Objektiv: 20X, Okular: 10X. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des unpaired *t* – Tests.

3.13 Die frühere Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft führt zu einer Verbesserung der Spiralarterienumwandlung

Nachdem die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft keinen Einfluss auf die Umwandlung der Spiralarterien hatte, wurde der Effekt eines früheren Behandlungsbeginns vom Tag 3 der Schwangerschaft auf die Spiralarterienumwandlung studiert. Die Modifikation der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 5) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 6) vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde durch die Bestimmung der Wanddicke und des Wand/Lumen Verhältnisses am Tag 10 der Schwangerschaft überprüft. In den mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen war im Vergleich zu der Kontrollgruppe die Wanddicke geringfügig und das Wand/Lumen Verhältnis signifikant vermindert (Abb. 40 A und B).

Diese Ergebnisse belegen die Notwendigkeit einer frühen *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid für einen positiven Effekt auf die Spiralarterienumwandlung.

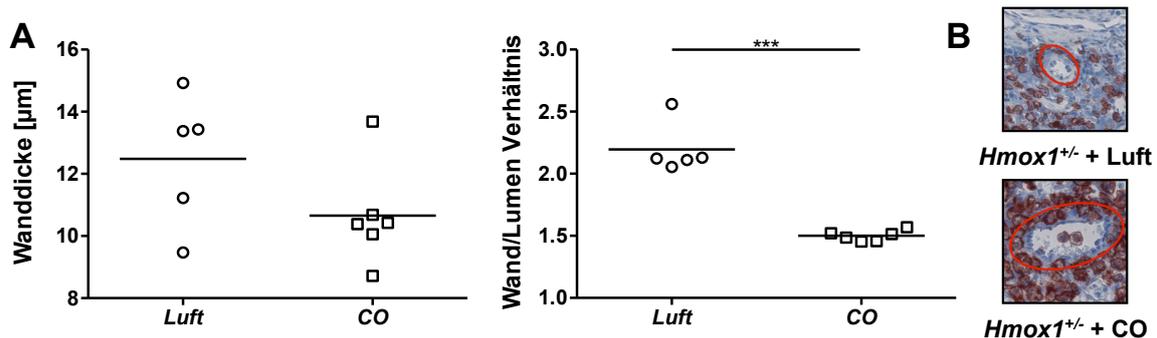


Abb. 40: Die *in vivo* Behandlung vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid führte zu einer verbesserten Umwandlung der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft. Nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen an Hand der Wanddicke und des Wand/Lumen Verhältnis die Spiralarterienentwicklung am Tag 10 der Schwangerschaft bestimmt. **(A)** Das Wand/Lumen Verhältnis der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid war im Vergleich zu den Spiralarterien der Kontrollgruppe signifikant herabgesetzt. **(B)** Repräsentative Aufnahmen der Spiralarterien in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid. Objektiv: 20X, Okular: 10X. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe des unpaired *t* – Tests. ****P* < 0.001.

3.14 Die PGF und VEGF mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen ist nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft unverändert

Die Analyse der HO-1 – defizienten Mäuse belegte eine verminderte mRNA Expression der Angiogenesefaktoren PGF und VEGF an der feto – maternalen Grenzfläche. Infolgedessen wurde untersucht, ob die *in vivo* Behandlung mit dem HO-1 Metaboliten Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft eine Auswirkung auf die PGF und VEGF mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche hat. Unter Zuhilfenahme der Echtzeit RT – PCR wurde am Tag 10 der Schwangerschaft die PGF und VEGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 4) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 5) vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft untersucht. Nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid war im MLAp der *Hmox1*^{+/-} Weibchen sowohl die PGF als auch die VEGF mRNA Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe leicht erhöht (Abb. 41 A und B). In der *Decidua basalis* der mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe keine Unterschiede in der PGF und VEGF mRNA Expression detektiert werden (Abb. 41 A und B).

Die relativ spät einsetzende Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid am Tag 5 der Schwangerschaft hat eine unzureichende Auswirkung auf die mRNA Expression der Angiogenesefaktoren PGF und VEGF an der feto – maternalen Grenzfläche.

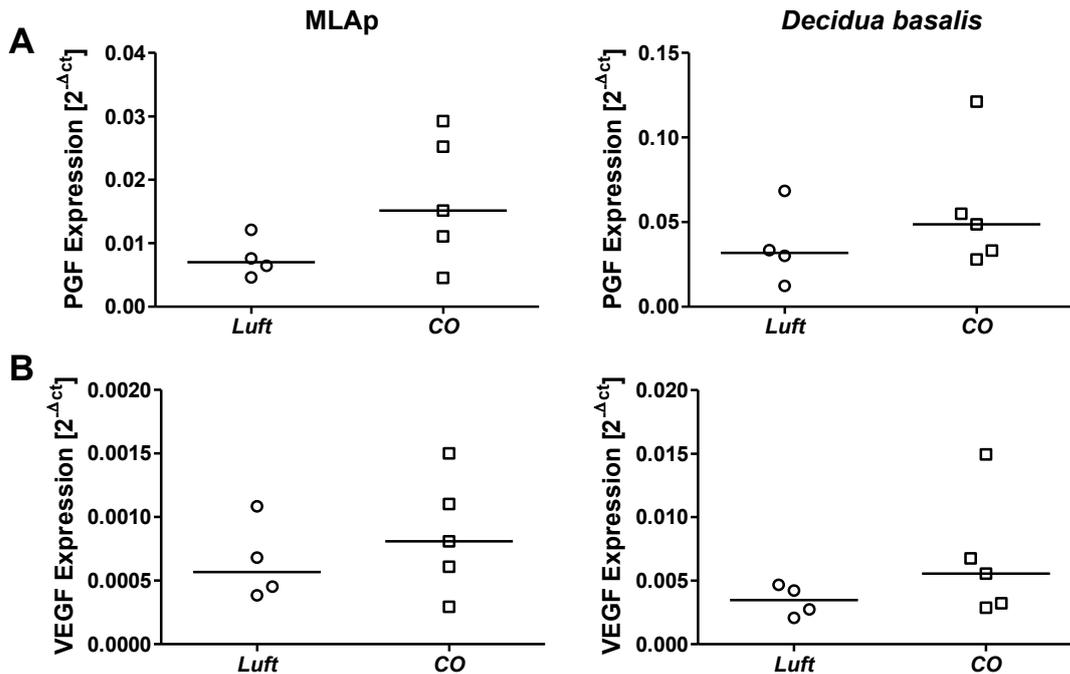


Abb. 41: Die PGF und VEGF mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft unverändert. Mittels der Echtzeit RT – PCR wurde die PGF und VEGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft, nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft, bestimmt. **(A)** Nach der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid war die PGF mRNA Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe im MLAp leicht erhöht und in der *Decidua basalis* vergleichbar. **(B)** Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid führte im Vergleich zu der Kontrollgruppe im MLAp zu einer Erhöhung VEGF mRNA Expression und hatte in der *Decidua basalis* keinen Einfluss. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests.

3.15 Die PGF mRNA, VEGF mRNA und Proteinexpression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen ist nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft erhöht im Vergleich zu mit einem Kontrollluftgemisch behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen

Weiterführend wurde der Effekt der frühen *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid beginnend am Tag 3 der Schwangerschaft auf die PGF und VEGF mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche untersucht. Am Tag 10 der Schwangerschaften wurde die PGF und VEGF mRNA Expression im MLAp und in der *Decidua basalis* von *Hmox1*^{+/-}

Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 5) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 6) vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Hilfe der Echtzeit RT – PCR bestimmt. Die VEGF Proteinkonzentration in der *Decidua basalis* wurde unter Zuhilfenahme des Western Blots analysiert. Die PGF mRNA Expression war im MLAp von mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht und in der *Decidua basalis* erhöht (Abb. 42 A). Des Weiteren war die VEGF mRNA Expression im MLAp und der *Decidua basalis* der mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe stark erhöht (Abb. 42 B). Die VEGF Proteinkonzentration in der *Decidua basalis* war in den mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 42 C). Die frühe *in vivo* Behandlung der *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid beginnend am Tag 3 der Schwangerschaft ist erforderlich um einen signifikanten Anstieg in der PGF und VEGF mRNA und Proteinexpression an der feto – maternalen Grenzfläche zu bewirken.

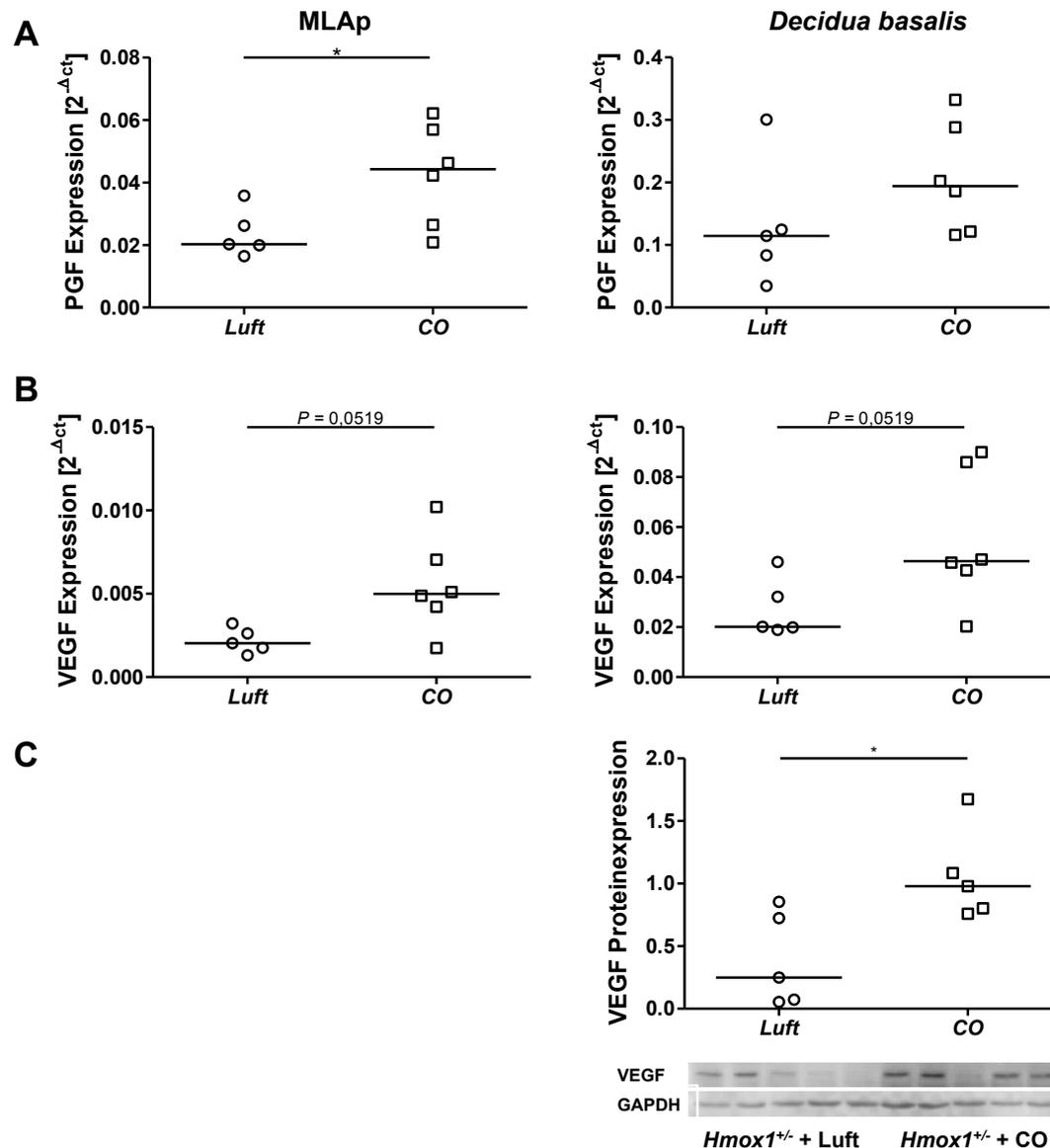


Abb. 42: Die *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid führte zu einer Erhöhung der PGF mRNA und der VEGF mRNA und Proteinexpression an der feto – maternalen Grenzfläche am Tag 10 der Schwangerschaft. Die PGF und VEGF mRNA Expression wurde mit Hilfe der Echtzeit RT – PCR im MLAp und der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft, nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft, bestimmt. Darüber hinaus wurde in der *Decidua basalis* mittels Western Blot die VEGF Proteinexpression ermittelt. **(A)** Die PGF mRNA Expression war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid im MLAp von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant und in der *Decidua basalis* leicht erhöht. **(B)** Im MLAp und der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid die VEGF mRNA Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht. **(C)** Nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid war die VEGF Proteinexpression in der *Decidua basalis* von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der

statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney U – Tests.
* $P < 0.05$.

3.16 Die Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid hat keinen Einfluss auf die IFN- γ mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche

Da das inflammatorische Zytokin IFN- γ einer der bedeutendsten Mediatoren der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche ist, wurde zunächst der Effekt der späten *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid beginnend am Tag 5 auf dessen mRNA Expression getestet. Für die Bestimmung der IFN- γ mRNA Expression am Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch ($n = 4$) oder 50 ppm Kohlenmonoxid ($n = 5$) vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde die Echtzeit RT – PCR angewendet. Die IFN- γ mRNA Expression war im MLAp der $Hmox1^{+/-}$ Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vergleichbar mit der IFN- γ mRNA Expression in der Kontrollgruppe (Abb. 43).

Damit wurde gezeigt, dass eine *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid am Tag 5 der Schwangerschaft keine Auswirkungen auf die mRNA Expression des uNK Zell Mediators IFN- γ hat.

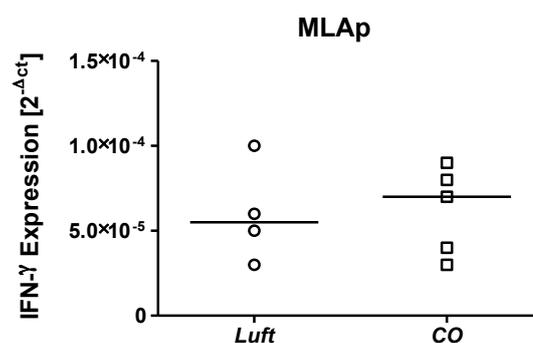


Abb. 43: Nach der *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft blieb die IFN- γ mRNA Expression am Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp unverändert. Im MLAp von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen wurde nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mittels der Echtzeit RT – PCR am Tag 10 der Schwangerschaft die IFN- γ mRNA Expression bestimmt. Die IFN- γ mRNA Expression war im MLAp von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vergleichbar zu der Expression in der Kontrollgruppe. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney U – Tests.

3.17 Die Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid führt zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche

Darüber hinaus wurde die IFN- γ mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der frühen *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid beginnend am Tag 3 der Schwangerschaft untersucht. Die IFN- γ mRNA Expression wurde am Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 5) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 6) vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mittels der Echtzeit RT – PCR bestimmt. Mit Hilfe des Western Blots wurde die IFN- γ Proteinexpression in der *Decidua basalis* von mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen analysiert. Die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid hatte einen signifikanten Anstieg der IFN- γ mRNA Expression im MLAp von *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe zur Folge (Abb. 44 A). Gleichermaßen war die IFN- γ Proteinexpression in der *Decidua basalis* von mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 44 B).

Die Daten bestätigen, dass der Beginn der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 3 der Schwangerschaft die IFN- γ mRNA und Proteinexpression an der feto – maternalen Grenzfläche signifikant erhöhen kann.

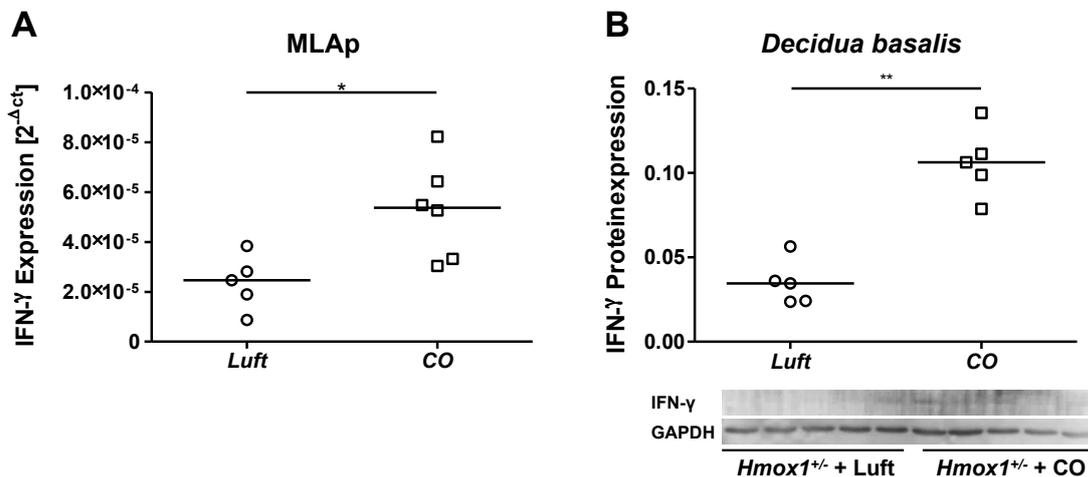


Abb. 44: Die IFN- γ mRNA Expression war am Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft erhöht. Mit Hilfe der Echtzeit RT – PCR wurde die IFN- γ mRNA Expression am Tag 10 der Schwangerschaft im MLAp von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft bestimmt. Die IFN- γ Proteinexpression in der *Decidua basalis* wurde mittels Western Blots analysiert. (A) Die IFN- γ mRNA Expression war im MLAp von mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im

Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. (B) In der *Decidua basalis* war die IFN- γ Proteinexpression in den mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney U – Tests. **P* < 0.05.

3.18 Die Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft, aber nicht vom Tag 5 bis Tag 8 verhindert die intrauterine Wachstumsretardierung der Feten

Die therapeutische *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft führte sowohl zu einem signifikanten Anstieg der uNK – Zellen, einer verbesserten Spiralarterienentwicklung als auch zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA Expression an Angiogenesefaktoren an der feto – maternalen Grenzfläche. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher überprüft, ob die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid die intrauterine Wachstumsretardierung der Feten unterbinden kann. Die Größenbestimmung der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle am Tag 10 der Schwangerschaft erfolgte in transversal geschnittenen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch (n = 4-5) oder 50 ppm Kohlenmonoxid (n = 5-6) vom Tag 3 oder Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Hilfe der digitalen Bildanalyse.



Abb. 45: Hämatoxylin – Eosin Färbung von ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen am Tag 10 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 oder Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft (X10). Am Tag 10 der Schwangerschaft wurden für die

Größenbestimmung der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle transversal geschnittene ganze Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 oder Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit einer Hämatoxylin – Eosin Färbung histologisch angefärbt. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 (**A**), oder Tag 3 (**B**) bis Tag 8 der Schwangerschaft. **M**, MLAp; **DB**, *Decidua basalis*; **P**, Plazenta; **E**, Embryonalhöhle. Objektiv: 1X, Okular: 10X.

Die Größe der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle waren nach der spät einsetzenden *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid am Tag 5 der Schwangerschaft im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Tabelle 8). Auch an Hand repräsentativer Aufnahmen von ganzen Implantationen von mit einem Kontrollluftgemisch oder mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die zu einem späteren Zeitpunkt eintretende *in vivo* Behandlung keinen Effekt auf das Wachstum der Implantationen hatte (Abb. 45 A).

Tabelle 8: Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid hatte keinen Effekt auf die intrauterine Wachstumsretardierung der Feten am Tag 10 der Schwangerschaft. In transversal geschnittenen, ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen, nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft, wurde die Größe der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle am Tag 10 der Schwangerschaft bestimmt. Nach der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid konnten keine Unterschiede in der Größe der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Werte sind in mm² angegeben und als Mediane dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney

Behandlung (Tag 5 – 8)	Luft (n = 4)	CO (n = 5)
Ganze Implantation	15,59	16,49
MLAp	0,66	0,49
<i>Decidua basalis</i>	5,09	4,32
Plazenta	1,34	1,38
Embryonalhöhle	5,10	4,86

U – Tests.

Die zu einem früheren Zeitpunkt einsetzende *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid am Tag 3 der Schwangerschaft bewirkte eine signifikante Vergrößerung der ganzen Implantation, des MLAp, der Plazenta und der Embryonalhöhle im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Einzig die Größe *Decidua basalis* war nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid unverändert (Tabelle 9). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen ganzer Implantationen von mit einem Kontrollluftgemisch oder mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen bestätigen die Ergebnisse der Größenbestimmung (Abb. 45 B).

Tabelle 9: Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid verhinderte die intrauterinen Wachstumsretardierung der Feten am Tag 10 der Schwangerschaft. Nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde in transversal geschnittenen, ganzen Implantationen von *Hmox1*^{+/-} Weibchen die Größe der ganzen Implantation, des MLAp, der *Decidua basalis*, der Plazenta und der Embryonalhöhle am Tag 10 der Schwangerschaft bestimmt. Die ganze Implantation, das MLAp, die Plazenta und die Embryonalhöhle war nach der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant vergrößert. Die Werte sind in mm² angegeben und als Mediane dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

Behandlung (Tag 3 – 8)	Luft (n = 5)	CO (n = 6)
Ganze Implantation	12,58	18,02 *
MLAp	0,79	1,47 **
<i>Dezidua basalis</i>	4,20	4,08
Plazenta	0,73	1,68 **
Embryonalhöhle	4,52	6,71*

3.19 Die Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft unterstützt das fötale Wachstum der Implantationen bis in die späte Schwangerschaft

Bereits am Tag 10 der Schwangerschaft konnte ein signifikanter Fortschritt im Wachstum der Implantationen nach der *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid beobachtet werden. Ein längerfristiger Effekt der Kohlenmonoxid – Behandlung in der frühen Schwangerschaft auf das Implantationswachstum wurde untersucht, indem die Implantationsgröße am Tag 18 der Schwangerschaft bestimmt wurde. Nach der *in vivo*

Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde in Hämatoxylin – Eosin gefärbten, ganzen transversal geschnittenen Implantationen von $Hmox1^{+/+}$ ($n = 4-5$) und $Hmox1^{+/-}$ ($n = 5-6$) Weibchen die Größe der ganzen Implantation am Tag 18 der Schwangerschaft mittels digitaler Bildanalyse ausgewertet. Die ganzen Implantationen von mit Kohlenmonoxid behandelten $Hmox1^{+/+}$ Weibchen und mit einem Kontrollluftgemisch behandelten $Hmox1^{+/-}$ Weibchen waren im Vergleich zu den mit einem Kontrollluftgemisch behandelten $Hmox1^{+/+}$ Weibchen signifikant kleiner. Die Implantationen der mit Kohlenmonoxid behandelten $Hmox1^{+/-}$ Weibchen waren im Vergleich zu den mit einem Kontrollluftgemisch behandelten $Hmox1^{+/-}$ Weibchen signifikant vergrößert (Abb. 46).

Es konnte bewiesen werden, dass die *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft einen langanhaltenden Effekt auf das Wachstum der Implantationen hat.

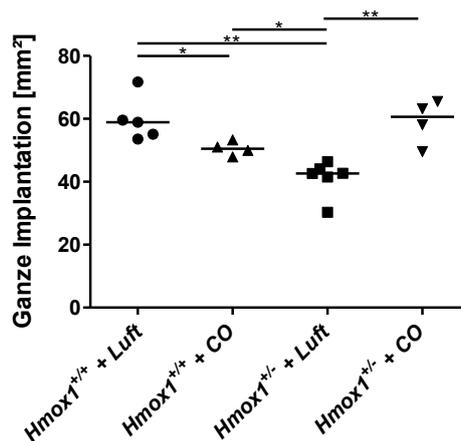


Abb. 46: Am Tag 18 der Schwangerschaft ist die Implantationsgröße von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen nach der *in vivo* Behandlung vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Kohlenmonoxid vergleichbar zu der Kontrollgruppe. Nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde in transversal geschnittenen, Hämatoxylin – Eosin gefärbten ganzen Implantationen von $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen die Größe der ganzen Implantation am Tag 18 der Schwangerschaft bestimmt. Die Größe der ganzen Implantation war nach der *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid im Vergleich zu den mit einem Kontrollluftgemisch behandelten $Hmox1^{+/-}$ Weibchen signifikant erhöht. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Medianen dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.20 *Hmox1*^{+/-} Weibchen entwickeln in der späten Schwangerschaft Bluthochdruck, während *Hmox1*^{+/+} Weibchen einen normalen Blutdruck zeigen

Sowohl eine verminderte Anzahl an uNK – Zellen als auch eine eingeschränkte Spiralarterienumwandlung wurden in der Vergangenheit mit der Entstehung der schwangerschaftsassozierten Erkrankung Präeklampsie in Verbindung gebracht. Ein Hauptmerkmal der Präeklampsie ist die Entstehung von Bluthochdruck im letzten Schwangerschaftsdrittel (Moffet *et al.* 2007). Nachdem in den HO-1 – defizienten Mäusen eine verminderte Anzahl an uNK – Zellen und eine eingeschränkte Spiralarterienumwandlung festgestellt werden konnte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft von *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Weibchen überprüft. Die Bestimmung des systolischen als auch des diastolischen Blutdrucks in *Hmox1*^{+/+} (n = 5) und *Hmox1*^{+/-} (n = 6) Weibchen während der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft erfolgte an jedem zweiten Tag vom Tag 0 bis Tag 18 der Schwangerschaft mit Hilfe der indirekten, nicht invasiven „Tail – Cuff Method“ (Wagner *et al.* 1999). Während die *Hmox1*^{+/+} Weibchen einen gleichbleibenden systolischen und diastolischen Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft hatten, kam es bei den *Hmox1*^{+/-} Weibchen zu einem signifikanten Anstieg im systolischen und diastolischen Blutdruck (Abb. 47 A und B).

An Hand dieser Beobachtungen konnte bewiesen werden, dass *Hmox1*^{+/-} Weibchen, die eine verminderte Anzahl an uNK – Zellen und eine eingeschränkte Spiralarterienentwicklung haben, im Verlauf der späten Schwangerschaft Bluthochdruck entwickeln und somit PE – ähnliche Symptome zeigen.

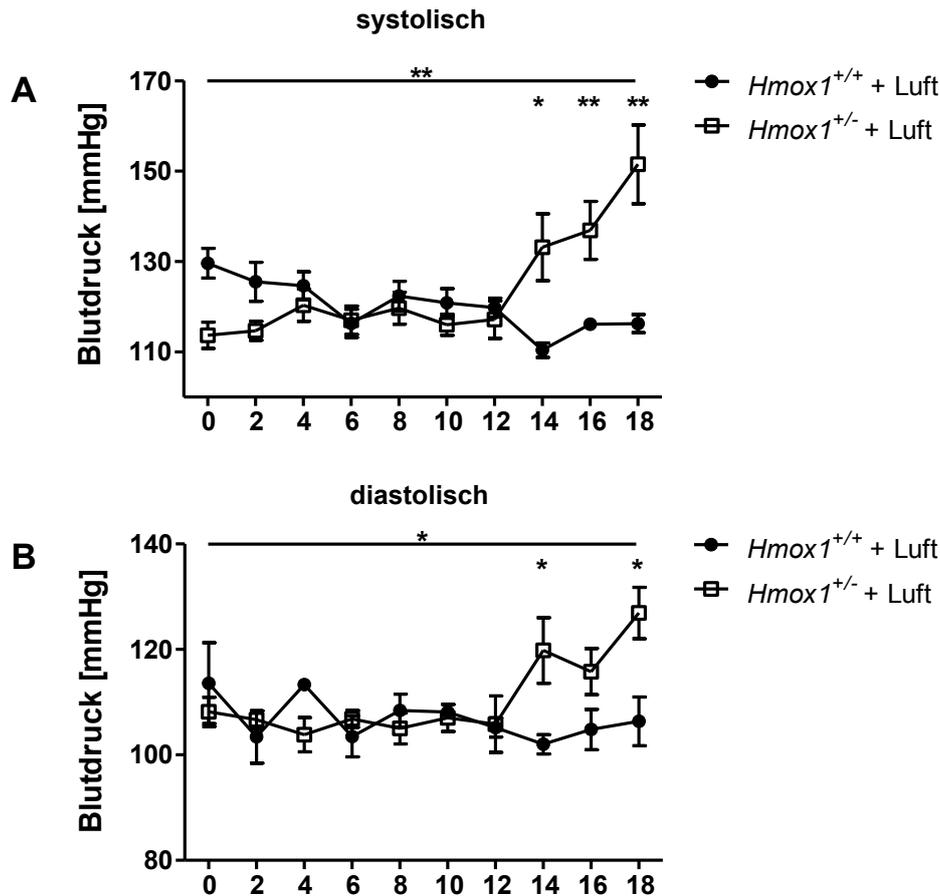


Abb. 47: Im Verlauf der Spätschwangerschaft entwickeln $Hmox1^{+/-}$ Weibchen beginnend am Tag 14 der Schwangerschaft systolischen und diastolischen Bluthochdruck. Die indirekte, nicht invasive Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdrucks in $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen erfolgte an jedem zweiten Tag vom Tag 0 bis Tag 18 der Schwangerschaft mit Hilfe der „Tail – Cuff Method“. Während bei den $Hmox1^{+/+}$ Weibchen keine Veränderung im systolischen (A) und diastolischen (B) Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft festgestellt werden konnte, kam es in den $Hmox1^{+/-}$ Weibchen zu einem signifikanten Anstieg im systolischen (A) und diastolischen (B) Blutdruck. Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Mittels des Friedmann – Tests wurde die statistische Veränderung innerhalb einer Gruppe über den zeitlichen Verlauf bestimmt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen an einem Tag erfolgte mit Hilfe des unpaired t – Tests. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.21 Die Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft verhindert die Entstehung von Bluthochdruck in der späten Schwangerschaft

Die positiven Auswirkungen der *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid auf die Anzahl der uNK – Zellen, die Spiralarterienentwicklung und den Wachstum der Feten konnten bereits im Rahmen dieser Arbeit dargelegt werden. Darüber

hinaus wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Auswirkung einer Kohlenmonoxid – Behandlung auf die Entstehung von Bluthochdruck in *Hmox1*^{+/-} Weibchen untersucht. Über die indirekte, nicht invasive „Tail – Cuff Method“ wurde der systolische und diastolische Blutdruck in *Hmox1*^{+/+} (n = 5) und *Hmox1*^{+/-} (n = 5) Weibchen während der *in vivo* Behandlung mit 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft an jedem zweiten Tag vom Tag 0 bis Tag 18 der Schwangerschaft erfasst. Die mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/+} Weibchen wiesen einen gleichbleibenden systolischen und diastolischen Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft auf. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen. Auch hier kam es zu keiner Veränderung im systolischen und diastolischen Blutdruck während der Schwangerschaft (Abb. 48 A und B).

Hiermit konnte erstmals demonstriert werden, dass die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen in der frühen Schwangerschaft die Entstehung von Bluthochdruck in der Spätschwangerschaft verhindern kann.

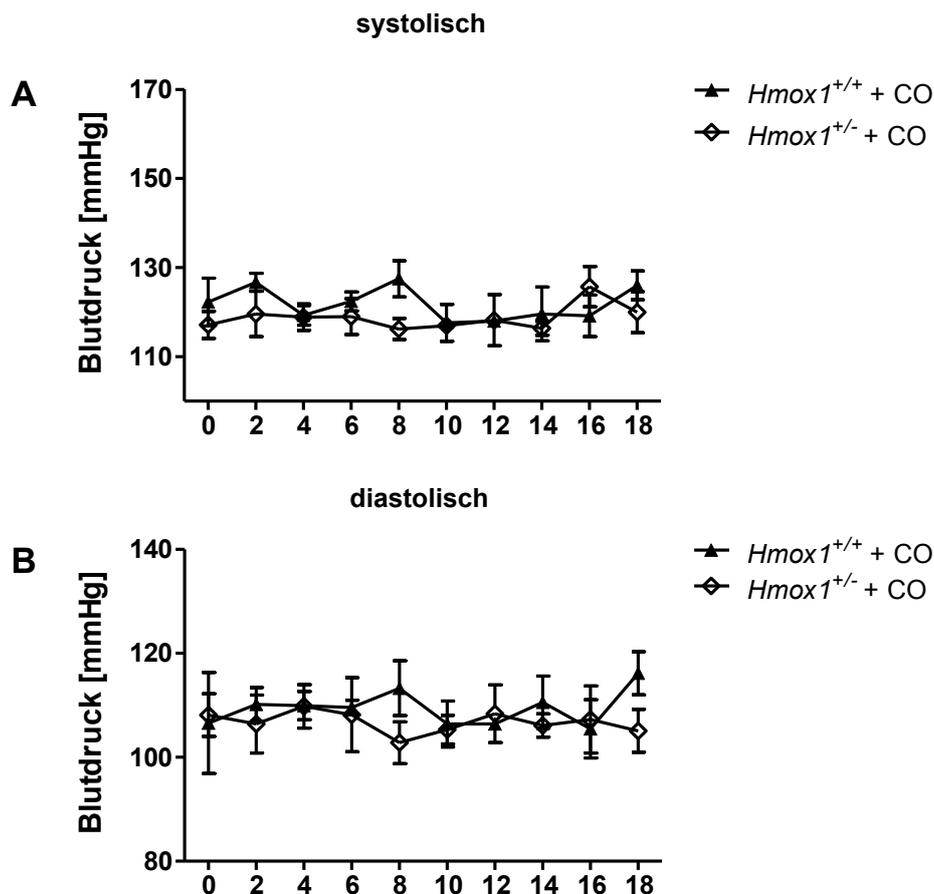


Abb. 48: Die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft verhinderte den systolischen und diastolischen Bluthochdruck in *Hmox1*^{+/-} Weibchen. Die indirekte, nicht invasive Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdrucks in mit 50 ppm Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Weibchen erfolgte an jedem zweiten Tag vom

Tag 0 bis Tag 18 der Schwangerschaft mit Hilfe der „Tail – Cuff Method“. In beiden Gruppen, den *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Weibchen, kam es nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft zu keinem Anstieg des systolischen (**A**) und diastolischen (**B**) Blutdrucks. Die Werte sind als Mittelwerte dargestellt. Mittels des Friedman – Tests wurde die statistische Veränderung innerhalb einer Gruppe über den zeitlichen Verlauf bestimmt. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen an einem Tag erfolgte mit Hilfe des unpaired *t* – Tests.

3.22 Die Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft hat keinen Einfluss auf die systemischen Level von sFlt-1 und sEndoglin

Neben der Entstehung von Bluthochdruck in der späten Schwangerschaft ist Präeklampsie durch erhöhte Konzentrationen an systemischen sFlt-1 und sEndoglin im Blutplasma gekennzeichnet. Die Level von sFlt-1 und sEndoglin wurden nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft im Plasma von *Hmox1*^{+/+} (*n* = 5) und *Hmox1*^{+/-} (*n* = 5-6) Weibchen am Tag 18 der Schwangerschaft mittels ELISA bestimmt. Die Konzentration an systemischen sFlt-1 war sowohl in den *Hmox1*^{+/+} als auch in den *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid vergleichbar (Abb. 49 A). Entsprechende Ergebnisse wurden in den Konzentrationen von sEndoglin detektiert. Die *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Weibchen hatten nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid vergleichbare Konzentrationen an sEndoglin im Plasma (Abb. 49 B).

Die Konzentrationen an systemischen sFlt-1 und sEndoglin ist in der späten Schwangerschaft von *Hmox1*^{+/-} Weibchen nicht erhöht. Somit hatte die *in vivo* Behandlung der *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid keine weiteren Auswirkungen auf die Konzentrationen der beiden Antiangiogenesefaktoren im Plasma.

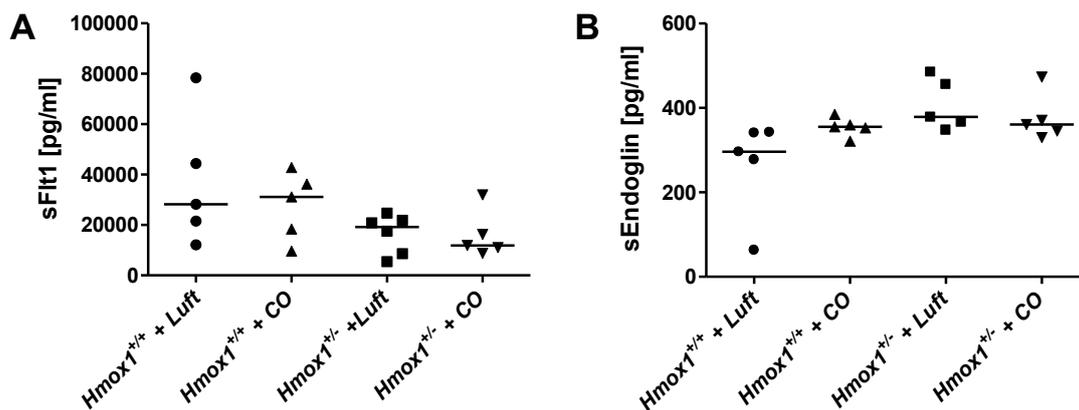


Abb. 49: Die systemischen Konzentrationen an sFlt-1 und sEndoglin waren im Plasma von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen am Tag 18 der Schwangerschaft nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft unverändert. Die Konzentration an sFlt-1 und sEndoglin wurde nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft im Plasma von $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen am Tag 18 der Schwangerschaft mittels ELISA bestimmt. Es konnten in der sFlt-1 und sEndoglin Konzentration keine Unterschiede zwischen den $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen nach der Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid festgestellt werden. Die Werte sind als individuelle Datenpunkte mit Mittelwerten dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann – Whitney *U* – Tests.

3.23 Die Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft verhindert die Schädigung der Nierenstrukturen

Nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft wurde in mit Hämatoxylin – Eosin angefärbten Nieren von $Hmox1^{+/+}$ und $Hmox1^{+/-}$ Weibchen am Tag 18 der Schwangerschaft die histopathologischen Strukturen in und um die *Capsula glomeruli* beurteilt. In den Nieren von mit einem Kontrollluftgemisch behandelten $Hmox1^{+/-}$ Weibchen (Abb. 50 C) konnte eine bindegewebsartige Verbreiterung der *Capsula glomerula*, eine deutliche mesangiale Proliferation und eine starke Einblutung in das umliegende Gewebe im Vergleich zu den mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid behandelten $Hmox1^{+/+}$ Weibchen (Abb. 50 A und B) festgestellt werden. Die Behandlung der $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid (Abb. 50 D) führte zu einer Verbesserung der histologischen Strukturen in und um den *Capsula glomeruli*, vergleichbar mit denen der Kontrollgruppen $Hmox1^{+/+}$ behandelt mit einem Kontrollluftgemisch oder Kohlenmonoxid.

Die *in vivo* Behandlung von $Hmox1^{+/-}$ Weibchen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft kann diese Entstehung von Nierenschäden verhindern.

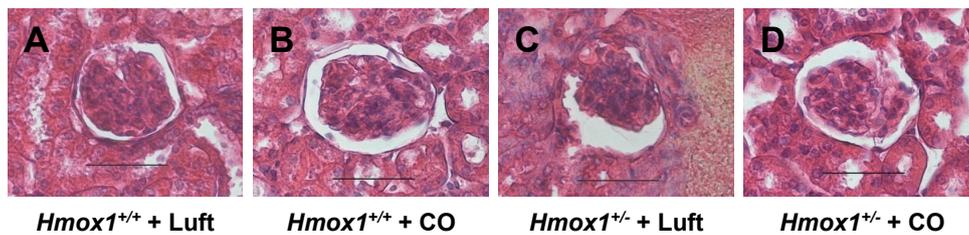


Abb. 50: Nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid konnte an den *Capsula glomeruli* in den Nieren von *Hmox1*^{+/-} Weibchen keine histologischen Schädigungen mehr festgestellt werden. Am Tag 18 der Schwangerschaft wurden die Nieren von *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Weibchen nach der *in vivo* Behandlung mit einem Kontrollluftgemisch oder 50 ppm Kohlenmonoxid vom Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft mit Hämatoxylin – Eosin angefärbt und die histopathologischen Strukturen der *Capsula Glomeruli* histologisch bewertet. (C) Die histologischen Strukturen der *Capsula Glomeruli* von mit einem Kontrollluftgemisch behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen sind im Vergleich zu den (A und B) Kontrollgruppen (D) mit Kohlenmonoxid behandelten *Hmox1*^{+/-} Weibchen stark geschädigt. Objektiv: 40X, Okular: 10X.

4 Diskussion

Eine erfolgreiche Schwangerschaft ist weitgehend von einer ausreichenden Plazentation abhängig. Denn ausschließlich eine adäquate Implantation und Plazentation stellt die Versorgung des Föten mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher. Auf Grund des Wachstums und der Umwandlung der uterinen Spiralarterien kommt es zu einem massiven Anstieg des Blutflusses zwischen Uterus und Plazenta während der Schwangerschaft. Schädigungen des uterinen Gefäßsystems, gekennzeichnet durch eine unvollständige Umwandlung der Spiralarterien, führen im Verlaufe einer Schwangerschaft zu Krankheitsbildern wie IUGR und Präeklampsie (Bewley *et al.* 1991, Bernstein *et al.* 1998).

Unlängst konnte unsere Arbeitsgruppe in HO-1 defizienten Mäusen sowohl eine gestörte Implantation als auch eine abnormale Plazentation mit IUGR und anschließenden fötalen Tod nachweisen. Die Ursache der Schwangerschaftskomplikationen in HO-1 defizienten Mäusen beruht auf der Akkumulation von freiem Häm an der feto – maternalen Grenzfläche. Diese Anreicherung des freien Häms an der feto – maternalen Grenzfläche führt zu Einblutungen innerhalb der Plazenta (Zenclussen *et al.* 2011). Die therapeutische *in vivo* Behandlung im Verlauf der Schwangerschaft mit exogenen Kohlenmonoxid, einem der bedeutendsten Produkte der HO-1, kann den ungeborenen Föten vor dem intrauterinen Tod schützen. Die therapeutische *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid resultiert in einer lokalen anti – inflammatorischen Immunantwort, Schutz des Gewebes und Anti – Apoptose (Zenclussen *et al.* 2011, El-Mousleh *et al.* 2012). Somit positioniert sich die HO-1 und sein Metabolit Kohlenmonoxid als zentrale Modulatoren in der Schwangerschaft und dem fötalen Wohlergehen.

Die Population der uNK – Zellen hat einen wesentlichen Anteil an der Umwandlung der Spiralarterien an der feto – maternalen Grenzfläche im Verlauf der Schwangerschaft. Aus diesem Grund wird oft bei den Schwangerschaftskomplikation IUGR und Präeklampsie eine veränderte uNK – Zellzahl an der feto – maternalen Grenzfläche vorausgesagt. Konzeptunterstützend konnte die Arbeitsgruppe um Williams eine Reduzierung in der Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von Patienten mit IUGR oder Präeklampsie feststellen (Williams *et al.* 2009). Darüber hinaus erinnert in Mäusen ohne uNK – Zellen das histopathologische Bild der Spiralarterien an das von präeklampsischen Frauen. Konkret bedeutet das, die Spiralarterien behalten die glatte Muskulatur bei und sowohl die Erweiterung als auch die Verlängerung der Arterien bleibt aus (Greenwood *et al.* 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob uNK – Zellen den positiven Effekt der HO-1 und des Metaboliten Kohlenmonoxid auf die Schwangerschaft vermitteln. Zudem verfolgten wir die Fragestellung, ob eine HO-1 Defizienz in Zusammenhang mit der Entwicklung von Bluthochdruck während der Schwangerschaft steht, wie bereits für die humane Schwangerschaft hypothesiert (Ahmed *et al.* 2011). Auch der therapeutische Effekt von Kohlenmonoxid während der Schwangerschaft sollte untersucht werden. Dies wurde bereits in der Vergangenheit näher in Betracht gezogen (Zhao *et al.* 2011), da das Rauchen in der Schwangerschaft das Risiko an Präeklampsie zu erkranken senkt (Ashkar *et al.* 2003).

Zunächst wurde die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 Implantationen mit Hilfe der spezifischen, histochemischen DBA – Lektin Färbung (Paffaro *et al.* 2003) untersucht. Bereits am Tag 8 der Schwangerschaft war die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Implantationen signifikant reduziert im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen. Diese signifikante Abnahme in der Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Implantationen hatte auch am Tag 10 und 12 der Schwangerschaft weiterhin Bestand. Zhao und Kollegen beschrieben bereits 2011 eine Veränderung in der Differenzierung und Reifung der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} Weibchen. Anders als in der Studie von Zhao und Kollegen wurde in der vorliegenden Arbeit der Phänotyp der Implantationen bei der Analyse der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche berücksichtigt. Folglich wurde erstmals die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{-/-} Implantationen bestimmt. Die Anzahl der uNK – Zellen in *Hmox1*^{-/-} Implantationen war beginnend am Tag 8 der Schwangerschaft bereits signifikant reduziert im Vergleich zu sowohl *Hmox1*^{+/+} Implantationen als auch zu *Hmox1*^{+/-} Implantationen. Somit konnte zum ersten Mal bestätigt werden, dass die HO-1 Expression an der feto - maternalen Grenzfläche einen direkten Einfluss auf die Anzahl der uNK – Zellen im Verlauf der Schwangerschaft hat.

Für die Reifung und Differenzierung benötigen uNK – Zellen IL-15 (Waldmann *et al.* 1999). Dementsprechend kommt es bei IL-15 – defizienten Mäusen zu einem kompletten Verlust der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche (Greenwood *et al.* 2000). Hier sollte untersucht werden, ob die verringerte Anzahl an uNK – Zellen auf eine verminderte IL-15 Expression an der feto - maternalen Grenzfläche von HO-1 – defizienten Implantationen beruht. Die IL-15 mRNA Expression war an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Implantationen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Implantationen verringert. An der feto – maternalen Grenzfläche wird sowohl die IL-15 mRNA als auch das IL-15 Protein vorrangig durch uterine Makrophagen und perivaskuläre Zellen, welche die Spiralarterien der Dezidua umgeben, exprimiert (Ye *et al.* 1996, Fortunato *et al.* 1998). Es ist bekannt, dass HO-1 in der Lage ist Makrophagen hinsichtlich ihres Phänotyps zu beeinflussen. Unter dem

Einfluss des Enzyms HO-1 nehmen Makrophagen überwiegend den anti – inflammatorischen Phänotyp M2 an (Weis *et al.* 2009). Diese Makrophagen des Typs M2 repräsentieren den größten Teil der uterinen Makrophagen an der feto - maternalen Grenzfläche im Verlaufe einer Schwangerschaft (Nagamatsu und Schust 2010). Ein direkter Einfluss von HO-1 auf die IL-15 – Expression hingegen wurde bislang nicht untersucht. Folglich ist es denkbar, dass die geringe HO-1 Expression an der feto - maternalen Grenzfläche eine Störung in der Ausbildung der M2 Makrophagen zur Folge hat, was wiederum zu einer verringerten IL-15 – Expression an der feto - maternalen Grenzfläche und somit zu einer verminderten Anzahl an uNK – Zellen führt. Dennoch besteht ebenfalls die Möglichkeit des direkten Einflusses von Kohlenmonoxid auf die IL-15 mRNA Expression. Fest steht in HO-1 defizienten Implantationen kommt es zu einer verringerten IL-15 mRNA Expression, die mit einer verminderten Anzahl an uNK – Zellen einhergeht.

Eine zentrale Rolle in der Ausbildung der Spiralarterien spielen die uNK – Zellen (Greenwood *et al.* 2000). Im Verlauf einer gesunden Schwangerschaft nehmen die Spiralarterien einen mehr venösen Charakter mit dünneren Arterienwänden und einem vergrößertem Lumen an und gewährleisten somit einen ausreichenden Blutfluss. Die Abwesenheit der uNK – Zellen an der feto - maternalen Grenzfläche verschiedenster Tiermodelle führte unausweichlich zu einer Beeinträchtigung in der Ausbildung von Spiralarterien (Croy *et al.* 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Beeinträchtigung der Spiralarterienentwicklung an der feto - maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Mäusen, die eine verringerte Anzahl an uNK – Zellen aufweisen. Hiermit konnte die Bedeutung der HO-1 Expression für die Rolle der uNK – Zellen in der Ausbildung von Spiralarterien an der feto – maternalen Grenzfläche belegt werden.

HO-1 hat basierend auf seinem Metaboliten Kohlenmonoxid einen positiven Einfluß auf die Angiogenese. In dieser Weise aktiviert Kohlenmonoxid zum Einen die VEGF (Dulak *et al.* 2002) und zum Anderen die PGF Produktion (El-Mousleh *et al.* 2012). Beide Wachstumsfaktoren sind ein wichtiger Bestandteil im Prozess der Umwandlung mütterlicher Blutgefäße im Uterus. Dabei regeln VEGF und PGF nicht nur die Erweiterung und Vergrößerung der bestehenden Blutgefäße, sondern rufen auch eine verstärkte Mitose der Endothelzellen hervor (Odorisio *et al.* 2002, Osol *et al.* 2008, Maynard *et al.* 2005). Darüber hinaus konnte eine beeinträchtigte Entwicklung der Spiralarterien an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Zhao *et al.* 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit offenbarten nicht nur die eingeschränkte Spiralarterienentwicklung in HO-1 defizienten Implantationen, sondern zeigten auch eine beeinträchtigte VEGF, PGF und IFN- γ mRNA Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen, was mit der geringen Anzahl an uNK – Zellen korreliert. Die Bedeutung der uNK – Zellen für die Entwicklung der

Spiralarterien begründet sich in der Generierung der Wachstumsfaktoren VEGF und PGF und des pro – inflammatorischen Zytokins IFN – γ (Wang *et al.* 2000, Tayade *et al.* 2007, Ashkar and Croy 2001).

Während der Schwangerschaft von sowohl Menschen als auch Nagetieren ist die Expression des HO-1 Proteins an der feto – maternalen Grenzfläche deutlich erhöht (Zenclussen *et al.* 2003, Zenclussen 2005, Ihara *et al.* 1998, Barber *et al.* 2001). Des Weiteren konnte eine verminderte HO-1 Expression an der feto - maternalen Grenzfläche mit Schwangerschaftskomplikationen wie Fehlgeburten, Präeklampsie und IUGR in Verbindung gebracht werden (Zhao *et al.* 2011, Zenclussen *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte die IUGR von Föten in *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Implantationen bestätigt werden. Als Grund für das verzögerte Wachstum der HO-1 defizienten Föten könnten die geringe Anzahl an uNK – Zellen und die damit einhergehende Verschlechterung der Spiralarterienentwicklung vorgeschlagen werden. Somit enthüllt diese Arbeit einen wichtigen Faktor für die normale embryonale Entwicklung.

Eine verminderte HO-1 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche führte nicht nur zu einer Reduzierung der uNK – Zellen, der VEGF, PGF und IFN- γ Expression sondern beeinträchtigte sowohl die Entwicklung der Spiralarterien als auch die Embryonalentwicklung. In der Vergangenheit wurden eine eingeschränkte Spiralarterienumwandlung mit der Entstehung der schwangerschaftsassozierten Erkrankung Präeklampsie in Verbindung gebracht. Ein Hauptmerkmal der Erkrankung ist die Entstehung von Bluthochdruck im letzten Schwangerschaftsdrittel (Moffet *et al.* 2007). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten HO-1 defiziente Weibchen entwickelten, wie vermutet, im Verlauf der Schwangerschaft einen systolischen und diastolischen Bluthochdruck. Beginnend am Tag 14 der Schwangerschaft stieg der systolische Blutdruck bis auf 151 mm Hg bei den HO-1 defizienten Weibchen, wogegen bei den HO-1 kompetenten Weibchen der Blutdruck im Normalbereich blieb. Somit repräsentieren die HO-1 defizienten Mäuse ein neues Tiermodell für natürlich vorkommende Präeklampsie. Derartige Tiermodelle sind unerlässlich um notwendige Untersuchungen durchführen zu können und hilfreiche Therapien zum Schutze des Fötus zu etablieren.

Ein weiteres Merkmal der Präeklampsie ist die Schädigung der Nieren im späteren Verlauf der Krankheit (Müller *et al.* 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir die Entstehung von Bluthochdruck in schwangeren *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit der Schädigung der Nieren in Verbindung bringen. Eine mögliche Ursache für den erhöhten Blutdruck und den einhergehenden Nierenschädigungen in schwangeren *Hmox1*^{+/-} Weibchen ist der systemische Überschuss an freiem Häm. Diese Tiere haben keinen Bluthochdruck, wenn sie nicht trächtig sind oder in der frühen Phase der Schwangerschaft. Jedoch mit fortschreitender Schwangerschaft kommt es zu einer Volumenerhöhung des zirkulierenden

Blutes und die unzureichende HO-1 Expression hat eine Anreicherung von hoch toxischem, freiem Häm zur Folge (Zenclussen *et al.* 2011). Die Behandlung von trächtigen *Hmox1^{+/+}* und *Hmox1^{+/-}* Weibchen mit Häm (20mg/kg) zum Zeitpunkt der Plazentation führte zu einer erhöhten intrauterinen Sterblichkeit der Föten (Zenclussen *et al.* 2011). Eine geringere Dosis an Häm (10 und 15 mg/kg) hatte keinen Einfluß auf die Schwangerschaft. Wohingegen die Erhöhung der Menge an Häm (30mg/kg) den Tod der trächtigen Mäuse zur Folge hatte. Die Akkumulation des freien Häms könnte den fehlenden Schutz von HO-1 auf die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Nierenschädigungen in *Hmox1^{+/-}* Weibchen während der Schwangerschaft erklären. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine reduzierte HO-1 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche von Mäusen mit einer verringerten Anzahl an uNK – Zellen und der damit verbundenen Verzögerung in der Spiralarterienentwicklung und der fötalen Entwicklung in Verbindung gebracht werden kann. Dies hat als Folge eine ernste Störung in der fötalen Entwicklung bis hin zum fötalen Tod.

Das Rauchen während der Schwangerschaft wird mit zahlreichen Schwangerschaftskomplikationen, wie zum Beispiel Frühgeburt, unzureichende Plazentation und Störungen in der Embryonalentwicklung, in Zusammenhang gebracht (Brainbridge *et al.* 2005). Allerdings konnte beobachtet werden, dass das Rauchen in der Schwangerschaft das Risiko an Präeklampsie zu erkranken signifikant senkt (Conde-Agudelo *et al.* 1999, England *et al.* 2007). Es ist davon auszugehen, dass der wesentliche Bestandteil von Zigarettenrauch, das Kohlenmonoxid, für die Senkung des Risikos an Präeklampsie zu erkranken verantwortlich ist (Zhai *et al.* 2012). Dabei beruhen die positiven Effekte von Kohlenmonoxid auf seine zytoprotektiven und anti – apoptotischen Eigenschaften (Otterbein *et al.* 1999, Petrache *et al.* 2000). Die Summe aller anderen Bestandteile des Zigarettenrauches scheint für die negativen Effekte des Rauchens in der Schwangerschaft verantwortlich zu sein. Unsere Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe der *in vivo* Behandlung von Kohlenmonoxid eine Verbesserung des Schwangerschaftsverlaufes in zwei unabhängigen Tiermodellen, die beide durch eine intrauterine Wachstumsretardierung gekennzeichnet sind, erzielen (Zenclussen *et al.* 2011, El-Mousleh *et al.* 2012). Die *in vivo* Behandlung von HO-1 defizienten Weibchen mit Kohlenmonoxid von Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft führte zu einem signifikanten Anstieg der uNK – Zellen. Hier führte die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid vom Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft hingegen hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass für einen positiven Effekt die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft, bereits vor dem Beginn der Implantation am 4. Tag der Schwangerschaft, stattfinden muss.

Der Anstieg der Anzahl an uNK – Zellen nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft war unabhängig von der IL-15 mRNA Expression der

feto – maternalen Grenzfläche. Das deutet darauf hin, dass CO einen direkten, IL-15 unabhängigen Effekt auf die Anzahl der uNK – Zellen. Mehrere Studien in der Vergangenheit konnten einen direkten immunregulatorischen Effekt des exogen angewandten Kohlenmonoxid auf die unterschiedlichsten Zelltypen, wie zum Beispiel Makrophagen, Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen, beweisen (Otterbein *et al.* 2000, Brouard *et al.* 2000, Morita *et al.* 1997). Es ist davon auszugehen, dass die *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid einen unmittelbaren Einfluss auf die *in situ* Proliferation der uNK – Zellen hat. Ausstehende Proliferationstests von uNK – Zellen nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid, beruhen auf der Schwierigkeit uNK – Zellen in ausreichender Anzahl zu isolieren und vor allem in Kultur zu halten. Dennoch konnten wir mit Hilfe der Immunfluoreszenz *ex vivo* eine signifikant erhöhte Anzahl an Ki67⁺ uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von mit Kohlenmonoxid behandelten Implantationen am Tag 10 der Schwangerschaft detektieren. Das Antigen Ki-67 ist ein Zellmarker, der untrennbar mit der Proliferation von Zellen verbunden ist. Diese Ergebnisse erlauben erste Rückschlüsse auf die Wirkung von exogenen Kohlenmonoxid auf die *in situ* Proliferation von uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche.

Die *in vivo* Behandlung von HO-1 defizienten Weibchen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft führte nicht nur zu einem signifikanten Anstieg der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche sondern erhöhte auch die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF und PGF und des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ . Neueste Erkenntnisse erlauben Rückschlüsse auf die Existenz von mindestens drei verschiedenen uNK – Subpopulationen an der feto – maternalen Grenzfläche, eine DBA⁻ und zwei DBA⁺ Populationen. Alle drei Subpopulationen unterscheiden sich grundlegend in ihrer VEGF, PGF und IFN- γ Expression. Die DBA⁺ uNK – Zellen können somit auf Grund ihrer VEGF Expression in zwei Subpopulationen unterteilt werden. Zudem exprimieren uNK – Zellen sogar mehr PGF als VEGF (Chen *et al.* 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die uNK Zellen in *PGF*^{-/-} Implantationen eine ungewöhnliche Morphologie aufweisen (Tayade *et al.* 2007). Man davon aus, dass das enorme Wachstum und die Reifung der DBA⁺ uNK – Zellen während der Schwangerschaft für die verstärkte Akkumulation von IFN- γ an der feto – maternalen Grenzfläche verantwortlich ist (Chen *et al.* 2012). Da die Vermehrung der DBA⁺ uNK – Zellen in *Hmox1*^{+/-} Implantation nach der *in vivo* Behandlung mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft mit einer signifikanten Erhöhung der IFN- γ Expression an der feto – maternalen Grenzfläche korrelierte, wird diese Annahme bestätigt.

Durch die Behandlung der *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft war es möglich den Verlauf der Schwangerschaft zu verändern und sowohl IUGR als auch den Tod der Föten zu verhindern. Das ergibt sich auch aus unseren früheren

Studien, wo die Schwangerschaft von HO-1 defizienten Tieren durch die Behandlung von Kohlenmonoxid gerettet werden konnten. Hier erhöhte die Verabreichung des Kohlenmonoxid erhöhte nicht nur die Anzahl der uNK – Zellen, die Expression der Angiogenesefaktoren, insbesondere die von IFN- γ , sondern beeinflusste auch die Spiralarterienentwicklung. Ähnliche Auswirkungen, wie eine verbesserte MLAp, Dezidua und Spiralarterienentwicklung, konnten nach einer Knochenmarkstransplantation oder der Verabreichung von Maus-IFN- γ in Tiermodellen ohne uNK – Zellen oder unzureichender IFN- γ Expression, beobachtet werden (Guimond *et al.* 1998, Ashkar *et al.* 2000).

Die *in vivo* Behandlung von *Hmox1*^{+/-} Weibchen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft konnte den HO-1 Mangel an der feto – maternalen Grenzfläche kompensieren und verhinderte sowohl das Entstehen von Bluthochdruck in der späten Schwangerschaft, als auch die Schädigungen der Nieren. Eine Behandlung mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft, lange bevor das zirkulierende Blutvolumen steigt, führt vermutlich zu einer Bindung des Kohlenmonoxids an das Fe²⁺ der Hämgruppe und verhindert auf diesem Wege die Hämoglobinoxidation und somit die Freisetzung von Häm (Pamplona *et al.* 2007).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig erklärt werden, warum das Rauchen paradoxerweise einen positiven Einfluss auf die Entstehung von Präeklampsie in der Schwangerschaft hat. Das erklärt auch, warum der gemäßigte Kontakt mit Kohlenmonoxid aus der Umgebung zu einer nachweislichen Senkung des Risikos an Präeklampsie zu erkranken führt (Zhai *et al.* 2012).

Das Verhindern von Bluthochdruck, Nierenschäden und IUGR, welches auch zum fötalen Tod führen kann, in HO-1 defizienten Tieren durch die Behandlung mit Kohlenmonoxid während der frühen Schwangerschaft mag sowohl an der Unterbindung von freiem Häm als auch an der Erhöhung der uNK – Zellen liegen. uNK – Zellen unterstützen die Invasion der Trophoblasten in der frühen Schwangerschaft. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht in der Spiralarterienentwicklung auf Grund unzureichender Aktivierung der uNK Zellen in der frühen Schwangerschaft zur Entstehung einer Präeklampsie in der späten Schwangerschaft beiträgt (Parham 2004, Zhang und Tian 2004, Robson *et al.* 2012). Unsere Untersuchungsergebnisse über reduzierte uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Mäusen, die Bluthochdruck entwickeln, bestätigen diese Hypothese und unterstreicht die Effektivität von Kohlenmonoxid bereits in der frühen Schwangerschaft.

Unter Berücksichtigung aller gewonnen Daten im Rahmen der vorliegenden Arbeit lässt sich folgendes Szenario zusammenstellen (siehe Abb. 51). Während einer gesunden Schwangerschaft mit einer ausreichenden HO-1 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche kommt es durch den Abbau des zytotoxischen, freien Häm zu einer

hinreichenden Akkumulation des zytoprotektiven Produktes Kohlenmonoxid (siehe Abb. 51 A). Die Anwesenheit des Kohlenmonoxid an der feto – maternalen Grenzfläche hat einen positiven Einfluss auf die Proliferationsrate der uNK – Zellen. Die uNK – Zellen wiederum produzieren die für die Spiralarterienentwicklung nötigen Angiogenesefaktoren VEGF und PGF und das pro – inflammatorische Zytokin IFN – γ . Auf Grund des gut entwickelten maternalen Blutgefäßsystems an der feto – maternalen Grenzfläche kann sich der Fötus ungestört und zeitgerecht entwickeln. An der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Mäusen hingegen kommt es zu einer verstärkten Anreicherung von schädlichem, freiem Häm, was mit einer mangelten Versorgung von Kohlenmonoxid bereits in der frühen Schwangerschaft einhergeht (siehe Abb. 51 B). Dieser Mangel hat eine verringerte Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche zur Folge. Somit ist auch die Expression von VEGF, PGF und IFN- γ an der feto – maternalen Grenzfläche reduziert, was eine schlechte Entwicklung der Spiralarterien mit sich bringt. Diese Fehlsteuerungen bereits früh in der Schwangerschaft führen zur Ausbildung von präeklampsischen Symptomen, wie Bluthochdruck, Nierenschäden und embryonale Entwicklungsstörungen, in der späten Schwangerschaft. Die therapeutische Anwendung von exogenem Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft von HO-1 defizienten Mäusen kann diese Entwicklung verhindern (siehe Abb. 51C). Das exogen verabreichte Kohlenmonoxid hat einen positiven Effekt auf die Proliferation der uNK – Zellen wie das an der feto – maternalen Grenzfläche natürlich vorkommende Kohlenmonoxid. Die erhöhte Anzahl der uNK – Zellen geht einher mit einer verstärkten Expression der Angiogenesefaktoren VEGF, PGF und dem pro-inflamatorischen Zytokin IFN- γ . Die Implantationen weisen eine normale Spiralarterienentwicklung und Embryonalentwicklung ohne Bluthochdruck und Schädigungen der Niere auf.

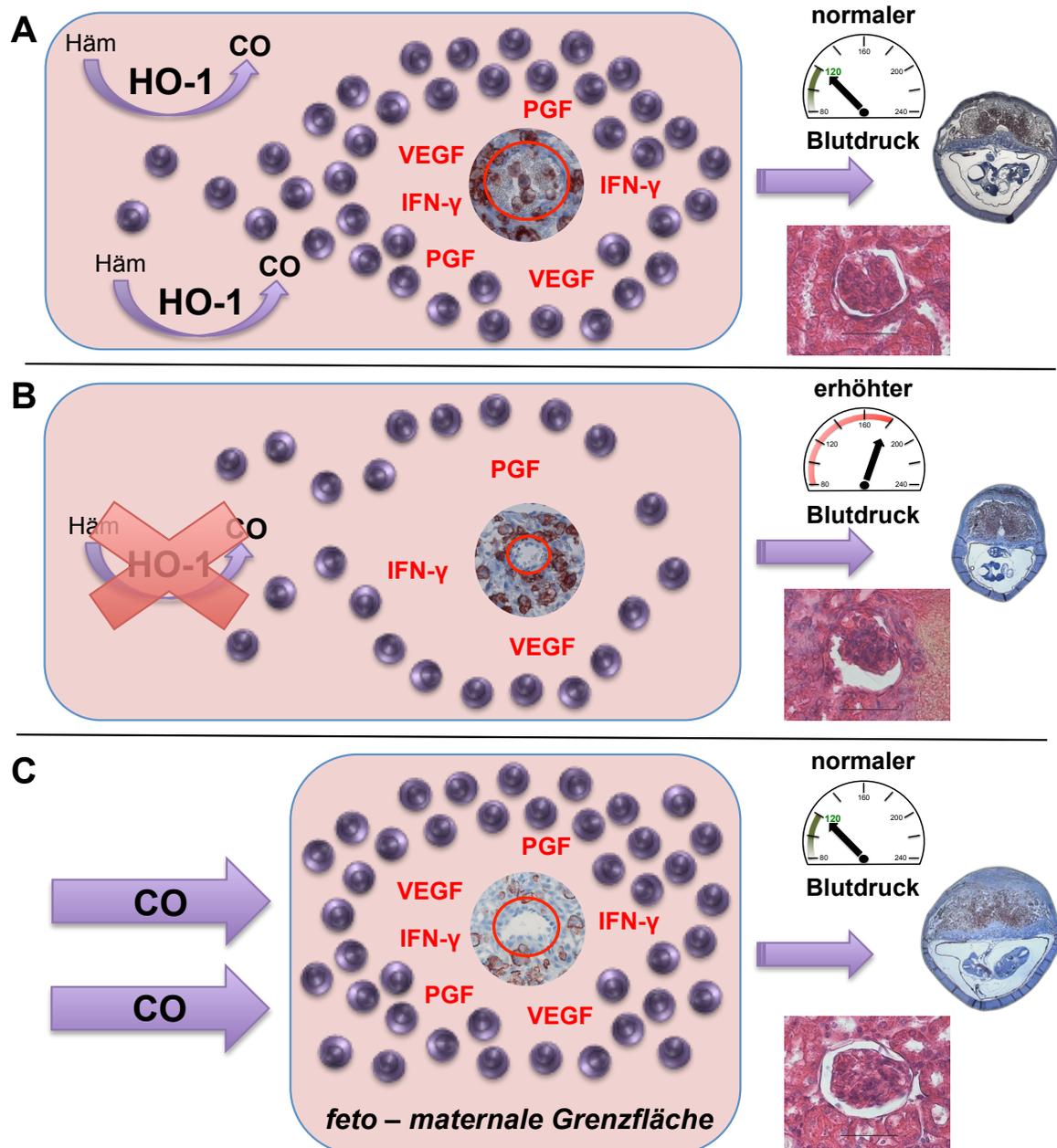


Abb. 51: Szenario für den Einfluss von HO-1 auf die Proliferation von uNK – Zellen und den Verlauf der Schwangerschaft. (A) Das adäquate Vorkommen von HO-1 und die resultierende Kohlenmonoxidproduktion während einer gesunden Schwangerschaft führen zu einer ausreichenden Anzahl an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche. Dies hat eine erfolgreiche Spiralarterienentwicklung, normalen Blutdruck und eine gesunde fötale Entwicklung zur Folge. (B) Kommt es hingegen zu einem Mangel an Kohlenmonoxid in HO-1 defizienten Tieren, verursacht dies eine Abnahme von uNK – Zellen, eine verschlechterte Spiralarterienentwicklung, Bluthochdruck und eine signifikante Wachstumsretardierung der Föten. (C) Die therapeutische Behandlung der HO-1 defizienten Tiere mit exogenen Kohlenmonoxid resultiert in einer erfolgreich verlaufenden Schwangerschaft mit einer normalen Spiralarterienentwicklung, einem Blutdruck im Normbereich und gesund entwickelten Föten.

Ich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit den Zusammenhang zwischen der HO-1 Expression an der feto – maternalen Grenzfläche und deren Auswirkungen auf die Plazentation und die Embryonalentwicklung näher veranschaulichen. Es konnte gezeigt werden, dass die HO-1 Defizienz bereits in der frühen Schwangerschaft eine Reihe an Ereignissen in Gang setzt, die teilweise von uNK – Zellen gesteuert werden und in der späten Schwangerschaft zum Ausbruch von präeklampsischen Symptomen führt. Zum ersten Mal konnte eine Beziehung zwischen zwei Hauptakteuren der Implantation und Plazentation während der Schwangerschaft, HO-1 und uNK – Zellen, näher beschrieben werden. Meine Arbeit erklärt darüber hinaus zum ersten Mal, welchen wichtigen Anteil endogenes Kohlenmonoxid für den Schwangerschaftserfolg hat und welche Mechanismen dem zu Grunde liegen.

5 Zusammenfassung

Der Erfolg einer Schwangerschaft ist maßgeblich von einer effizienten Implantation des Föten und einer anschließenden effektiven Plazentation abhängig. Störungen von dieser Art können zu zahlreichen Schwangerschaftskomplikationen, wie zum Beispiel Präeklampsie führen. Sowohl das Enzym HO-1 als auch die Population der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche haben nachweislich einen grundlegenden Anteil an einer erfolgreichen Implantation und Plazentation. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von HO-1 und seines Metaboliten Kohlenmonoxid auf die uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche zu untersuchen.

Erste Untersuchungen zeigten eine deutliche Abnahme der uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche von HO-1 defizienten Implantationen. Der signifikante Rückgang an uNK – Zellen an der feto – maternalen Grenzfläche ging einher mit einer eingeschränkten Entwicklung der Spiralarterien. Diese Anomalitäten in der Spiralarterienentwicklung führte zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung, bis hin zum Absterben der Föten. Ebenso entwickelten HO-1 defiziente Mütter im Verlauf der Schwangerschaft Bluthochdruck, welches zu Schädigungen der Nieren führte. Sowohl die Entwicklung von Bluthochdruck als auch die Schädigungen der Nieren während einer Schwangerschaft sind Symptome für die Entstehung einer Präeklampsie.

Viele der positiven Effekte von HO-1 beruhen auf die Wirkungsweise des Metaboliten Kohlenmonoxid. Die therapeutische Behandlung von HO-1 defizienten Mäusen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft führte zu der in situ Proliferation der uNK – Zellen. Darüber hinaus war eine erhebliche Verbesserung in der Spiralarterienentwicklung nach der Behandlung mit Kohlenmonoxid zu beobachten. Die Wiederherstellung der Spiralarterien hatte einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Schwangerschaft und verhinderte die Ausbildung von Wachstumsretardierungen. Gleichmaßen konnte die Behandlung von HO-1 defizienten Mäusen mit Kohlenmonoxid in der frühen Schwangerschaft die Entstehung von Bluthochdruck und das Auftreten von Nierenschädigungen unterbinden.

Die gewonnenen Daten in der vorliegenden Arbeit geben neue Einblicke in die Wirkungsweise von HO-1 an der feto – maternalen Grenzfläche. Der Mangel an HO-1 und das Fehlen von uNK – Zellen in der frühen Schwangerschaft führten deutlich zur Ausbildung präeklampsischer Symptome.

Zum ersten Mal konnte ein Bezug zwischen den wichtigsten Akteuren der Implantation und Plazentation, HO-1 und uNK – Zellen, aufgezeigt werden.

6 Summary

A successful pregnancy outcome depends substantially on an efficient implantation of the fetus and a subsequently effective placentation. Disturbances in these processes may lead to severe pregnancy complications, such as for example preeclampsia. Both, the enzyme Heme Oxygenase-1 (HO-1) and uterine natural killer (uNK) cells at the feto – maternal interface were proposed to contribute to successful implantation and placentation. The aim of my dissertation was to investigate whether HO-1 and its metabolite carbon monoxide influence uNK cells in their number and function and by doing so, contribute to pregnancy success.

The first results depict a clear reduction in the number of uNK cells at the feto – maternal interface of HO-1 deficient implantations. This went along with an suboptimal remodeling of spiral arteries that in turn impacted negatively on fetal growth leading to intrauterine growth restriction followed by death. Furthermore, HO-1 deficient mothers developed hypertension towards the end of gestation, which gave rise to renal damage. These two signs closely resemble the symptoms of human pre-eclampsia.

Positive HO-1 effects are due to its metabolite carbon monoxide. The therapeutic treatment of HO-1 deficient mice with carbon monoxide in early pregnancy provoked the in situ proliferation of uNK cells. The augmentation of the uNK cell number correlated with a normalization of spiral artery remodeling that in turn prevented both intrauterine growth restriction and fetal death. Likewise the treatment of HO-1 deficient mice with carbon monoxide in early pregnancy hindered the development of hypertension and prevented renal damage.

The data obtained in the present study offer new insights into the mechanisms underlying the protective effects of HO-1 during pregnancy. HO-1 had a positive effect on the proliferation of uNK cells, favouring the remodeling of spiral arteries and fostering fetal growth and well-being. CO application to HO-1 deficient mothers during pregnancy could positively influence uNK cell number and function, preventing the development of maternal hypertension and fetal growth retardation. Our work reveals important mechanisms underlying normal implantation and placentation, thus contributing to a successful pregnancy.

7 Literaturverzeichnis

Achen MG, Gad JM, Stacker SA, Wilks AF (1997): Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors*. 15:69–80.

Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, Bussolati B, St John J (2000): Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Mol. Med*. 6:391-409.

Akamatsu Y, Haga M, Tyagi S, Yamashita K, Graca-Souza AV, (2004): Hemeoxygenase-1 derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *FASEB J*. 18:771–772.

Alam J, Cai J, and Smith A (1914): Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5 sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J. Biol. Chem*. 269:1001–1009.

Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, Smith D (2002): Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 359:1877–1890.

Ashkar AA, di Santo JP, Croy BA (2000): Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *Journal of Experimental Medicine*. 192:259–270.

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

Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, Croy BA (2003): Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J. Immunol*. 171:2937-2944.

Bainbridge SA, Smith GN (2005): HO in pregnancy. *Free. Radial. Biol. and Med*. 38:979-988.

Bainbridge SA, Sidle EH, Smith GN (2005): Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: the specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta. *Med. Hypotheses*. 64:17-27.

Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, and Vercellotti GM (1992): Ferritin: a cytoprotective stratum of endothelium. *J. Biol. Chem*. 267:18148–18153.

- Baranano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, and Ferris CD(2000): A mammalian iron ATPase induced by iron. *J. Biol. Chem.* 275:15166 –15173.
- Barber A, Robson SC, Myatt L, Bulmer J, Lyall F (2001): Heme Oxygenase Expression in Human Placenta and Placental Bed: Reduced Expression of Placenta Endothelial HO-2 in Pre-Eclampsia and Fetal Growth Restriction. *FASEB J.* 15:1158-1168.
- Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J (1992): Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 22:1–6.
- Becker V (1981): Die Plazenta des Menschen. *Thieme Verlag.*
- Berezowsky J, Zbieranowski I, Demers J, Murray D (1995): DNA ploidy of hydatidiform moles and nonmolar conceptuses: a study using flow and tissue section image cytometry. *Mod. Pathol.* 8:775–781.
- Bernstein IM, Meyer MC, Osol G, Ward K (1998): Intolerance to volume expansion: a theorized mechanism for the development of preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 92:306-308.
- Bewley S, Cooper D, Campbell S (1991): Doppler investigation of utero-placental blood flow resistance in the second trimester: a screening study for pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 98:871-879.
- Bilban M, Bach FH, Otterbein SL, Ifedigbo E, deCostad'AvilaJ (2006): Carbonmonoxideorches- trates a protective response through PPARgamma. *Immunity* 24:601–610.
- 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(2):218-226.
- Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP (2000): Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 192:1015–1026.
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D (1991): Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum. Reprod.* 6:791–798.
- Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J (1990): Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity recep- tors. *J. Exp. Med.* 171:1509–1526.

- Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ (1993): Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J. Clin. Invest.* 91:123–132.
- Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ (1999): Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J. Clin. Invest.* 103:1641–1650.
- Carr DB, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR, Critchlow CW(2005): A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193:965–972.
- Charalambous F, Elia A, Georgiades P (2012): Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: investigation of associations with decidual uNK cells and invasive trophoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417:847-852.
- Chen Z, Zhang J, Hatta K, Lima PD, Yadi H, Colucci F, Yamada AT, Croy BA (2012): DBA-Lectin Reactivity Defines Mouse Uterine Natural Killer Cell Subsets with Biased Gene Expression. *Biol Reprod.* 87:81.
- Chin BY, Jiang G, Wegiel B, Wang HJ, Macdonald T (2007): Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:5109–5114.
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP (2003): What does it take to make a natural killer?. *Nat. Rev. Immunol.* 3:413–425.
- Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizán JM, Kafury-Goeta AC (1999): Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181:1026-1035.
- Converso DP, Taillé C, Carreras MC, Jaitovich A, Poderoso JJ, Boczkowski J (2006): HO-1 is located in liver mitochondria heme content and metabolism. *FASEB J.* 8:1236-1238.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001a): The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology.* 22:633–640.
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC (2001b): Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 97:3146–3151.
- Copp AJ (1979): Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the polar trophectoderm. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 51:109–120.
- Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C (2006): Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunological Reviews.* 214:161–185.

- von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM (2003): Subclassification of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*. 22:143–148.
- Das SK, Chakraborty I, Paria BC, Wang XN, Plowman G, Dey SK (1995): Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol. Endocrinol.* 9: 691–705.
- Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G (2007): The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 13:365-377.
- Drews U (1993): Taschenatlas der Embryologie. *Thieme Verlag*.
- Duckitt K, Harrington D (2005): Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 330:565.
- Dulak J, Józkwicz A, Foresti R, Kasza A, Frick M, Huk I, Green CJ, Pachinger O, Weidinger F, Motterlini R (2002): Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxid. Redox. Signal*. 4:229-240.
- Eisenstein RS, Garcia MD, Pettingell W, Munro HN (1991): Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:688–92.
- El-Mousleh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, Jensen F, Zenclussen AC (2012): Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy complications. *Med. Gas. Res.* 20:2(1)-4.
- England L, Zhang J (2007): Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. *Front. Biosci.* 12:2471-2483.
- Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, Varner MW (2001): Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 344:867–872.
- Fenton HJH (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65:899–910.
- Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP (2008): A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J. Mol. Med.* 86:1097-1111.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH (1999): Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat. Cell. Biol.* 1:152–157.
- Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E (2004): Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 40:1333–1341.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ (1998): IL-15, a novel cytokine produced by human

- fetal membranes, is elevated in preterm labor. *Am. J. Reprod. Immunol.* 39:16-23.
- Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y (2001) Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat. Med.* 7:598–604.
- 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.
- Guimond MJ, Wang B, Croy BA (1998): Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. *Journal of Experimental Medicine* 187:217–223.
- Hawrami K, Breuer J (1997): Analysis of United Kingdom wild-type strains of varicella-zoster virus: differentiation from the Oka vaccine strain. *J. Med. Virol.* 53:60-62.
- Hayakawa Y, Smyth MJ (2006): CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J. Immunol.* 176:1517–1524.
- Hearn JP (1986): The embryo-maternal dialogue during early pregnancy in primates. *J Reprod Fertil.* 76:809-819.
- 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.
- Ikawa T, Fujimoto S, Kawamoto H, Katsura Y, Yokota Y (2001): Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:5164–5169.
- Johnson PM, Wegman TG (1981): Placental immunology. *Am. J. Reprod. Immunol.* 3:46–70.
- Kapitulnik J, Maines MD. (2009): Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends Pharmacol. Sci.* 30:129–137.
- Kaufmann P, Burton G (1994): Anatomy and genesis of the placenta. *In The Physiology of Reproduction.* 2:441–484.
- Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM (2004): Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.* 10:1080-1089.
- Kim HP, Ryter SW, Choi AM (2006): CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:411–449.
- Kim KM, Pae HO, Zheng M, Park R, Kim YM, Chung HT (2007): Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ. Res.*

101:919–927

Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, Yokoyama WM (2002): In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* 3:523–528.

King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW (1989): Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum. Immunol.* 24:195–205.

Levytska K1, Kingdom J, Baczyk D, Drewlo S (2013): Heme oxygenase-1 in placental development and pathology. *Placenta.* 34:291-298.

Lin Q, Wels S, Yang G, Weng Y-H, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery PA (2007): Heme Oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 28:20621-20633.

MacAuley A, Cross JC, Werb Z (1998): Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol. Biol. Cell* 9:795–807.

Ma N, Ding X, Doi M, Izumi N, Semba R (2004): Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *J. Neurocytol.* 33:407–415.

Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK (1986): Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* 261:411-419.

Maines MD, Trakshel GM, and Kutty RK (1986): Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 261:411–419.

Maines MD (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2:2557-2568.

Maines MD (1992): Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions. *Boca. Raton.*

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2003): Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 111:649–658.

Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA (2005): Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr. Res.* 57:1–7.

McCoubrey WK and Maines MD (1994): The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* 139:155–161.

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD (1997a): Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and

binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J. Biol. Chem.* 272:12568–12574.

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD(1997b): Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 247:725–732.

Moffett A, Hiby SE (2007): How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta.* 28:51-56.

Montellano PR (2000): The Mechanism of Heme Oxygenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:221-227.

Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y, Kourembanas S (1997): Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272:32804–32809.

Morse D, Choi AM (2002): Heme Oxygenase-1: The "Emerging Molecule" Has Arrived. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1:8-16.

Müller-Deile J, Schiffer M (2014): Preeclampsia from a renal point of view: Insides into disease models, biomarkers and therapy. *World. J. Nephrol.* 3:169-181.

Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH (2009): Signaling by gasotransmitters. *Sci. Signal.* 2:re2.

Nagamatsu T, Schust DJ (2010): The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod. Sci.* 17:209-218.

Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH (1989): Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* 143:3183–3191.

Nagler A, Lanier LL, Phillips JH (1990): Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16- natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 171:1527–1533.

Nagy A: Manipulating the Mouse Embryo. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 3. Auflage.

Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L (2002): Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J. Cell. Mol. Sci.* 115:2559–2567.

Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M (2008): Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and 53 human resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 243:1381–1387.

Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM (1999): Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 276:688–694.

Otterbein LE, Choi AM (2000): Heme Oxygenase: Colors of Defense against Cellular Stress.

Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 279:1029-1037.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6:422–428.

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

Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, Chora A, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP, Mota MM (2007): Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat. Med.* 13:703-710.

Parham P (2004): NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J. Exp. Med.* 200:951-955.

Parr, M. B., and Parr, E. L. (1989): The implantation reaction. In *“The Uterus”* (R. M. Wynn and W. P. Jollie, Eds.) 233–277.

Perussia B, Chen Y, Loza MJ (2005): Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol. Immunol.* 42:385–395.

Piantadosi CA (2008): Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 45:562–569.

Psychoyos, A (1986). Uterine receptivity for implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 476, 36–42.

Poss KD, Tonegawa S (1997): Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10925–10930.

Robertson MJ, Ritz J (1990): Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76:2421–2438.

Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF (1992): Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* 175:779–88.

Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Di Santo JP (2001): Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 31:1900–1909.

Rossant J and James C (2001): Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2:538-548.

Rotenberg MO and Maines MD (1990): Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 265:7501–7506.

Rotenberg MO and Maines MD (1991): Characterization of a cDNA-encoding rabbit brain

heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? *Arch. Biochem. Biophys.* 290:336–344.

Ryter SW, Alam J, Choi AM (2006): Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* 86:583-650.

Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M (2005): Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289:1131–1137.

Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith NR, Brouard S (2001): Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse to rat cardiac transplants. *J. Immunol.* 166:4185–4194.

Shibahara S, Muller RM, Taguchi H, and Yoshida T (1985): Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7865–7869.

Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Dai G, Kamei T, Orwig KE (1996): Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta* 17:277–289.

Spornitz UM (1992): The functional morphology of the human endometrium and decidua. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 124:1-99.

Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y (2007): Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *Journal of Immunology.* 178:4267–4275.

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.

Teesalu T, Masson R, Basset P, Blasi F, Talarico D (1999): Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Dev. Dyn.* 214:248–258.

Tenhunen R, Marver H, and Schmid R (1969): Microsomal heme oxygenase, characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244:6388– 6394.

Trakshel GM and Maines MD (1989): Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *J. Biol. Chem.* 264:1323–1328.

Trinchieri G (1989): Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* 47:187–376.

Tuffnell DJ, Jankowicz D, Lindow SW, Lyons G, Mason GC, Russell IF, Walker JJ (2005): Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG* 112:875–880.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R,

- Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA (2006): Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12:642–649.
- Vuorela, P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmäki E (1997): Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol. Reprod.* 56:489–494.
- Wagner C, Hinder M, Kramer BK, Kurtz A (1999): Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 34:1101-1105.
- Waldmann TA, Tagaya Y (1999): The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 17:19-49.
- Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ (2000): Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J.* 14:1289–1296.
- Wang C, Umesaki N, Nakamura H (2000): Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell and Tissue Research.* 300:285-293.
- Wang H, Dey SK (2006): Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 7:185-199.
- Weis N, Weigert A, von Knethen A, Brüne B (2009): Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol. Biol. Cell.* 20:1280-1288.
- Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC (2009): Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. *Reproduction.* 138:177-184.
- Wolpert L (1999): Lehrbuch der Entwicklungsbiologie. *Spektrum Verlag.*
- World Health Organization (2005): World Health Report: Make Every Mother, and Child Count. *Geneva: World Health Org.*
- Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM (2003): Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 126:569-577.
- Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, Tsui TY, Berberat PO (2004): Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J.* 18:765–767.
- Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S,

- Tsutsumi Y (2011): Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.* 6:321-328.
- Ye W, Zheng LM, Young JD, Liu CC (1996): The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J. Exp. Med.* 184:2405-2410.
- Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K (1999): Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J. Clin. Invest.* 103:R23–29.
- Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC. (2003): Heme Oxygenases in Pregnancy II: HO-2 Is Downregulated in Human Pathologic Pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50:66-76.
- Zenclussen AC, Sollwedel A, Zambon Bertoja A, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C, Volk HD (2005): Heme Oxygenase as a Therapeutic Target in Immunological Pregnancy Complications. *Int. Immunopharmacol.* 5:41-51.
- 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, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA, Zenclussen AC (2012): Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *Am. J. Reprod. Immunol.* 67:376-382.
- Zenclussen ML, Casalis PA, Jensen F, Woidacki K, Zenclussen AC (2014): Hormonal Fluctuations during the Estrous Cycle Modulate Heme Oxygenase-1 Expression in the Uterus. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 13:5-32.
- Zhai D, Guo Y, Smith G, Krewski D, Walker M, Wen SW (2012): Maternal exposure to moderate ambient carbon monoxide is associated with decreased risk of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 207:1-9
- Zhang J, Villar J, Sun W, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Mathai M, Ali M, Yu KF, Zavaleta N, Purwar M, Nguyen TN, Campodonico L, Landoulsi S, Lindheimer M, Carroli G (2007): Blood pressure dynamics during pregnancy and spontaneous preterm birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197:e161–e166.
- Zhang J, Tian Z (2007): UNK cells: their role in tissue re-modelling and preeclampsia. *Semin. Immunopathol.* 29:123-133.
- Zhao GQ1, Garbers DL (2002): Male germ cell specification and differentiation. *Dev. Cell.* 2:537-47.

Zhao H, Azuma J, Kalish F, Wong RJ, Stevenson DK (2011): Maternal heme oxygenase 1 regulates placental vasculature development via angiogenic factors in mice. *Biol. Reprod.* 85:1005-1012.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate (1997a): A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 99:2139–2151.

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ (1997b): Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J. Clin. Invest.* 99:2152–2164.

Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ (2002): Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am. J. Pathol.* 160:1405–1423.

Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, de Costa d'Avila J, Rao J (2007): Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J.* 21:1099–1106.

Zybina, E. V. and Zybina, T. G. (1996): Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int. Rev. Cytol.* 165:53–119.

8 Danksagung

Bei Frau Prof. Ana C. Zenclussen bedanke ich mich für die stetige und umfassende Unterstützung bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit im Team ihrer Abteilung für experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe.

Bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit hatte ich die Möglichkeit, von ihr die Grundsätze wissenschaftlicher Arbeit zu erlernen und moderne Techniken in der Laborarbeit anzuwenden. Frau Prof. Ana C. Zenclussen ist eine Betreuerin, die ihren Mitarbeitern viele Möglichkeiten bietet und sie im besten Sinne fördert und fordert.

Vielen Dank Ana.

Das größte Dankeschön geht an meine Eltern. Nicht nur im Rahmen der Arbeit waren sie immer an meiner Seite und stets eine große Stütze in meinem Leben. Dabei ermöglichten sie mir viele Dinge, die so nicht für viele selbstverständlich sind. Sie bestärkten mich jederzeit darin, mit mehr Selbstbewusstsein an meine Arbeit heranzugehen, motivierten mich damit und gaben mir immer wieder neuen Mut.

Danke Mama und Papa, ich liebe euch sehr.

Ein großes Dankeschön geht an meinen geliebten Mann, der bereits seit vielen Jahren an meiner Seite steht. Ein Mensch der mich so akzeptiert wie ich bin und mir somit viel Kraft gibt.

Danke Sandy,

ich freue mich mit unserer, über alles geliebten Tochter Charlie auf
die gemeinsame Zukunft.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen für die moralische Unterstützung und die schöne Zeit im Labor bedanken. Insbesondere zwei Menschen durfte ich in diesem Zusammenhang näher kennen und schätzen lernen, Anne Schumacher und Stefanie Langwisch. Eine tiefe Freundschaft verbindet uns bis heute.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

„Die regulatorische Funktion von HO-1 auf uterine NK Zellen an der feto-maternalen Grenzfläche“

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.

Mittenwalde, den 21.Juni 2016

Nadja Linzke

10 Publikationen

Zenclussen ML, **Linzke N**, Schumacher A, Fest S, Meyer N, Casalis PA, Zenclussen AC (2015): Heme oxygenase-1 is critically involved in placentation, spiral artery remodeling, and blood pressure regulation during murine pregnancy. *Front Pharmacol.* 5:291.

Linzke N, Schumacher A, Woidacki K, Croy BA, Zenclussen AC (2014): Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. *Hypertension* 63:580-588.

Teles A, Schumacher A, Kühnle MC, **Linzke N**, Thuere C, Reichardt P, Tadokoro CE, Hämmerling GJ, Zenclussen AC (2013): Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Front Immunol.* 4:158.

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.* 190:2650-2658.

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.* 4:e462.

Schumacher A, Wafula PO, Teles A, El-Mousleh T, **Linzke N**, Zenclussen ML, Langwisch S, Heinze K, Wollenberg I, Casalis PA, Volk HD, Fest S, Zenclussen AC (2012): Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. *PLoS One.* 7(8):42301.

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(2):293-304.

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 Mol. Biol.* 677:397-417.

Anne Schumacher, **Nadja Brachwitz**, Sindy Sohr, Kurt Engeland, Stefanie Langwisch, Maria Dolaptchieva, Alexander T, André Taran, Sara Fill Malfertheiner, Serban d. Costa, Zimmermann G, Nitschke C, Hans D. Volk, Alexander H, Matthias Gunzer, Zenclussen AC (2009): Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *Immunol.* 182:5488-5497.

Stefan Fest, **Nadja Brachwitz**, Anne Schumacher, Maria L. Zenclussen, Faisal Khan, Paul O. Wafula, Pablo A. Casalis, Sara Fill, Serban-Dan Costa, Gil Mor, Hans D. Volk, Holger N. Lode und Ana C. Zenclussen (2008): Supporting the hypothesis of pregnancy as a tumor: survivin is upregulated in normal pregnant mice and participates in human trophoblast proliferation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59:75-83