

**Die Beteiligung
von uterinen Mastzellen und uterinen Natürlichen Killerzellen
an einer erfolgreichen Schwangerschaft und
einer gesunden Entwicklung des Fetus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

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

von: Dipl.-Biol. Nicole Meyer

geb. am: 03.05.1988 in Stendal

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ana Claudia Zenclussen
Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gunzer

eingereicht am: 21.06.2016

verteidigt am: 16.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Maus als Modellorganismus für immunologische Untersuchungen	1
1.2 Die Schwangerschaft.....	1
1.2.1 Stationen eines entstehenden Lebens	1
1.2.2 Die Plazenta.....	3
1.2.3 Spiralarterien	5
1.3 Schwangerschaftspathologien	7
1.4 Immunzellen und ihre Bedeutung in der Schwangerschaft.....	8
1.4.1 Natürliche Killerzellen	9
1.4.1.1 Eigenschaften und Funktionen	9
1.4.1.2 Subpopulationen.....	10
1.4.1.2.1 Uterine Natürliche Killerzellen	11
1.4.1.3 Modelle zur Untersuchung der Funktion Natürlicher Killerzellen	12
1.4.1.3.1 IL-15-defizientes Mausmodell	12
1.4.1.3.2 Anti-CD122 und anti-asialo GM1- Antikörper zur Depletion von Natürlichen Killerzellen	13
1.4.2 Mastzellen	13
1.4.2.1 Eigenschaften und Funktionen	13
1.4.2.2 Subpopulationen.....	15
1.4.2.2.1 Uterine Mastzellen	16
1.4.2.3 Mastzellchymasen	16
1.4.2.4 Untersuchung der Funktion von Mastzellen in vivo	18
1.4.2.4.1 Kit-abhängige Mausmodelle	18
1.4.2.4.2 Kit-unabhängige Mausmodelle	18

1.4.2.5 Untersuchung der Funktion von Mastzellen in vitro.....	19
1.5 Zielstellung.....	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Chemikalien und Lösungen.....	27
2.1.4 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren, biologisch aktive Substanzen	30
2.1.5 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Medienzusammensetzung.....	30
2.1.6 Pufferlösungen	32
2.1.7 Kitsysteme.....	34
2.1.8 Antikörper	34
2.1.9 Primer.....	36
2.1.10 Computerprogramme	36
2.1.11 Zelllinien	37
2.1.12 Mausstämme.....	37
2.2 Methoden.....	39
2.2.1 Tierexperimentelle Methoden	39
2.2.1.1 Tierhaltung	39
2.2.1.2 Verpaarung.....	39
2.2.1.3 Anästhesie und Blutentnahme.....	41
2.2.1.4 Präparation, Probengewinnung, Bestimmung von Implantations-/ Abortrate .	41
2.2.1.5 Depletion von Natürlichen Killerzellen in vivo mittels Antikörper-Behandlung	43
2.2.1.5.1 Anti-asialo GM1 Behandlung	43
2.2.1.5.2 Anti-CD122 Behandlung.....	44
2.2.1.6 Blutdruckmessung.....	46
2.2.1.7 Gewichtsmessung.....	46

2.2.2 Durchflusszytometrie	46
2.2.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus Blut und verschiedenen Geweben	47
2.2.2.2 Markierung von Zelloberflächenmarkern mittels Antikörpern	48
2.2.2.3 Auswertung durchflusszytometrischer Daten	49
2.2.3 Histologie	49
2.2.3.1 Fixierung von Gewebe	49
2.2.3.2 Paraffineinbettung	50
2.2.3.3 Schnittpräparation	50
2.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	50
2.2.3.4.1 Spiralarterienanalyse	51
2.2.3.5 Toluidinblau-Färbung und Mastzellauszählung	53
2.2.3.6 Dolichos Biflorus Agglutinin Lektin-Färbung	53
2.2.4 Immunhistochemie	54
2.2.4.1 Immunfluoreszenz	55
2.2.5 Molekularbiologische Methoden	55
2.2.5.1 Isolation von RNA	55
2.2.5.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	56
2.2.5.3 Synthese von komplementärer DNA	56
2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion	57
2.2.5.4.1 Echtzeit (real-time) PCR mit der SYBR Green Methode	57
2.2.5.4.2 Auswertung der real-time PCR-Expressionsanalysen	58
2.2.5.5 Isolation von Proteinen	59
2.2.5.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	59
2.2.5.7 Western Blot	60
2.2.5.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
2.2.5.7.2 Blotting	61
2.2.5.7.3 Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine	62
2.2.6 Zellkulturtechniken	62

2.2.6.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	62
2.2.6.2 Kultivierung und Subkultivierung von Zelllinien	63
2.2.6.3 Zellzahlbestimmung	64
2.2.6.4 Kokultur uteriner glatter Muskelzellen mit der MC/9-Mastzelllinie	64
2.2.6.5 Apoptosedetektion mittels Annexin V- Färbung	66
2.2.7 Statistik.....	66
3 Ergebnisse	68
3.1 Untersuchung der Gegenregulation uteriner Natürlicher Killerzellen und uteriner Mastzellen	68
3.1.1 IL-15-Defizienz führt zu einer drastischen Reduktion peripherer und zum Verlust uteriner Natürlicher Killerzellen	68
3.1.2 IL-15-defiziente Mäuse zeigen eine vergleichbare Implantations- und Abortrate zur Kontrollgruppe	70
3.1.3 Eingeschränkte Umwandlung der Spiralarterien in IL-15-defizienten, trächtigen Mäusen	71
3.1.4 IL-15-defiziente Mäuse entwickeln keinen Bluthochdruck während der Schwangerschaft.....	72
3.1.5 Der Feto-Plazentare Index ist in Mäusen von IL-15-defizienten Müttern signifikant geringer als in der Kontrollgruppe	73
3.1.6 Erhöhte Anzahl an uterinen Mastzellen in IL-15-defizienten Mäusen	74
3.1.7 Erhöhte Expression der Mastzellproteasen 1 und 6 in IL15-defizienten Weibchen	76
3.2 Etablierung eines Mausmodelles mit Doppeldefizienz für Natürliche Killerzellen und Mastzellen	78
3.2.1 Anti-asialo GM1 depletiert periphere, jedoch keine uterinen Natürlichen Killerzellen in vivo.....	78
3.2.2 Anti- CD122 depletiert periphere und uterine Natürliche Killerzellen in vivo.....	80
3.2.3 Cpa3 ^{Cre/+} besitzen im Vergleich zu Cpa3 ^{+/+} Mäusen keine uterinen Mastzellen	82
3.2.4 Anti-CD122 depletiert periphere und uterine Natürliche Killerzellen in Cpa3 ^{+/+} und Cpa3 ^{Cre/+} Mäusen.....	83

3.3 Analyse schwangerschaftsspezifischer Parameter in Mäusen, die defizient für Natürliche Killerzellen und Mastzellen sind.....	86
3.3.1 Die Abwesenheit von Natürlichen Killerzellen und Mastzellen hat keinen Einfluss auf die Implantationsrate.....	86
3.3.2 Die Abwesenheit Natürlicher Killerzellen und Mastzellen ist mit einer stark eingeschränkten Umwandlung der Spiralarterien assoziiert.....	86
3.3.3 Mäuse ohne Natürliche Killerzellen und Mastzellen entwickeln keinen Bluthochdruck während der Trächtigkeit.....	89
3.3.4 Feten deren Mütter Mastzell- oder Mastzell/Natürliche Killerzellen-defizient sind, weisen am Gestationstag 18 einen reduzierten Feto-Plazentaren Index auf und sind wachstumsretardiert.....	90
3.3.5 Nachkommen von Mäusen ohne Mastzellen haben bei der Geburt ein zu geringes Gewicht, dieser Phänotyp verschlechtert sich noch mehr nach NK-Depletion.....	92
3.3.6 Die mRNA- und Proteinexpression der Mastzellprotease 5 ist in Deziduaprobe von Mastzell- sowie Mastzell/Natürlichen Killerzell-defizienten Mäusen signifikant verringert.....	94
3.3.7 Natürlichen Killerzellen exprimieren die Mastzellprotease 5.....	96
3.3.8 Mastzellen exprimieren die Mastzellprotease 5.....	98
3.4 Untersuchung des Einflusses Mastzellprotease 5-exprimierender Zellen auf schwangerschaftsrelevante Prozesse.....	99
3.4.1 Mastzellprotease 5-exprimierende MC/9 Zellen induzieren Apoptose in uterinen glatten Muskelzellen.....	99
3.4.2 Der Verlust Mcpt5-exprimierender Zellen hat keinen Einfluss auf die Implantations- und Abortrate in Mäusen.....	100
3.4.3 Mcpt5-exprimierende Zellen sind notwendig für die Modifikation der Spiralarterien.....	101
3.4.4 Die mRNA Expression der Matrix Metalloprotease 9 ist signifikant verringert in Deziduaprobe von Mäusen ohne Mcpt5-exprimierende Zellen.....	102
3.4.5 Der Verlust Mcpt5-exprimierender Zellen in Muttertieren ist mit einem zu geringeren Geburtsgewicht der Nachkommen assoziiert.....	103

4 Diskussion	105
4.1 Die Rolle von uterinen Natürlichen Killerzellen und uterinen Mastzellen während der Schwangerschaft.....	105
4.2 Natürliche Killerzell-defiziente IL-15 ^{-/-} Mäuse zeigen Einschränkungen bei der Spiralarterienumwandlung sowie ein erhöhtes Plazentagewicht	107
4.3 Natürliche Killerzell-defiziente IL-15 ^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl an uterinen Mastzellen auf	109
4.4 Reproduktionsmerkmale von weiblichen Mäusen, die weder Natürliche Killerzellen noch Mastzellen besitzen	110
4.4.1 Die gleichzeitige Abwesenheit von Natürlichen Killerzellen und Mastzellen führt zu einer dramatischen Verschlechterung der Umwandlung von Spiralarterien	111
4.4.2 Die Abwesenheit von Mastzellen, jedoch nicht von Natürlichen Killerzellen führt zu einer suboptimalen fetalen Entwicklung; beim Fehlen beider Zelltypen kann eine dramatische Wachstumsretardierung und ein zu geringes Geburtsgewicht beobachtet werden	113
4.5 Die Mastzellprotease 5 fungiert als Mediator von uterinen Mastzellen und uterinen Natürlichen Killerzellen	115
4.6 Mastzellprotease 5-positive Zellen beeinflussen die Schwangerschaft und die fetale Entwicklung positiv.....	116
4.7 Neue Erkenntnisse der Rolle uteriner Natürlicher Killerzellen und uteriner Mastzellen im Rahmen einer erfolgreichen Schwangerschaft.....	121
5 Zusammenfassung.....	123
6 Summary	124
7 Literaturverzeichnis.....	125
8 Abbildungsverzeichnis	141
9 Tabellenverzeichnis.....	144
Selbstständigkeitserklärung	145
Danksagung.....	146

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BMMC	„bone marrow-derived mast cell“; Knochenmark-abgeleitete Mastzelle
BSA	„bovine serum albumin“; Rinderserumalbumin
CD	„cluster of differentiation“; Differenzierungscluster
cDNA	„complementary DNA“; komplementäre DNA
Cma1	humane α -Chymase
Cpa3	Carboxypeptidase A3
Cpa3 ^{+/+}	C57BL/6J-Cpa3 ^{+/+} (Mausstamm)
Cpa3 ^{Cre/+}	C57BL/6J-Cpa3 ^{Cre/+} (Mausstamm)
CTMC	„connective tissue type mast cell“; Bindegewebs-Mastzelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBA	Dolichos biflorus agglutinin
DC	„dendritic cell“; Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
FBS	„fetal bovine serum“; Fetales Kälberserum
Fc	„fragmentcrystallizable“; kristallisierbares Fragment der Antikörper
Fc ϵ RI	Fc Epsilon Rezeptor I
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPI	Feto-Plazentarer Index
gd	„gestation day“; Gestationstag
GM-CSF	Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-15 ^{-/-}	C57BL/6NTac-IL15 ^{tm1Imx} N5 (Mausstamm)
i.p.	intraperitoneal
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung
LK	Lymphknoten
MC	„mast cell“; Mastzelle
Mcpt	„mast cell protease“; Mastzellprotease
Mcpt5-Cre ⁻ R-DTA ⁺	C57BL/6J-Mcpt5-Cre ⁻ R-DTA ⁺ (Mausstamm)
Mcpt5-Cre ⁺ R-DTA ⁺	C57BL/6J-Mcpt5-Cre ⁺ R-DTA ⁺ (Mausstamm)
MLAp	„mesenterial lymphoid aggregate of pregnancy“; Struktur an der Kontaktstelle zwischen Uterus und Dezidua
MMC	„mucosal type mast cell“; Mukosa-Mastzelle
MMP	Matrix-Metalloprotease
NK	Natürliche Killerzelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PCMC	„peritoneal mast cell“; peritoneale Mastzelle
PFA	Paraformaldehyd
pNK	„peripheral natural killer cell“; periphere Natürliche Killerzelle
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
SA	Spiralarterie

SCF	„stem cell factor“ ; Stammzellfaktor
SDS	„sodiumdodecylsulfate“ ; Natriumdodecylsulfat
SM	„smooth muscle cell“; glatte Muskelzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
ü. N.	über Nacht
uMC	„uterine mast cell“; uterine Mastzelle
uNK	„uterine natural killer cell“; uterine Natürliche Killerzelle
WT	Wildtyp
W-sh	C57BL/6J-Kit ^{W-sh/W-sh} (Mausstamm)

1 Einleitung

1.1 Die Maus als Modellorganismus für immunologische Untersuchungen

Die forschungsbezogene Suche nach neuen Erkenntnissen wird im Fachgebiet der Biologie durch die Verwendung verschiedener Modellorganismen erleichtert. Die Maus (*Mus musculus*) eignet sich in vielerlei Hinsicht als Modellorganismus. Mit einer Körperlänge von etwa 7-10 cm und einem Gewicht von 18-25 g haben Mäuse ein geringes Körpervolumen, benötigen daher nur wenig Platz und Nahrung. Ihre Haltung ist im Vergleich zu anderen Spezies unkompliziert und kostengünstig. Mäuse zeichnen sich zudem durch eine kurze Generationszeit aus. Mit einer Tragezeit von 18-21 Tagen und Wurfgrößen von etwa 3-11 Nachkommen, können sie in großer Anzahl gezüchtet werden. Ebenso wie der Mensch, ist auch die Maus ein Säugetier. Daher weisen beide Organismen grundlegende anatomische und physiologische Gemeinsamkeiten auf. Die Genome von Mensch^{1,2} und Maus sind vollständig sequenziert und besitzen viele orthologe Sequenzen und Gene³. Von großer Bedeutung sind die bereits etablierten Techniken zur gezielten Manipulation des Mausgenoms, welche die Analyse der Funktion einzelner Gene, Mediatoren und Zellen zu bestimmten Zeitpunkten ermöglichen. Insbesondere auf dem Gebiet der Immunologie führte die Verwendung von Mausmodellen in der Vergangenheit zu bahnbrechenden Erkenntnissen³, da es eine Vielzahl immunologischer Gemeinsamkeiten zwischen beiden Organismen gibt. Des Weiteren stehen zahlreiche Mausmodelle für humane Erkrankungen zur Verfügung, welche einerseits genutzt werden, um Therapien zu entwickeln und andererseits, um die entsprechende Therapieeffizienz zu bewerten⁴. Versuche mit transgenen Mauslinien tragen dazu bei, die grundlegenden Mechanismen der Schwangerschaft besser zu erforschen.

1.2 Die Schwangerschaft

1.2.1 Stationen eines entstehenden Lebens

Eine Schwangerschaft ist ein hochregulierter, komplexer Mechanismus, der die Existenz unserer eigenen und die Existenz anderer Spezies sichert. Voraussetzung ist neben der Spermatogenese im männlichen Geschlecht, die zyklische Reifung und Ovulation von Eizellen und die zeitgleich auftretenden Veränderungen der Uterusschleimhaut im weiblichen Geschlecht. Diese werden im Menschen als Menstruationszyklus und in der Maus als Östruszyklus bezeichnet. Sowohl die Zyklen in Mensch und Maus, als auch die verschiedenen

Phasen der Schwangerschaft, werden durch die zeitlich abgestimmte Balance der Sexualhormone Östrogen und Progesteron reguliert ^{5,6}. Eine Schwangerschaft kann in die Prozesse Befruchtung, Implantation, Dezidualisierung, Plazentation und Geburt unterteilt werden. Die Befruchtung, die noch im Eileiter stattfindet, bezeichnet die Vereinigung eines Spermiums und einer Eizelle und deren damit verbundene Aktivierung. Die befruchtete Eizelle entwickelt sich durch die Aufeinanderfolge mehrerer Zellteilungen, die als Furchungsteilungen bezeichnet werden, zur Morula, gelangt in den Uterus und differenziert sich anschließend zur Blastozyste. Die Blastozyste besteht aus einem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Blastozoel) und zwei Zellpopulationen: Der inneren Zellmasse und den als Trophoectoderm bezeichneten Zellen, die die innere Zellmasse sowie das Blastozoel umgeben und Vorläufer der Trophoblastenzellen darstellen. Der Embryo wird später von der inneren Zellmasse, fetale Teile der Plazenta vom Trophoectoderm gebildet ⁷. Die Zona pellucida ermöglicht es dem sich entwickelnden Embryo durch den Eileiter in den Uterus zu gelangen, ohne sich zuvor am Gewebe anzuheften. Erst nach Entfernung der Zona pellucida ist die Implantation möglich ⁸. Das Zeitfenster, in dem die Implantation stattfinden kann, ist sehr klein. Reifegrad der Blastozyste und Rezeptivität des mütterlichen Uterus müssen dabei zeitlich zusammentreffen. Die Interaktion zwischen Blastozyste und dem mütterlichen, uterinen Epithel leitet den Implantationsprozess ein ⁹. Während die innere Zellmasse der Blastozyste bei der Maus mesometrial orientiert ist, hat sie im Menschen eine antimesometriale Orientierung. Die Implantation beginnt in der Maus am 4., im Menschen am 8. Gestationstag und wird in drei Stadien unterteilt. Die Annäherung des embryonalen Trophoectoderms an das uterine, lumenale Epithel wird als Apposition bezeichnet. Die anschließende Adhäsion kennzeichnet eine sehr enge Verbindung zwischen Blastozyste und lumenalem Epithel. Dringt das Trophoectoderm in das mütterliche Epithel ein, ist das Stadium der Penetration erreicht ^{8,10}. Mit der Implantation werden auch die Dezidualisierung und die Plazentation eingeleitet. Während der Dezidualisierung differenziert sich das Endometrium in die Dezidua. Stromazellen, die die implantierende Blastozyste umgeben, proliferieren sehr stark und differenzieren sich in spezialisierte Zelltypen, diese werden Deziduazellen genannt ¹¹. Die der inneren Zellmasse gegenüberliegenden Trophoectodermzellen der Blastozyste entwickeln sich zu mehrkernigen Trophoblasten-Riesenzellen. Im Menschen entspricht das dem Zytotrophoblasten. Polyploidie erreichen die Zellen durch Replikation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) trotz angehaltener Zellteilung. Die mehrkernige Struktur wird als Synzythiotrophoblast bezeichnet. Trophoectodermzellen im Bereich der inneren Zellmasse proliferieren und bilden das extraembryonale Ektoderm, aus welchem das Chorionepithel

entsteht. Dieses wird von einer Schicht aus mesenchymalen Zellen begrenzt. In der Maus treten am Gestationstag 8,5 das Chorion und Allantois, die den Ursprung der Nabelschnur bildet, in Kontakt. Einige Stunden später entstehen durch die Faltung des Chorion Bereiche, an denen fetale Blutgefäße in Form von Zotten aus der Allantois ins mütterliche Gewebe einwachsen, sich intensiv versprossen und eine Labyrinthstruktur entwickeln^{12,13}. Beim Menschen dringt der Synzytiotrophoblast durch Auflösung des Epithels mit Hilfe proteolytischer Enzyme im mütterlichen Gewebe vor. Es entwickeln sich Primärzotten, die im Inneren aus dem Zytotrophoblasten und einer äußeren Schicht Synzytiotrophoblast bestehen. Die Differenzierung in Sekundärzotten ist durch das Eindringen von mesenchymalem Gewebe gekennzeichnet. Durch das Einwachsen fetaler Blutgefäße differenzieren sich die Sekundär- zu Tertiärzotten (Villi), die sich stark verzweigen und in direktem Kontakt mit dem im intervillösen Raum zirkulierenden, mütterlichen Blut stehen¹⁴. Ebenfalls wird die Modifikation der uterinen Spiralarterien (SA) eingeleitet. Trophoblastenzellen dringen dabei in die uterinen, mütterlichen Blutgefäße ein, zerstören endotheliale Zellen und teilweise auch die Muskelschicht der SAs. Das invasive Potential der Trophoblasten unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Spezies sehr stark. Durch die Erweiterung der Gefäße wird der Blutfluss zur fetoplazentaren Einheit erhöht¹⁵. Während der Implantation, der Dezidualisierung und der Plazentation sind Gewebeumwandlung und Angiogenese von enormer Bedeutung. Die Entwicklung der Organe findet während der Organogenese in der Maus zwischen Gestationstag 8 und 14 und im Menschen zwischen der 3. - 8. Schwangerschaftswoche statt. Im Anschluss an die Organogenese beginnt die Fetalentwicklung, die mit der Geburt endet¹⁶. Bei der Geburt verlassen sowohl der Fetus als auch die Plazenta den mütterlichen Uterus. Die Geburt kennzeichnet zugleich das Ende der Schwangerschaft und den Beginn neuen Lebens außerhalb des Uterus.

1.2.2 Die Plazenta

Bei einer uneingeschränkten Funktion ermöglicht die Plazenta einen optimalen Austausch von Nährstoffen, Gasen und Abfallprodukten zwischen fetalem und mütterlichem Blut. Dieser Stoffaustausch ist essentiell für das Überleben, die Entwicklung und das Wachstum des Fetus. Auch aufgrund ihrer immunologischen Funktion und der Hormonsynthese ist die Plazenta von enormer Bedeutung¹². Verschiedene Spezies weisen unterschiedliche Plazentastrukturen auf, die nach Grosser (1919) unterteilt wurden (siehe Tabelle 1). Die Klassifizierung basiert auf der äußeren Form der Plazenta sowie auf der Anzahl der Gewebeschichten, die das

mütterliche und das fetale vaskuläre System voneinander trennen. Im Laufe der Evolution wurden die mütterlichen Gewebsschichten zur Eindämmung der Diffusionsbarriere unterschiedlich weit abgebaut, während die fetalen vollständig erhalten blieben¹⁷.

Tabelle 1: Verschiedene Plazentatypen. Dargestellt sind die verschiedenen Plazentatypen unter Abgabe des Vorkommens in der jeweiligen Spezies sowie die mütterlichen Gewebsschichten, die das mütterliche von dem fetalen Blut trennen.

Plazentatyp	Vorkommen/ Spezies	Mütterliche Gewebsschichten
Epitheliochoriale Plazenta	z. B. Pferd, Schwein	Uterusepithel Bindegewebe/ Dezidua Endothel
Syndesmo-choriale Plazenta	z. B. Rind, Schaf, Ziege	Bindegewebe/ Dezidua Endothel
Endotheliochoriale Plazenta	z. B. Hund, Katze, Elefant	Endothel
Hämochoriale Plazenta	z. B. Mensch, Nagetier	-

Sowohl Maus als auch Mensch werden dem hämochorialen Plazentationstyp (*Placenta haemochorialis*) zugeordnet, der durch einen direkten Kontakt der Trophoblasten mit dem mütterlichem Blut charakterisiert ist. Des Weiteren gehören die Plazenten beider Spezies dem chorio-allantoiden Plazentatyp an. Sowohl Maus als auch Mensch besitzen außerdem eine *deziduate* Plazenta. Diese ist gekennzeichnet durch das enge Verwachsen der fetalen und maternalen Bestandteile. Bei der Geburt werden nicht nur fetale, sondern auch maternale Gewebsbestandteile abgestoßen. Maus und Mensch besitzen eine *discoidale* Plazenta (*Placenta discoidalis*). Die Plazenten weisen eine runde Form auf, mit einer flachen, zum Fetus gerichteten Seite, auf welcher sich die aus Arterien und Venen bestehende Nabelschnur befindet. Die gegenüberliegende Seite der Plazenta ist zur uterinen Wand gerichtet¹⁸. Sowohl die humane, als auch die murine Plazenta lässt sich in drei Schichten einteilen. Die in der Maus als „Labyrinth“ und im Menschen als „fetaler Teil der Plazenta“ bezeichnete Region enthält fetale und mütterliche Blutkanäle, in denen das jeweilige Blut zirkuliert (siehe Abbildung 1). In dieser Region, findet der Stoffaustausch statt. Die zweite, angrenzende Region, die nur von mütterlichen, jedoch nicht von fetalen Blutkanälen durchzogen ist, wird in der Maus als „junktionale Zone“ bzw. „Spongiotrophoblastzone“ und im Menschen als „Basalplatte“ bezeichnet. Die mütterlichen Blutkanäle sind von fetalen Trophoblasten ausgekleidet und transportieren mütterliches Blut in die Labyrinthzone bzw. den fetalen Teil der Plazenta hinein- und hinaus. Die dritte, sich anschließende Region ist das mütterliche,

uterine Gewebe, bestehend aus *decidua basalis* (Region des dezidualisierten mütterlichen Gewebes) und dem Myometrium. Im Menschen wird diese Region auch als „Plazentabett“ bezeichnet. Durch die darin platzierten mütterliche Arterien und Venen, die zur junktionalen Zone bzw. zur Basalplatte reichen, fließt mütterliches Blut in und aus dem intravillösen Raum. Die *decidua basalis* bzw. das Plazentabett wird von Trophoblasten, in Abhängigkeit von der Spezies, unterschiedlich weit invadiert. Im Vergleich zur Maus, bei welcher die eindringenden Trophoblasten bis in die *decidua basalis* gelangen, invadieren menschliche Trophoblasten sogar bis in das Myometrium¹⁸.

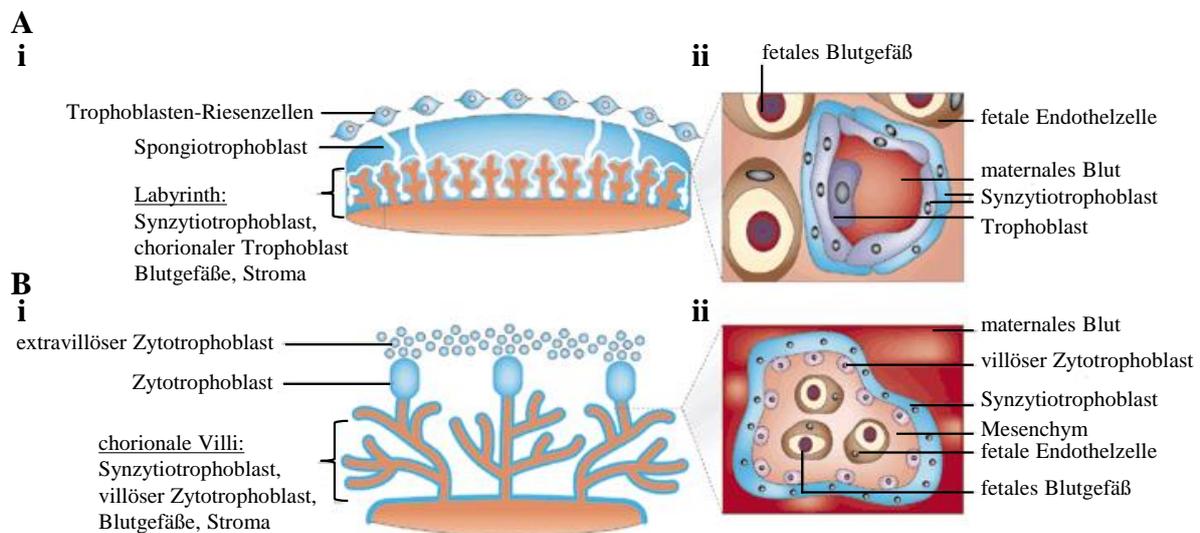


Abbildung 1: Plazentastrukturen von Maus und Mensch. (A) Dargestellt ist der Aufbau der murinen Plazenta (i) sowie ein detaillierter Ausschnitt (ii) aus der Labyrinthzone. (B) Gezeigt ist der Aufbau der humanen Plazenta (i) sowie der Querschnitt einer Plazentazotte (Villi, ii). In den detaillierten Abbildungen (ii) sind die Zellschichten illustriert, die fetales von maternalem Blut trennen. Modifiziert nach Rossant und Cross, 2001.

1.2.3 Spiralarterien

Der Stoffaustausch zwischen fetalem und maternalem Blut findet im intravillösen Raum statt, in dem Zotten, welche die eingewanderten fetalen Blutgefäßen beinhalten, von maternalem Blut umspült werden. In den intravillösen Raum gelangt das maternale Blut über helixartig gewundene SA, die über Basal- und Radialarterien von den Uterusarterien (*Aa. uterinae*) hervorgehen (siehe Abbildung 2)¹⁹⁻²¹. Die spiralförmig gewundene Form der SA ist das Ergebnis eines verhältnismäßig stärkeren Wachstums der Arterien im Vergleich zum Dickenwachstum des Endometriums während des Zyklus und der Schwangerschaft²¹. Im

Menschen sind etwa 100-150 SA im Plazentabett lokalisiert¹⁸, in der *decidua basalis* der Maus sind es etwa 10-15 SA. Vor der Schwangerschaft besitzen die englumigen SA ein elastisches Gefäßwandgewebe und eine dicke Schicht glatter Muskelzellen^{22,23}. Um eine optimale Versorgung des Fetus sicherzustellen, muss eine strukturelle Umwandlung der mütterlichen Blutgefäße während der frühen Schwangerschaft stattfinden. Sowohl das Endothel, als auch die glatten Muskelzellen werden durch invadierende Trophoblasten ersetzt. Dabei kann der Durchmesser der Arterien auf ein Zehnfaches vergrößert werden. Durch die Modulation verlieren SA ihre Elastizität und sind nicht mehr dazu in der Lage, zu kontrahieren bzw. auf Vasokonstriktoren zu reagieren^{24,25}. Die Trophoblasteninvasion sowie die damit verbundenen physiologischen Veränderungen der SA sind im Zentrum des Plazentabettes, Ausgangsort der Implantation, am auffälligsten und verlieren an Intensität je weiter man in die Peripherie der Plazenta gelangt¹⁹. Eine effiziente Modifikation der SA bewirkt die Zunahme des uteroplazentaren Blutstromes um ein Zehnfaches²⁶. Des Weiteren werden Druck und Geschwindigkeit mit der das maternale Blut in den intravillösen Raum strömt, stark herabgesetzt. Dies verhindert zum einen die Beschädigung der empfindlichen Zotten, zum anderen wird der Rückfluss des Blutes aus dem intravillösen Raum über die mütterlichen Venen durch den herabgesetzten Strömungswiderstand erleichtert²¹. Die Umwandlungen der SA, sind bis zur Mitte der Schwangerschaft abgeschlossen. Dies entspricht im Menschen dem Zeitraum der 22. Schwangerschaftswoche, in der Maus Gestationstag 10. Eine effiziente Umwandlung der SA ist die Voraussetzung einer optimalen Versorgung des Feten. Bei einer gestörten oder fehlenden SA Umwandlung verbleiben unterschiedliche große Mengen an glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden, wodurch die Gefäßerweiterung stark inhibiert ist. Die Folgen können schwerwiegende Schwangerschaftspathologien wie Fehlgeburt, Frühgeburt, Präeklampsie oder intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) sein²⁵. Trotz zahlreicher Studien sind die genauen Mechanismen, die den Umwandlungsprozess der SA regulieren, noch nicht ausreichend geklärt und erfordern weitere Forschung.

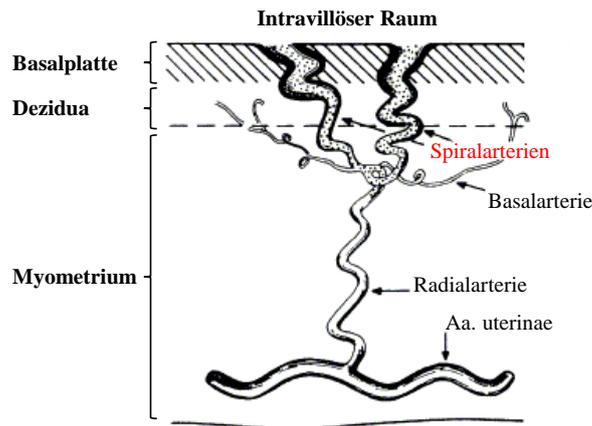


Abbildung 2: Ursprung und Lokalisation der Spiralarterien. Modifiziert nach Pijnenborg et al., 2006.

1.3 Schwangerschaftspathologien

Neben anatomischen, genetischen und hormonellen Ursachen können insbesondere immunologische Dysbalancen für eine Vielzahl reproduktiver Störungen verantwortlich sein. Dazu zählen weibliche In- oder Subfertilität, Fehlgeburt, Frühgeburt, Totgeburt, Präeklampsie und IUGR. Präeklampsie ist eine Schwangerschaftserkrankung, die durch das Eintreten von Bluthochdruck und Proteinurie in der zweiten Schwangerschaftshälfte (ab der 20. Woche) charakterisiert ist²⁷. Präeklampsie ist die häufigste Ursache für mütterliche Sterblichkeit und trägt maßgeblich zur perinatalen Sterblichkeits- und Erkrankungsrate bei²⁸. Sowohl Mutter als auch der Nachwuchs besitzen ein erhöhtes Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung im späteren Leben²⁹. Die genauen Ursachen der Entstehung sind noch nicht eindeutig geklärt. Jedoch ist sichergestellt, dass vor einer Präeklampsie eine inadäquate Umwandlung von SA am Anfang der Schwangerschaft stattfindet. Ursache kann eine unzureichende Einwanderung von Trophoblasten in die SA sein^{24,30}, was wiederum aus einer veränderten Freisetzung immunregulatorischer Zytokine und angiogenetischer Faktoren resultiert. Die Folge ist eine systemische, inflammatorische Immunantwort des mütterlichen Immunsystems³¹.

Wird das angeborene Wachstumspotential eines Fetus aufgrund einer pathologischen Wachstumseinschränkung nicht erreicht, spricht man von IUGR. Es gibt unterschiedliche Definitionen für den Grenzwert einer IUGR. Der am meisten genutzte Grenzwert ist die 10. Perzentile³²⁻³⁵. Feten deren Gewichte unter der 10. Perzentile liegen, wiegen somit weniger als 90 % aller Feten desselben Alters. Sehr schwerwiegend sind die Auswirkungen einer IUGR bei Nachkommen, deren Gewicht sich unterhalb der 5. Perzentile befindet³⁶. Fetale IUGR kann als Folge einer Präeklampsie bzw. Bluthochdruck auftreten³⁷, jedoch auch unabhängig davon entstehen. Eine verminderte Invasion von Trophoblasten und eine

eingeschränkte Umwandlung der uteroplazentaren Arterien sind die pathologischen Hauptfaktoren, die zur Entwicklung der IUGR führen können^{19,24}. Des Weiteren kann von einem Einfluss des Enzymes Hämoxigenase-1 ausgegangen werden, welches seine Wirkung größtenteils über das Stoffwechselprodukt Kohlenstoffmonoxid ausübt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Defekt des Hämoxigenase-1 Gens zu Bluthochdruck während der Schwangerschaft und fetaler IUGR führt. Die Verabreichung geringer Mengen Kohlenstoffmonoxid unterstützte die Proliferation von Natürliche Killerzellen (NKs), förderte die SA Umwandlung, verhinderte den Bluthochdruck und sorgte für ein optimales fetales Wachstum³⁸. Auch im Menschen konnte gezeigt werden, dass die Hämoxigenase in die SA Umwandlung und die Plazentafunktion involviert ist^{39,40}. Von IUGR betroffene Babies besitzen ein fünf- bis zehnfach erhöhtes Risiko noch im Mutterleib zu sterben⁴¹. Durch eine Vielzahl von Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass auch ein geringes Geburtsgewicht bzw. eine reduzierte Größe bei der Geburt bis in das Erwachsenenalter reichende Folgen haben kann. Dies umfasst unter anderem Bluthochdruck, koronaren Herzerkrankungen, Herzinfarkt, Type 2 Diabetes, Übergewicht, Entwicklung des metabolischen Syndromes und Osteoporose^{42,43}. Die erhöhte Mortalitäts- und Morbiditätsrate von Mutter und Kind als Folge verschiedener Schwangerschaftspathologien ist neben hohen physischen oder psychischen Belastungen der Betroffenen auch mit erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden.

1.4 Immunzellen und ihre Bedeutung in der Schwangerschaft

Das Immunsystem setzt sich aus zellulären und löslichen Komponenten zusammen und kann in die angeborene, natürliche und die erworbene, adaptive Immunantwort unterteilt werden. Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor schädlichen Einflüssen wie Bakterien, Parasiten, Pilzen, Viren, Substanzen aus der Umwelt sowie entarteten körpereigenen und körperfremden Zellen zu schützen. Während der Schwangerschaft wird das Immunsystem vor eine besondere Herausforderung gestellt. Es muss nicht nur Mutter und Fetus effektiv vor Infektionen schützen, sondern auch den semiallogenen bzw. halbfremden Fetus tolerieren. Für die Induktion und Aufrechterhaltung der Toleranz des Fetus sind verschiedene mütterliche und fetale Immunmechanismen verantwortlich⁴⁴. Für eine Aktivierung von CD8⁺ oder CD4⁺ T Lymphozyten durch Antigen-präsentierende Zellen werden Proteine prozessiert und in Form von Peptiden auf MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert. Im fetalen Gewebe sind die klassischen humanen Leukozytenantigene (HLA) nicht vorhanden

oder werden lediglich in sehr geringen Mengen exprimiert. Hingegen gibt es eine hohe Expression von nicht-klassischem HLA-E, HLA-G und HLA-C, die als Liganden für die inhibierenden Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen (NKs) fungieren, diese inhibieren und den Fetus somit vor der Abstoßung schützen^{45,46}. Als weiteren fetalen Schutzmechanismus exprimieren Trophoblasten den Fas-Liganden (CD95-L). Dieser bindet an den Fas-Rezeptor, welcher auf mütterlichen Lymphozyten gebildet wird und aktiviert die Apoptose der mütterlichen Zellen⁴⁷. Fetales Gewebe setzt daneben das Enzym Indoleamin-2, 3-Dioxygenase frei, das die Aktivität von mütterlichen T Zellen durch die Katalysation von Tryptophan inhibiert⁴⁸. Die mütterlichen Toleranzmechanismen beinhalten neben einem angepassten hormonellen Milieu, eine zeitlich angepasste Balance zwischen Th1 Zytokinen (z. B. IL-2, Interferon (IFN)- γ) und Th2 Zytokinen (z.B. IL-4, 5, 6, 9, 10, transformierender Wachstumsfaktor β)⁴⁹ sowie verschiedene immunregulatorische Moleküle. Des Weiteren ist das Zusammenspiel von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, wie Dendritischen Zellen, B Zellen, Makrophagen, T Zellen, regulatorischen T Zellen, NKs und Mastzellen (MCs) von großer Bedeutung⁵⁰. Im Folgenden werden NKs und MCs und ihre bisher bekannte Bedeutung in der Schwangerschaft näher beschrieben.

1.4.1 Natürliche Killerzellen

1.4.1.1 Eigenschaften und Funktionen

NKs gehören zum angeborenen Immunsystem. Die großen, granulären Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläufern im Knochenmark und repräsentieren einen Anteil von 5-10 % an der Gesamtheit der Lymphozyten⁵¹. NKs zirkulieren im Blut und sind in lymphoidem Gewebe, jedoch auch in der Lunge, der Leber, der Haut und im Reproduktionstrakt von Mensch und Maus zu finden⁵². Sie besitzen die Fähigkeit zur Rezirkulation und können durch inflammatorische Prozesse in verschiedene Gewebe rekrutiert werden⁵³. NKs gelten als eine der ersten Verteidigungslinien des Körpers. Sie sind hauptsächlich für die antigenunspezifische Abwehr von virus- und tumorbefallenen Zellen verantwortlich⁵⁴. Ihre Funktion üben NKs durch Zytotoxizität sowie über die Freisetzung verschiedener Zytokine, wie IFN- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und den Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), aus⁵⁴. Lytische Aktivität erlangen NKs über die in ihren Granula enthaltenen Proteine. Nach dem Entlassen führt das porenformende Perforin zum Zersetzen der Zielzellenmembran und ermöglicht es den Granenzymen in die Zelle einzudringen. Diese führen über apoptotische und anti-apoptische

Wege zum Zelltod der Zielzelle⁵⁵. Aktivierende und inhibierende Rezeptoren sind daran beteiligt, Zielzellen von körpereigenen, normalen Zellen zu unterscheiden und die Funktion von NKs durch entsprechende Signale, in Form von Aktivierung oder Inhibierung, zu regulieren. Aktivierende Rezeptoren umfassen neben dem Rezeptorhomodimer NKG2D, Natürliche-Zytotoxizitäts-Rezeptoren⁵⁶. Inhibierende Rezeptoren werden in drei Gruppen unterteilt: 1.) Die Ly49 Rezeptoren, welche der Lektinfamilie (C-Typ Lektine) zugeordnet und von Mäusen exprimiert werden. 2.) Differenzierungscluster (CD) 94/NKG2 Rezeptorheterodimere, die ebenfalls der C-Typ Lektinfamilie angehören. 3.) Killer-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren, die in Menschen und Primaten anstelle der Ly49 Rezeptoren gebildet werden⁵⁷. Mit Hilfe der Rezeptoren sind NKs in der Lage, MHC Klasse I Moleküle zu erkennen. Virus- und tumorbefallene Zellen regulieren ihre MHC Klasse I Moleküle herunter, um sich vor dem Angriff von reaktiven T Zellen zu schützen. NKs erkennen die Abwesenheit bzw. eine veränderte Expression von MHC Klasse I Molekülen und eliminieren die Zielzellen. Bezeichnet wird dieses Phänomen als „missing-self“ Hypothese. Ergänzt wird die Hypothese durch die „induced-self“ Theorie. Dabei erkennen aktivierende Rezeptoren von NKs zelluläre Stressliganden, die durch den Befall mit Viren oder maligne Veränderungen entstehen^{56,58}. Im fetalen Gewebe sind die klassischen HLAs nicht vorhanden oder werden lediglich in sehr geringen Mengen exprimiert. Hingegen gibt es eine hohe Expression von nicht-klassischem HLA-E, HLA-G und HLA-C, die als Liganden für die inhibierenden Rezeptoren von NKs fungieren, diese hemmen und den Fetus somit vor der Abstoßung schützen^{45,46}. In zahlreichen Studien konnte des Weiteren belegt werden, dass eine spezielle Subpopulation von NKs, die sich während der Schwangerschaft im Reproduktionstrakt befindet, Prozesse wie die Dezidualisierung und die Plazentation reguliert.

1.4.1.2 Subpopulationen

Während für murine NKs die Expression der Oberflächenmoleküle NK1.1 und DX5 charakteristisch ist⁵⁹, werden humane NKs basierend auf der Expression von CD56 und CD16 in zwei Gruppen unterteilt. Etwa 90 % gehören der zytotoxischen CD56^{dim}CD16⁺ Subpopulation an. Diese sind durch die Expression von CD16 (FcγRIII) zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität in der Lage. Zytokine wie IFN-γ werden nur in geringer Menge gebildet. Etwa 10 % gehören zur Gruppe der CD56^{bright}CD16⁻ NKs. Diese sekretieren große Mengen an IFN-γ, TNF-α und GM-CSF, besitzen jedoch im Vergleich zu

CD56^{dim}CD16⁺ NKs nur eine geringe Zytotoxizität und sind vorrangig in der Nähe von Entzündungsherden zu finden. Während der Schwangerschaft ist eine hohe Anzahl an NKs im Uterus zu finden, die aufgrund ihrer Lokalisation als uterine NKs (uNKs) bezeichnet werden.

1.4.1.2.1 Uterine Natürliche Killerzellen

uNKs sind eine Subpopulation von NKs, die sich durch eine unterschiedliche Lokalisation und Funktion von NKs der Peripherie unterscheiden. Während der Schwangerschaft steigt die Anzahl an uNKs im Uterus stark an^{60,61}. Mit etwa 70 % sind uNKs die quantitativ am stärksten vertretene Lymphozytenpopulation an der feto-maternalen Grenzfläche von Maus und Mensch^{62,62,63}. Im Menschen gehören uNKs dem nichtzytotoxischen CD56^{bright}CD16⁻ Phänotyp an⁶⁴ und sind bereits während Ende der Sekretionsphase eines jeden Menstrualzyklus im Uterus zu finden. In Mäusen erscheinen uNKs erst nach der Implantation. Die zu Beginn der Schwangerschaft kleinen, agranulären Zellen, wachsen zu etwa 50 µm großen Zellen heran, proliferieren und differenzieren sich²³. In Ratten und Mäusen sammeln sich uNKs in jeder Implantation an der mesometrialen Seite des Uterus an. Sie sind in großer Zahl in der *decidua basalis* und im MLAp (mesenterial lymphoid aggregate of pregnancy) zu finden. Dabei handelt es sich um eine besondere Struktur an der Kontaktstelle zwischen Uterus und Dezidua, die sich ausschließlich während der Schwangerschaft ausbildet^{60,65,66}. Die Anzahl an uNKs sinkt ab Mitte der Schwangerschaft rapide ab²³. Aufgrund ihrer glykoproteinreichen, zytoplasmatischen Granula können uNKs histochemisch mittels PAS („Periodic Acid Schiff's“-Färbung identifiziert werden⁶⁰. PAS⁺ uNKs lassen sich wiederum in zwei Untergruppen unterteilen. Die Unterteilung unterliegt der Reaktivität gegenüber Dolichos biflorus agglutinin (DBA) Lektin. Das Lektin bindet spezifisch an N-Acetyl-α-D-Galactosamine, die sich in den zytoplasmatischen Granula sowie auf der Zellmembran von uNKs befinden. Da kein anderes Gewebe als der Uterus trächtiger Mäuse, sowie keine Lymphozytenpopulation in nichtträchtigen Mäusen eine vergleichbare Reaktivität zu DBA Lektin zeigt, ist es möglich, murine uNKs von allen anderen Lymphozyten zu unterscheiden⁶⁷. Die zwei Untergruppen von uNKs kommen zu Beginn der Dezidualisierung in gleicher Menge vor. Mitte der Schwangerschaft sind DBA⁺ uNKs jedoch in neunfach erhöhter Menge gegenüber DBA⁻ uNKs vorzufinden⁶⁸. uNKs induzieren Toleranz gegenüber dem semiallogenen Fetus und unterstützen die während der frühen Schwangerschaft notwendigen physiologischen Umwandlungen an der feto-maternalen Grenzfläche. Humane uNKs regulieren daneben die Trophoblasteninvasion und induzieren das Gefäßwachstum in der

Dezidua. Diese Funktionen werden durch die Interaktion von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren und den an der feto-maternalen Grenzfläche speziell exprimierten Liganden reguliert⁶⁹. Ihre angiogenetische Funktion üben uNKs beispielsweise über die Sekretion von VEGF und PGF aus⁷⁰⁻⁷². Die Abwesenheit von uNKs führt zu einer unzureichender SA Umwandlung, hat jedoch keine schwerwiegenden Folgen für die Schwangerschaft⁷³. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass IFN- γ an uterinen vaskulären Modifikationen und der Dezidualisierung beteiligt zu sein scheint⁷⁴. Obwohl die Bedeutsamkeit von uNKs in Bezug auf reproduktive Prozesse in vielen Studien belegt werden konnte, sind die verantwortlichen Mechanismen und involvierten Mediatoren bisher noch nicht eindeutig geklärt.

1.4.1.3 Modelle zur Untersuchung der Funktion Natürlicher Killerzellen

1.4.1.3.1 IL-15-defizientes Mausmodell

IL-15 ist ein zentraler Regulator für die Entwicklung, die Aktivierung, die Proliferation und das Überleben von NKs^{75,76}. Mäuse, die einen Defekt in den IL-15 Rezeptoren bzw. im IL-15 Gen aufweisen, werden daher als Modell zur Untersuchung der Funktion von NKs *in vivo* verwendet. IL-15-defiziente Mäuse (IL-15^{-/-}) konnten durch gezielte genetische Veränderung generiert werden⁷⁶. Hierfür wurde das IL-15 Gen auf einem genspezifischen Vektor durch Einbringen eines 7,5 kb großen Fragmentes, welches die Exons 3-5 des IL-15 Gens sowie eine Neomycinkassette enthält, zerstört. Anschließend kam es zum Einbringen des Vektors in embryonale Stammzellen von C57BL/6 Mäusen. Positive Klone wurden anschließend in BALB/c Blastozysten injiziert, um chimäre Mäuse zu erhalten, die entstandenen Männchen mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Der Nachwuchs, welcher heterozygot für das IL-15 Allel war (IL-15^{+/-}), wurde untereinander gekreuzt. Die resultierenden IL-15^{-/-} Mäuse weisen neben der Abwesenheit von NKs eine reduzierte Anzahl an NKTs, CD8⁺ T Zellen, und verschiedenen Populationen von Darmschleimhautzellen auf. Ansonsten zeigen sie keine phänotypischen Abnormalitäten. In Hinsicht auf Körper- und Organgewicht, Gewebemorphologie und Antikörper-Serumlevel gibt es keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch zeigen sich keine Hinweise auf Autoimmunerkrankungen und die Tiere besitzen eine normale Lebensspanne⁷⁶. IL15-defiziente Mäuse sind fertil, haben eine normale Gestationsdauer und eine vergleichbare Anzahl an Nachkommen im Vergleich zu Wildtypen (WT)⁷³ besitzen jedoch keine uNKs und eine mangelhafte deziduale Arterienumwandlung verglichen mit normalen Mäusen⁷⁷.

1.4.1.3.2 Anti-CD122 und anti-asialo GM1- Antikörper zur Depletion von Natürlichen Killerzellen

Neben der Verwendung von NK-defizienten Mausstämmen zur Untersuchung der NK Funktion *in vivo*, werden verschiedene Antikörper zur gezielten NK Depletion eingesetzt. Der Vorteil, beispielsweise gegenüber dem IL-15-defizienten Mausmodell, ist die zeitlich regulierbare Depletion von NKs. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Kombinierbarkeit mit bereits etablierten, genetisch veränderten Mauslinien. Möchte man beispielsweise die Auswirkung des Fehlens von NKs kombiniert mit einem anderen Defekt untersuchen, erreicht man dies ohne zeit- und kostspielige erneute genetische Manipulation oder Verpaarung, sondern durch die unkomplizierte Injektion eines NK-depletierenden Antikörpers.

Der heterotrimere IL-2 Rezeptor (IL-2R) besteht aus einer α , einer β (CD122) und einer γ (CD132) Kette. Das Zytokin kann an mit geringer Affinität an die α oder mit mittlerer Affinität an den heterodimeren Komplex aus β und γ Kette binden. Die β und γ Kette sind für die Signalweiterleitung verantwortlich⁷⁸. Das für das Überleben von NKs wichtige Zytokin IL-15 kann einerseits an den IL-15 Rezeptor α (IL-15R α) oder andererseits an den auf NKs exprimierten heterodimeren β/γ Komplex des IL-2R binden^{75,79,80}, um seine Wirkung zu entfalten. Die einmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion des monoklonalen Antikörper anti-CD122 (TM- β 1), der gegen IL-2R β gerichtet ist, resultiert in verschiedenen Mausstämmen in einem etwa 5 Wochen anhaltenden NK Verlust⁸¹. Der Antikörper wird daher verwendet, um die physiologische Rolle von NKs *in vivo* zu untersuchen.

Neben IL-2R β , wird auch der Oberflächenmarker Asialo ganglio-N-tetraosylceramide in hohen Mengen auf NKs von Maus und Mensch- exprimiert^{54,82}. Die Behandlung verschiedener Mausstämme mit einem gegen dieses Glykolipid gerichteten polyklonalen Antikörper (anti-asialo GM1), führt somit zu einem Verlust der NK Aktivität *in vivo*^{83,84}. Die NK Aktivität ist am 3. Tag nach einmaliger Injektion extrem reduziert und beginnt am 7. Tag wieder zu steigen. Eine wiederholte Injektion aller drei Tage hält die NK Aktivität dauerhaft auf einem sehr niedrigem Niveau⁸⁴.

1.4.2 Mastzellen

1.4.2.1 Eigenschaften und Funktionen

MCs wurden von dem deutschen Wissenschaftler Paul Ehrlich im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit entdeckt und werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen, pluripotenten Stammzellen des

Knochenmarks und gelangen als unreife Vorläufer über den Blutfluss ins periphere Gewebe^{85,86}. MCs sind insbesondere in der Nähe von Blutgefäßen und Nerven lokalisiert, und befinden sich größtenteils in Regionen des Körpers, die an die äußere Umgebung grenzen, wie Haut, Lunge, Magen-Darmtrakt und Reproduktionstrakt⁸⁷⁻⁸⁹. Im peripheren Gewebe angekommen, findet die Reifung der Zellen unter dem Einfluss der vom umliegenden Gewebe exprimierten Zytokine statt. Unter inflammatorischen Bedingungen ist die Migration von MC-Vorläufern ins periphere Gewebe erhöht⁸⁶. Reife MCs hingegen bewegen sich kaum. Die Proliferation, Migration als auch die Aktivierung von MCs, wird durch eine Vielzahl von Rezeptoren reguliert. Die wichtigsten sind der membranständige Tyrosinkinase-Rezeptor KIT (c-Kit/ CD117) und der ebenfalls membranständige, hochaffine Immunglobulin (Ig) E Rezeptor Fc (kristallisierbares Fragment der Antikörper) Epsilon Rezeptor I (FcεRI)⁸⁶. Die Bindung des Stammzellfaktors (SCF) an c-Kit führt zur Dimerisierung des Rezeptors, wodurch die Proteinkinase und anschließend eine Reihe von Signalwegen aktiviert werden⁹⁰. Die Liganden-Rezeptor-Bindung ist die Voraussetzung für die Entwicklung, Maturierung und Proliferation von MCs in Maus und Mensch^{86,91}. Eine Defizienz von SCF oder c-Kit kann mit Störungen der Blutzellproduktion, zu geringer Pigmentierung oder Unfruchtbarkeit assoziiert sein. Eine vermehrte Expression oder verstärkte Aktivität des Rezeptors in Folge von Mutationen, können Tumorerkrankungen und die Entwicklung von Mastozytose zur Folge haben^{90,92}. Der FcεRI Rezeptor bindet die Fc-Rezeptorbindungsstelle im konstanten Teil der schweren Kette von IgE Antikörpern. Die Bindung von monomerem IgE an den FcεRI Rezeptor induziert in Abwesenheit von Antigenen das Überleben und das Wachstum von MCs^{93,94}. Daneben spielt der FcεRI Rezeptor eine zentrale Rolle beim Schutz des Organismus vor parasitären Infektionen⁹⁵⁻⁹⁷. Die IgE-abhängige Aktivierung von MCs kann allerdings auch pathologische Auswirkungen haben und zu MC-assoziierten Erkrankungen führen. So spielen MCs eine zentrale Rolle als Effektorzellen bei allergischen Reaktionen, einschließlich Anaphylaxie und Asthma^{89,98,99}. Zudem ist die α-Kette des FcεRI Rezeptors die Zielsequenz von Autoantikörpern bei der chronischen Urtikaria¹⁰⁰.

MCs sind in der Lage, Antigene zu prozessieren, zu präsentieren und somit T Zellen zu aktivieren und deren Antigen-spezifische klonale Vermehrung zu induzieren. Sie können ebenfalls die Migration, Reifung und die Funktion von verschiedensten Immunzellen, wie Dendritischen Zellen (DCs), NKs, NKT Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Tregs und B Zellen beeinflussen^{89,101-104} und somit in die gesamte Immunantwort eines Organismus eingreifen. Zu den komplexen Funktionen von MCs zählt auch die Unterstützung der Angiogenese. So kommt es zu einer Anhäufung von MCs in Geweben bzw. bei Prozessen,

in denen Angiogenese erforderlich ist, wie bei der Wundheilung, der Gewebereparatur, beim Tumorwachstum und der Ovulation¹⁰⁵. MCs sind dazu in der Lage, die Gefäßerweiterung und -permeabilität sowie Kontraktionen von Gebärmutter und glatten Muskelzellen zu beeinflussen¹⁰⁶. Des Weiteren sind MCs wichtige Mediatoren bei der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg-vermittelten Toleranz gegenüber Transplantaten¹⁰³. Verantwortlich für die Multifunktionalität von MCs sind eine Vielzahl an Mediatoren, die proinflammatorische, antiinflammatorische, als auch immunregulatorische Effekte haben können und in Abhängigkeit der Stärke und Art der Aktivierung von MCs sezerniert werden^{88,89}.

1.4.2.2 Subpopulationen

Obwohl MCs viele gemeinsame Eigenschaften aufweisen, stellen sie keine homologe Population dar. Sie unterscheiden sich in ihrer Funktion, ihrer Lokalisierung, ihren histochemischen Eigenschaften und Mediatoren⁸⁸. MCs von Nagetieren werden in langlebige Bindegewebs-Mastzellen (CTMC) und kurzlebige mukosale Mastzellen (MMC) unterteilt. Während sich CTMC vorwiegend in der Haut, dem Bindegewebe und im Peritoneum befinden, sind MMCs in Schleimhäuten lokalisiert. Die Granula von CTMCs enthalten das Proteoglykan Heparin sowie große Mengen an Histamin und der Carboxypeptidase A3 (Cpa3). Nach entsprechender Fixierung und Färbung mit Safranin färben sich die Granula rot. Mit einer Größe von 10-20 µm sind CTMCs größer als MMCs, die eine Größe vom 5-10 µm aufweisen. In den Granula von MMCs befinden sich im Vergleich zu CTMCs lediglich geringe Mengen an Histamin und Cpa3, dafür wird vorrangig das Proteoglykan Chondroitinsulfat exprimiert. Aufgrund dieser histochemischen Eigenschaften lassen sich MMCs mit Alcianblau blau anfärben^{85,88,107}. Neben der Färbung mit Alcianblau und Safranin können die Granula von MCs mit dem Farbstoff Toluidinblau metachromatisch lila gefärbt werden¹⁰⁸. Nicht alle MCs in Maus und Ratte können eindeutig der Kategorie CTMC oder MMC zugeordnet werden, da einige von ihnen Eigenschaften beider Gruppen aufweisen⁸⁸. Auch eine Umwandlung einer der Subpopulation in die jeweils andere ist in Abhängigkeit des umgebenden Milieus möglich^{107,109}.

In humanen MCs definiert das Vorhandensein der Serinproteasen Tryptase und Chymase deren Einteilung in verschiedene Subpopulationen. MCs, die lediglich Tryptase exprimieren, werden als „MC_T“ bezeichnet und kommen vorrangig auf Schleimhautoberflächen, nahe Blutgefäßen, Nerven, Drüsen und Epitheloberflächen vor. MC_Ts sind an der Pathogenabwehr

des Körpers beteiligt. MCs, deren Granula sowohl Tryptase, als auch Chymase enthalten, werden als „MC_{TC}“ bezeichnet und sind vor allem im Bindegewebe lokalisiert. MC_{TC}s tragen vor allem zur Gewebeumwandlung und zur Angiogenese bei ^{106,110}.

1.4.2.2.1 Uterine Mastzellen

Uterine MCs (uMCs) befinden sich in hoher Anzahl im Myometrium, im Endometrium, in der Cervix und in den Ovarien des weiblichen Reproduktionstraktes von Maus und Mensch, oft in der Nähe von Blutgefäßen ^{111–116}. Weiterhin sind sie sowohl im Menschen, als auch in der Maus, nahe myometrischer glatter Muskelzellen zu finden ^{106,117,118}. In der Maus ist die Anzahl an uMCs während des Östrus, der fruchtbaren Phase des murinen Östruszyklus, signifikant erhöht und steigt im Falle einer Schwangerschaft weiter an. uMCs stellen eine heterogene Population bestehend aus CTMC, MMCs und Zellen, die Eigenschaften beider Gruppen aufweisen, dar ¹¹⁶. So sind uMCs sowohl mit Alcianblau, mit Safranin und mit Toluidinblau anfärbbar und repräsentieren einen einzigartigen Phänotyp ^{116,119}. Östrogen- und Progesteronrezeptoren werden auf der Oberfläche von uMCs exprimiert ¹²⁰. Sie sind somit in der Lage, auf endokrine Signale zu reagieren. Östrogen und Progesteron steuern die Migration von MCs aus der Peripherie in den Uterus, sowie deren Reifung und Degranulierung ¹²¹. Einige der von uMCs freigesetzten Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen sind essentiell für den Prozess der Inflammation ^{122,123}, der insbesondere während der Implantation und der Plazentation eine Rolle spielt ¹²⁴. Daneben sind uMCs in die Angiogenese und die SA Umwandlung involviert ^{115,116,125} und regulieren die Uteruskontraktilität ^{118,126,127} sowie die Zervixreifung ^{128,129}, die zum Ende der Schwangerschaft wichtig sind. Auch hier gibt es noch einen enormen Forschungsbedarf hinsichtlich verantwortlicher Mediatoren und Mechanismen, die für die MC Funktionen verantwortlich sind.

1.4.2.3 Mastzellchymasen

Die nach Aktivierung von MCs freigesetzten Mediatoren können, in Abhängigkeit von ihrer Herkunft und ihrer biologischen Aktivität, in zwei Gruppen unterteilt werden. Histamin, Serotonin, Heparin, andere Proteoglykane und Proteasen gehören zu der Gruppe der „vorgefertigten Mediatoren“, welche in den zytoplasmatischen Granula der Zellen gespeichert vorliegen und innerhalb weniger Sekunden durch Exozytose ins extrazelluläre Medium abgegeben werden können ¹³⁰. Mediatoren der zweiten Gruppe werden „neu synthetisiert“ und umfassen unter anderem Arachidonsäuremetaboliten, Zytokine, Wachstumsfaktoren und

Chemokine. Einige Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise TNF und VEGF können sowohl als vorgefertigte Mediatoren freigesetzt, als auch neu synthetisiert werden⁸⁹. Die der ersten Gruppe zugehörigen, granulären und an das Proteoglykan Serglycin gebundenen Proteasen umfassen etwa 50 % des gesamten Proteingehaltes von MCs. Proteasen der murinen MCs werden unterteilt in die Metalloexopeptidase Cpa3, verschiedene Trypsasen (Mastzellprotease (Mcpt) 6, 7, 11) und Chymasen (Mcpt1, 2, 4, 5, 9). Während die Chymasen Mcpt1 und 2 vorrangig MMCs gebildet werden, exprimieren CTMCs primär Cpa3 sowie die Chymasen Mcpt4, und Mcpt5, sowie die Trypsase Mcpt6^{131,132}.

Chymasen sind Serinproteasen, mit chymotrypsin-ähnlicher Substratspezifität, die Proteine und Peptide nach aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tyrosin und Phenylalanin, spalten¹³³. Aufgrund ihrer biochemischen Struktur können sie in α -Chymasen und in β -Chymasen unterteilt werden. Mäuse exprimieren die α -Chymase Mcpt5 sowie die β -Chymasen Mcpt1, 2, und 4. Humane MCs exprimieren lediglich eine als Cma1 bezeichnete α -Chymase¹³⁴. Hinsichtlich funktioneller Gesichtspunkte und der Verteilung im Gewebe ist Mcpt4 der Maus der humanen Chymase am ähnlichsten¹³⁵. Phylogenetisch hat jedoch Mcpt5 der Maus am meisten Ähnlichkeit mit der humanen Chymase¹³³. So sind 72 % der Aminosäuresequenz beider Chymasen identisch. Durch eine Mutation in der katalytischen Domäne, die zu einem Austausch von Glycin durch Valin (V216G) führt, besitzt die α -Chymase Mcpt5 von Ratten und Mäusen im Gegensatz zu anderen Chymasen keine chymotryptische, sondern eine elastolytische Aktivität¹³⁶. Chymasen besitzen vielseitige Funktionen. Zum einen induzieren sie die Akkumulation von Neutrophilen, Eosinophilen und anderen inflammatorischen Zellen *in vivo*¹³⁷, zum anderen sind sie dazu in der Lage den Blutdruck zu regulieren¹³⁸. Es konnte gezeigt werden, dass Chymasen die Vorstufen der Matrix-Metalloprotease (MMP) 9 und MMP2 in ihre aktive Form umwandeln^{135,139,140}. MMPs sind wiederum in eine Menge physiologische und pathologische Prozesse involviert wie beispielsweise Zellwachstum- und Differenzierung, Angiogenese, Vaskularisierung, Gewebeumbau sowie Metastasierung^{135,141}. Des Weiteren können Chymasen die extrazelluläre Matrix degradieren^{142,143}, das Wachstum glatter Muskelzellen inhibieren¹⁴⁴ oder auch Apoptose in glatten Muskelzellen induzieren^{143,145,146}. Ihre Fähigkeit zur Förderung des Gewebeumbaus spricht für eine Rolle von Chymasen während der Schwangerschaft, diese wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

1.4.2.4 Untersuchung der Funktion von Mastzellen *in vivo*

1.4.2.4.1 Kit-abhängige Mausmodelle

Die Entwicklung und Reifung von MCs ist von der Aktivierung des c-Kit Rezeptors durch SCF abhängig ⁸⁶. Die c-Kit Mutantenstämme, die sich durch eine eingeschränkte c-Kit Thyrosinkinase-abhängige Signalweiterleitung in Folge einer Mutation und den damit verbundenen Verlust von MCs auszeichnen, dienen der Untersuchung der Funktionen von MCs *in vivo*. Die Punktmutation im WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v} Mausmodell ¹⁴⁷ führt neben einer starken Reduktion von MCs, zu makrozytischer Anämie, Abwesenheit von Interstitialzellen und Sterilität. C57BL/6-Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh} (*W-sh*) Mäuse sind durch eine Inversionsmutation gekennzeichnet. Ab einem Alter von 10 Wochen sind die Tiere MC-defizient und dabei weder anämisch, noch steril ^{148,149}. Mit Hilfe dieser Modelle gelang es in den letzten Jahrzehnten, unzählige Einblicke in die weichen Funktionen von MCs zu erhalten. Dies war insbesondere durch die Rekonstitution der Mutationsstämme mit Knochenmark-abgeleiteten MCs (BMDCs) möglich ¹⁴⁹. Da Unterschiede in der Immunantwort zwischen WT und c-Kit Mutationslinien jedoch nicht immer Auswirkungen der MC-Defizienz sind, sondern auch Folgen der c-Kit Mutation selbst sein können ¹⁰⁴, wurden in den letzten Jahren neue Mausmodelle entwickelt, die eine c-Kit-unabhängige *in vivo* Untersuchung von MC Funktion erlauben.

1.4.2.4.2 Kit-unabhängige Mausmodelle

Viele der Kit-unabhängigen Mausmodelle basieren auf der Verwendung des Cre-lox Rekombinationssystems. Rekombination ist ein natürlicher, in allen Organismen vorkommender Prozess zur Modifizierung von genetischem Material, der vor allem für die genetische Diversität von enormer Bedeutung ist. Das Cre-lox-Rekombinationssystem entstammt aus dem Bakteriophagen P1 ¹⁵⁰. Die Cre-Rekombinase (cyclization recombination) katalysiert die Rekombination zwischen zwei lox P- (locus of X-over of P1) Erkennungssequenzen. Bei gleicher Orientierung der Erkennungssequenzen auf dem DNA Strang, wird der von den lox P-Sequenzen flankierte DNA Abschnitt herausgeschnitten und in Form der zusammengeführten, ringförmigen DNA in der Zelle abgebaut. Bei entgegengesetzter Orientierung der lox P-Sequenzen, kommt es zur Inversion des flankierten DNA Bereiches ¹⁵¹. Heute wird das Cre-lox Rekombinasessystem insbesondere zur

Generierung von konditionalen bzw. zeit- und gewebsspezifischen knockout Mäusen verwendet¹⁵².

Das *Cpa3* Gen codiert für die MC-spezifische Protease *Cpa3*¹⁵³, die bereits von MC Vorläuferzellen exprimiert wird¹⁵⁴. Das Einbringen der Cre-Rekombinase (Cre) in den MC *Cpa3* Genlokus durch homologe Rekombination¹⁵⁵ depletiert sowohl CTMCs als auch MMCs konstitutiv durch einen gentoxischen Mechanismus. Mit Ausnahme einer auf etwa 40% reduzierten Anzahl an Basophilen in der Milz in heterozygoten *Cpa3*^{Cre/+} (Cre-Master) Mäusen gibt es hinsichtlich hämatologischen und immunologischen Parametern keine Unterschiede zwischen den MC-defizienten *Cpa3*^{Cre/+} und *Cpa3*^{+/+} Kontrollmäusen¹⁵⁶. Der komplette Verlust von MCs, ohne weitere Auswirkungen auf das Immunsystem, macht die Mäuse zu einem interessanten Versuchsmodell zur Analyse MC-spezifischer Funktionen.

Neben dem Cre-Master Mausmodell gibt es weitere Modelle zur konstitutiven und induzierbaren Depletion von MCs, beispielsweise auf der Grundlage von *Mcpt5*, welche von CTMCs exprimiert wird. *Mcpt5*-Cre transgene Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Mcpt5* Promotors¹⁵⁷. Im Vergleich zur transgenen *Cpa3*^{Cre/+} Mauslinie, führt die Expression der Cre-Rekombinase in *Mcpt5*-Cre Mäusen nicht zum Absterben der Cre-Rekombinase-exprimierenden Zellen. Wird die *Mcpt5*-Cre Mauslinie mit der iDTR¹⁵⁸ oder der R-DTA Mauslinie¹⁵⁹ verpaart, kommt es aufgrund der Aktivität der Cre-Rekombinase zur Deletion einer im Promotorbereich lokalisierten loxP-flankierte STOP Kasette und somit zur Expression des Diphtheria Toxin Rezeptors (DTR) bzw. des Diphtheria Toxin A (DTA) in allen Cre-exprimierenden Zellen. Es kommt zu einem Verlust von CTMCs, jedoch nicht von MMCs durch die Injektion von Diphtheria Toxin (*Mcpt5*-Cre⁺ iDTR⁺) bzw. direkt infolge der Toxinausschüttung (*Mcpt5*-Cre⁺ R-DTA⁺). Die Mauslinien ermöglichen eine konstitutive, spezifische Inaktivierung von *Mcpt5*-exprimierenden Zellen *in vivo*¹⁶⁰. *Mcpt5*-Cre⁺ iDTR⁺ und *Mcpt5*-Cre⁺ R-DTA⁺ Mäuse haben sich in den letzten Jahren als nützliches Modell zur Untersuchung der Funktion von *Mcpt5*-exprimierenden CTMCs bewährt.

1.4.2.5 Untersuchung der Funktion von Mastzellen *in vitro*

Eine Vielzahl der experimentell gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Funktion von MCs basieren auf der Verwendung von peritonealen MCs (PCMCs). Die reifen Zellen werden aus dem Peritoneum gewonnen und mittels Zugabe von IL-3 und SCF in Kultur vermehrt. PCMCs gehören der Subpopulation der CTMC an, exprimieren den für MCs typischen c-Kit,

als auch den FcεRI Rezeptor und sekretieren lediglich geringe Mengen an Lipidmediatoren, Chemokinen und Zytokinen. Im Kontrast enthalten sie sehr hohe Mengen an vorgefertigten und proteolytischen Mediatoren, die nach Aktivierung der Zellen freigesetzt werden ¹⁶¹. Zur Untersuchung der Funktionalität von MCs *in vitro* bedient man sich neben primären Zellen wie z.B. PCMCs, kommerziell erhältlicher MC-Zelllinien. Diese weisen den Vorteil auf, schnell und in großer Menge verfügbar zu sein. Die IL-3 abhängige murine MC/9 MC-Linie wurde aus fetalen Leberzellen generiert und exprimiert den hochaffine IgE Rezeptor FcεRI. Die einzig verfügbare humane MC-Linie HMC1 stammt von einem MC Leukämie Patienten ¹⁶². Die Zelllinie bildet den c-Kit Rezeptor, der hochaffine IgE Rezeptor wird im Gegensatz dazu nicht gebildet. HMC-1 Zellen exprimieren Trypsinase, sowie Heparin und Chondroitinsulfat in gleicher Menge ¹⁶³ und sind metachromatisch mit dem Farbstoff Toluidinblau anfärbbar ¹⁶².

1.5 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von uNKs und uMCs sowie mögliche Wirkmechanismen auf reproduktive Prozesse zu untersuchen. Analysiert wurden dabei zum einen eine mögliche Gegenregulation von uMCs und uNKs, sowie trächtigkeitsspezifische Parameter in einem IL-15-defizienten Mausmodell. Zum anderen wurden die Auswirkungen der gleichzeitigen Abwesenheit von NKs und MCs im Mausmodell untersucht. Außerdem wurde der mögliche Einfluss der Chymase Mcpt5 auf reproduktionsrelevante Prozesse geprüft. Folgende Fragestellungen wurden hierbei bearbeitet:

- (1) Sind IL-15^{-/-} Mäuse von Veränderungen reproduktiver Parameter (Implantations- und Abortrate, SA Umwandlung, Blutdruck, fetales Gewicht, Plazentagewicht, Feto-Plazentarer-Index (FPI)) betroffen?
- (2) Liegt in IL-15^{-/-} Mäusen, die sich durch die Abwesenheit von pNKs und uNKs auszeichnen, eine veränderte Anzahl an uMCs oder eine veränderte Expression von MC Mediatoren vor?
- (3) Wie wirkt sich die kombinierte Abwesenheit von NKs und MCs auf verschiedene Trächtigkeitsparameter (Implantations- und Abortrate, SA Umwandlung, Blutdruck, fetales Gewicht, Plazentagewicht, FPI, Geburtsgewicht) aus?
- (4) Welche Mediatoren sind entscheidend für einen möglichen Einfluss von uNKs und uMCs auf trächtigkeitsrelevante Prozesse?
- (5) Sind Mcpt5-exprimierende Zellen in reproduktive Prozesse involviert?

Die bedeutende Rolle von Immunzellen im Rahmen einer erfolgreichen Schwangerschaft ist unumstritten. Der individuelle Beitrag von NKs und MCs an reproduktionsrelevanten Prozessen sowie die zugehörigen Wirkmechanismen sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt und werden in der vorliegenden Promotionsarbeit untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Baretthaube	Medline, Kleve, Deutschland
Blutglaskapillaren (heparinisiert)	Kabe, Nürnberg-Elsenroth, Deutschland
Chromatographiepapier	Sigma, Steinheim, Deutschland
CPE-Überschuhe	TransatlanticClinic, Neu-Anspach, Deutschland
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassette aus Kunststoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Dentalkanülen (20G, 27G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Eisbad	NeolabMigge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Färbekammer, ABS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fettstift	Dako, Glostrup, Dänemark
Filterspitzen RNase-/ DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Glaswaren	NeolabMigge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Transfermembran (0,45 µm)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Kapillarpipetten	Servoprax, Wesel, Deutschland

Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Netzmikrometer	Corning, Corning, USA
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger mit Mattrand	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Okularmikrometer	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Omnifix-F Einmalspritze (1ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
OP-Maske	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Parafilm „M“	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
PCR Platten (96 Vertiefungen)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettensatz (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rundbodenröhrchen (5ml)	Corning, Corning, USA
Serologische Pipetten aus Glas (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten aus Kunststoff (10 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten aus Kunststoff (5 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spritzenfilter (0,2 µm)	Whatman, Dassel, Deutschland
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultureinsatz (Porengröße 1 µm)	Corning, Corning, USA
Vernichtungsbeutel	NeoLabMigge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Wägepapier	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6 bzw. 48 Vertiefungen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsiebe (Poren: 40 µm, 100 µm)	Corning, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
2.1.2 Geräte	
Abzug „Airflow-control EN14175“	Bense, Hardegsen, Deutschland
Autoklav „Laboklav 80-V“	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Blutdruckmessgerät „TSE Blood Pressure Monitoring Systems“	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland
Chemilumineszenzgerät „SYGN/A609“	Synoptics, Cambridge, UK
CO ₂ -Inkubator „Hera Cell 240“	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
CO ₂ -Inkubator „NU-5500 E“	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Digitalkamera „Canon IXUS 80 IS“	Canon, Berlin, Deutschland
Durchflusszytometer „FACS Calibur TM “	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbehälter „Mr. Frosti TM “	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

Eismaschine „ZBE70-35“	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Elektrophorese-Stromversorgungsgerät „Electrophorese Power Supply Consort EV231“	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Gefriertruhe „Froster“(-20°C)	Kirsch, Offenburg, Deutschland
Gefriertruhe „HERA freeze“(-80°C)	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Gefriertruhe „Premium No Frost“(-20°C)	Liebherr, Bulle, Deutschland
Geldokumentationsgerät „Syngene Bio Image“	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Homogenisator „Ultra Turrax T25 Homogenisator“	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Kryosystem „Kryosystem 4000“	Jutta Ohst German Cryo, Juchen, Deutschland
Kühlschrank „Liebherr FKEX 3600“	Rexel, Hannover, Deutschland
Kühlschrank „Liebherr KTO 1810-20“	Unielektro, Eschborn, Deutschland
Magnetrührer „RH Basic 2 IKAM“	Windhaus-Labortechnik, Clausthal- Zellerfeld, Deutschland
Mastercycler „Mastercycler personal“	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop „Axio Observer.A1“	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikroskop „Axiovert 40C“	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle „Panasonic NN-E205W“	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Multifunktionsplattenlesegerät „Synergy HT“	Bio Tek Instruments, Winooski, USA
Paraffin- Ausgießstation „EC 350-1“	Microm, Neuss, Deutschland
Paraffin- Kühleinheit „EC 350-2“	Microm, Neuss, Deutschland

Paraffin Streckbad „2052”	GFL, Burgwedel, Deutschland
pH Meter „Microprocessor pH211“	NeolabMigge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage „LA 620“	Sartorius, Berlin, Deutschland
Präzisionswaage „Kern 440-21N“	Kern & Sohn, Bahlingen, Deutschland
Rotationsmikrotom „Microm HM355S”	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Schüttelwasserbad „SWB25”	Windhaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Sicherheitswerkbank „Nu-437-400E”	IntegraBiosciences, Fernwald, Deutschland
Thermozykler „iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System”	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultraschallhomogenisator “BandelinSonopuls”	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortexer „Vortex MixerMS3 basic“	Laborfachhandel Gaudig, Osterweddingen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage „Elix10”	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Wippschüttler „Rocher 25“	Labnet, Edison, USA
Zentrifuge „5417R“	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge „5810R“	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge „Mini Spin“	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Wasser für Injektionszwecke (Aqua ad iniectabilia)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
(3-Aminopropyl) triethoxysilane	Sigma, Steinheim, Deutschland
3-Amino-9-Ethylcarbozol (AEC)	Dako, Jena, Deutschland
Aceton	Sigma, Steinheim, Deutschland
Acrylamid/ Bis-Acrylamid-Lösung (30%)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aquatex (wässriges Einbettmittel)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Sigma, Steinheim, Deutschland
D (+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol (75 %, 96%, 100 %)	Otto Fischer, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Fixierungs-/Permeabilisierungs-Diluent	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Fixierungs-/Permeabilisierungs-Konzentrat	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Fluorescein	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Gelatin-basierte Beschichtungslösung	CellBiologics, Chicago, USA
Glycerol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin Lösung nach Mayer	Sigma, Steinheim, Deutschland
Heparin- Natrium	Zentralapotheke, Magdeburg, Deutschland
Immersionsöl 518F	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-HCL)	Pfizer New York, USA
Methanol (CH ₄ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase 5x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumzitat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS, 10 %)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma, Steinheim, Deutschland

Natriummetavanadate (NaVO ₃)	Sigma, Steinheim, Deutschland
n-Dodecyl-beta-Maltosid (LM)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraffin (Gewebe Einbettmedium)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Roti-Histokitt (Einbettmittel)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tergitol (NP-40)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Toluidinblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trisbase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trishydrochlorid (TrisHCL)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trizol	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Rompun)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol (< 98%)	Sigma, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren, biologisch aktive Substanzen

Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTPs)	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
DNase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Dolichos biflorus agglutinin (DBA) Lektin	Biozol, Eching, Deutschland
Hasenserum	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Liberase	Roche, Mannheim, Deutschland
Milchpulver	Sigma, Steinheim, Deutschland
Oligo-Desoxy-Thymidin-Nukleotide (odTs)	Promega, Mannheim, Deutschland
Rekombinantes Interleukin (rIL) 3	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypsin Inhibitor aus <i>Glycine max</i> , Sojabohne (SBTI)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Western Blot Marker	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

2.1.5 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Medienzusammensetzung

Zellkulturmedien:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium 21056 (IMDM)	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium (RPMI)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Smooth Muscle Medium Kit	Cell Biologics, Chicago, USA

Medienzusätze:

Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (AS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	ThermoFisher, Dreieich, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland

Kultivierungs- bzw. Einfriermedien verschiedener Zelllinien:

Zelllinie	Kultivierungsmedium	Einfriermedium
C57BL/6 Maus uterine glatte Muskelzellen	Smooth Muscle Medium Kit	90 % FBS 10 % DMSO
MC/9 (Maus, MC-Linie)	RPMI 10 % FBS 1 % P/S 0,1 mM nichtessentielle AS 0,05 mM β -Mercaptoethanol 30 ng/ml rIL-3	95 % Kulturmedium 5 % DMSO
HMC-1 (Human, MC-Linie)	IMDM 10 % FBS 1 % P/S	50 % FBS 40 % Kulturmedium 10 % DMSO

Medienzusammensetzung für den Verdau von Uterus/ Decidua:

Inaktivierungsmedium	RPMI 10 % FBS 1 % P/S
Liberasemedium	RPMI 5 % P/S 10 μ g/ml Liberase

2.1.6 Pufferlösungen

Allgemeine Pufferlösungen:

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 10x)	80g NaCl 21,9 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 2 g KCL 2 g KH ₂ PO ₄ Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser pH = 7,4
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS, 10x)	87,8 g NaCl 68,5 g TrisHCl 9 g Tris Base Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser pH = 7,6

Pufferlösungen für Durchflusszytometrie:

FACS-Puffer	10 g BSA 1 g NaN ₃ Auffüllen auf 1 l mit PBS (1 x)
Lysis-Puffer (10x)	89 g NH ₄ Cl 10 g KHCO ₃ 0,38 g EDTA Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser
PFA-Lösung (4 %)	5 g PFA 4,28 g Saccharose Auffüllen auf 125 ml mit PBS (1x) pH = 7,4

Pufferlösungen für Immunhistochemie:

Zitratpuffer	82 ml 0,1 M Natriumcitrat 18 ml 0,1 M Zitronensäure 900 ml destilliertes Wasser (1 x) pH = 6
--------------	---

Pufferlösungen für Proteinisolation, Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot:

Ammonium Persulfat (APS) 10 %	1 g Ammonium Persulfat Auffüllen auf 10 ml mit destilliertem Wasser
Blockierungslösung	5 % Milch in TBS (1x): 1 g Milchpulver 20 ml TBS
Elektrophoresepuffer (10x)	144 g Glycin 30,25 g Tris Base Auffüllen auf 800 ml mit destilliertem Wasser; pH = 8,3 10 g SDS Auffüllen auf 1l mit destilliertem Wasser
Lysispuffer	Angaben zur Herstellung von 1 ml: 100 µl NP40 100 µl LM 20 µl NaF 10 µl NaVO ₃ 10 µl PMSF 50 µl Tris (pH 7,5) 20 µl EDTA 33 µl NaCl 657 µl destilliertes Wasser
Probenpuffer (5x)	9 g Glycerol 2,25 g β-Mercaptoethanol 0,9 g SDS 0,0009 g Bromphenolblau 2,7 ml Tris 12,3 ml destilliertes Wasser
Transferpuffer (10x)	144,15 g Glycin 30,3 g Tris Base Auffüllen auf 1l mit destilliertem Wasser

Transferpuffer (1x)	120 ml Transferpuffer (10x) 300 ml Methanol 1080 ml destilliertes Wasser
Waschpuffer	0,05 % Tween in TBS (1x): 500 µl Tween 1 l TBS (1x)
Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

2.1.7 Kitsysteme

Avidin/Biotin Blockierungskit	Biozol, Eching, Deutschland
Bio-Rad Proteinassay	Bio-Rad Laboratories, München Deutschland
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) Annexin V Apoptose Detektions Kit I	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
VectaShield Eindeckmedium für Fluoreszenz mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Biozol, Eching, Deutschland
Vectastain ABC Kit (Peroxidase Standard)	Biozol, Eching, Deutschland

2.1.8 Antikörper

Antikörper für die Durchflusszytometrie:

Allophycocyanin (APC)-konjugierter Hamster anti-Maus CD3e (Klon: 145-2C11)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC-konjugierter Hamster anti-Maus FcεRα (Klon: MAR-1)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC-konjugierter Ratte anti-Maus CD122 (Klon: 5H4)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Phycoerythrin (PE)-konjugierter Maus anti-Maus **NK1.1** (Klon: PK136) BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

PE-konjugierter Ratte anti-Maus **CD117** (Klon: 2B8) BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Peridinin-Chlorophyll (PerCP)-konjugierter Hamster anti-Maus **CD3** (Klon: 145-2C11) BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Antikörper für die Immunhistochemie:

DBA-biotinyliert (Verdünnung1:150) Biozol, Eching, Deutschland

Antikörper für die Immunfluoreszenz:

Erstantikörper:

DBA-FITC (Verdünnung1:50) US Biological, Salem, USA

Mast Cell Chymase (polyklonal, Hase, Verdünnung1:50) Proteintech, Chicago, USA

Smooth muscle actin (Klon: 1A4, monoklonal, Maus, Verdünnung1:50) Dako, Glostrup, Dänemark

Zweitantikörper:

DyLight 594 Affe anti-Hase IgG (Klon 4064, Verdünnung1:500) BioLegend, Fell, Deutschland

Alexa Fluor 555 Ziege anti-Maus IgG (Verdünnung1:500) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper für Western Blot:

Erstantikörper:

Anti-β-Actin (Klon AC-74, monoklonal, Maus, Verdünnung1:10'000) Sigma, Steinheim, Deutschland

Mast Cell Chymase (polyklonal, Hase, Verdünnung1:200) Proteintech, Chicago, USA

Zweitantikörper:

Ziege anti-Hase IgG-HRP (Verdünnung1:1'000) Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

Ziege anti-Maus IgG-HRP
(Verdünnung 1: 5'000)

Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

Antikörper zur Depletion von Zellen in vivo:

Anti-asialo GM1 (polyklonal, Hase anti-Maus/Ratte)

Wako, Neuss, Deutschland

LEAF™ anti-Maus CD122 (IL-2Rβ, Klon TM-β1)

Biozol, Eching, Deutschland

2.1.9 Primer

Mcpt1

Fwd: TGG CAC TTC TCT TGC CTT CT
Rev: GCT CAC ATC ATG AGC TCC AA

Mcpt5

Fwd: CCG ACA CAC TGC AGG AAG TA
Rev: TAT CCC AGC ACA CAG CAG AG

Mcpt6

Fwd: GAC ATC GTG CTG GGT GAC
Rev: ATA AGG AGG TGG GAG AGG C

MMP9

Fwd: CAA TCC TTG CAA TGT GGA TG
Rev: TAA GGA AGG GGC CCT GTA AT

β-Actin

Fwd: TGC GTC TGG ACC TGG CTG G
Rev: ATC CTG TCA GCA ATG CCT GGG

2.1.10 Computerprogramme

AxioVision Rel. 4.6

Zeiss Microimaging, Göttingen,
Deutschland

Cell Quest Pro 4.bf4b

BD Pharmingen, 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 Exel 2010	Microsoft, Berlin, Deutschland
Microsoft Powerpoint 2010	Microsoft, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2010	Microsoft, Berlin, Deutschland
Photoshop CS3/ CS5	Adobe, München, Deutschland

2.1.11 Zelllinien

Mauszelllinien:

C57BL/6 Maus primäre uterine glatte Muskelzellen	CellBiologics, Chicago, USA
MC/9 (MC Linie)	ATTC, Wesel, Deutschland

Humane Zelllinien:

HMC-1 (MC Linie)	Erworben von Mr. Butterfield, Rochester, USA
------------------	--

2.1.12 Mausstämme

Männchen:

BALB/c	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
--------	--------------------------------------

Weibchen:

C57/BL/6N	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
-----------	--------------------------------------

C57BL/6J	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
----------	--------------------------------------

C57BL/6J-Cpa3 ^{+/+}	Institutseigene Zucht. Zuchtpaar erhalten von Prof. Rodewald/ Dr. Feyerabend (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) im Rahmen eines Transferabkommens (MTA-Material Transfer Agreement)
------------------------------	--

C57BL/6J-Cpa3 ^{Cre/+}	Institutseigene Zucht. Kolonie etabliert von Prof. Rodewald/ Dr. Feyerabend (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) im Rahmen eines MTA.
--------------------------------	--

C57BL/6NTac-IL15^{tm1Imx}N5

Institutseigene Zucht. Kommerziell erworben von Taconic, New York, USA.

Mcpt5-Cre⁻ x R-DTA⁺

Institutseigene Zucht. Ursprünglich erworben von Prof. Roers (Institut für Immunologie, TU Dresden, Deutschland).

Mcpt5-Cre⁺ x R-DTA⁺

Institutseigene Zucht. Ursprünglich erworben von Prof. Roers (Institut für Immunologie, TU Dresden, Deutschland).

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1 Tierhaltung

Die Haltung der verschiedenen weiblichen Mausstämme erfolgte artgerecht in Gruppen von zwei bis vier Tieren in jeweils einem Käfig, welche wöchentlich zu Reinigungszwecken ausgetauscht wurden. Männliche Tiere waren einzeln in Käfigen untergebracht. Nahrung und Wasser stand den Tieren stets unbegrenzt zur Verfügung. Im Tierstall herrschte ein 12:12 Stunden Hell-Dunkelrhythmus (Hellphase von 7-19 Uhr), eine Temperatur von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ und eine relative Luftfeuchte von $45 \pm 5 \%$. Alle Versuche wurden vom Landesverwaltungsamt Sachsen Anhalt unter der Tierversuchsantragsnummer 42502-2-1296 UniMD genehmigt. Meine eigene Genehmigung zur Durchführung von Tierexperimenten an der Otto-von-Guericke- Universität Magdeburg wurde durch die erfolgreiche Teilnahme am Kurs „Einführung in tierexperimentelle Methoden für Doktoranden, wissenschaftliches und nichtwissenschaftliches Personal der Hochschule“ erlangt.

2.2.1.2 Verpaarung

Um trüchtige Mäuse zu erhalten, wurden jeweils ein bis drei Weibchen im Alter von sechs bis acht Wochen in den Käfig eines geschlechtsreifen Männchens gesetzt. Zur Verwendung kamen stets BALB/c Männchen, ein vom Weibchen abweichender Stamm, um eine allogene Verpaarung zu erreichen. Um festzustellen, ob es zur Begattung kam, erfolgte die Untersuchung der Weibchen morgens und abends auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes (Plug). Die Sichtung des Plug wurde als Gestationstag 0 definiert. Anschließend erfolgte die Trennung der entsprechenden Weibchen von dem Männchen. Eine Zusammenstellung aller Verpaarungen sowie die Behandlung der Mäuse, Tötungstag und nachfolgende Untersuchungen, einschließlich angewandter Methodik, sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Mauskombinationen		Tötungstag und Art der Untersuchung
<p>BALB/c ♂ C57BL/6 ♀ BL/6N IL-15^{-/-}</p>		<p>gd5: • pNKs (Durchflusszytometrie) • uMCs (Durchflusszytometrie, Histologie) • Mcpt1, Mcpt6 (RT-PCR)</p> <p>gd10: • pNKs (Durchflusszytometrie) • uNKs (Immunhistochemie) • uMCs (Durchflusszytometrie) • Mcpt1, Mcpt6 (RT-PCR) • Implantations- und Abortrate • SA-Analyse (Histologie, Immunfluoreszenz)</p> <p>gd18: • Blutdruck der Mütter (gd0,2,4,6,8,10,14,16,18) • Fetale Gewichte, Plazentagewichte • FPI</p>
<p>BALB/c ♂ C57BL/6 ♀ Cpa3^{+/+} + PBS (250 µl) Cpa3^{+/+} + anti-CD122 (0,25 mg) Cpa3^{Cre/+} + PBS (250 µl) Cpa3^{Cre/+} + anti-CD122 (0,25 mg)</p>	<p>gd0: </p>	<p>gd10: • pNKs (Durchflusszytometrie) • uNKs (Immunhistochemie) • Implantations- und Abortrate • SA-Analyse (Histologie, Immunfluoreszenz) • Mcpt5 (RT-PCR, Western Blot)</p> <p>gd18: • Blutdruck der Mütter (gd0,2,4,6,8,10,14,16,18) • Fetale Gewichte, Plazentagewichte • FPI</p> <p>Geburt: • Gewicht Nachwuchs</p>
<p>BALB/c ♂ C57BL/6 ♀ Mcpt5-Cre⁻ R-DTA⁺ Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺</p>		<p>gd10: • Implantations- und Abortrate • SA-Analyse (Histologie) • MMP9 (RT-PCR)</p> <p>Geburt: • Gewicht Nachwuchs</p>

Abbildung 3: Schematische Darstellung von Mauskombinationen, Behandlung, Tötungstag und Art der Untersuchungen. BALB/c Männchen wurden mit C57BL/6N (BL/6N) WT sowie IL-15-defizienten C57BL/6NTac-IL15^{tm1Imx}N5 (IL-15^{-/-}) Weibchen verpaart. An den Gestationstagen (gd) 5, 10 und 18 erfolgte die Tötung der Weibchen. Des Weiteren wurden BALB/c Männchen mit C57BL/6-Cpa3^{+/+} (Cpa3^{+/+}) WT sowie MC-defizienten C57BL/6-Cpa3^{Cre/+} (Cpa3^{Cre/+}) Weibchen verpaart. Nach Kenntnisnahme des Plugs wurde den Weibchen einmalig entweder PBS (250 µl) oder der NK-depletierende Antikörper anti-CD122 (0,25mg) i.p. injiziert. Die Tötung der Tiere erfolgte am gd10, 18 oder nach dem Absetzen ihrer Nachkommen. Weiterhin wurden BALB/c Männchen mit C57BL/6-Mcpt5-Cre⁻ R-DTA⁺ (Mcpt5-Cre⁻ R-DTA⁺) Kontrolltieren bzw. mit C57BL/6-Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ (Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺) Weibchen, denen Mcpt5-exprimierende Zellen fehlen, verpaart. Am gd10 bzw. nach dem Absetzen ihrer Nachkommen wurden die Weibchen getötet. Untersuchungen beinhalteten neben der Analyse von peripheren NKs (pNKs), uterinen NKs (uNKs) und uterinen MCs (uMCs) die Untersuchung verschiedener MC Proteasen (Mcpt) und einer Matrix-Metalloprotease (MMP) sowie die Bestimmung von Implantations- und Abortraten. Des Weiteren wurde die Umwandlungseffizienz der Spiralarterien (SA) sowie der Blutdruck der Muttertiere, Gewichte von Nachkommen und Plazenten analysiert und die Feto-Plazentaren-Indizes (FPI) ermittelt.

2.2.1.3 Anästhesie und Blutentnahme

Vor der Blutentnahme wurde das Versuchstier durch i.p. Injektion einer körperwarmen Narkoselösung (5 % Ketamin, 2 % Rompun, Verdünnung 1:4 in 0,9 % Kochsalzlösung) anästhesiert. Nach Überprüfung der Empfindungslosigkeit der Maus erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des sich hinter dem Auge lokalisierten retrobulbären Venenplexus, mit Hilfe einer heparinisierten Kapillare. Das Blut wurde aus der Kapillare direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.1.4 Präparation, Probengewinnung, Bestimmung von Implantations-/ Abortrate

Im Anschluss an die Blutentnahme kam es mittels zervikaler Dislokation zur Tötung der Maus. Durch Fixierung in Rückenlage und Ethanolbesprühung konnte vermieden werden, dass bei der Probenentnahme Haare ins Innere der Maus gelangen. Anschließend wurde ein Schnitt ventral am unteren Bauch gesetzt und das Tier bis zum Brustkorb aufgeschnitten, ohne die Bauchdecke zu durchtrennen. Es erfolgten weitere Schnitte in Richtung der Extremitäten, sowie das Lösen der Ober- von der Unterhaut. Nach Entnahme der inguinalen LK, kam es zur Öffnung der Bauchdecke. Im Inneren der Maus wurden die mesenterischen und para-aortalen LK sowie die Milz freipräpariert, ohne das umliegende Gewebe zu verletzen. Die für die Durchflusszytometrie entnommenen Gewebe wurden mit kaltem PBS gewaschen und bis zur weiteren Aufarbeitung in RPMI auf Eis gelagert. Im Anschluss daran erfolgte die Auszählung der Implantationen sowie der Aborte. Aborte konnten durch das Vorhandensein von deutlich nekrotischen Veränderungen bzw. einer wesentlich verringerten Größe von normalen Implantationen unterschieden werden (siehe Abbildung 4).

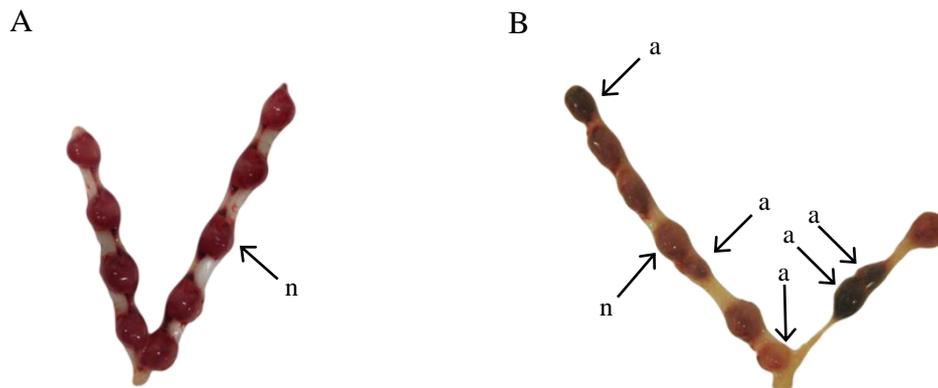


Abbildung 4: Bikornealer Uterus am Gestationstag 10. Bikornealer Uterus mit normalen Implantationen ohne Aborte (A) bzw. mit Aborten (B) am Gestationstag 10. Aborte (a) sind durch nekrotische Veränderungen oder eine sehr geringe Größe im Vergleich zu normalen Implantationen (n) identifizierbar.

Anhand der Anzahl der Aborte und der Gesamtanzahl an Implantationen konnte die Abortrate berechnet werden (siehe Formel 1).

Formel 1:

$$\text{Abortrate [\%]} = \frac{\text{Anzahl Aborte}}{\text{Anzahl Implantationen}} \times 100$$

Die Abtrennung einer Implantation und Fixierung in 4 % PFA mit Saccharose erfolgte für die Histologie. Anschließend wurden die Uterushörner der Länge nach aufgeschnitten, Embryonen und Plazenten vorsichtig entfernt. Zur Aufarbeitung für die spätere Durchflusszytometrie wurde ein Teil der Dezidua in kleine Stücke geschnitten und in Liberasemedium gegeben. Zwei weitere Deziduastücke von jeweils ca. 0,5 cm wurden zur Isolierung von RNA bzw. Protein entnommen, in kaltem PBS gewaschen, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für histochemische Untersuchungen des Uterus am Gestationstag 5 wurde der komplette Uterus entnommen, in einer Einbettkassette mit Hilfe von Kanülen aufgespannt und in 96 % Ethanol über Nacht (ü. N.) bei 4°C fixiert.

2.2.1.5 Depletion von Natürlichen Killerzellen *in vivo* mittels Antikörper-Behandlung

Zur Generierung von Mäusen, welche weder MCs noch NKs besitzen, wurden zwei verschiedene Antikörper auf ihre Fähigkeit untersucht, periphere NKs (pNKs) als auch uNKs *in vivo* zu depletieren. Zur Auswahl kamen die Antikörper anti-asialo GM1⁸³ und anti-CD122⁸¹. Da die Anwendungsprotokolle hinsichtlich Wirkdauer (anti-asialo GM1) bzw. Konzentration (anti-CD122) in der Literatur sehr stark voneinander abweichen, kam es zur Durchführung eines Vorversuches, um die optimalen Bedingungen für eine effiziente Depletion zu erreichen. Die Effizienz der Entfernung von pNKs wurde anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen, die von uNKs mittels Färbung mit DBA Lektin, getestet.

2.2.1.5.1 Anti-asialo GM1 Behandlung

Vorversuch:

Zur Untersuchung der Wirkdauer des Antikörpers erfolgte die i.p. Injektion von 0,29 mg (100 µl) anti-asialo GM1 in C57BL/6J Mäusen. Diese wurden an Tag 2, Tag 4 oder Tag 6 nach der Verabreichung des Antikörpers durch zervikale Dislokation nach Anästhesie getötet. Die entnommenen Gewebe oder Organe Milz, mesenterische Lymphknoten (LK), para-aortale LK, inguinale LK sowie das Blut wurden mithilfe des Durchflusszytometers auf das Vorhandensein von CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ pNK Zellen untersucht (siehe Abbildung 5). Die Werte wurden mit denen unbehandelter C57BL/6 Tiere verglichen. Die anti-asialo GM1-behandelten Tiere wiesen an Tag 2 nach der Injektion des Antikörpers die geringste Anzahl an CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ Zellen in den untersuchten Geweben auf, an Tag 4 erhöhte sich diese wieder. Um eine erneute Anreicherung von NKs zu verhindern, war die Injektion des Antikörpers im Versuch aller 2 Tage zu wiederholen.

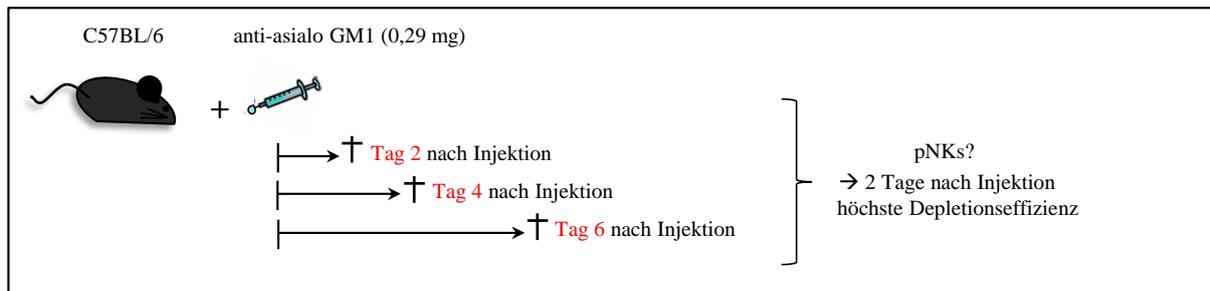


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Untersuchung der Wirkdauer von anti-asialo GM1. Anti-asialo GM1 (0,29 mg) wurde C57BL/6J Weibchen i.p. injiziert. Die Tiere wurden 2, 4, oder 6 Tage nach der Verabreichung des Antikörpers getötet und die Menge an peripheren CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ NKs (pNKs) im Blut, Milz, mesenterischen- und para-aortalen Lymphknoten mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Werte wurden mit denen unbehandelter Tiere verglichen.

Anwendung im Versuch:

Nach der Verpaarung von BALB/c Männchen mit C57BL/6J Weibchen und dem Erkennen des Plugs erfolgte die erste i.p. Injektion von 0,29 mg (100 µl) anti-asialo GM1. Der Antikörper wurde aller zwei Tage erneut injiziert (Gestationstag 0, 2, 4, 6, und 8) (siehe Abbildung 6). Der Kontrollgruppe wurde anstelle des Antikörpers an den entsprechenden Tagen jeweils 100 µl Hasenserum injiziert. Am Gestationstag 10 erfolgte die Tötung der Tiere zur Untersuchung der Depletionseffizienz von pNKs und uNKs.

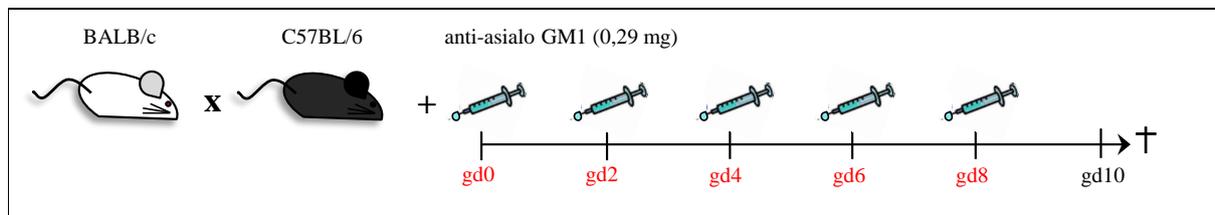


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Anwendung von anti-asialo GM1. BALB/c Männchen wurden mit C57/BL6J Weibchen verpaart. Nach Sichtung des Plugs wurde den Weibchen anti-asialo GM1 (0,29 mg) bzw. den Kontrolltieren Hasenserum (100 µl) i.p. injiziert. Eine erneute Injektion erfolgte aller 2 Tage (Gestationstag (gd) 2, 4, 6, 8). Am gd 10 wurden die Weibchen getötet und standen für die Versuche zur Verfügung.

2.2.1.5.2 Anti-CD122 Behandlung

Vorversuch:

Zur Feststellung der notwendigen Konzentration des anti-CD122 Antikörpers wurde C57BL/6J Weibchen nach Verpaarung mit BALB/c Männchen und Detektion des Plugs 1 mg

(1000 μ l), 0,5 mg (500 μ l) oder 0,25 mg (250 μ l) des Antikörpers i.p. injiziert. Am Gestationstag 10 erfolgte die Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation. Die Untersuchung des Blutes bzw. der entnommenen Gewebe oder Organe Milz, mesenterische LK, para-aortale LK, inguinale LK sowie des Blutes auf CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ pNK Zellen erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers. Ebenfalls erfolgte eine Analyse der Implantationen auf das Vorhandensein von uNKs mithilfe einer DBA Lektin Färbung (siehe Abbildung 7). Bereits die geringste getestete Konzentration des Antikörpers bewirkte eine effektive Depletion von pNKs als auch uNKs und wurde für die Versuche eingesetzt.

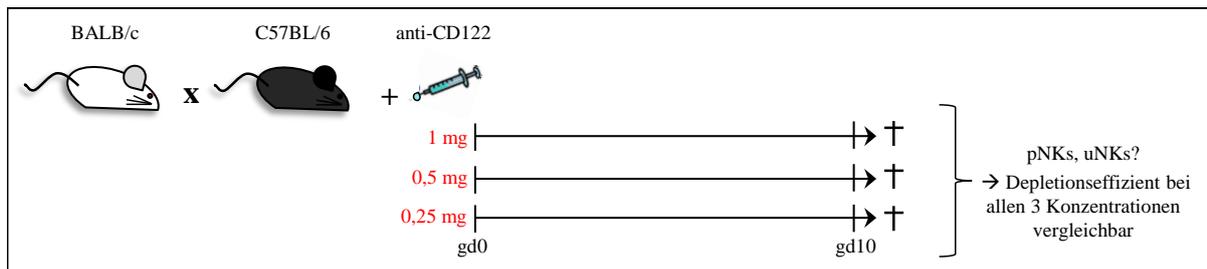


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Untersuchung einer wirksamen Konzentration von anti-CD122. BALB/c Männchen wurden mit C57/BL6J Weibchen verpaart. Nach Sichtung des Plugs wurde den Weibchen anti-CD122 (1 mg, 0,5 mg oder 0,25 mg) i.p. injiziert. Am Gestationstag 10 wurden die Weibchen getötet und die Menge an peripheren CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ NKs (pNKs) im Blut, Milz, mesenterischen- und para-aortalen Lymphknoten mittels Durchflusszytometer analysiert und mit denen unbehandelter Tiere verglichen. Außerdem wurden uterine NKs (uNKs) mittels Immunhistochemie analysiert.

Anwendung im Versuch:

Den Versuchstieren wurde nach Verpaarung und Kenntnisnahme des Plug einmalig 0,25 mg (250 μ l) anti-CD122 i.p. injiziert. Kontrolltiere erhielten statt des Antikörpers 250 μ l PBS i.p. Der Einsatz der Tiere zur Untersuchung der Depletionseffizienz von pNKs und uNKs erfolgte am Gestationstag 10.

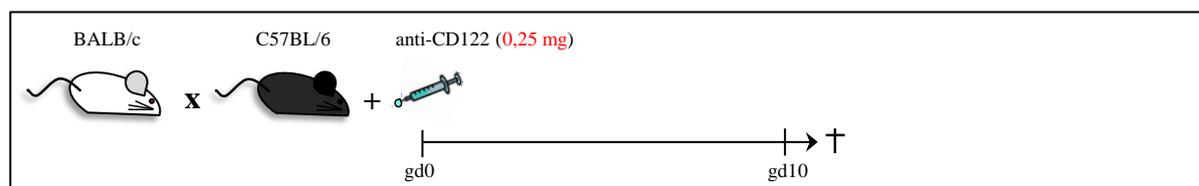


Abbildung 8: Schematische Darstellung des der Anwendung von anti-CD122. BALB/c Männchen wurden mit C57/BL6J Weibchen verpaart. Nach Sichtung eines Plugs wurde den Weibchen anti-CD122 (0,25 mg) bzw. den Kontrolltieren PBS (100 μ l) i.p. injiziert. Am Gestationstag 10 wurden die Weibchen getötet und standen für Versuche zur Verfügung.

2.2.1.6 Blutdruckmessung

Mit Hilfe des vollautomatischen Blutdruckmessgerätes „TSE Blood Pressure Monitoring Systems“ wurde der systolische und diastolische Blutdruck von Mäusen während der gesamten Trächtigkeit bestimmt. Um die Bewegung der Mäuse während der Messung auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die Weibchen zwei Wochen lang jeden Tag 5 min an das Gerät und die Messung gewöhnt, anschließend wurden sie verpaart. Die Blutdruckmessung erfolgte an den Gestationstagen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18. Zur Erzielung besserer Messergebnisse wurden die Tiere vor der Messung 10 min unter einer Rotlichtlampe gewärmt, um eine Erweiterung der Schwanzvene zu erreichen. Anschließend erfolgte die Platzierung der Maus auf der Wärmeplattform (37°C) des Gerätes und die nicht-invasive Messung des Blutdruckes wurde mit Hilfe einer Schwanzmanschette durchgeführt. Der Berechnung des Mittelwertes für systolische und diastolische Werte lagen zehn Einzelmessungen zugrunde.

2.2.1.7 Gewichtsmessung

Für einen Vergleich zwischen den Versuchsgruppen wurden die Gewichte der einzelnen Plazenten und Feten am Gestationstag 18 mit Hilfe einer Waage gemessen. Anhand dieser Werte konnte auch der FPI ermittelt werden (Formel 2):

Formel 2:

$$\text{FPI} = \frac{\text{Gewicht Fetus}}{\text{Gewicht Plazenta}}$$

Des Weiteren wurden die Geburtsgewichte einzelner Feten kurz nach der Geburt durch Wiegen ermittelt.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode der Zellenanalyse, bei der einzelne Zellen in einer Suspension untersucht werden können. Zur Identifikation der Oberflächenmoleküle findet eine Inkubation der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern statt. Die Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt, fließen hintereinander durch die Messkammer des Durchflusszytometers und passieren einen oder mehrere Laserstrahlen,

welche die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper zur Fluoreszenz anregen. Neben der Messung der Fluoreszenz wird die Streuung des Anregungslichtes detektiert, welches bei dem Durchtritt der Zellen durch den Laser entsteht. Man unterscheidet zwischen Vorwärtsstreulicht, welches die Lichtstreuung der Zellen in einem flachen Winkel zum Laser darstellt, und dem Seitwärtsstreulicht, der Lichtstreuung der Zellen im rechten Winkel zum Laser. Das Vorwärtsstreulicht (forwardscatter, FSC) lässt Rückschlüsse auf die Größe einer Zelle ziehen. Das Seitwärtsstreulicht (sidescatter, SSC) gibt Aufschluss über Granularität der Zelle. Durch Messung der Fluoreszenz, welches beim Durchtritt der Zellen durch den Laser emittiert wird, kann auf die Oberflächenmarker der Zellen geschlossen werden und eine Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp ist möglich. Die graphische Darstellung kann mit Hilfe eines Dot Plots oder eines Histogramms erfolgen ¹⁶⁴.

Die Durchflusszytometrie kam zur Anwendung, um die Expression verschiedener Oberflächenmarker zu analysieren, anhand dessen den prozentualen Anteil an NKs (CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺) oder MCs (CD117⁺FcεRα⁺) in verschiedenen Geweben und im Blut festzustellen und diesen zwischen verschiedenen Tiergruppen an einem definierten Gestationstag zu vergleichen.

2.2.2.1 Isolierung von Lymphozyten aus Blut und verschiedenen Geweben

Lymphozyten wurden zum Zweck der durchflusszytometrischen Zellanalyse aus dem Blut oder aus Gewebe von Mäusen isoliert. Anschließend erfolgte die Markierung der Zelloberflächenmoleküle mittels Antikörpern.

Lymphozytenisolierung aus Blut

Um das Plasma von den übrigen Blutbestandteilen abzutrennen, erfolgte eine Zentrifugation (7000 rpm, 10 min, 21°C). Das Plasma wurde abgenommen und die verbleibenden Blutbestandteile zusammen mit Lysispuffer (1x) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zentrifugation (1200 g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet mit 10 ml RMPI gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend kam es zur Verteilung der Suspension auf Rundbodenröhrchen.

Lymphozytenisolierung aus Milz und Lymphknoten

Die entsprechenden Organe wurden unter Zugabe von 4 ml RPMI durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße in eine Zellkulturplatte (6 Vertiefungen) gegeben und anschließend mit Lysispuffer (1x) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 10 min bei RT inkubiert. Das Pellet wurde nach Zentrifugation (1200 g, 10 min, 4°C) mit 10 ml RPMI gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Verteilung auf Rundbodenröhrchen.

Lymphozytenisolation aus Dezidua

Beide Uterushörner wurden der Länge nach aufgeschnitten, Plazenten und Embryonen entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der zerschnittenen Deziduastücke in Liberasemedium im CO₂-Inkubator. Nach 60 min kam es zur Inaktivierung der Liberase durch die Zugabe von Inaktivierungsmedium (Volumenverhältnis 1:1). Im Folgenden wurden die Deziduastücke unter Zugabe von 2 ml RPMI durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße und im Anschluss darauf erneut durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße in eine Zellkulturplatte (6 Vertiefungen) überführt. Nach weiteren 30 min Inkubation im CO₂-Inkubator erfolgte die Zentrifugation (1200 g, 10 min, 4°C) der Zellsuspension in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und auf Rundbodenröhrchen verteilt.

2.2.2.2 Markierung von Zelloberflächenmarkern mittels Antikörpern

Zur Markierung der Oberflächenmarker von Zellen wurden die zuvor hergestellten Einzelzellsuspension in Rundbodenröhrchen zentrifugiert (1200 g, 10 min, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet anschließend mit 100 µl Antikörperlösung (Verdünnung 1:100 in FACS Puffer) bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Analyse von NKs erfolgte nach Gabe von FITC-markierten CD122, APC oder PerCP-markierten CD3 und PE-markierten NK1.1 Antikörpern. Die Untersuchung von MCs geschah mit Hilfe von PE-markierten CD177 und FITC-markierten FcεRα Antikörpern. Den Negativkontrollen wurden anstelle der Antikörperlösung 100 µl FACS Puffer zugegeben. Nach 30 min erfolgte die Zentrifugation der Proben nach Zugabe von 1 ml FACS Puffer (1200 g, 10 min, 4°C). Dem Pellet wurden 100 µl FACS Puffer zugegeben und die Messung erfolgte im Anschluss.

2.2.2.3 Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Nach Messung der Antikörper-markierten Zellsuspensionen durch das Durchflusszytometer erfolgte die Auswertung der Daten mit Hilfe der Cell Quest Pro 4.bf4b Software. Es wurde der prozentuale Anteil an $CD122^+CD3^-NK1.1^+$ NKs und $CD117^+Fc\epsilon R\alpha^+$ MCs bestimmt.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Fixierung von Gewebe

Fixierung von Uteri:

Die Fixierung des Mausuterus erfolgte nach der 1962 entwickelten Methode nach Sainte-Marie. Nach Entnahme des Uterus wurde dieser in kaltem PBS gewaschen, mit Hilfe von Kanülen in einer Einbettkassette aufgespannt und in 96 % Ethanol ü. N. bei 4°C zur Fixierung gelagert. Am folgenden Tag schloss sich die Entwässerung des Gewebes durch zweistündige Inkubation in einem auf Eis gelagertem Ethanolbad (100 %) an. Das Ethanolbad wurde dabei alle 30 min erneuert. Anschließend erfolgte ein einstündiges Xylolbad, ebenfalls auf Eis, das alle 20 min erneuert wurde. Die Proben wurden danach 1 h bei RT in Xylol inkubiert. Hierbei war das Xylol alle 30 min zu erneuern. Die Proben wurden ü. N. in etwa 60°C warmes, flüssiges Paraffin gelegt und am folgenden Tag in Paraffin eingebettet.

Implantationsfixierung:

Der bikorneale Uterus wurde der Maus entnommen. Eine komplette Implantation abgetrennt, in kaltem PBS gewaschen und in 4 % PFA-Lösung mit Saccharose 6 h bei RT auf dem Schüttler und anschließend ü. N. bei 4°C in 17 % Ethanol fixiert. Am folgenden Tag wurde ca. ein Drittel der Implantation mit einem Skalpell entfernt (siehe Abbildung 9) und verworfen. Dies diente dazu, beim verbleibenden Teil der Implantation eine parallele Schnittfläche zum Einbetten und Schneiden zu erhalten. Die Inkubation der Implantation erfolgte zum Zwecke der Entwässerung jeweils 15 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (2 x 70 % Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 95 % Ethanol, 4 x 100 % Ethanol) bei RT unter Schütteln. Anschließend wurde die Überführung in Eindeckkassetten sowie die Inkubation der Proben in Xylol, welches sowohl mit Ethanol als auch mit Xylol mischbar ist, für 2 x 25 min unter Schütteln bei RT durchgeführt. Die Lagerung der Proben in flüssigem, etwa 60°C warmen Paraffin fand ü. N. statt.

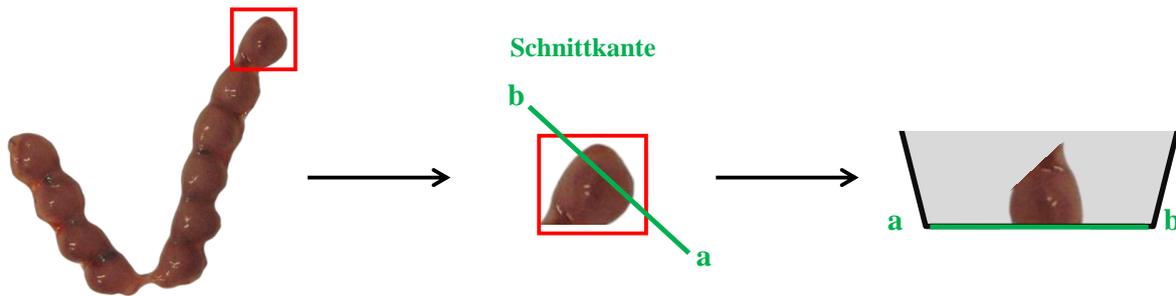


Abbildung 9: Darstellung der Vorbereitung einer Implantation zur Fixierung und Positionierung bei der Einbettung in Paraffin. Der bikornealen Uterus wurde dem Versuchstier am Gestationstag 10 entnommen. Eine einzelne Implantation wurde abgetrennt und nach Fixierung etwa ein Drittel entlang der dargestellten Schnittkante mit einem Skalpell abgetrennt. Das größere Stück der zerteilten Implantation wurde mit der Schnittfläche nach unten mittig auf eine Einbettkassette gelegt und in Paraffin eingebettet.

2.2.3.2 Paraffineinbettung

Die paraffindurchtränkten Gewebe wurden auf einer Wärmeplatte mittig in einer mit Paraffin gefüllten metallischen Einbettkassette ausgerichtet, mit einer Einbettkassette aus Plastik bedeckt und mit Paraffin aufgefüllt. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Kühlplatte. Nach vollständiger Abkühlung konnte die in Paraffin eingebettete Probe aus der metallischen Einbettkassette entnommen und ü. N. bei -20°C gelagert werden.

2.2.3.3 Schnittpräparation

Zum Erlangen besserer Schneideresultate erfolgte die Lagerung der Paraffinblöcke vor dem Schneiden ü. N. bei -20°C . Nach Überführung der gekühlten Blöcke in die entsprechende Vorrichtung des Mikrotoms, wurde zunächst bis zur Mitte der Implantation bzw. des Gewebes grob geschnitten ($20\ \mu\text{m}$ Schnittdicke). Anschließend wurden $5\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte angefertigt, die zur Streckung in ein auf 45°C temperiertes Wasserbad gegeben und anschließend auf beschichtete (2 min in 2 % (3-Aminopropyl)-triethoxysilane in 98 % Aceton) Objektträger überführt wurden. Die Trocknung der Objektträger erfolgte ü. N. bei RT.

2.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Charakterisierung der SA kam es zur Entnahme von Implantationen am Gestationstag 10. Diese wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung gefärbt.

Hierfür wurden die Proben auf den Objektträgern zunächst durch 2 x 10 min Inkubation in Xylol deparaffinisiert, um eine Bindung der Farbstoffe an die Zellstrukturen zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Proben zur Fixierung jeweils 5 min in Ethanol verschiedener Konzentrationen (100 %, 96 %, 75 %) und 5 min in destilliertem Wasser bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben 2 min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und zweimal kurz in warmes Leitungswasser getaucht. Hämatoxylin wurde benutzt, um saure Zellbestandteile, wie beispielsweise Zellkerne, blau anzufärben. Die anschließende Eosinfärbung diente der Anfärbung von basischen Zellstrukturen, somit wird beispielsweise das Zytoplasma von Zellen rosa gefärbt. Die Proben wurden 1 min in Eosin-Lösung inkubiert, danach kurz in destilliertes Wasser getaucht. Als nächstes erfolgte zehnfaches Eintauchen der Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (75 %, 95 %, 100 %). Abschließend wurden die Proben 2 x 2 min in Xylol inkubiert und mit dem synthetischen Einschlussmedium Roti-Histokitt und einem Deckglas bedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Schnitte erfolgte am folgenden Tag.

2.2.3.4.1 Spiralarterienanalyse

Nach erfolgter Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnten die SA, welche sich in der *decidua basalis* der Implantationen befinden (siehe Abbildung 10), durch mikroskopische Vermessung analysiert werden.

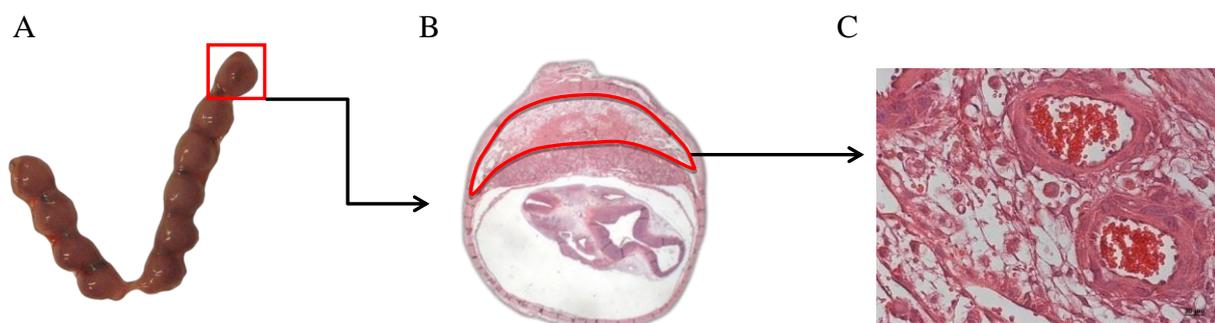


Abbildung 10: Spiralarterien (SA) in der *decidua basalis* einer Implantation. Der bikornealen Uterus (A) wurde der Maus am Gestationstag 10 entnommen, eine einzelne Implantation abgetrennt, in Paraffin eingebettet, 5 µm dicke Querschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung gefärbt. In der rot umrandeten *decidua basalis* (B) befinden sich die SA, die mikroskopisch vergrößert (C) und vermessen wurden.

Mit Hilfe eines Lichtmikroskopes und der AxioVision4 Software wurden jeweils der Umfang der gesamten Arterie sowie der Umfang des Lumens von drei bis zehn SA pro Implantation von Weibchen am Gestationstag 10 vermessen. Anschließend wurde der Durchmesser der gesamten SA sowie der Durchmesser des Lumens bestimmt (siehe Formel 3). Mithilfe der erhaltenen Größen konnte das Wand-zu-Lumen Verhältnis ermittelt werden (siehe Formel 4). Des Weiteren konnte die Wanddicke der SA berechnet werden (siehe Formel 5). Abschließend wurden die Mittelwerte der SA Wanddicke bzw. des Wand-zu-Lumen Verhältnisses von mehreren SA pro Weibchen sowie pro Versuchsgruppe berechnet.

Formel 3:

$$\text{Durchmesser} = \frac{\text{Umfang}}{\pi}$$

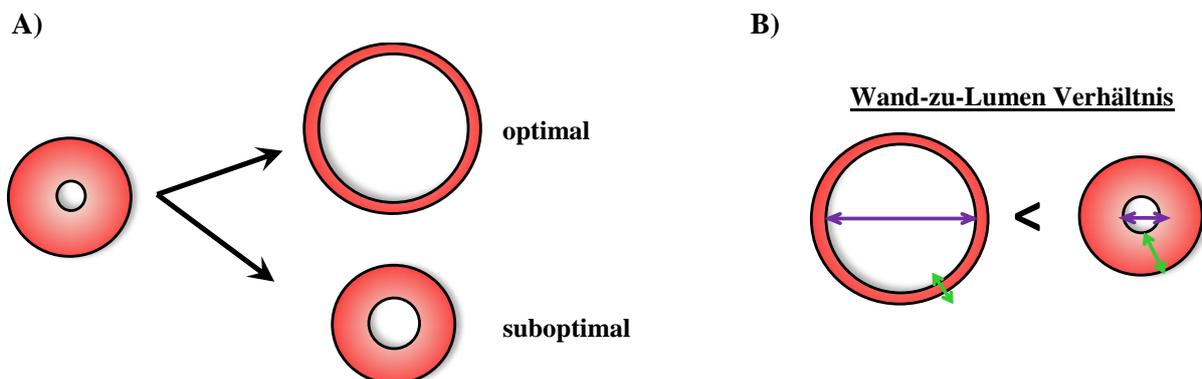
Formel 4:

$$\text{Wand-zu-Lumen Verhältnis} = \frac{\text{SA Durchmesser}}{\text{Lumen Durchmesser}}$$

Formel 5:

$$\text{Wanddicke} = \frac{\text{SA Durchmesser} - \text{Lumen Durchmesser}}{2}$$

Eine dickere SA Wand oder ein großes Wand-zu-Lumen Verhältnis ist ein Indikator für eine unzureichende Umwandlung der SA im Vergleich zu dünnen Wänden bzw. einem geringen Wand-zu-Lumen Verhältnis (siehe Abbildung 11).

**Abbildung 11: Schematische Darstellung einer optimalen sowie suboptimalen Spiralarterienumwandlung.**

(A) Dickwandige Spiralarterien (SA) werden zu Beginn der Schwangerschaft in dünnwandige Arterien umgewandelt, um einen optimalen Blutfluss zum Fetus zu gewährleisten. Dabei kommt es durch einen Abbau der Wand zu einer Vergrößerung des Lumens. Verläuft die Umwandlung suboptimal, bleiben die SA dickwandig und das Lumen wird nicht im benötigten Umfang erweitert. (B) Daraus ergibt sich bei optimal umgewandelten SA mit dünner Wand (grüne Pfeile) und großen Lumen (lila Pfeile) ein kleineres Wand-zu-Lumen Verhältnis, als bei suboptimal umgewandelten, dickwandigen SA mit kleinem Lumen.

2.2.3.5 Toluidinblau-Färbung und Mastzellauszählung

Um die Anzahl an uMCs zwischen verschiedenen Mausstämmen zu vergleichen, wurde die Toluidinblau-Färbung in Schnittpräparaten von Uterusproben durchgeführt, welche am Gestationstag 5 aus Mäusen entnommen wurden. Bei der Verwendung von Toluidinblau macht man sich die metachromatischen Eigenschaften des Farbstoffes zunutze, die eine Differenzierung verschiedener Gewebe ermöglichen. Während sich MC Granula violett färben, erscheint das umliegende Gewebe blau. Nach der Deparaffinisierung und Fixierung, wie unter Punkt 2.2.3.4 beschrieben, wurden die Objektträger mit den sich darauf befindenden Gewebeschnitten 45 sek in 0,1 % Toluidinblaulösung und danach kurz in destilliertes Wasser getaucht. Dann erfolgte die Dehydratation durch 10-faches Eintauchen der Objektträger in 75 %, 95 % und zuletzt 100 % Ethanol. Im Folgenden waren die Proben zweimal für 2 min in Xylol zu inkubieren und mit Roti-Histokitt und einem Objektglas zu bedecken. Toluidinblau-positive, violette Zellen wurden als uMCs identifiziert.

Mit Hilfe eines Durchlichtmikroskopes und eines Okularmikrometers wurden uMCs ausgezählt. Das Okularmikrometer besteht aus 10x10 Einzelquadraten, wobei jedes Einzelquadrat bei Verwendung des 20er Objektivs eine definierte Größe von 60x60 μm aufweist. Dies entspricht einer Gesamtfläche von **0.36 mm²**. Diese 10x10 Einzelquadrate wurden an 10 Stellen des Uterus ausgezählt, anschließend der Mittelwert gebildet (**MW MCs**). Anhand der Auszählung und der angegebenen Größen konnte die Anzahl an MCs pro 1 mm² berechnet werden (Formel 6).

Formel 6:

$$\text{Mastzellen/mm}^2 = \frac{(\text{MW MCs}) * 1 \text{ mm}^2}{0,36 \text{ mm}^2}$$

2.2.3.6 Dolichos Biflorus Agglutinin Lektin-Färbung

Die Identifizierung von uNKs erfolgte anhand der Färbung von Implantationen, welche am Gestationstag 10 entnommen wurden, mit DBA Lektin. Das Lektin bindet spezifisch an N-Acetyl- α -D-Galactosamine, die sich in den zytoplasmatischen Granula sowie auf der Zellmembran von uNKs befinden. Es ermöglicht, murine uNKs von allen anderen Lymphozyten zu unterscheiden, da keine andere Zellpopulation eine vergleichbare Reaktivität zu DBA Lektin im Vergleich zu uNKs zeigt ⁶⁷.

Bei der in der Arbeit angewandten DBA Lektin-Färbung wird biotinyliertes DBA als Primärantikörper eingesetzt. Bei der Kopplung von Biotin an DBA macht man sich die starke Bindung zwischen Biotin und Streptavidin zunutze. Die an den Zweitantikörper Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Umsetzung des chromogenen Substrates AEC, welches als braunes Präzipitat ausfällt.

Nach erfolgter Deparaffinisierung und Fixierung wie unter Punkt 2.2.3.4 beschrieben, wurden die Implantationen auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet und mit 3 % H₂O₂ in Methanol für 30 min bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach einem zweifachen Waschschrift in 50 mM PBS erfolgte 15 min Avidinblockierung, ein zweifacher Waschschrift mit PBS und 15 min Biotinblockierung mit erneutem Waschen für 2 x 5 min. Zur Proteinblockierung wurden die Objektträger 30 min mit 1 % BSA in 100 mM PBS behandelt. Die Färbung mit DBA Lektin (Verdünnung 1:150 in 1 % BSA in 100 mM PBS) erfolgte ü. N. bei 4°C. Die Negativkontrolle wurde anstelle von DBA Lektin mit 1 % BSA in 100 mM PBS inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger 2 x 5 min mit PBS gewaschen und im Anschluss mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Lösung für 30 min inkubiert. Nach 2 x 5 min Waschen wurden die Proben 6 min mit AEC Substrat Chromogen behandelt und erneut gewaschen. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung für 1-2 min, danach die Objektträger kurz in warmes Leitungswasser getaucht und anschließend mit dem wässrigen Eindeckmittel Aqua Tex und einem Objektglas bedeckt. Die Analyse erfolgte am darauf folgenden Tag mit Hilfe eines Lichtmikroskopes. uNKs wurden als DBA Lektin-positive, braune Zellen identifiziert, mittels eines Okularmikrometers gezählt und per 1 mm² berechnet (Vorgehensweise und Berechnung entspricht Formel 6 unter Punkt 2.2.3.5).

2.2.4 Immunhistochemie

Das Prinzip immunhistochemischer Färbungen basiert auf der Reaktivität verschiedener Antikörper gegen gewisse Oberflächenstrukturen auf Zellen oder in Geweben, die als Epitope bezeichnet werden. Die Epitope und die als Erstantikörper bezeichneten Antikörper, gehen eine feste Bindung ein. Zweitantikörper, die gegen Strukturen des Primärantikörpers gerichtet und außerdem an ein Enzym gekoppelt sind, werden dem Reaktionsansatz zugegeben. Das Enzym ist in der Lage, ein Substrat umzuwandeln und durch den daraus resultierenden Farbumschlag als Indikator für die Lokalisierung des Epitopes zu dienen.

2.2.4.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Variante der Immunhistochemie, bei der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper zur Detektion eines Zielgens verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunfluoreszenz in Proben, welche in Paraffin eingebettet waren, durchgeführt. Nach der Standard-Deparaffinisierung, wie unter Punkt 2.2.3.4 beschrieben, erfolgte die Antigendemaskierung durch Kochen der Objektträger in der Mikrowelle (600 W) für 10 min in 0.1M Zitratpuffer (pH 6.0) zur Wiederherstellung der Immunreaktivität der Proben, welche eventuell nach Paraffin blockiert war. Nach Abkühlung der Proben wurden diese mit einem Fettstift umrandet und 3 x 5 min in TBS gewaschen. Für die Aktinfärbung glatter Muskelzellen wurden die Proben ü. N. bei 4°C mit dem Primärantikörper „smooth muscle actin“ (Verdünnung 1:50 in 10 % BSA in TBS) inkubiert, anschließend gewaschen und 2 h bei RT mit dem AF555-gekoppelten sekundären Ziege anti-Maus AK inkubiert (Verdünnung 1:500 in 10 % BSA in TBS). Zur Färbung von Implantationsquerschnitten mit Mcpt5 und DBA Lektin wurden diese ü. N. bei 4°C mit dem Primärantikörper „Mcpt5“ (Verdünnung 1:50 in 10 % BSA in TBS) inkubiert. Negativkontrollen wurden mit 10 % BSA in TBS anstelle der Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit TBS und eine Inkubation von 2 h bei RT mit dem DyLight 594-gekoppelten sekundären Affe anti-Hase AK (Verdünnung 1:500 in 10 % BSA in TBS). Nach einem erneutem Waschschrift wurden die Proben mit FITC-konjugiertem DBA (Verdünnung 1:50 in 10 % BSA in TBS) für 2 h bei RT inkubiert. VECTASHIELD® Einbettmedium mit DAPI zur Kernfärbung genutzt.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Isolation von RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte aus Deziduaprobe, welche zuvor bei -80°C gelagert waren und folgte dem Prinzip der single-step Methode¹⁶⁵. Hierbei wurden die Proben in ein 2 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt und nach der Zugabe von 1 ml Trizol homogenisiert. Anschließend wurde die RNA unter Zugabe von eiskaltem Chloroform und anschließender Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) extrahiert. Im Reaktionsgefäß bilden sich drei Phasen, wobei die obere, wässrige Phase die RNA enthält. Diese wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mittels kaltem Isopropanol (im Mengenverhältnis 1:1) präzipitiert und ü. N. bei -80°C gelagert. Am folgenden Tag wurde die RNA nach einem zweifachen Waschschrift mit

eiskaltem 80 % Ethanol (Zentrifugation bei 7500 g, 5 min, 4°C) etwa 7 min bei RT getrocknet und anschließend, je nach Größe des Pellets, in 11–31 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.5.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Die Bestimmung der Konzentration sowie der Reinheit der RNA erfolgte in 1:200 in destilliertem Wasser verdünnten Proben. Die spektrometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, diente der Bestimmung der RNA Konzentration. Die spektrometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, und die anschließende Quotientenbildung der 260 nm/280 nm-Werte diente der Reinheitsbestimmung der Proben. Angestrebt wurden Werte im Bereich 1,8 bis 2,0. Ein Wert außerhalb dieses Bereiches zeigte eine Verunreinigung der RNA Proben mit Proteinen, DNA oder anderen Kontaminationen an und führte dazu, dass die Probe nicht verwendet wurde.

2.2.5.3 Synthese von komplementärer DNA

Bei der Synthese von komplementärer DNA (cDNA) diente die Gesamt-RNA als Ausgangsstoff, um die darin enthaltene mRNA in cDNA umzuschreiben. Bei der cDNA Synthese wurden 2 µg der Gesamt-RNA bis zu einem Volumen von 18 µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt und mit 2 µl Oligo-Desoxy-Thimidin-(oligo dT) Nukleotiden 10 min bei 75°C inkubiert. In dieser Zeit fand die Anlagerung der oligo dT-Nukleotide an den poly-A Schwanz der mRNA statt und bildete somit den Startpunkt für die Verlängerung entlang des Nukleotidstranges. Es folgte eine Inkubation der Proben auf Eis. Die mit oligo dTs markierte mRNA wurde anschließend für 30 min bei 37°C mit dNTPs (4 µl, 2.5 mmol/l), DNase I (2 µl, 2 U/µl) und RNase Inhibitor (0,5 µl, 40 U/µl) in einem Reaktionspuffer (8 µl) inkubiert. Während dieses Schrittes kam es durch die Aktivität der DNase zum Abbau verbliebener DNA in den Proben. Die DNase Inaktivierung erfolgte durch Inkubation bei 75°C für 5 min. Die Proben wurden erneut 2 min auf Eis gelagert. Die cDNA Synthese erfolgte durch Zugabe des Enzymes Reverse Transkriptase (1 µl, 200 U/µl) und RNase Inhibitor (1 µl, 40 U/µl) bei 42°C für 60 min. Nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 94°C für 5 min, schloss sich die Lagerung der cDNA Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C an.

2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA. Bereits kleinste Mengen des genetischen Erbmaterials reichen aus, um mit Hilfe von Primern, dem Enzym Taq Polymerase und Nukleotiden in einem entsprechenden Puffer, spezifische Sequenzabschnitt der DNA zu vermehren. Die Reaktion besteht aus den folgenden drei Phasen: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Im ersten Schritt, der Denaturierung, kommt es zum Erwärmen des Reaktionsansatzes auf über 90°C, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA zu lösen und die Doppelstränge voneinander zu trennen. Durch die hohe Temperatur wird ebenfalls sichergestellt, dass die Primer sich nicht zusammenlagern und einzelsträngig vorliegen. Im zweiten Schritt, der Primerhybridisierung, wird die Temperatur runterreguliert, um die Anlagerung der Primer an die DNA Einzelstränge zu ermöglichen. Die Temperatur ist abhängig von den eingesetzten Primern und liegt im Normalfall 2°C unter der Schmelztemperatur der kurzen Oligonukleotide. Während der dritten Phase, der Elongation, welche bei 72°C stattfindet, werden die Primer von der Polymerase mit den Nukleotide komplementär zum Gegenstrang verlängert. Die drei Zyklen werden mehrfach wiederholt. Die dabei entstandenen Produkte dienen jeweils als Ausgangsstoff für den nächsten Zyklus. Daraus ergibt sich eine Kettenreaktion, die sich auch im Namen der Methode widerspiegelt. Die Reaktion findet in einem Thermozykler statt, der zu einer automatischen Temperaturregulation fähig ist. Am Ende der Reaktion wird das PCR Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden können anhand ihrer Größe auf das Vorhandensein bestimmter Gene analysiert werden.

2.2.5.4.1 Echtzeit (real-time) PCR mit der SYBR Green Methode

Die real-time PCR ist eine Variante der PCR, bei welcher fluoreszierende Stoffe eingesetzt werden, um die Zunahme der PCR Produkte in „Echtzeit“, d.h. zu jedem Zeitpunkt der Reaktion, verfolgen zu können. Bei der SYBR Green Methode wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert. Die Fluoreszenz steigt proportional zur entstandenen Menge an doppelsträngiger DNA, wodurch die Menge an gebildetem Produkt zu einem jedem Zykluszeitpunkt ermittelt und auf die Ausgangsmenge an DNA geschlossen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die real-time PCR genutzt, um die aus mRNA umgeschriebene cDNA zu vervielfältigen und somit die Ausgangsmenge an mRNA zu einen

bestimmten Zeitpunkt der Trächtigkeit zwischen verschiedenen Mausstämmen zu vergleichen, um Unterschiede in der Genexpression zu analysieren.

Zur Kühlung fand die Vorbereitung der Proben auf Eis statt. Zu 1 µl cDNA (1 µg) wurden 6,5 µl SYBRGreen PCR Mastermix, 2 µl RNase freies Wasser, 3 µl Mcpt5 Primermix und 0,5 µl Fluorescein (50 nM) in eine Vertiefung einer PCR Platte (96 Vertiefungen) gegeben. Den Negativkontrollen enthielten 1 µl Wasser anstelle von cDNA. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Reaktionszyklen der PCR sind Tabelle 2 zu entnehmen. Zur relativen Quantifizierung wurde β-Actin als Referenzgen mitgeführt.

Tabelle 2: Verwendete PCR Zyklen. Dargestellt sind die verschiedenen Zyklen während der PCR unter Angabe von Temperatur, Zeit und Anzahl der Zyklen.

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	} 40
Hybridisierung	60°C (Mcpt1, Mcpt5) 55°C (Mcpt6) 56°C (MMP9)	45 s	
Elongation	72°C	30 s	
Finale Denaturierung	95°C	1 min	1

2.2.5.4.2 Auswertung der real-time PCR-Expressionsanalysen

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung. Dabei wird die Expression des zu untersuchenden Zielgens auf die Expression eines überall gleichermaßen exprimierten Referenzgens, in diesem Fall β-Actin, bezogen. Zunächst werden die Ct-Werte (cycle treshold, Schwellenwert-Zyklus) vom Ziel- als auch vom Referenzgen ermittelt. Der Ct-Wert zeigt den Beginn der exponentiellen Phase an, in der die Fluoreszenz der gebildeten PCR Produkte die Hintergrundfluoreszenzsignale erstmals signifikant übersteigen. Anschließend kommt es zur Normalisierung der Expressionswerte des zu untersuchenden Zielgens und der Expressionswerte des Referenzgenes durch Subtraktion des Ct-Wertes des Referenzgenes vom Ct Wert des Zielgens (Formel 7). Im Anschluss ist es möglich, die relative Expression des Zielgens zu berechnen (Formel 8). Vorteil der relativen Quantifizierung ist der Ausgleich von Abweichungen der RNA Ausgangsmenge in den Proben.

Formel 7:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

Formel 8:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta C_t}$$

2.2.5.5 Isolation von Proteinen

Zur Isolation von Proteinen aus Deziduaprobe, welche zuvor bei -80°C gelagert waren, wurden diese mit Lysispuffer versetzt. Die Menge an Lysispuffer wurde dabei so gewählt, dass das jeweilige Gewebe bzw. das Zellpellet gerade vom Puffer bedeckt war. Sofort nach Pufferzugabe wurden die Zellen mittels Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen. Hierfür wurden die Proben 2×5 sec beschallt und zwischen den beiden Zyklen im Eisbad gekühlt. Nach weiteren 60 min Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (12000 rpm, 20 min, 4°C), wurden die Überstände abgenommen und ü. N. in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert.

2.2.5.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte basierend auf der 1976 entwickelten Methode nach Bradford mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay ¹⁶⁶. Die Funktionalität des Bio-Rad Protein Assay basiert auf dem Farbumschlag von Coomassie Brilliantblau G-250 in Folge verschiedener Proteinkonzentrationen. Es wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ der zuvor 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnten Proteine in Doppelbestimmung auf eine Flachbodenplatte (96 Vertiefungen) pipettiert. Ebenfalls wurde eine BSA Standardreihe (1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,01 mg/ml) erstellt, hierfür BSA im entsprechenden Verhältnis mit destilliertem Wasser verdünnt. Von jedem Standard wurden ebenfalls $10 \mu\text{l}$ in Doppelbestimmung in Vertiefungen der Flachbodenplatte gegeben. Sowohl zu den Standards, als auch zu den Proben wurden jeweils $200 \mu\text{l}$ einer mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnten, steril filtrierten Bio-Rad Farbstoff-Konzentrat-Lösung gegeben. Pure Bio-Rad Farbstoff-Konzentrat-Lösung diente als Blank. Im Anschluss an eine Inkubation bei RT für 5 min erfolgte die photometrische Messung der Proben bei 595 nm, dem Absorptionsmaximum des im Bio-Rad Protein Assay enthaltenen Farbstoffes. Die Proteinkonzentration wurde im Folgenden anhand der BSA Standardkurve ermittelt.

2.2.5.7 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, zum Zwecke der Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern.

2.2.5.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Variante der Gelelektrophorese, die es ermöglicht, Proteine im elektrischen Feld aufzutrennen. Als Trennmedium wird dabei ein Gel aus Polyacrylamid genutzt, das je nach eingesetzter Acrylamidkonzentration eine netzartige Struktur mit unterschiedlicher Porengröße ausbildet. TEMED wird als Katalysator, APS als Radikalstarter für die Polyacrylamid-Polymerisation eingesetzt. Das Detergenz SDS wird verwendet, um die Eigenladung der Proteine mit negativen Ladungen zu überdecken, um bei der Denaturierung während der Probenvorbereitung eine Abstoßung zwischen den negativen Ladungen und somit eine effektivere Streckung des Proteins zu erreichen. Außerdem ermöglicht erst das Vorhandensein negativer Ladungen die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld. In Abhängigkeit von der Porengröße des Polyacrylamidgels wandern kleinere Proteinbestandteile schneller, größere Proteinbestandteile langsamer im Gel und werden so aufgrund ihrer Größe aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE verwendet, um die aus Dezipuapoben isolierten Proteingemische aufzutrennen und anschließend mittels Western Blot und Proteindetektion auf das Vorhandensein bestimmter Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt der Trächtigkeit zwischen verschiedenen Tierstämmen zu vergleichen.

Nach Zusammenbau der Gelapparatur wurde das 12 % Trenngel entsprechend der Angaben in Tabelle 3 hergestellt und mit einer Pasteurpipette zwischen zwei Glasscheiben gegeben, die durch Abstandhalter definierter Größe voneinander getrennt sind. Zum Erreichen einer geraden Gelkante kam es zur Überschichtung der Gelmasse mit Isopropanol. Nach Auspolymerisierung wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel entsprechend Tabelle 3 hergestellt und mit einer Pasteurpipette auf das Trenngel gegeben, anschließend der Probenkamm in dem noch flüssigen Gel platziert und erst nach Auspolymerisierung des Sammelgels wieder aus diesem herausgezogen. Je 50 µg der isolierten Proteinproben wurden mit SDS Probenpuffer und entsprechender Menge destilliertem Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt und 5 min bei 99°C gekocht, um die Wasserstoffbrückenbindungen aufzuspalten und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophoreseapparatur wurde

mit Elektrophoresepuffer befüllt, anschließend Luftblasen unter dem Gel mit einer Spritze entfernt und die Taschen, die sich durch den Probenkamm im Sammelgel gebildet haben, mit Elektrophoresepuffer gespült. In die Taschen wurden anschließend je 30 µl der Proben bzw. 8 µl Western Blot Marker pipettiert, die Kammer wurde geschlossen und der Strom angelegt. Zunächst erfolgte eine 15 min Sammlung der Proben im Sammelgel bei einer elektrischen Spannung von 80 V, anschließend wurden die Proben bei 100 V etwa 2-3 h im Gel aufgetrennt.

Tabelle 3: Ansetzen des Trenn- und Sammelgels für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dargestellt ist die Zusammensetzung eines 12 % Trenngels sowie eines Sammelgels. Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von einem Gel.

Reagenz	12 % Trenngel (µl)	Sammelgel (µl)
Dest. Wasser	4900	3400
Tris-HCL 1,5 M pH= 8,8	3700	-
Tris-HCL 1,0 M pH= 6,8	-	630
Acrylamid/ Bis- Acrylamid-Lösung 30 %	6100	830
SDS 10%	150	50
TEMED	12	5
APS 10%	150	50

2.2.5.7.2 Blotting

Zunächst wurde eine Nitrocellulose Membrane (Porengröße 0,45 µm) durch Inkubation in Methanol (30 sek) aktiviert, dann in destilliertem Wasser (2 min) und Transferpuffer (bis zur weiteren Verwendung) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stapelung folgender Materialien in einer Blotkassette, welche sich in einem mit Transferpuffer gefüllten Gefäß befand: Blottschwamm, drei Schichten Filterpapier, die aktivierte Membran, das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen, drei Schichten Filterpapier, Blottschwamm. Die Blotkassette wurde geschlossen und in die mit Transferpuffer gefüllte Blotapparatur, welche sich auf einem Eisbad befand, hineingesteckt. Nach Anlegen des Stromes erfolgte die Übertragung der Proteine bei einer Dauer von 2 h bei 80 V von dem Polyacrylamidgel auf die Membran. Anschließend wurde die Membran 5 min in TBS gewaschen.

2.2.5.7.3 Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Zur Blockierung der nichtspezifischen Bindungen wurde die Membran mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen 1 h in 5 % Milchpulver in TBS inkubiert. Danach wurde sie 3 x 5 min mit TBS/Tween gewaschen und ü. N. bei 4°C mit dem Erstantikörper „Mastzell Chymase“ (Verdünnung 1:200 in TBS) inkubiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu entfernen, wurde die Membran gewaschen. Anschließend wurde sie für 1 h bei RT mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper Ziege anti-Maus IgG (Verdünnung 1:5000 in TBS) oder Ziege anti-Hase IgG (Verdünnung 1:10'000 in TBS) inkubiert, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist. Nach einem letzten Waschschriff wurde die Membran im Geldokumentationsgerät platziert und mit Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat vollständig bedeckt. Das Enzym Peroxidase oxidiert das Luminol-enhaltende Substrat, es kommt zur Emission von Licht, welches anschließend mit der Kamera des Geldokumentationsgerätes detektiert werden kann. Die Auswertung der Intensität der verschiedenen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Gen 5 TM Data Analysis Software.

2.2.6 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturtechniken erfolgten unter sterilen Bedingungen durch die Benutzung einer Sicherheitswerkbank. Die Materialien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert und kurz vor dem Einsatz durch Besprühen mit 70 % Ethanol desinfiziert.

2.2.6.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Auftauen:

Zum Auftauen einer Zelllinie wurde ein Kryoröhrchen, welches die Zellen beinhaltet, aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, im 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut, anschließend in 10 ml entsprechendes Kultivierungsmedium gegeben und zentrifugiert (1200rpm, 10 min, 21°C). Der Auftauprozess sollte schnell durchgeführt werden, um unnötigen Stress für die Zellen zu vermeiden. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml Kultivierungsmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche mit 9 ml vorgewärmten Kultivierungsmedium gegeben und im CO₂-Inkubator kultiviert. Am folgenden Tag war das Medium zu erneuern, um tote Zellen zu entfernen.

Einfrieren:

Bevor Zellen eingefroren werden, sollten sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Vorgehensweise beim Einfrieren unterscheidet sich zwischen Suspensions- und adhärenen Zellen. Adhärenen Zellen entnimmt man das Medium, anschließend werden sie zweimal mit PBS gewaschen und mit 8 ml warmer 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung (verdünnt in PBS) 3-5 min bei 37°C inkubiert. Das Trypsin bewirkt das Spalten der Peptidbindungen zwischen den Zellen und ein Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Um die Zellen nicht zu schädigen, sollte die Inkubation lediglich so kurz wie nötig durchgeführt und per Sichtkontrolle unter dem Mikroskop überprüft werden. Nach diesen Schritten wurde die durch Trypsin/EDTA-Lösung gelöste Zellsuspension in 10 ml warmes Kultivierungsmedium gegeben und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 21°C). Suspensionszellen wurden im Vergleich zu adhärenen Zellen direkt aus der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und durch Zentrifugation (1200 rpm, 6 min, 21°C) mit PBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden gleichermaßen für adhärenen als auch Suspensionzellen durchgeführt: der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in kaltem Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter etwa 24 h bei -80°C langsam eingefroren. Ab dem folgenden Tag kam es zur Überführung der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff (-196°C).

2.2.6.2 Kultivierung und Subkultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von adhärenen C57BL/6 Maus primären uterinen glatten Muskelzellen erfolgte in Gelatin-beschichteten T75 Zellkulturflaschen (75 cm² Wachstumsfläche). Die Suspensions-MC-Linien MC/9 bzw. HMC1 wurden auf unbeschichteten T75 Zellkulturflaschen kultiviert, das Medium aller zwei bis drei Tage erneuert. Das Zellwachstum unterlag einer täglichen Kontrolle. Die Subkultivierung von adhärenen Zellen von einer auf mehrere Kulturflaschen erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80 %. Hierfür erfolgte die Abnahme des Mediums, zweifaches Waschen der Zellen mit PBS und trypsinieren der Zellen, wie unter Punkt 2.2.6.1 „Einfrieren“ beschrieben. Nach der Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 21°C) wurden die Zellen je nach Bedarf auf mehrere Zellkulturflaschen, mit vorgelegtem, warmem Medium, aufgeteilt. Zur Subkultivierung von Suspensionszellen wurden diese in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 1200 rpm, 10 min, 4°C) und anschließend ebenfalls je nach Bedarf auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.2.6.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die entsprechenden Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt (je nach Zelldichte beispielsweise 1:10, 1:100 oder 1:1000), um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht aufnehmen und im Mikroskop weiß erscheinen, erscheinen tote Zellen im Mikroskop dunkelblau, da Trypanblau durch die zerstörte Membran eindringt. Etwa 20 µl der hergestellten Zellsuspension-Trypanblau-Lösung wurden in den Zwischenraum einer mit einem Deckglas bedeckten Neubauer- Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Auszählung der lebenden Zellen auf vier durch ein Liniennetz abgegrenzten Zählquadraten und die Berechnung der Zellzahl pro ml (siehe Formel 9). Hierfür wird der Mittelwert der lebenden Zellen der vier Zählquadrat bestimmt (**M**), mit dem Verdünnungsfaktor (**VF**) mit welchem die Zellsuspension verdünnt wurde, dem Volumen (**V**) in welchem sich die Zellen befinden sowie mit dem **Faktor 10⁴** multipliziert. Die Fläche der 4 Zählquadraten ist 1 mm² groß. Durch Auflegen des Deckgläschens ergibt sich ein Raum mit einem definierten Volumen von 0,1 mm³, was 0,1 µl entspricht. Erst die Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ ergibt somit die Zellzahl pro ml (10⁴ x 0,1 µl = 1 ml).

Formel 9:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = M \times VF \times V \times 10^4$$

2.2.6.4 Kokultur uteriner glatter Muskelzellen mit der MC/9-Mastzelllinie

Um zu untersuchen, ob Mcpt5-kompetente Zellen in der Lage sind, die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen zu beeinflussen, wurden primäre uterine glatte Muskelzellen mit der MC-Linie MC/9 kokultiviert. Die Kokultivierung erfolgte in einem Transwellsystem, um einen direkten Kontakt zwischen den Zellen auszuschließen und die Untersuchung auf die Wirksamkeit von löslichen Faktoren zu begrenzen. Um die Aktivität von Chymasen in einem Kontrollansatz zu unterdrücken, erfolgte die Kokultivierung in Anwesenheit von "Inhibitor from *Glycine max* (SBTI)", welches als Chymase-Inhibitor eingesetzt wird¹⁶⁷⁻¹⁷¹. Es wurden 50000 glatte Muskelzellen in 2 ml Kultivierungsmedium in je eine Vertiefung einer Gelatinbeschichteten Zellkulturplatte (6 Vertiefungen) gegeben und ü. N. im CO₂-Inkubator

inkubiert. In dieser Zeit war es den Zellen möglich, auf der Platte anzuwachsen. Am folgenden Tag wurde das Kultivierungsmedium für glatte Muskelzellen vorsichtig abgenommen und durch 2 ml MC/9 Kultivierungsmedium ersetzt. Nach Einlegen des Zellkultureinsatzes (Porengröße 1 μm) wurden 50000 MC/9 Zellen in 2 ml MC/9 Kultivierungsmedium mit oder ohne STBI (100 $\mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Als Kontrollen wurden glatte Muskelzellen allein oder unter Zugabe von STBI (100 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Die Ansätze erfolgten in Duplikaten und wurden 48 h im CO_2 -Inkubator gelagert (Abbildung 12).

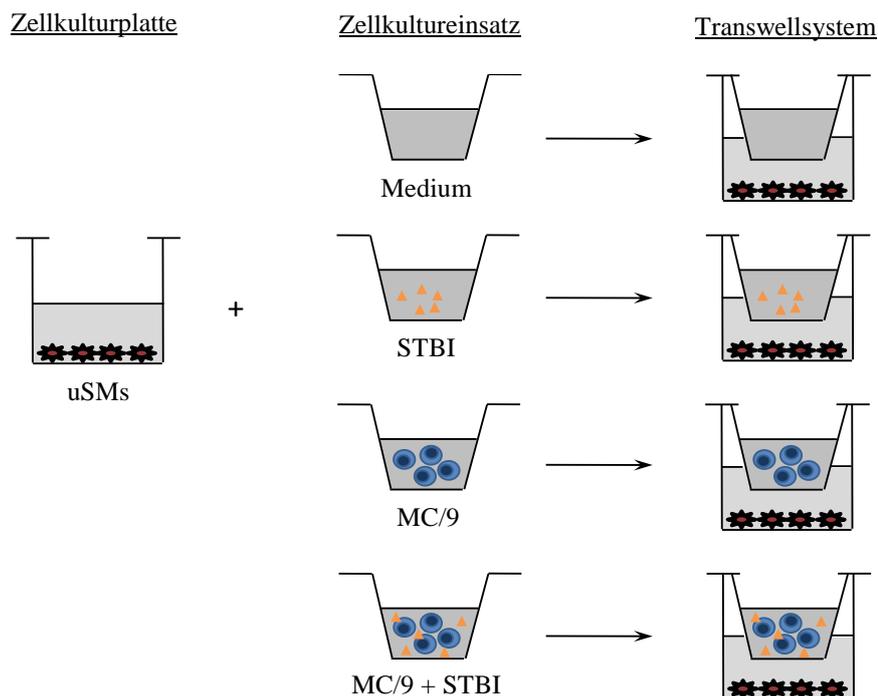


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Kokultivierung uteriner glatter Muskelzellen (uSMs) und MC/9 Zellen unter Anwendung des Transwellsystems. Adhärente uSMs wurden in Zellkulturplatten ausgesät und ü.N. im CO_2 -Inkubator gelagert. Am nächsten Morgen erfolgte deren Kultivierung in An- oder Abwesenheit des Chymase-Inhibitors "Inhibitor from *Glycine max*" (SBTI) mit Mcpt5-exprimierenden MC/9 Mastzellen unter Verwendung eines Transwellsystems (Porengröße des Zellkultureinsatzes: 1 μm). Als Kontrollen dienten mit Medium oder STBI kultivierte uSMs, ohne MC/9 Zellen. Nach 48 h erfolgte die durchflusszytometrische Analyse auf Annexin V-positive uSMs zur Bestimmung des prozentualen Anteils apoptotischer uSMs.

2.2.6.5 Apoptosedetektion mittels Annexin V- Färbung

Nach 48 h Kokultivierung der uterinen glatten Muskelzellen mit der Mcpt5-kompetenten MC/9-Mastzelllinie, wurden die Zellkultureinsätze mit den sich darin befindenden MC/9 Zellen verworfen und das verbleibende Medium aus der Zellkulturplatte, welches vom Boden abgelöste, apoptotische Zellen enthielt, je Ansatz in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die uterinen glatten Muskelzellen trypsiniert, zu den zugehörigen Medien in das 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 50 µl Bindungspuffer wurden die Zellsuspensionen auf zwei Rundbodenröhrchen aufgeteilt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 21°C). Ein Röhrchen diente jeweils als ungefärbte Negativkontrolle, das andere Röhrchen wurde mit 1,25 µl Annexin V sowie 1,25 µl Propidiumiodid gefärbt. Der Negativkontrolle wurde anstelle der Färbung 2,5 µl Bindungspuffer zugegeben. Beide Röhrchen wurden gevortext und 15 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Abschließend wurden jeweils 100 µl Bindungspuffer zugegeben und die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Annexin V-positive Zellen wurden als apoptotische Zellen identifiziert.

2.2.7 Statistik

Die statistische Analyse der in der Arbeit dargestellten Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism5 (GraphPad Software). Die Datentestung auf Normalverteilung erfolgte mit dem D'Agostino Pearson-Omnibus Test. In Abhängigkeit von ihrer Verteilung wurden sie als Median oder Mittelwerte \pm SEM dargestellt und mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Testes oder des parametrischen ungepaarten t-Testes auf Signifikanz untersucht. Durchflusszytometrie-, Implantations-, Abort-, real-time PCR- und Western Blot-Daten wurden mittels Mann-Whitney-U Test analysiert und der Median wurde dargestellt. Zur Berechnung der Anzahl uMCs und uNKs wurde der Mittelwert mehrerer Auszählungen bestimmt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test untersucht. Bei der histologischen Untersuchung der SA wurde der Mittelwert der Durchmesser von Wand bzw. Lumen von drei bis zehn SA pro Weibchen ermittelt, die Wanddicke sowie das Wand-zu-Lumen Verhältnis berechnet. Anschließend wurde der ungepaarte t-Test verwendet, um gruppenspezifische Unterschiede zu untersuchen. Die systolischen und diastolischen Blutdruckkurven zeigen jeweils den Mittelwert aller in der Gruppe untersuchten Mäuse an einem bestimmten Gestationstag. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test analysiert. Die Gewichtsdaten zeigen die Werte

einzelner Plazenten, Feten und Nachkommen. Der FPI-Wert stellt die Korrelation eines einzelnen Fetus mit seiner zugehörigen Plazenta dar. Die Daten wurden mittels ungepaartem t-Test ausgewertet. Bei dem Kokultivierungsversuch von glatten Muskelzellen und MC/9 Zellen wurde der Mittelwert aus den Duplikaten gebildet. Insgesamt wurde der Versuch dreimal durchgeführt und ebenfalls mit dem ungepaartem t-Test analysiert. Die Anzahl der Versuche, der Proben oder der verwendeten Tiere, sowie der jeweils genutzte statistische Test und das Signifikanzniveau (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) ist in jeder Abbildungslegende angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Gegenregulation uteriner Natürlicher Killerzellen und uteriner Mastzellen

Eine uneingeschränkte Entwicklung des Nachwuchses wird durch das fein modulierte immunologische Milieu der Mutter während der Schwangerschaft ermöglicht. Ein geregeltes Zusammenspiel von Immunzellen und deren Mediatoren an der feto-maternalen Grenzfläche sind dabei unentbehrlich. Störungen können weitreichende Auswirkungen für Mutter und Fetus haben. Studien unserer Arbeitsgruppe ergaben Hinweise auf eine mögliche Gegenregulation von uMCs und uNKs an der Grenzfläche von Mutter zu Fetus. So wiesen C57BL/6J-*Kit*^{W-sh/W-sh} (W-sh) Mäuse¹⁴⁹, die unter anderem durch MC-Defizienz charakterisiert sind, eine erhöhte Anzahl an uNKs in der Dezidua auf¹¹⁶. Diese mögliche Gegenregulation von uNKs und uMCs wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht. Hierfür wurden uMCs in C57BL/6NTac-IL15^{tm1Imx}N5 (IL15^{-/-}) Mäusen, die eine genetische Defizienz für IL15 aufweisen und sich unter anderem durch die Abwesenheit von NKs auszeichnen⁷⁶, untersucht. Zuvor wurde die Abwesenheit von pNKs und uNKs in den Mäusen überprüft und verschiedene Schwangerschaftsparameter untersucht.

3.1.1 IL-15-Defizienz führt zu einer drastischen Reduktion peripherer und zum Verlust uteriner Natürlicher Killerzellen

Die in der Literatur beschriebene extreme Reduktion von NKs in IL15^{-/-} Mäusen⁷⁶ macht diese zu einem interessanten Versuchsmodell, um die Gegenregulation von NKs und MCs zu untersuchen. Zunächst wurde die Menge an NKs in IL15-defizienten Mäusen geprüft. Dafür kam es zur durchflusszytometrischen Analyse des Anteils an pNKs systemisch im Blut sowie in den sekundären lymphatischen Organen Milz, den mesenterischen und inguinalen LK. Die Ergebnisse zeigen, dass IL15-defiziente Weibchen im Vergleich zu C57BL/6N Weibchen sowohl am Gestationstag 5, als auch am Gestationstag 10 einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ pNKs aufwiesen, der nahezu bei 0 % lag. Dies konnte für alle untersuchten Proben gezeigt werden (Abbildung 13).

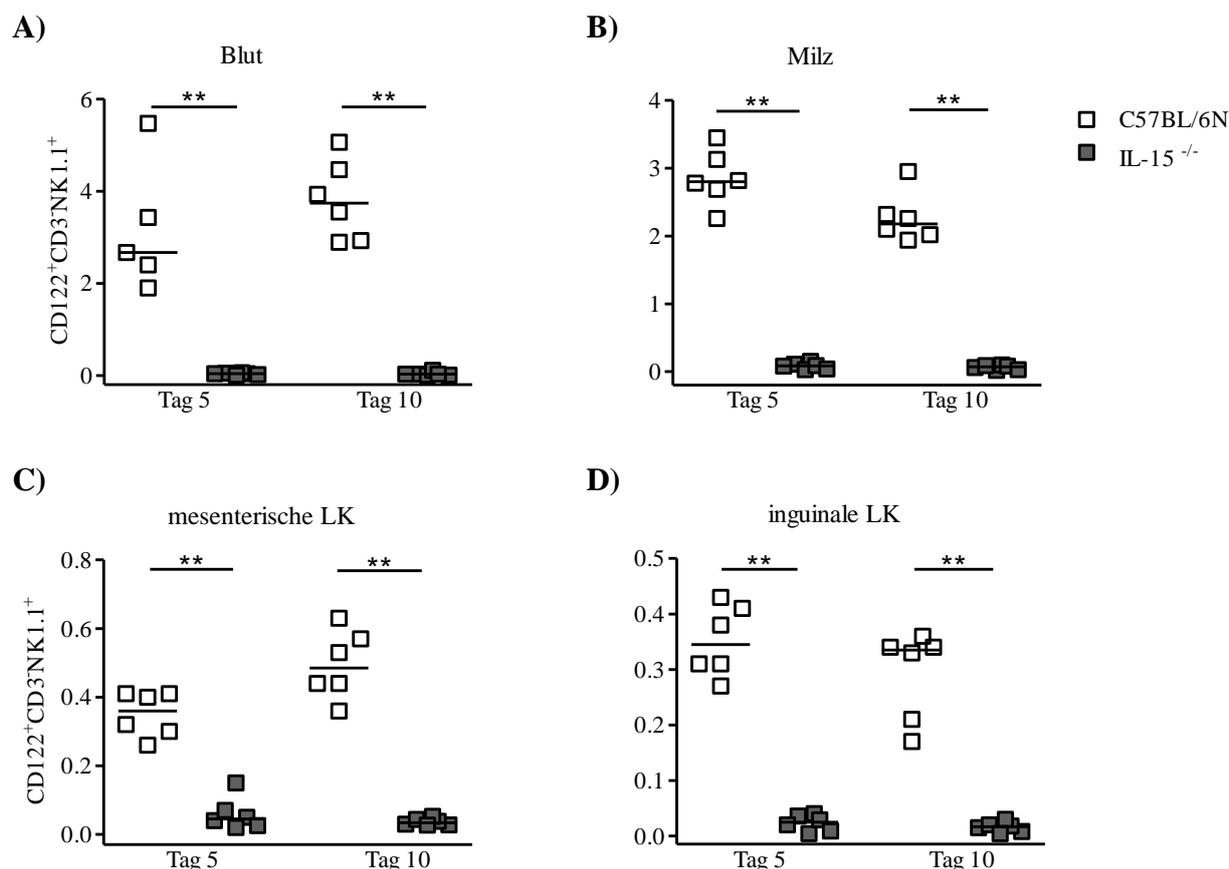


Abbildung 13: IL-15-defiziente Mäuse weisen eine signifikant geringere Anzahl an peripheren NKs (pNKs) im Vergleich zur C57BL/6N Kontrollgruppe auf. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen wurde der prozentuale Anteil an CD122⁺CD3⁺NK1.1⁺ pNKs an den Gestationstagen 5 und 10 in Blut (A), Milz (B), mesenterischen (C) und inguinalen Lymphknoten (D) von BALB/c verpaarten C57BL/6N (n = 6) und IL-15^{-/-} (n = 6) Weibchen untersucht. Dargestellt sind die Werte einzelner Tiere sowie die Mediane der Werte. Der Mann-Whitney-U-Test kam für die statistische Auswertung zur Anwendung (**p<0,01).

Nach Feststellung des Anteils an pNKs, kam es im Folgenden zur Untersuchung der Mäuse auf das Vorhandensein von uNKs. Dazu wurden Implantationsschnittpräparate vom Gestationstag 10 mit DBA-Lektin angefärbt. Implantationen von C57BL/6N Mäusen zeigten im Bereich der *decidua basalis* eine Vielzahl an braun gefärbten, als uNKs identifizierbare Zellen (Abbildung 14A). Im Gegensatz dazu wiesen Implantationen von IL15^{-/-} Weibchen keine einzige DBA-positive Zelle auf (Abbildung 14B). Die Ergebnisse bestätigen eine extreme Reduktion von pNKs sowie die vollständige Abwesenheit von uNKs in IL15-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6N Mäusen.

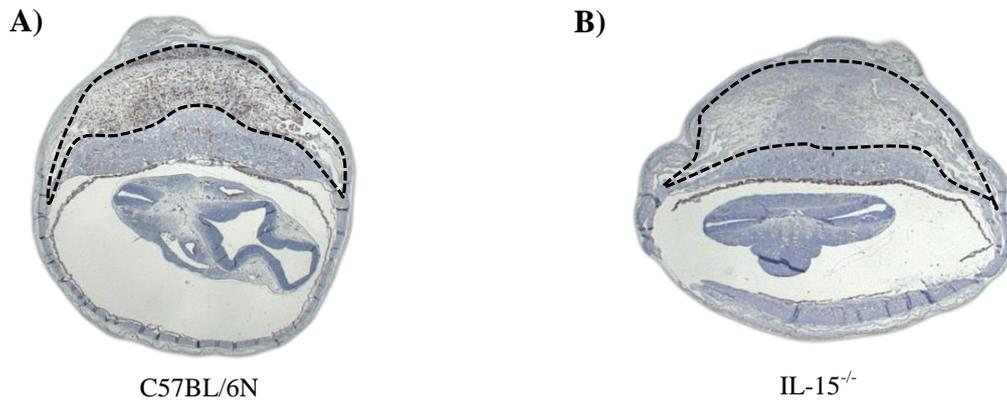


Abbildung 14: Implantationen von IL15-defizienten Weibchen besitzen keine Dolichos biflorus agglutinin (DBA)-positiven uterinen NKs (uNKs). Repräsentative Implantationen von C57BL/6N (A) und IL-15^{-/-} (B) Mäusen nach DBA-Lektin Färbung an Gestationstag 10. uNKs sind im Bereich der *decidua basalis* (gestrichelte Linie) angesiedelt und anhand ihrer braunen Färbung identifizierbar.

3.1.2 IL-15-defiziente Mäuse zeigen eine vergleichbare Implantations- und Abortrate zur Kontrollgruppe

Am Gestationstag 10 wurde die Anzahl an Implantationen und die Abortrate von WT und IL-15-defizienten Tieren ermittelt. Die IL-15-defiziente Versuchsgruppe wies eine vergleichbare Implantationsrate im Vergleich zu der IL15-kompetenten Versuchsgruppe auf (Abbildung 15A). Die Abortrate war ebenso vergleichbar in beiden Gruppen (Abbildung 15B).

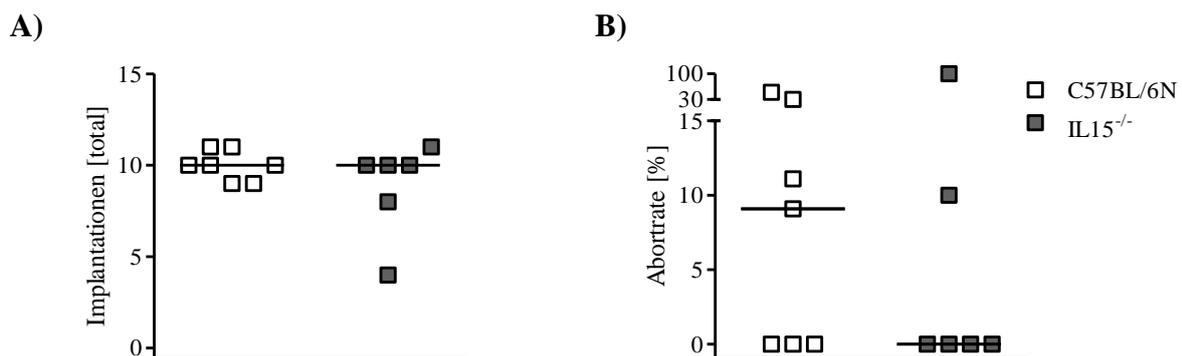
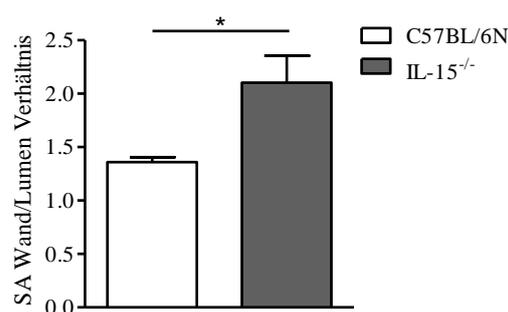


Abbildung 15: Vergleichbare Anzahl an Implantationen und Aborten in C57BL/6N und IL15-defizienten Tieren. Dargestellt ist die Anzahl an Implantationen (A) sowie die Abortrate (B) von BALB/c verpaarten C57BL/6N (n = 7) und IL15^{-/-} (n = 6) Weibchen am Gestationstag 10. Gezeigt ist der Median der Einzelwerte der Tiere. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U Test (keine Signifikanz).

3.1.3 Eingeschränkte Umwandlung der Spiralarterien in IL-15-defizienten, trächtigen Mäusen

Im nächsten Schritt der Arbeit wurde geprüft, ob sich die IL15-Defizienz, verbunden mit der Abwesenheit von NKs, auf die Umwandlung der SA auswirkt. Eine Umwandlung der zu Beginn der Schwangerschaft dickwandigen, kleinlumigen Arterien in dünnwandige, großlumige Arterien ist von enormer Bedeutung. Nach einer effizienten Umwandlung kann die bis zu zehnfache Menge an Blut²⁶, welches wichtige Nährstoffe sowie den lebensnotwendigen Sauerstoff beinhaltet, von der Mutter zum Fetus transportiert werden. Zur Analyse der SA wurden Schnittpräparate von Implantationen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, Umfang und Lumen von drei bis zehn SA pro Weibchen am Gestationstag 10 vermessen und das Wand-zu-Lumen Verhältnis ermittelt. Das SA Wand-zu-Lumen Verhältnis von IL15-defizienten Weibchen war verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 16A) und deutet somit auf eine ineffiziente SA Umwandlung hin. Die Abbildung 16B zeigt Ausschnitte aus der *decidua basalis* von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Implantationsquerschnitten, mit deutlich dickwandigeren, kleinlumigen SA in IL15-defizienten Tieren im Vergleich zu WT (i, iv). Weiterhin dargestellt sind Immunfluoreszenzbilder nach Färbung mit einem Antikörper gegen Aktin (ii, iii, v, vi), das von glatten Muskelzellen exprimiert und als Indikator für die Schichtdicke glatter Muskelzellen genutzt wird. Eine dicke glatte Muskelzellschicht deutet ebenfalls auf eine unzureichende SA Umwandlung hin (Abbildung 16B).

A)



B)

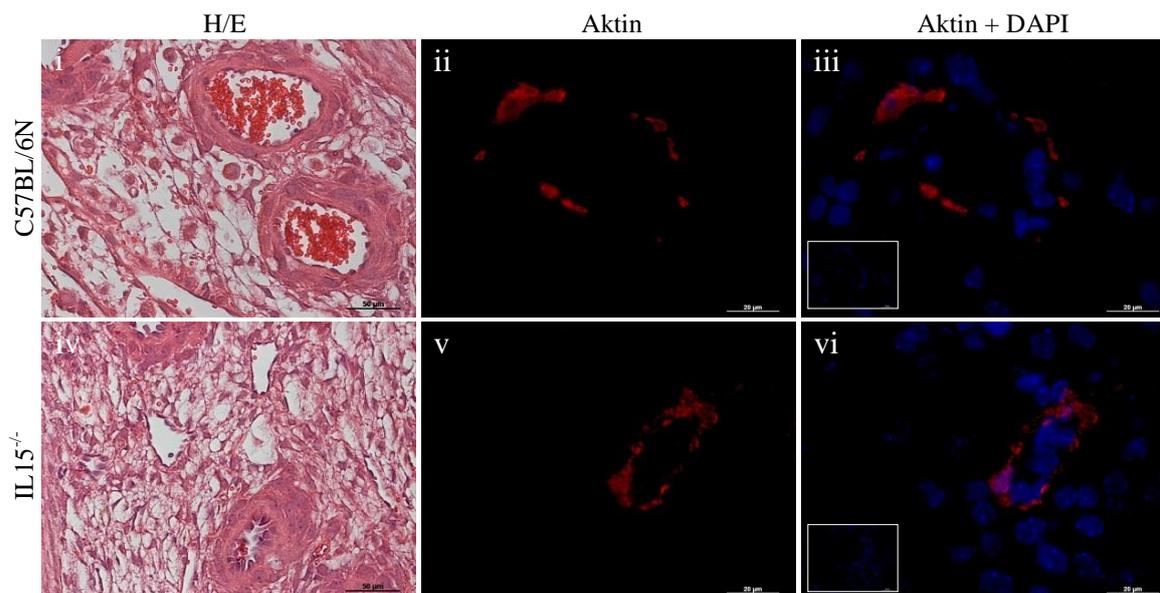


Abbildung 16: IL15-defiziente Mäuse besitzen im Vergleich zum WT signifikant schlechter umgewandelte Spiralarterien (SA). Am 10. Trächtigkeitstag wurde jeweils der Umfang des Lumen und der Umfang der gesamten SA von 3-10 SA von BALB/c verpaarten C57BL/6N (n = 6) und IL15^{-/-} (n = 5) Mäusen gemessen, die Durchmesser von Lumen und Arterien bestimmt. Aus diesen Werten konnte das SA Wand-zu-Lumen Verhältnis (A) berechnet werden. Abgebildet sind die Mittelwerte mit SEM der Mittelwerte der SA der Tiere einer Gruppe, sowie die statistische Signifikanz, die durch paarweisen Vergleich mit dem ungepaarten t-Test ermittelt wurde (*p<0,05). (B) Dargestellt sind repräsentative Bilder von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (i, iv, Messbalken = 50 µm), sowie gegen das Aktin glatter Muskelzellen fluoreszenzgefärbten (ii, v, Messbalken = 20 µm) und mit DAPI überlagerten (iii, vi, Messbalken = 20 µm) Implantation im Bereich der *decidua basalis*, in welchem SA zu erkennen sind.

3.1.4 IL-15-defiziente Mäuse entwickeln keinen Bluthochdruck während der Schwangerschaft

Probleme bei der SA Umwandlung sind charakteristisch für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen und fetale Wachstumsretardierung^{21,24}. Aufgrund der eingeschränkten SA Umwandlung in IL15-defizienten Tieren wurde der Blutdruck trächtiger

Weibchen während der gesamten Schwangerschaft aller zwei Tage dokumentiert. Die systolischen Blutdruckwerte IL15-defizienter Mäuse waren ab Gestationstag 4 im Vergleich zu C57BL/6N Mäusen signifikant erhöht, jedoch wiesen die Tiere zu keinem Zeitpunkt der Trächtigkeit Bluthochdruck (>140 mmHg) auf (Abbildung 17).

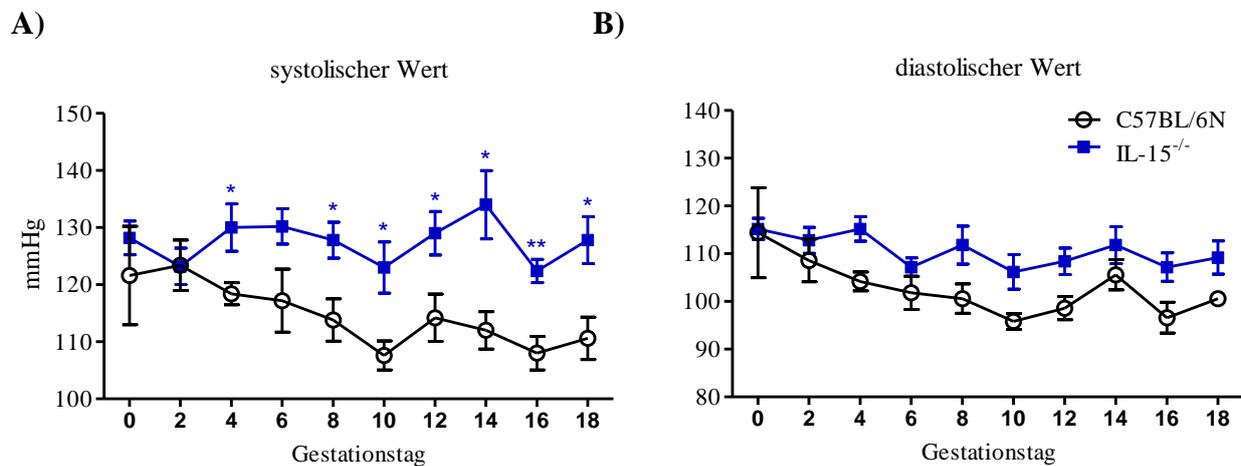


Abbildung 17: IL15-defiziente Mäuse weisen keinen Bluthochdruck während der Schwangerschaft auf. Gezeigt sind die systolischen (A) und diastolischen (B) Blutdruckwerte von BALB/c verpaarten IL15^{-/-} (n = 5) vs. C57BL/6N (n = 5) Weibchen. Die Messung des Blutdruckes erfolgte jeden zweiten Tag zwischen Gestationstag 0 bis 18. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit SEM aller Tiere einer Gruppe dargestellt. Der ungepaarte t-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet (*p<0,05; **p<0,01).

3.1.5 Der Feto-Plazentare Index ist in Mäusen von IL-15-defizienten Müttern signifikant geringer als in der Kontrollgruppe

Die defekte SA Umwandlung trächtiger IL15-defizienter Weibchen war nicht mit Bluthochdruck verbunden. Um den Einfluss der IL-15 Defizienz auf das Wachstum der Feten bzw. der Plazenta zu untersuchen, wurde am Gestationstag 18, kurz vor Ende der Trächtigkeit, das Gewicht von Feten und Plazenten bestimmt und der FPI, der das Gewicht jedes Fetus mit seiner zugehörigen Plazenta korreliert, berechnet. Während beide Versuchsgruppen keine Unterschiede im fetalen Gewicht zeigten (Abbildung 18A), ließ sich ein signifikant höheres Plazentagewicht (Abbildung 18B) in IL15-defizienten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen. Der FPI IL15-defizienter Mäuse war dadurch signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 18C).

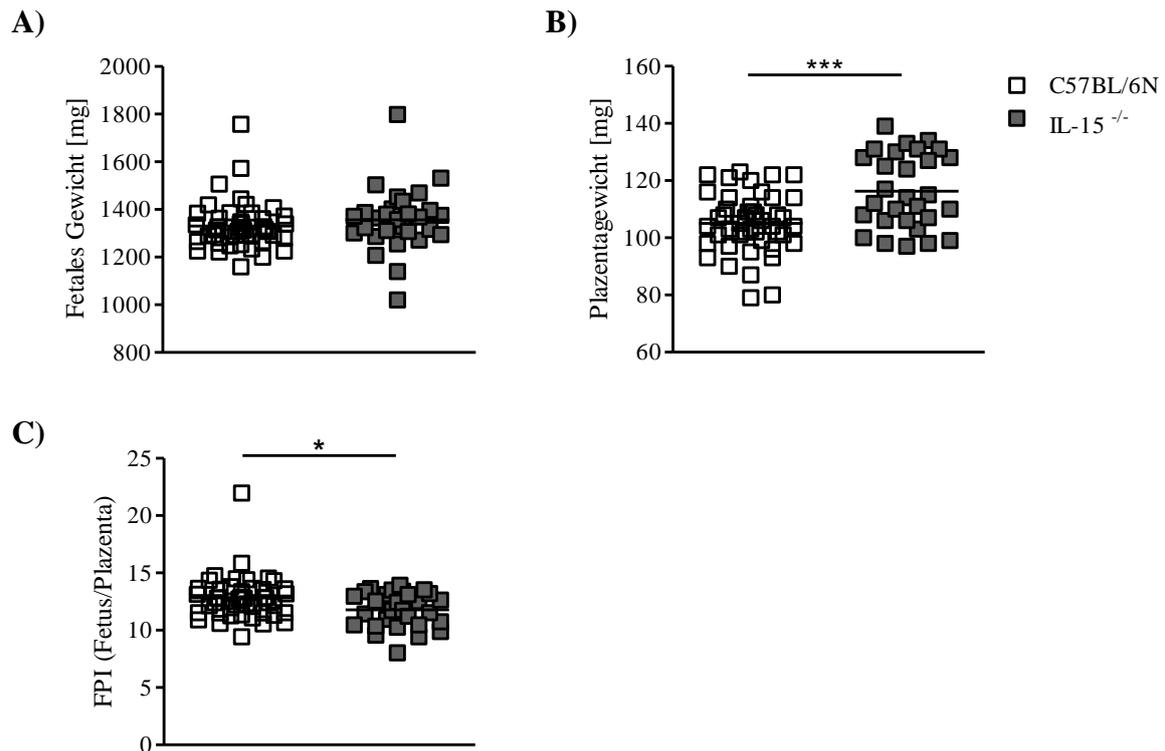


Abbildung 18: IL15-defiziente Tiere wiesen ein signifikant höheres Plazentagewicht und einen reduzierten Feto-Plazentaren Index (FPI) auf. Die fetalen Gewichte unterscheiden sich nicht von denen der WT Gruppe. Am Gestationstag 18 wurde das fetale Gewicht (A) sowie das Gewicht der Plazenten (B) von BALB/c verpaarten C57BL/6N (Mütter n = 5, Feten/Plazenten n = 46) und IL15^{-/-} (Mütter n = 5, Feten/Plazenten n = 29) Weibchen ermittelt. Basierend auf diesen Werten wurde der FPI (Fetales/plazentales Gewicht) bestimmt (C). Dargestellt sind die Werte einzelner Feten und Plazenten sowie deren Mittelwerte. Der ungepaarte t-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet (*p<0,05; ***p<0,001).

3.1.6 Erhöhte Anzahl an uterinen Mastzellen in IL-15-defizienten Mäusen

Neben der experimentellen Bestätigung der Abwesenheit von pNKs und uNKs konnte eine unzureichende SA Umwandlung, ein höheres Plazentagewicht und ein niedrigerer FPI in IL15-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zur Untersuchung einer möglichen Gegenregulation von uNKs und uMCs wurde im nächsten Schritt der Arbeit die Menge an uMCs in den IL15-defizienten Tieren untersucht. Hierfür wurde trächtigen Weibchen am Gestationstag 5 der Uterus entnommen und Schnittpräparate zur Visualisierung von uMCs mit Toluidinblau angefärbt. Die uMC (Abbildung 19A), welche zwischen den Implantationen des Uterus lokalisiert sind (Abbildung 19B), wurden anschließend ausgezählt. Die Zählung ergab eine signifikant höhere Anzahl an uMCs in IL15^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 19B und D).

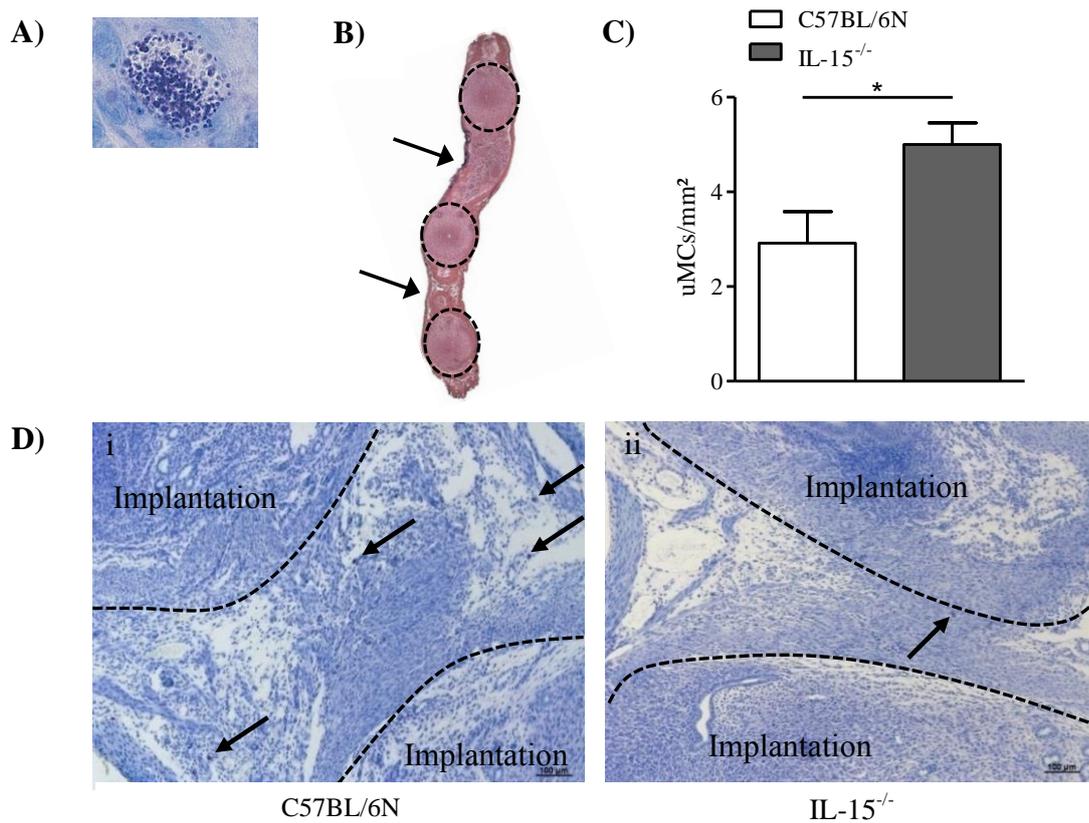


Abbildung 19: IL-15-Defizienz ist mit einer signifikant erhöhten Anzahl an uterinen MCs (uMCs) verbunden. Die Auszählung von uMCs (A) fand in Toluidinblau-gefärbten Schnittpräparaten von Uterusproben statt, welche von mit BALB/c verpaarten C57BL/6N (n = 6) und IL15^{-/-} (n = 6) Weibchen an Gestationstag 5 entnommen wurden. Die uMCs befinden sich zwischen den Implantationen. Implantationen sind mit gestrichelten Kreisen, Zwischenräume mit Pfeilen gekennzeichnet (B). Dargestellt ist die Anzahl an uMCs pro 1 mm² (C), gezeigt als Mittelwert mit SEM der Mittelwerte mehrerer Auszählungen pro Tier. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaartem t-Test (*p < 0,05). (D) zeigt jeweils einen repräsentativen Uterusausschnitt eines C57BL/6N (i) und eines IL15^{-/-} (ii) Weibchens. Implantationen sind mit gestrichelten Linien abgegrenzt, uMC mit Pfeilen gekennzeichnet (Messbalken = 100μm).

Die Auszählung von uMCs am Gestationstag 5 zeigt eine signifikant erhöhte Anzahl an uMCs in IL15-defizienten Mäusen. Dieses Ergebnis wurde in weiteren Experimenten überprüft. Mäusen beider Versuchsgruppen wurde hierfür am Gestationstag 5 der Uterus bzw. am Gestationstag 10 die Dezidua entnommen und mittels durchflusszytometrischer Analyse der prozentuale Anteil an CD117⁺FcεRα⁺ Zellen bestimmt. Zellen, die beide Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden als MCs charakterisiert. Es zeigte sich, dass IL15-defiziente Weibchen im Vergleich zu C57BL/6N Weibchen sowohl am Gestationstag 5 als auch am

Gestationstag 10 einen signifikant höheren prozentualen Anteil an CD117⁺FcεRα⁺ uMCs aufweisen (Abbildung 20).

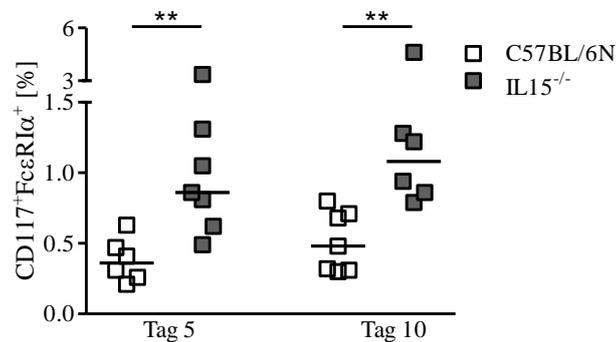


Abbildung 20: Trächtige IL-15^{-/-} Mäuse besitzen einen signifikant höheren Anteil an CD117⁺FcεRα⁺ uterinen MCs (uMCs) verglichen mit C57BL/6N Mäusen. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an CD117⁺FcεRα⁺ uMCs erfolgte in Uterus- (Gestationstag 5) und Deziduproben (Gestationstag 10) von trächtigen, BALB/c verpaarten C57BL/6N (n = 6-7) und IL-15^{-/-} (n = 6-7) Mäusen mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Werte einzelner Tiere sowie deren Mediane. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die statistische Analyse herangezogen (**p<0,01).

3.1.7 Erhöhte Expression der Mastzellproteasen 1 und 6 in IL15-defizienten Weibchen

Sowohl direkter Zellkontakt als auch lösliche Mediatoren können für die Wirkung von Zellen auf andere Zellen bzw. auf das umgebende Milieu von Bedeutung sein. Da die Anzahl an uMCs in IL15-defizienten Tieren signifikant höher war als die der Kontrollgruppe, wurde im nächsten Schritt der Arbeit die Expression der MC Mediatoren Mcpt1 und Mcpt6 zwischen den Versuchsgruppen verglichen. Trächtigen Weibchen wurde am Gestationstag 5 der Uterus bzw. am Gestationstag 10 die Dezidua entnommen. Die daraus isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und für die real-time PCR eingesetzt. Die Analyse ergab keine Expressionsunterschiede von Mcpt1 und Mcpt6 am Gestationstag 5. Am Gestationstag 10 hingegen war sowohl die Expression von Mcpt1, als auch die Expression von Mcpt6 in IL15-defizienten Mäusen signifikant höher als in C57BL/6N Tieren (Abbildung 21).

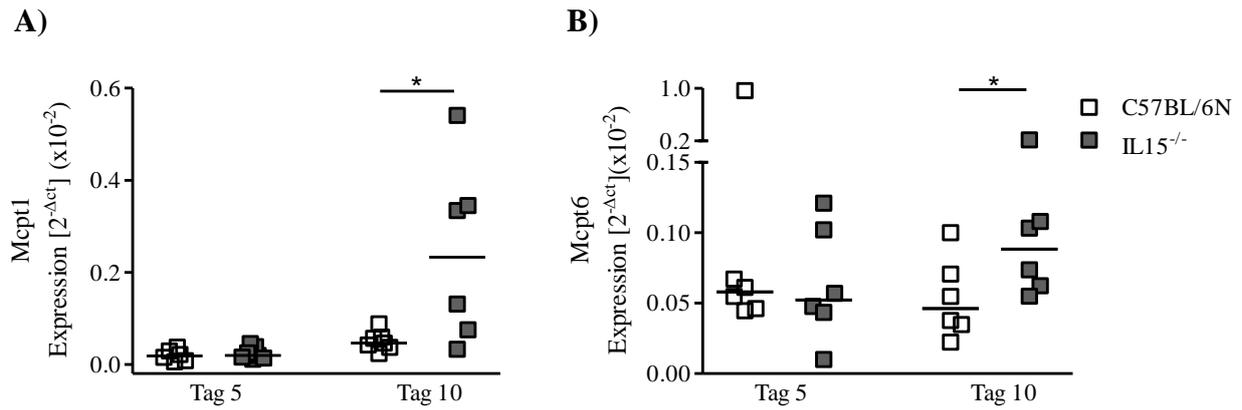


Abbildung 21: IL-15-Defizienz in trächtigen Mäusen ist am Gestationstag 10 mit einer signifikant erhöhten mRNA Expression der Mastzellproteasen (Mcpt) 1 und 6 assoziiert. Dargestellt ist die relative mRNA Expression von Mcpt1 (A) sowie Mcpt6 (B) in Uterus- (Gestationstag 5) und Deziduaeproben (Gestationstag 10) von C57BL/6N (n = 6) und IL15^{-/-} (n = 6) Weibchen. Gezeigt sind der Median sowie die Einzelwerte der Tiere. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U Test (*p<0,05).

3.2 Etablierung eines Mausmodelles mit Doppeldefizienz für Natürliche Killerzellen und Mastzellen

Studien unserer und auch anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass sowohl NKs^{38,172–174} als auch MCs^{116,125,175} wichtige Funktionen an der feto-maternalen Grenzfläche ausüben, die die Umwandlung von SA einschließt.

Im vorangegangenen Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL15-defiziente Mäuse weder pNKs noch uNKs besitzen. Das Fehlen von NK Zellen war mit einer eingeschränkten Modifikation der SA sowie Abweichungen des Plazentagewichtes und des FPI vom Normalwert verbunden. Des Weiteren konnte eine erhöhte Anzahl von uMCs und eine erhöhte Expression der MC Mediatoren Mcpt1 und Mcpt6 in den Tieren festgestellt werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen lokal auftretenden Kompensationsmechanismus, um den Mangel an NKs auszugleichen. Die Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass NKs und MCs eine große Menge gemeinsamer Mediatoren sezernieren, die beispielsweise der Angiogenese und dem Gewebeumbau dienen^{89,176,177}. Dieser Kompensationsmechanismus scheint allerdings nicht auszureichen, um die schwangerschaftsbezogenen Defizite der NK-defizienten Tiere auszugleichen. Basierend auf diesen interessanten Ergebnissen ergab sich als weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Auswirkung einer gleichzeitigen Abwesenheit von NKs und MCs auf die Schwangerschaft im Mausmodell. Da zur Beantwortung dieser Fragestellung kein geeignetes Mausmodell vorhanden war, wurde dieses im Rahmen der Promotionsarbeit etabliert und anschließend untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Anti-asialo GM1 depletiert periphere, jedoch keine uterinen Natürlichen Killerzellen *in vivo*

Um zu untersuchen wie sich die kombinierte Abwesenheit von NKs und MCs auf die Schwangerschaft auswirkt, kam es zu der Entscheidung, NKs in bereits MC-defizienten Mäusen zu depletieren. Um NKs zu depletieren, wurde zunächst in normalen C57BL/6 Mäusen die Effektivität des NK-depletierenden anti-asialo GM1 Antikörpers untersucht.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass anti-asialo GM1-behandelte C57BL/6 Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe einen signifikant geringeren prozentualen Anteil an CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ pNKs in Milz, Blut, den mesenterischen und inguinalen LK aufwiesen, der nahezu bei 0 % lag (Abbildung 22).

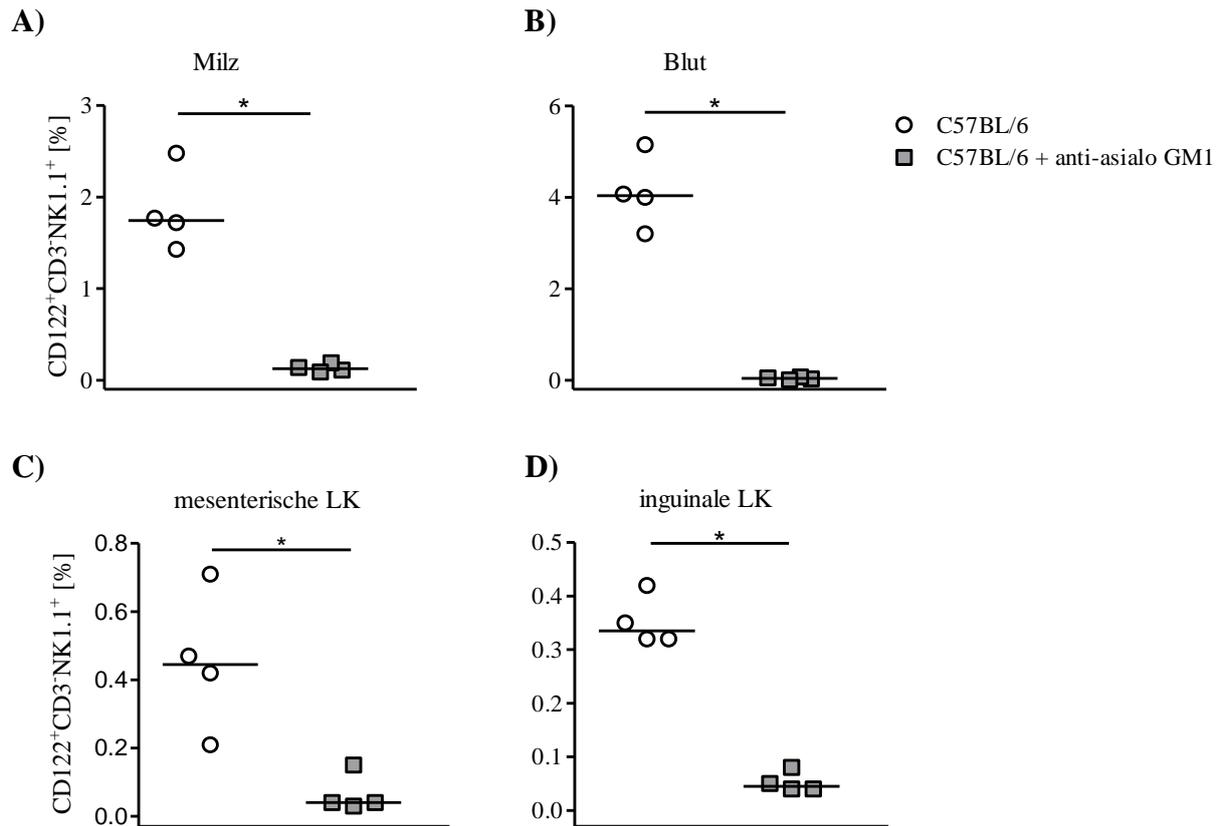


Abbildung 22: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit dem Antikörper anti-asialo GM1 führt zur Depletion von peripheren NKs (pNKs). Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an $CD122^+CD3^+NK1.1^+$ pNKs von BALB/c verpaarten, ohne (n = 4) oder mit (n = 4) anti-asialo GM1-behandelten C57BL/6 Weibchen an Gestationstag 10 in Milz (A), Blut (B), mesenterischen (C) und inguinalen Lymphknoten (D) bestimmt. Dargestellt sind die Werte einzelner Tiere sowie die Mediane der Werte. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,05$).

Zur Untersuchung der Fähigkeit von anti-asialo GM1 neben pNKs, uNKs zu depletieren, wurden Schnittpräparate von Implantation an Gestationstag 10 mit DBA Lektin gefärbt. Implantationen von Tieren der Kontrollgruppe wiesen eine hohe Menge an uNKs im Bereich der *decidua basalis* auf (Abbildung 23A). Es zeigte sich, dass Implantationsquerschnitte von anti-asialo GM1-behandelten Mäusen eine vergleichbar hohe Menge an uNKs aufwiesen (Abbildung 23B).

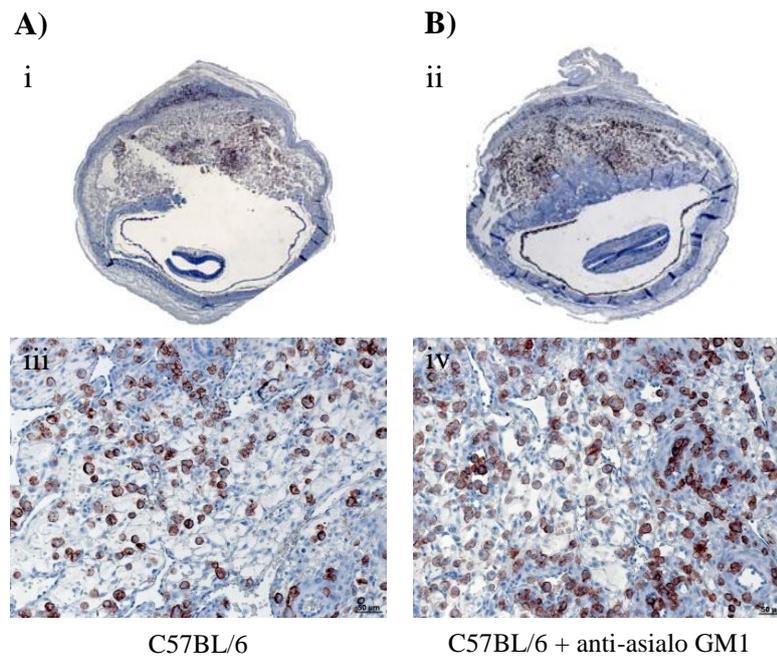


Abbildung 23: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit anti-asialo GM1 führt zu keiner Depletion von uterinen NKs (uNKs). Gezeigt sind in der oberen Reihe (i-ii) Dolichos biflorus agglutinin-gefärbte Schnittpräparate von Implantationen von BALB/c verpaarten C57BL/6 (A) und anti-asialo GM1-behandelten (B) C57BL/6 Mäusen am Gestationstag 10. Die untere Reihe (iii-iv) zeigt jeweils einen vergrößerten Ausschnitt aus der *decidua basalis* der Implantationen (Messbalken = 50 µm). Braun angefärbte Zellen können als uNKs identifiziert werden.

3.2.2 Anti- CD122 depletiert periphere und uterine Natürliche Killerzellen *in vivo*

Da anti-asialo GM1 nicht in der Lage war neben pNKs auch uNKs in Mäusen zu depletieren, war die Suche nach einer neuen Strategie erforderlich, um beide Subpopulationen von NKs *in vivo* zu entfernen. Hierfür wurde die Effektivität des NK-depletierenden anti-CD122 Antikörpers untersucht.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass anti-CD122-behandelte C57BL/6 Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe einen auffallend geringeren prozentualen Anteil an $CD122^+CD3^-NK1.1^+$ pNKs in Milz, Blut, den mesenterischen und inguinalen LK aufweisen, der nahezu bei 0 % lag (Abbildung 24). Aufgrund der zu geringen Tierzahl konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden. Da der prozentuale Anteil jedoch vergleichbar mit dem der anti-asialo GM1-behandelten Tiere war, ist davon auszugehen, dass bei höherer Tieranzahl eine Signifikanz erlangt worden wäre.

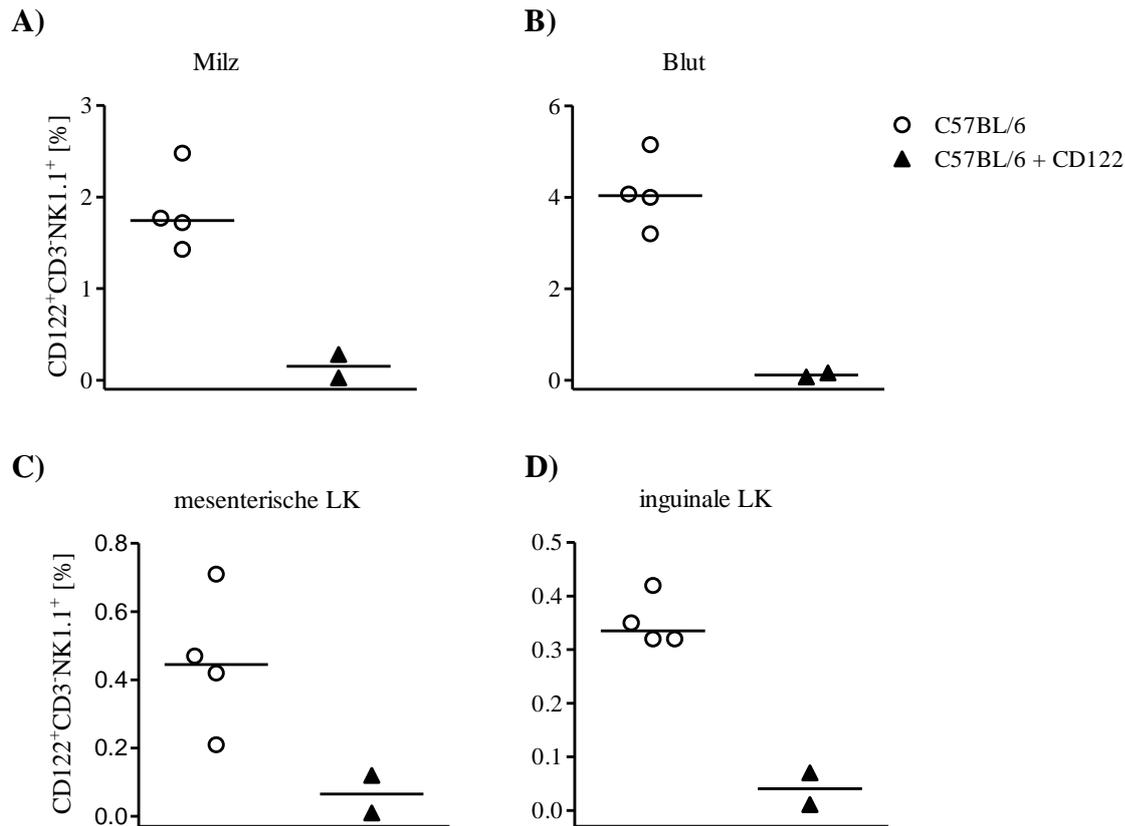


Abbildung 24: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit dem Antikörper anti-CD122 führt zur Depletion von peripheren NKs (pNKs). Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil an CD122⁺CD3⁺NK1.1⁺pNKs von BALB/c verpaarten, ohne (n = 4) oder mit (n = 2) anti-CD122-behandelten C57BL/6 (n = 4) Weibchen an Gestationstag 10 in Milz (A), Blut (B), mesenterischen (C) und inguinalen Lymphknoten (D) bestimmt. Dargestellt sind die Werte einzelner Tiere sowie die Mediane der Werte. Keine statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test aufgrund zu geringer Tieranzahl.

Zur Untersuchung der Fähigkeit von anti-CD122 neben pNKs, uNKs zu depletieren, wurden Schnittpräparate von Implantation an Gestationstag 10 mit DBA Lektin gefärbt. In anti-CD122-behandelten Weibchen konnte keine einzige DBA Lektin-positive uNK detektiert werden im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 25).

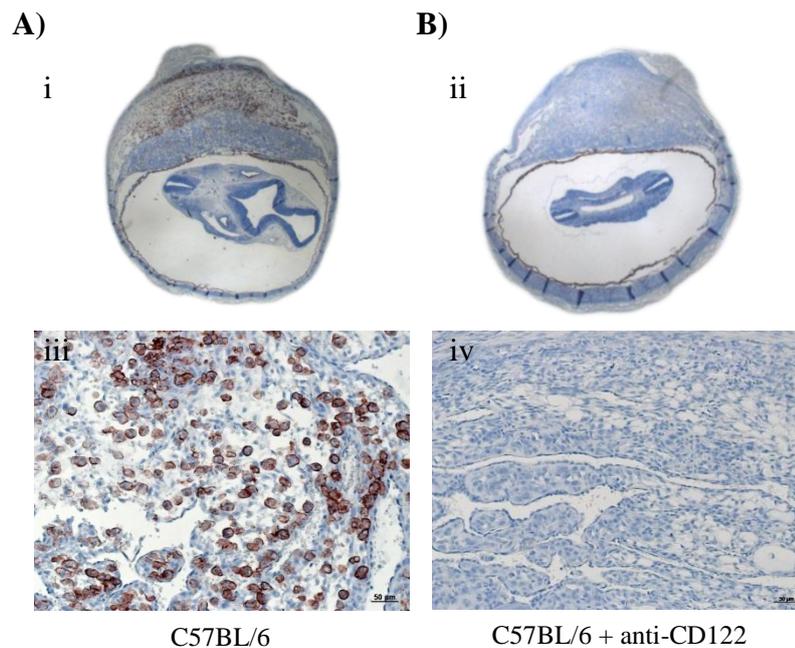


Abbildung 25: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit anti-CD122 führt zur Depletion von uterinen NKs (uNKs). Gezeigt sind in der oberen Reihe (i, ii) Dolichos biflorus agglutinin-Lektin-gefärbte Schnittpräparate von Implantationen von BALB/c verpaarten C57BL/6 (A) und anti-CD122-behandelten (B) C57BL/6 Mäusen am Gestationstag 10. Die untere Reihe (iii-iv) zeigt jeweils einen vergrößerten Ausschnitt aus der *decidua basalis* der Implantationen (Messbalken = 50 µm). Braun angefärbte Zellen können als uNKs identifiziert werden.

3.2.3 $Cpa3^{Cre/+}$ besitzen im Vergleich zu $Cpa3^{+/+}$ Mäusen keine uterinen Mastzellen

Um zu untersuchen wie sich die kombinierte Abwesenheit von NKs und MCs auf die Schwangerschaft auswirkt, kamen neben dem NK-depletierenden anti-CD122 Antikörper, MC-defiziente $Cpa3$ -Cre Mäuse zum Einsatz, welche derzeit als optimales MC-defizientes Modell gelten. Im $Cpa3$ -Cre Mausmodell wurde die Cre Rekombinase mittels homologer Rekombination in den $Cpa3$ Genlokus eingefügt. Als Folge der Cre-vermittelten Zytotoxizität in $Cpa3$ -produzierenden Zellen, besitzen die $Cpa3^{Cre/+}$ Mäuse weder CTMC noch MMC¹⁵⁶. Die An-oder Abwesenheit von uMCs wurde in diesem Modell jedoch nicht getestet. Zur Überprüfung der Abwesenheit von uMCs wurden in der vorliegenden Arbeit Schnittpräparate von Uteri nichtträchtiger Mäuse mit Toluidinblau gefärbt und analysiert. Die Analyse zeigte uMCs in $Cpa3^{+/+}$ Kontrollmäusen (Abbildung 26A). In $Cpa3^{Cre/+}$ Mäusen waren hingegen keine uMCs auffindbar (Abbildung 26B).

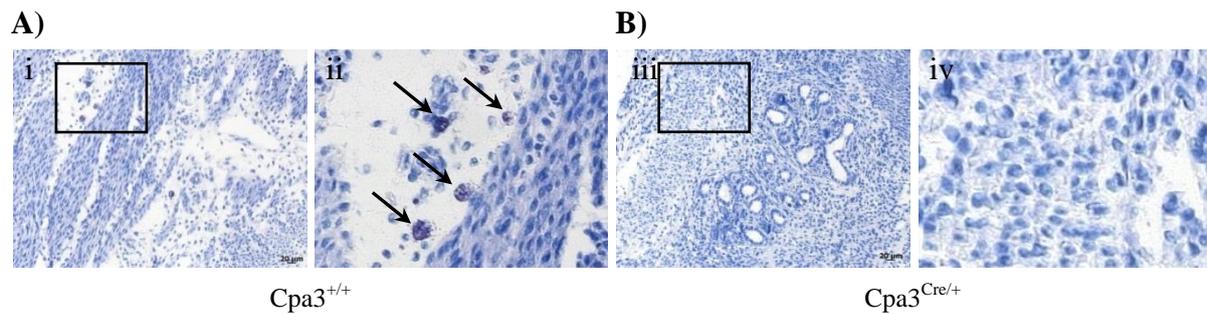


Abbildung 26: Uterusproben von Cpa3^{Cre/+} Weibchen zeigen im Vergleich zu Proben von Cpa3^{+/+} Weibchen keine uterine MCs. Gezeigt sind repräsentative Toluidinblau-gefärbte Uterusschnitte nichtträchtiger Cpa3^{+/+} (A, i) und Cpa3^{Cre/+} (B, iii) Weibchen (Messbalken = 20 µm) mit einem vergrößert dargestellten Ausschnitt (Kasten, ii bzw. iv). Mastzellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.2.4 Anti-CD122 depletiert periphere und uterine Natürliche Killerzellen in Cpa3^{+/+} und Cpa3^{Cre/+} Mäusen

Nachdem anti-CD122 als geeigneter Antikörper zur NK-Depletion ausgewählt worden war, wurde dieser nach einer erfolgten Verpaarung mit BALB/c Männchen, in Cpa3^{Cre/+} Weibchen injiziert. Es wurde überprüft, ob eine Verabreichung des anti-CD122 Antikörpers auch in diesem CTMC und MMC-defizienten Mausmodell wie gewünscht zur Depletion von pNKs und uNKs führt. Als Kontrollen wurden neben trächtigen PBS-behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen, PBS- oder anti-CD122-behandelte Cpa3^{+/+} WT Weibchen verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass anti-CD122-behandelte Cpa3^{+/+} als auch Cpa3^{Cre/+} Weibchen im Vergleich zu PBS-behandelten Cpa3^{+/+} und Cpa3^{Cre/+} Weibchen in der Milz, im Blut sowie den mesenterischen und inguinalen LK eine signifikant geringere Anzahl an CD122⁺CD3⁻NK1.1⁺ pNKs aufwiesen, die nahezu bei 0 % lag (Abbildung 27).

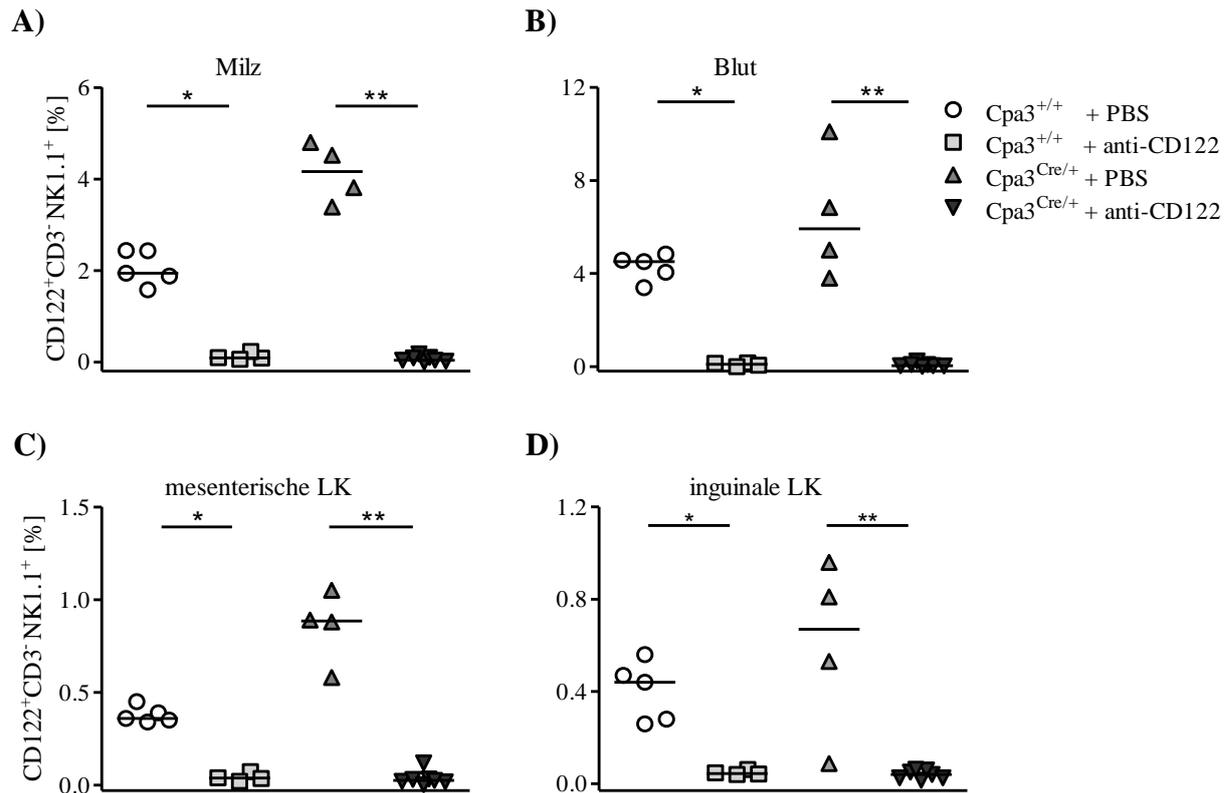


Abbildung 27: Die Verabreichung des Antikörpers anti-CD122 bewirkt eine signifikante Reduktion von peripheren NKs (pNKs) in trächtigen Cpa3^{+/+} und Cpa3^{Cre/+} Mäusen. Der prozentuale Anteil an CD122⁺CD3⁺NK1.1⁺ pNKs wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen am Gestationstag 10 in Milz (A), Blut (B), mesenterischen (C) und inguinalen Lymphknoten (D) bestimmt. Untersucht wurden dabei BALB/c verpaarte, PBS- (n = 5) oder anti-CD122- (n = 4) -behandelte Cpa3^{+/+} sowie PBS- (n = 4) oder anti-CD122- (n = 7) behandelte Cpa3^{Cre/+} Weibchen. Dargestellt sind die Werte einzelner Tiere sowie die Mediane. Für die statistische Auswertung kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung (*p < 0,05; **p < 0,01).

In DBA Lektin-gefärbten Implantationsquerschnitten ist zu erkennen, dass der anti-CD122 Antikörper uNKs sowohl in trächtigen Cpa3^{+/+} und in trächtigen Cpa3^{Cre/+} Mäusen vollständig entfernt (Abbildung 28). Ein Mausmodell, welches sich durch die Abwesenheit von NKs und MCs (CTMC sowie MMC) auszeichnet, wurde somit erfolgreich etabliert und stand für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

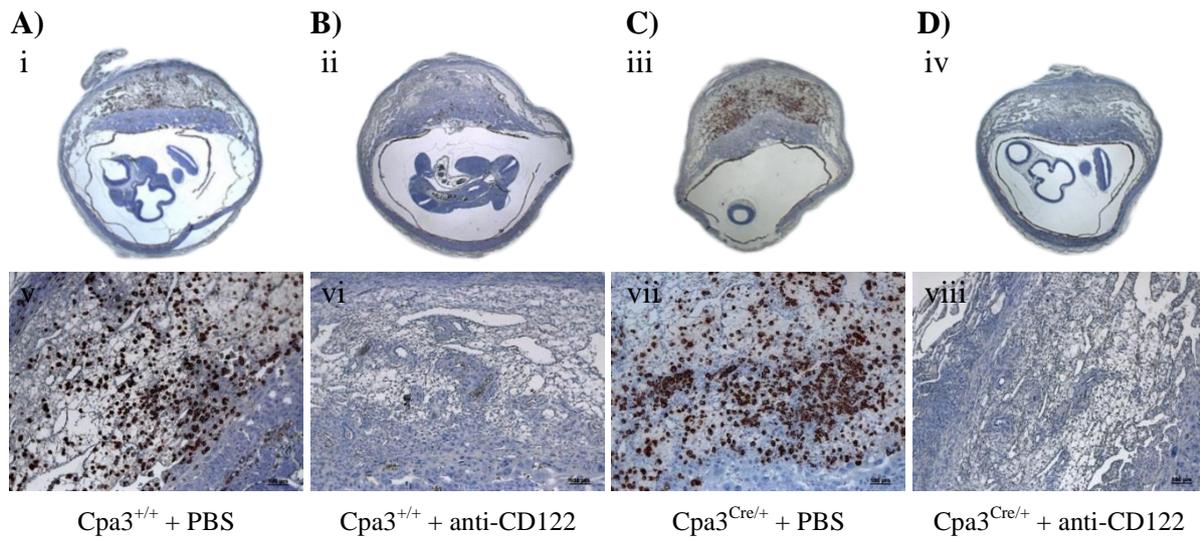


Abbildung 28: Die Injektion des anti-CD122 Antikörpers bewirkt einen Verlust von uterinen NKs (uNKs) in schwangeren Cpa3^{+/+} und Cpa3^{Cre/+} Weibchen. In der oberen Reihe (i-iv) sind repräsentative Dolichus biflorus agglutinin-Lektin-gefärbte Implantationen von BALB/c verpaarten, PBS- (A) oder anti-CD122-(B) behandelten Cpa3^{+/+} sowie PBS- (C) oder anti-CD122- (D) behandelten Cpa3^{Cre/+} Mäusen am Gestationstag 10 dargestellt. Ein vergrößerter Ausschnitt aus der *decidua basalis* der Implantationen ist jeweils in der unteren Reihe gezeigt (v-viii, Messbalken = 50 µm). uNKs erscheinen braun gefärbt.

3.3 Analyse schwangerschaftsspezifischer Parameter in Mäusen, die defizient für Natürliche Killerzellen und Mastzellen sind

3.3.1 Die Abwesenheit von Natürlichen Killerzellen und Mastzellen hat keinen Einfluss auf die Implantationsrate

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie die gleichzeitige Abwesenheit von NKs und MCs die Schwangerschaft beeinflusst, wurden NK/MC-defiziente, d.h. anti-CD122-behandelte $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen sowie die Kontrollgruppen auf verschiedene schwangerschaftsrelevante Parameter untersucht. Zunächst kam es zur Bestimmung der Implantations- und Abortrate am Gestationstag 10. Es konnte festgestellt werden, dass alle Versuchsgruppen eine vergleichbare Anzahl an Implantationen aufwiesen (Abbildung 29 A). Anti-CD122-behandelte $Cpa3^{+/+}$ Weibchen zeigten eine höhere Abortrate im Vergleich zu anti-CD122-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Tieren (Abbildung 29 B).

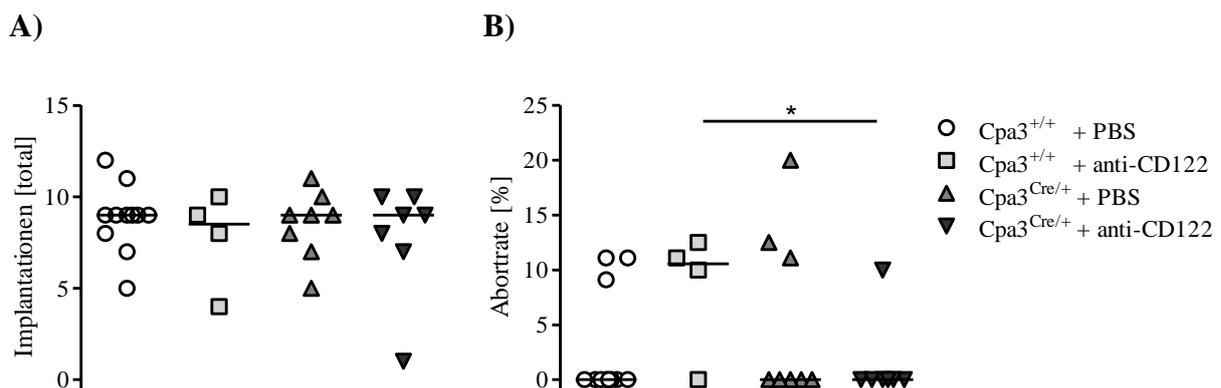


Abbildung 29: Vergleichbare Anzahl an Implantationen in PBS- oder anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$ und $Cpa3^{Cre/+}$ Mäusen sowie erhöhte Abortrate in anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$ Mäusen. Dargestellt ist die Anzahl an Implantationen (A) sowie die Abortrate (B) von BALB/c verpaarten, PBS- (n = 11) oder anti-CD122- (n = 4) behandelten $Cpa3^{+/+}$ sowie PBS- (n = 8) oder anti-CD122- (n = 7) behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen am Gestationstag 10. Gezeigt ist der Median der Einzelwerte der Tiere. Der Vergleich von jeweils zwei Gruppen erfolgte paarweise mit dem Mann-Whitney-U Test (*p<0,05).

3.3.2 Die Abwesenheit Natürlicher Killerzellen und Mastzellen ist mit einer stark eingeschränkten Umwandlung der Spiralarterien assoziiert

Im nächsten Schritt der Arbeit wurde überprüft, ob sich die Abwesenheit von MCs, NKs oder die gleichzeitige Abwesenheit beider Zellpopulationen auf die Umwandlung der SA auswirkt.

Hierfür erfolgte die Einfärbung von Schnittpräparaten von Implantationen, die den Versuchstieren am Gestationstag 10 entnommen wurden, mit Hämatoxylin-Eosin. Umfang und Lumen von drei bis zehn SA pro Weibchen wurden vermessen und die Wanddicke sowie das Wand-zu-Lumen Verhältnis ermittelt. Es zeigte sich, dass die SA von NK-depletierten, anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$, als auch MC-defizienten, PBS-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen signifikant dickere Wände aufweisen als die SA der WT Kontrolltiere. Die Wanddicke von NK/MC-defizienten, anti-CD122-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen war im Vergleich zu allen anderen Gruppen am stärksten (Abbildung 30A). Dies ist ein Zeichen einer unzureichenden SA Umwandlung. Ähnliches zeigte sich bei der Analyse des Wand-zu-Lumen Verhältnisses. Ein hohes Verhältnis zwischen der Gefäßwand und dem Lumen einer SA deutet auf eine ineffiziente SA Umwandlung hin. Das SA Wand-zu-Lumen Verhältnis von anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$, als auch das der PBS-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen war signifikant erhöht im Vergleich zu dem der WT Kontrollgruppe. Den höchsten Wert des Wand-zu-Lumen Verhältnisses und somit die am schlechtesten umgewandelten SA, wiesen erneut anti-CD122 behandelte $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen auf (Abbildung 30B). Zur Visualisierung der kleineren SA Lumen sowie der stärkeren Wandstärken der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe sind in Abbildung 30C Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Implantationsquerschnitte (i-iv) gezeigt. Auch die exemplarischen Immunfluoreszenzbilder nach Färbung mit einem Antikörper gegen das Aktin glatter Muskelzellen (v-xii) zeigen, dass das Aktin in den Wänden der SA PBS-behandelter $Cpa3^{+/+}$ sowie PBS-oder anti-CD122-behandelter $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen stärker exprimiert ist, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies stellt ein weiteres Zeichen für eine eingeschränkte SA Umwandlung in Mäusen ohne MCs oder NKs, insbesondere aber in Mäusen, die sich durch die gleichzeitige Abwesenheit beider Zellpopulationen auszeichnen, dar. Dies bestätigt die Hypothese, dass beide Zellpopulationen eine Rolle bei der SA Umwandlung spielen.

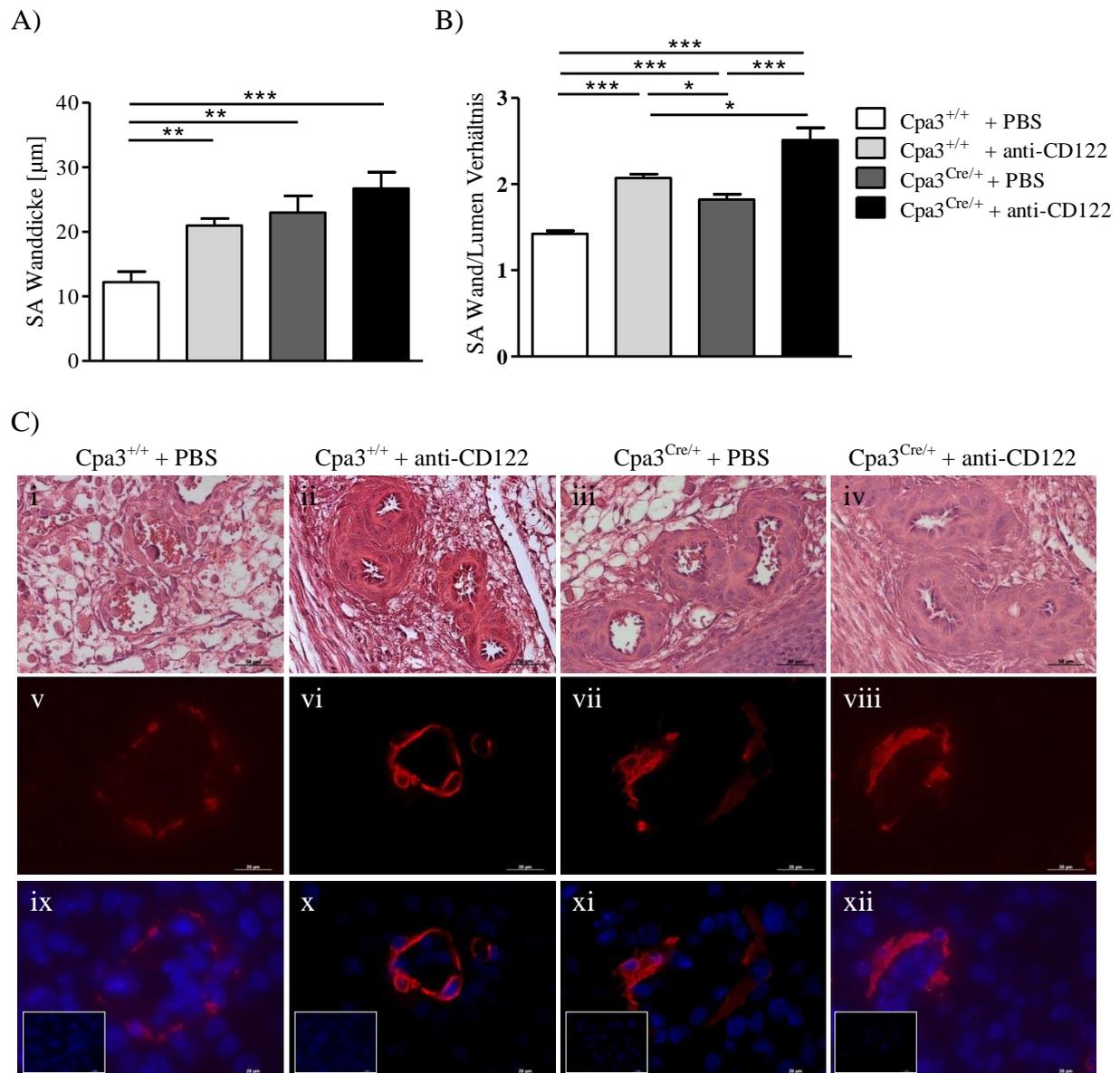


Abbildung 30: Anti-CD122-behandelte $Cpa3^{+/+}$, PBS-behandelte $Cpa3^{Cre/+}$, insbesondere aber anti-CD122-behandelte $Cpa3^{Cre/+}$ Mäuse weisen im Vergleich zur WT Kontrollgruppe eine signifikant schlechtere Umwandlung der Spiralarterien (SA) auf. Am 10. Gestationsstag wurde jeweils der Umfang der Lumen und der gesamten SA von 3-10 SA von BALB/c verpaarten, PBS- (n = 9) oder anti-CD122- (n = 4) behandelten $Cpa3^{+/+}$, sowie von PBS- (n = 8) oder anti-CD122- (n = 6) behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Mäusen gemessen. Die Durchmesser von Lumen und Arterien wurden bestimmt. Aus diesen Werten konnte die SA Wanddicke (A) sowie das SA Wand-zu-Lumen Verhältnis (B) berechnet werden. Abgebildet sind die Mittelwerte mit SEM der Mittelwerte der SA der Tiere einer Gruppe, sowie die statistische Signifikanz, die durch paarweisen Vergleich mit dem ungepaartent-Test ermittelt wurde (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (C) Dargestellt sind repräsentative Bilder von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (i-iv, Messbalken = 50 μm), sowie gegen das Aktin glatter Muskelzellen fluoreszenzgefärbten (v-viii, Messbalken = 20 μm) und mit DAPI überlagerten (ix-xii, Messbalken = 20 μm) Implantation im Bereich der *decidua basalis*, in welchem SA zu erkennen sind.

3.3.3 Mäuse ohne Natürliche Killerzellen und Mastzellen entwickeln keinen Bluthochdruck während der Trächtigkeit

Aufgrund der unzureichenden SA Umwandlung in den Versuchsgruppen, wurde im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit der Blutdruck der trächtigen Weibchen während der gesamten Schwangerschaft aller zwei Tage gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass die systolischen Blutdruckwerte bei anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$ Mäusen im Vergleich zur WT Gruppe an den Gestationstagen 6 und 16 signifikant erhöht waren (Abbildung 33A). Insgesamt konnte jedoch bei keiner der Gruppen zu keinem Zeitpunkt der Trächtigkeit Bluthochdruck (>140 mmHg) festgestellt werden (Abbildung 33).

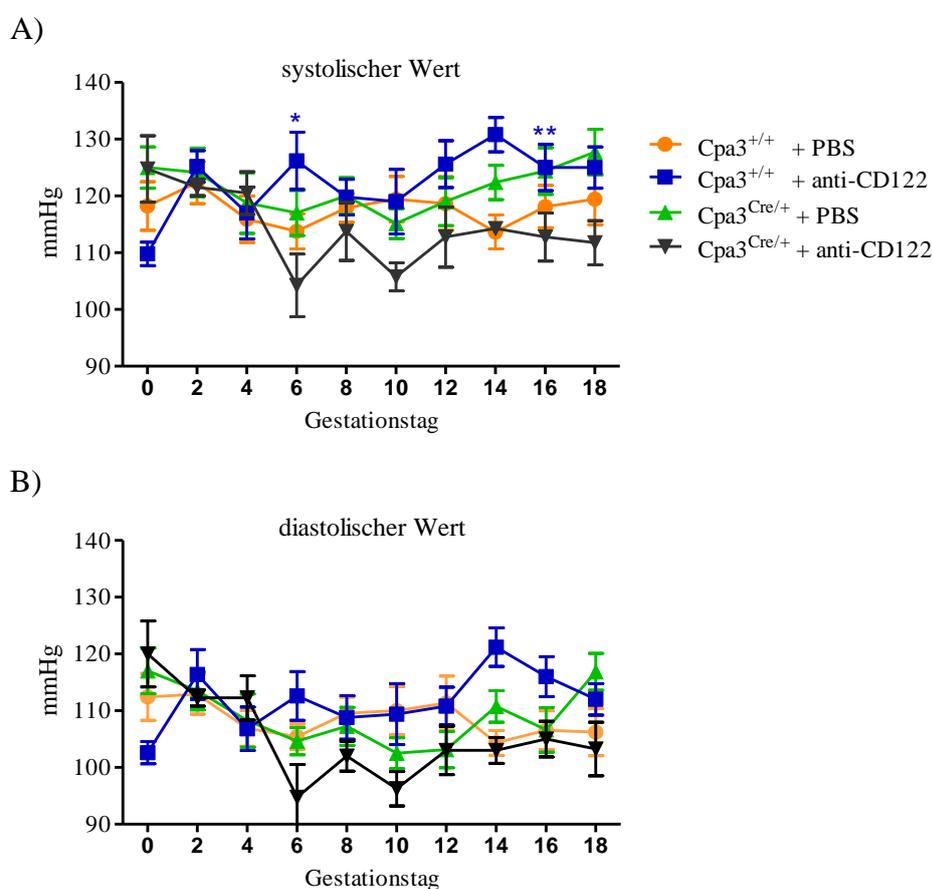


Abbildung 31: PBS-oder anti-CD122-behandelte $Cpa3^{+/+}$ und $Cpa3^{Cre/+}$ Mäuse zeigen keinen Bluthochdruck während der Trächtigkeit. Dargestellt sind die systolischen (A) und diastolischen (B) Blutdruckwerte von BALB/c verpaarten, PBS- (n = 9) oder anti-CD122- (n = 5) behandelten $Cpa3^{+/+}$, sowie von PBS- (n = 8) oder anti-CD122- (n = 4) behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Mäusen. Die Messung des Blutdruckes fand zwischen Gestationstag 0 und 18 jeden zweiten Tag statt. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit SEM aller Tiere einer Gruppe zu sehen. Der ungepaarten t-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Dabei fand jeweils der Vergleich einer Versuchsgruppe zur PBS-behandelten $Cpa3^{+/+}$ Kontrollgruppe statt.

3.3.4 Feten deren Mütter Mastzell- oder Mastzell/Natürliche Killerzellen-defizient sind, weisen am Gestationstag 18 einen reduzierten Feto-Plazentaren Index auf und sind wachstumsretardiert

Ein Einfluss der unzureichend umgewandelten SA auf den Blutdruck der Muttertiere im Verlauf der Schwangerschaft konnte ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Fragestellung, ob sich die Abwesenheit von NKs, MCs oder beider Zelltypen auf den Nachwuchs auswirkt, wurden am Gestationstag 18 das Gewicht der Feten und der Plazenten bestimmt und der FPI, der das Gewicht eines jeden Fetus mit seiner zugehörigen Plazenta korreliert, berechnet. Außerdem wurde das fetale Gewicht in die Kategorien „unter der 5. Perzentile“, „zwischen der 5. und 10. Perzentile“ und „dem Gestationsalter entsprechend“ eingeteilt, um eine mögliche IUGR (Gewicht unter der 10. Perzentile, besonderer Schweregrad unter der 5. Perzentile) festzustellen. Bezogen wurden die fetalen Gewichte dabei jeweils auf die der PBS-behandelte Cpa3^{+/+} Kontrollgruppe.

Feten von anti-CD122-behandelten Cpa3^{+/+} Müttern zeigten ein signifikant erhöhtes Plazentagewicht (Abbildung 32B) und 4,8 % der Feten waren am Gestationstag 18 unter der 5. Perzentile (Abbildung 32D, i). Feten von PBS-behandelten, MC-defizienten Cpa3^{Cre/+} Müttern zeigten ein signifikant geringeres Gewicht am Gestationstag 18 (Abbildung 32A). 7,5 % lagen zwischen der 5.-10. Perzentile und 3,8 % sogar unter der 5. Perzentile (Abbildung 32D, ii). Feten von anti-CD122-behandelten, MC-defizienten Cpa3^{Cre/+} Müttern, also Müttern die weder MCs noch NKs besaßen, zeigten ein signifikant geringeres Gewicht am Gestationstag 18 im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Abbildung 32A). 11 % von ihnen lagen zwischen der 5.-10. Perzentile und 19 % unter der 5. Perzentile (Abbildung 32D, iii). Des Weiteren wiesen sie einen signifikant geringeren FPI-Wert auf (Abbildung 32C). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass insbesondere MCs einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Nachkommen haben. Die gleichzeitige Abwesenheit von NKs und MCs schränkt das fetale Wachstum enorm ein.

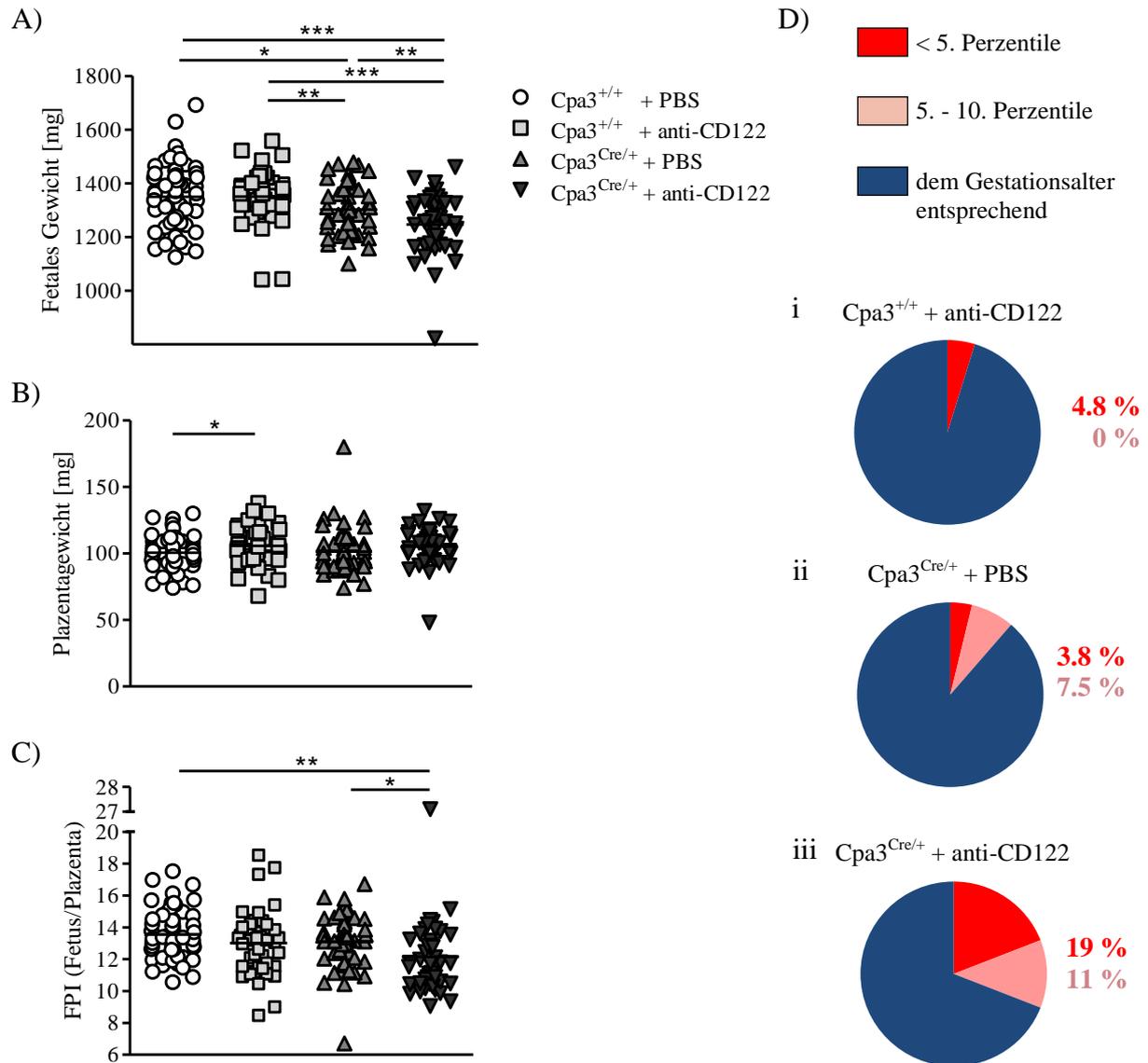


Abbildung 32: Feten PBS-behandelter Cpa3^{Cre/+}, besonders aber anti-CD122-behandelter Cpa3^{Cre/+} Weibchen weisen ein signifikant niedrigeres Gewicht im Vergleich PBS- oder anti-CD122-behandelten Cpa3^{+/+} Weibchen auf. Auch der Feto-Plazentaren Index (FPI) anti-CD122-behandelter Cpa3^{Cre/+} Weibchen ist signifikant erniedrigt. Hingegen ist das Plazentagewicht in PBS-behandelten Cpa3^{+/+} Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zur WT Gruppe. Am Gestationstag 18 wurde das fetale Gewicht (A) sowie das Gewicht der Plazenten (C) von BALB/c verpaarten, PBS- (Mütter: n = 8, Feten/Plazenten: n = 64) oder anti-CD122- (Mütter: n = 8, Feten/Plazenten: n = 42) behandelten Cpa3^{+/+} sowie PBS- (Mütter: n = 5, Feten/Plazenten: n = 53) oder anti-CD122- (Mütter: n = 5, Feten/Plazenten: n = 42) behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen bestimmt. Basierend auf diesen Werten erfolgte die Ermittlung der FPI (Fetales/plazentales Gewicht)-Werte (D). Dargestellt sind die Werte einzelner Feten und Plazenten sowie deren Mittelwerte. Der ungepaarte t-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Weiterhin ist der prozentuale Anteil an Feten (D) aus Abbildung 32A gezeigt, der von intrauteriner Wachstumsretardierung (Gewicht unter der 10. Perzentile, besonderer Schweregrad unter der 5. Perzentile) betroffen ist (rot: Gewicht unter der 5. Perzentile, rosa: Gewicht zwischen der 5. und der 10. Perzentile). In blau ist der prozentuale Anteil der Feten dargestellt, dessen Gewicht dem Gestationsalter entspricht. Bezogen wurden die fetalen Gewichte jeweils auf die der PBS-behandelten Cpa3^{+/+} WT Feten.**

3.3.5 Nachkommen von Mäusen ohne Mastzellen haben bei der Geburt ein zu geringes Gewicht, dieser Phänotyp verschlechtert sich noch mehr nach NK-Depletion

Ein wichtiges Kriterium, das einen weitreichenden Einfluss auf das spätere Leben hat, ist das Geburtsgewicht. Ein zu geringes Geburtsgewicht kann mit der Entwicklung schwerwiegender kardiovaskulärer oder metabolischer Erkrankungen¹⁷⁸, aber auch mit einem erhöhten Risiko für Depressionen und Angstzustände¹⁷⁹ assoziiert sein. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Geburtsgewicht der Nachkommen aller Versuchsgruppen ermittelt.

Die Neugeborenen von NK-depletierten $Cpa3^{+/+}$ Weibchen wiesen bei der Geburt alle ein Gewicht auf, das dem Gestationsalter entsprach und vergleichbar zur Kontrolle war (Abbildung 33A, B, i). Dagegen waren Nachkommen der PBS-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen signifikant leichter bei der Geburt (Abbildung 33A). Das Gewicht von 9,7 % der Nachkommen lag zwischen der 5. und der 10. Perzentile und das Gewicht von 16,1 % unter der 5. Perzentile (Abbildung 33B, ii). Nachkommen der anti-CD122-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen, die weder NKs noch MCs hatten, wiesen das geringste Geburtsgewicht auf (Abbildung 33A). 10,5 % von ihnen lagen zwischen der 5. und der 10. Perzentile und enorme 42,1 % unter der 5. Perzentile (Abbildung 33B, iii). Die Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von MCs in $Cpa3^{Cre/+}$ Mäusen mit negativen Auswirkungen auf das Geburtsgewicht der Nachkommen assoziiert ist, ein Phänotyp welcher durch die NK-Depletion dramatisch verschlechtert wird.

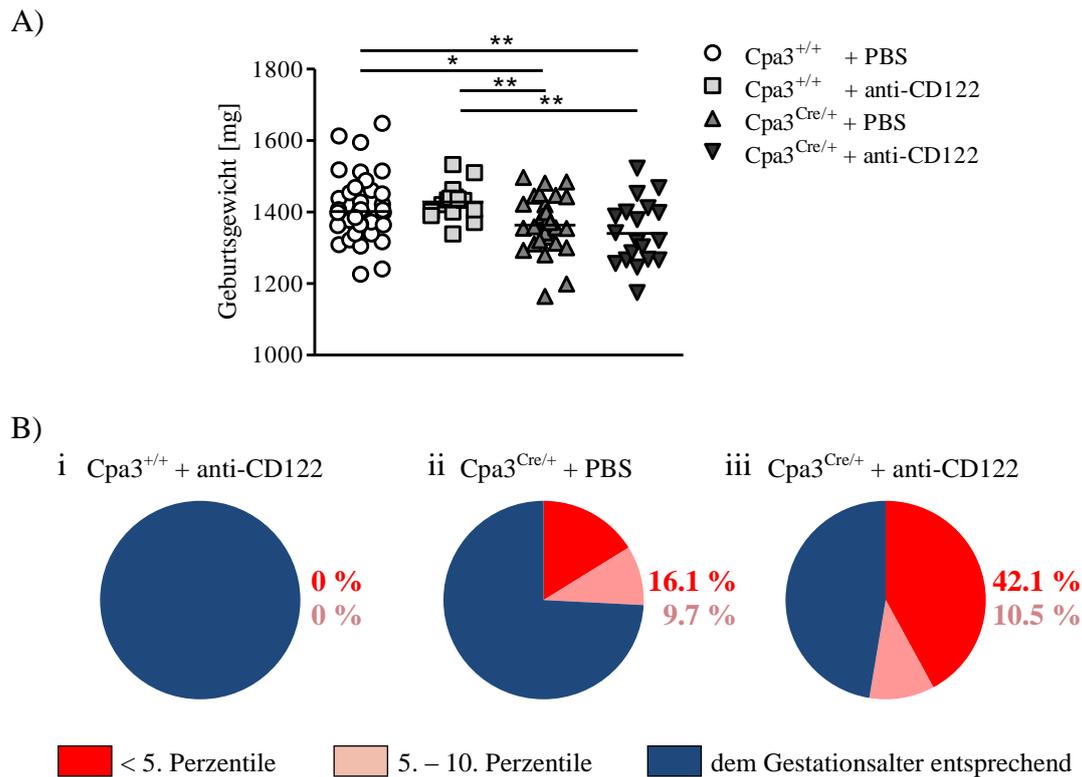


Abbildung 33: Nachkommen von PBS-behandelten Cpa3^{Cre/+} Mäusen, insbesondere aber von anti-CD122-behandelten Cpa3^{Cre/+} Mäusen haben ein signifikant geringeres Geburtsgewicht. Dargestellt ist das Geburtsgewicht der Nachkommen von BALB/c verpaarten, PBS- (Mütter: n = 6, Nachkommen: n = 49) bzw. anti-CD122- (Mütter: n = 2, Nachkommen: n = 15) behandelten Cpa3^{+/+} oder PBS- (Mütter: n = 4, Nachkommen: n = 31) bzw. anti-CD122- (Mütter: n = 3, Nachkommen: n = 19) behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen. Gezeigt sind die Einzelwerte aller Nachkommen sowie deren Mittelwerte. Der Vergleich von jeweils zwei Gruppen erfolgte paarweise mit dem ungepaarten t-Test (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Weiterhin ist der prozentuale Anteile (B) an Feten aus Abbildung 33A gezeigt, deren Geburtsgewicht unter der 5. Perzentile (rot) bzw. zwischen 5. und 10. Perzentile (rosa) liegen und somit zu klein sind oder dem Gestationsalter entsprechen (blau). Die Geburtsgewichte aller Gruppen wurden auf die der PBS-behandelten Cpa3^{+/+} Nachkommen bezogen.

Neben der Erhebung des Geburtsgewichtes wurde der Anteil an weiblichen und männlichen Nachkommen bestimmt, als die Tiere ein Alter von etwa 28 Tagen erreicht hatten (Tabelle 4). Es ergab sich folgende Weibchen/ Männchen-Aufteilung: PBS-behandelte Cpa3^{+/+} Mütter brachten 64,4 % Weibchen und 35,6 % Männchen zur Welt. Anti-CD122-behandelte Cpa3^{+/+} Mütter haben 40 % Weibchen und 60 % Männchen geboren. 50 % Weibchen sowie 50 % Männchen wurden von PBS-behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen gezeugt und 36,8 % Weibchen sowie 63,2 % Männchen von anti-CD122-behandelte Cpa3^{Cre/+} Weibchen.

Tabelle 4: Anteil der weiblichen/männlichen Nachkommen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an geborenen Weibchen und Männchen von PBS oder anti-CD122-behandelten Cpa3^{+/+} bzw. Cpa3^{Cre/+} Weibchen.

Mausstamm/Behandlung	Geborene Weibchen	Geborene Männchen
Cpa3 ^{+/+} + PBS	64,4 %	35,6 %
Cpa3 ^{+/+} + anti-CD122	40 %	60 %
Cpa3 ^{Cre/+} + PBS	50 %	50 %
Cpa3 ^{Cre/+} + anti-CD122	36 %	63 %

3.3.6 Die mRNA- und Proteinexpression der Mastzellprotease 5 ist in Deziduaprobe von Mastzell- sowie Mastzell/Natürlichen Killerzell-defizienten Mäusen signifikant verringert

Es konnte festgestellt werden, dass trächtige Mäuse ohne NKs oder MCs und insbesondere Mäuse ohne beide Zellarten, eine unzureichende Modifikation der SA im Vergleich zum WT aufweisen. Diese war mit Auswirkungen auf das fetale Gewicht und im Fall von MC und NK/MC-defizienten Tieren, sogar mit Wachstumsretardierung sowie negativen Auswirkungen auf das Geburtsgewicht der Nachkommen assoziiert. Zur Klärung der Ursache der unzureichenden SA Modifikation in den Mäusen wurden Deziduaprobe aller Versuchsgruppen mittels real-time PCR auf die Expression verschiedener Mediatoren untersucht, die hauptsächlich von NKs oder MC freigesetzt werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die mRNA Expression von Mcpt5 in Deziduaprobe von MC-defizienten Cpa3^{Cre/+} Weibchen im Vergleich zu WT Cpa3^{+/+} Weibchen, wie zu erwarten, signifikant reduziert war. Interessanterweise wiesen daneben auch NK-depletierte Cpa3^{+/+} Weibchen eine geringere Mcpt5 Expression als PBS-behandelte Cpa3^{+/+} Weibchen auf. Auch in NK-depletierten Cpa3^{Cre/+} Weibchen war die Mcpt5 mRNA Expression signifikant geringer, verglichen mit PBS-behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen (Abbildung 34).

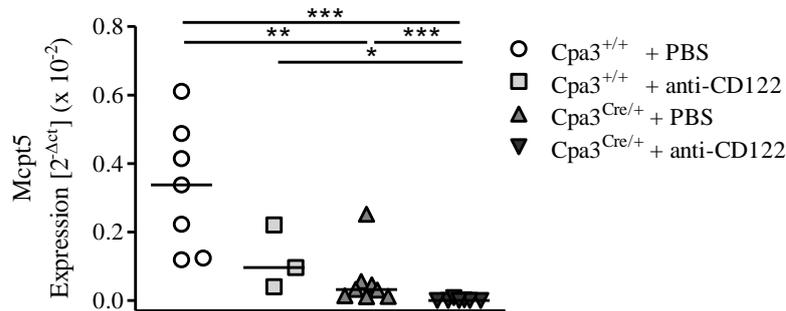


Abbildung 34: Geringere mRNA Expression der Mastzellprotease (Mcpt) 5 in Deziduaprobe von PBS-behandelten, insbesondere aber von NK-depletierten Cpa3^{Cre/+} Mäusen. Dargestellt ist die relative mRNA Expression von Mcpt5 in Deziduaprobe von BALB/c verpaarten, PBS-(n = 7) oder anti-CD122-(n = 3) behandelten Cpa3^{+/+} und PBS-(n = 8) oder anti-CD122-(n = 6) Cpa3^{Cre/+} Weibchen am Gestationstag 10. Gezeigt ist der Median der Einzelwerte der Tiere. Der Vergleich von jeweils zwei Gruppen erfolgte paarweise mit dem Mann-Whitney-U Test (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Zur Bestätigung der Mcpt5 mRNA Expressionsdaten wurde die Proteinexpression von Mcpt5 bestimmt. Hierfür wurden Proteine aus Deziduaprobe aller Versuchsgruppen isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine Membran übertragen und anschließend mit Antikörper gegen Mcpt5 und β -Actin detektiert. Eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zu allen anderen Gruppen zeigten die Proben von anti-CD122 behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen (Abbildung 35), die weder NKs noch MCs besitzen und sehr schlecht umgewandelte SA aufweisen.

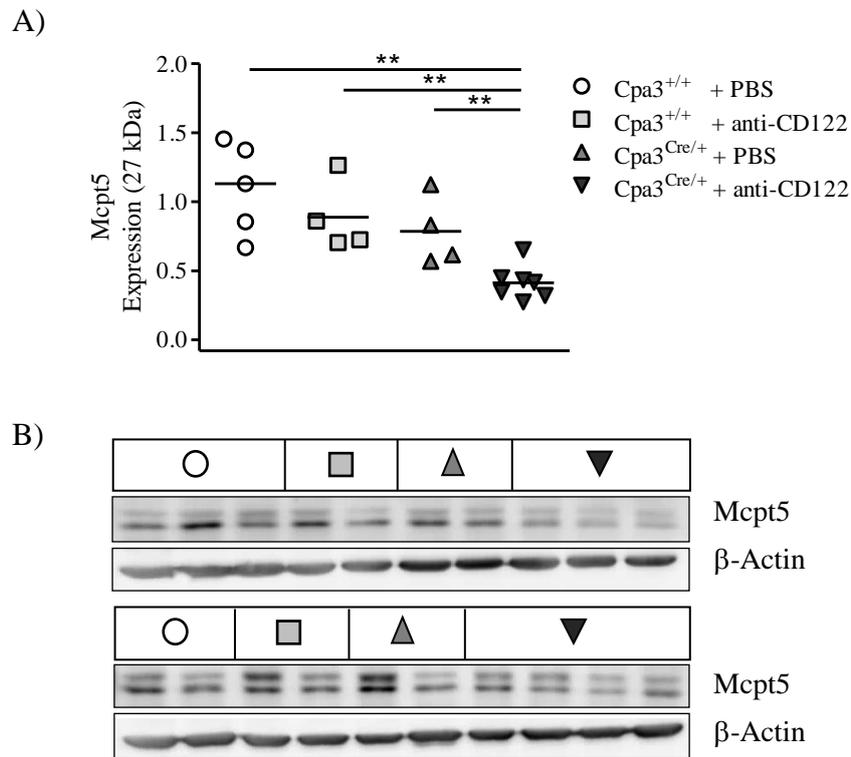


Abbildung 35: Deziduaprobe NK-depletierter Cpa3^{Cre/+} Mäuse besitzen eine signifikant reduzierte Proteinexpression der Mastzellprotease (Mcpt) 5. (A) Dargestellt ist die relative Proteinexpression von Mcpt5 in Deziduaprobe von BALB/c verpaarten PBS- (n = 5) oder anti-CD122- (n = 4) behandelten Cpa3^{+/+} und PBS- (n = 4) oder anti-CD122- (n = 7) Cpa3^{Cre/+} Weibchen am Gestationstag 10. Gezeigt ist der Median der Einzelwerte der Tiere. Der Vergleich von jeweils zwei Gruppen erfolgte paarweise mit dem Mann-Whitney-U Test (**p < 0,01). (B) Weiterhin sind die auf der Membran detektierten Proteinbanden von Mcpt5 (27 kDa) und β-Actin (42 kDa) nach dem Western Blot gezeigt.

Für Versuchsgruppen mit schlechter umgewandelten SA konnte eine geringere Mcpt5 Expression gezeigt werden, was einen Zusammenhang zwischen Mcpt5 Expression und SA Umwandlung vermuten lässt. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nicht wie bisher angenommen lediglich MCs, sondern auch NKs an der Expression von Mcpt5 an der feto-maternalen Grenzfläche beteiligt sind.

3.3.7 Natürlichen Killerzellen exprimieren die Mastzellprotease 5

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass neben MCs auch NKs an der Expression von Mcpt5 in der Dezidua beteiligt sind. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die Expression von Mcpt5 in uNKs mittels Doppelfluoreszenzfärbung

getestet. Dafür wurden Implantationen von PBS-behandelten WT $Cpa3^{+/+}$ und MC-defizienten $Cpa3^{Cre/+}$ Mäusen von Gestationstag 10 getestet. Mit Hilfe des spezifischen DBA Lektins konnten uNKs nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass DBA-positive Zellen *Mcpt5* exprimierten (Abbildung 36).

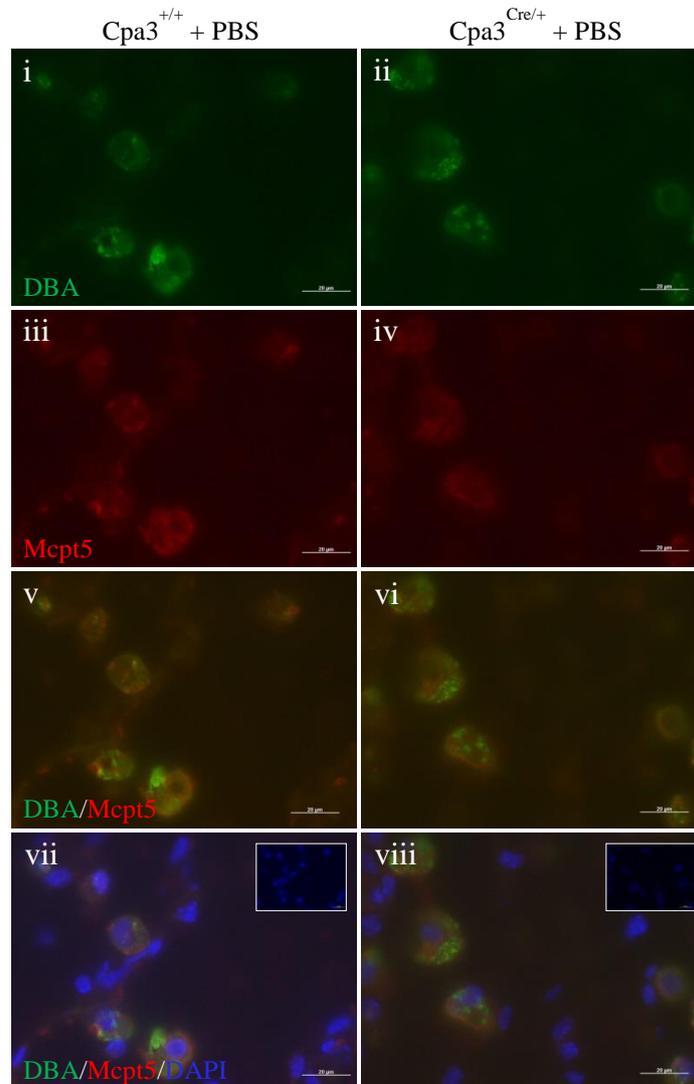


Abbildung 36: Uterine NKs (uNKs) exprimieren die Mastzellprotease (Mcpt) 5. Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen von Implantationen im Bereich der *decidua basalis* BALB/c verpaarter, PBS-behandelter $Cpa3^{+/+}$ und $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen am Gestationstag 10 (Messbalken = 20 μ m). Zu sehen sind Dolichos biflorus agglutinin⁺ uNKs (i, ii) sowie *Mcpt5*-positive Zellen (iii, iv). Mit DAPI wurden zusätzlich die Zellkerne angefärbt (vii, viii). Die Bilder zeigen, dass Dolichos biflorus agglutinin⁺ uNKs *Mcpt5* exprimieren (v, vi).

3.3.8 Mastzellen exprimieren die Mastzellprotease 5

Die α -Chymase Mcpt5 wird bereits zu einem sehr frühen Stadium der Differenzierung serosaler MC gebildet und in deren sekretorischen Granula gelagert¹³¹. Zur Bestätigung der Mcpt5 Expression in MCs wurden zum einen die murine MC-Linie MC/9, zum anderen PCMCs von Mäusen, sowie die humane MC-Linie HMC-1 auf die Expression von Mcpt5 (Maus α -Chymase) bzw. Cma1 (humane α -Chymase) überprüft. Hierfür wurden Proteine aus den Zellen isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine Membran übertragen und anschließend mit Antikörpern gegen Mcpt5/ Cma1 und β -Actin detektiert. Es zeigte sich, dass sowohl murine MC/9 Zellen und PCMCs als auch humane HMC-1 Zellen Mcpt5/Cma1 exprimieren (Abbildung 37).

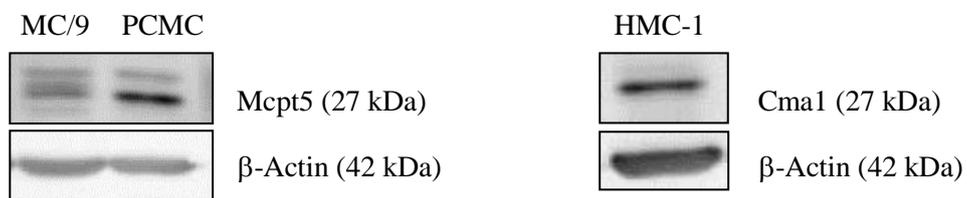


Abbildung 37: Mastzellen exprimieren die Mastzellprotease (Mcpt) 5. Dargestellt sind die nach Western Blot auf der Membran detektierten Proteinbanden von Mcpt5/Cma1 (27 kDa) und β -Actin (42 kDa) der murinen MC-Linie MC/9, von MCs aus dem Peritoneum von Mäusen (PCMCs) sowie der humanen MC-Linie HMC-1.

3.4 Untersuchung des Einflusses Mastzellprotease 5-exprimierender Zellen auf schwangerschaftsrelevante Prozesse

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt der vorliegenden Arbeit die Expression von Mcpt5 durch MCs und uNKs nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Teil der Arbeit geprüft werden, ob Mcpt5 den positiven Effekt beider Zelltypen auf die SA Umwandlung vermittelt. Zu diesem Zweck wurde *in vitro* untersucht, ob Mcpt5-exprimierende MC/9 Zellen die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen, ein wichtiger Prozess im Rahmen einer effizienten SA Umwandlung, induzieren. Des Weiteren wurde untersucht, ob das Fehlen Mcpt5-exprimierender Zellen die SA Umwandlung *in vivo* sowie andere schwangerschaftsrelevante Prozesse beeinflusst.

3.4.1 Mastzellprotease 5-exprimierende MC/9 Zellen induzieren Apoptose in uterinen glatten Muskelzellen

Ein wichtiger Mechanismus hinsichtlich der Umwandlung von SA umfasst die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen²². Es ist bekannt, dass uNKs durch die Sekretion von Chemokinen und MMPs am Prozess der SA Umwandlung beteiligt sind¹⁸⁰. Ob auch Chymase-exprimierende MC seinen Einfluss darauf haben, wurde *in vitro* untersucht.

Hierfür wurde die Mcpt5-exprimierende MC/9 MC-Zelllinie mit uterinen glatten Muskelzellen, Zellen von denen SA ausgekleidet werden, kokultiviert. Um einen direkten Zell-zu-Zell Kontakt zu vermeiden, fand die Kokultivierung in einem Transwellsystem statt, welches die Zellen räumlich voneinander trennt, so dass bei einem beobachteten Effekt nur lösliche Faktoren für diesen verantwortlich sein können. Des Weiteren wurden die Zellen in An-oder Abwesenheit des Chymase-Inhibitors STBI¹⁶⁷⁻¹⁷¹ kokultiviert. Somit kann bei beobachteten Effekten auf die Tätigkeit einer Chymase zurückgeschlossen werden. Nach 48 h erfolgte die Untersuchung der uterinen glatten Muskelzellen auf Annexin V-positive, apoptotische Zellen.

Die Ergebnisse legen dar, dass die gemeinsame Kultivierung von Mcpt5-exprimierenden MC/9 Zellen und uterinen glatten Muskelzellen den prozentualen Anteil an Annexin V-positiven und somit die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen, signifikant erhöht im Vergleich zu uterinen glatten Muskelzellen, die allein kultiviert wurden. Die Zugabe des Chymase-Inhibitors STBI bewirkte eine signifikante Reduktion der Annexin V-positiven uterinen glatten Muskelzellen (Abbildung 38). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine

Chymase, wahrscheinlich Mcpt5, die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen induziert und somit eine wichtige Rolle als Mediator bei die SA Umwandlung einnimmt.

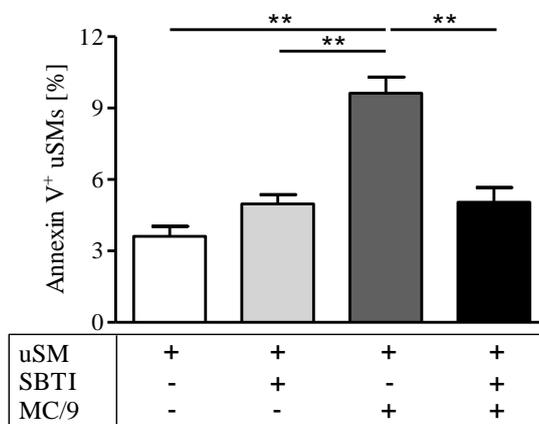


Abbildung 38: Mastzellprotease (Mcpt) 5-exprimierende MC/9 Zellen induzieren Apoptose in uterinen glatten Muskelzellen (uSMs). Nach 48 h Kokultivierung von Mcpt5-exprimierenden MC/9 Zellen und uSMs (Verhältnis 1:1) im Transwellssystem wurden Annexin-V-positive uSMs Zellen mittels Durchflusszytometer detektiert. Die gemeinsame Kultivierung beider Zelltypen führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl apoptotischer uSMs im Vergleich zu allein kultivierten uSMs. Durch die Zugabe des Chymase-Inhibitor STBI während der Kultivierung sank der prozentuale Anteil an apoptotischen uSMs signifikant ab. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM der Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Versuchen wiederholt. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test herangezogen (**p<0,01).

3.4.2 Der Verlust Mcpt5-exprimierender Zellen hat keinen Einfluss auf die Implantations- und Abortrate in Mäusen

Die Cre-transgene Mauslinie Mcpt5-Cre⁺ ¹⁵⁷ exprimiert die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des Mcpt5 Promotors eines BAC Transgenes. Durch Kreuzung der Mcpt5-Cre⁺ Mauslinie mit der R-DTA Mauslinie ¹⁵⁹ kommt es zum Ausschneiden der LoxP-flankierten Stop-Kassetten durch die Cre Rekombinase, Diphtheria Toxin A (DTA) wird exprimiert und das Toxin wirkt in Mcpt5⁺ Zellen ¹⁶⁰, die dadurch depletiert werden.

Um die Auswirkung des Verlustes Mcpt5-exprimierender Zellen auf die Schwangerschaft zu analysieren, wurden die Tiere zunächst verpaart und die Implantations- und Abortrate am Gestationstag 10 bestimmt. Beide Versuchsgruppen unterschieden sich nicht in der Anzahl an Implantationen sowie der Abortrate (Abbildung 39), ähnlich wie bei MC-defizienten Tieren.

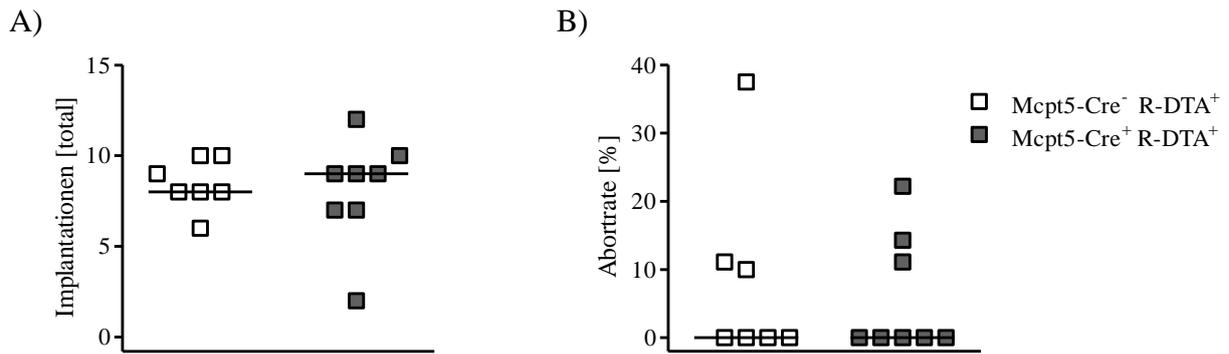


Abbildung 39: Vergleichbare Implantations- und Abortrate in Mcpt5-Cre⁺R-DTA⁺- und Kontrollmäusen. Dargestellt ist die Anzahl an Implantationen (A) sowie die Abortrate (B) von BALB/c verpaarten Mcpt5-Cre⁻R-DTA⁺ (n = 7) sowie Mcpt5-Cre⁺R-DTA⁺ (n = 8) Weibchen am Gestationstag 10. Gezeigt ist der Median der Werte einzelner Tiere. Der Vergleich von jeweils zwei Gruppen erfolgte paarweise mit dem Mann-Whitney-U Test.

3.4.3 Mcpt5-exprimierende Zellen sind notwendig für die Modifikation der Spiralarterien

Um Auswirkungen des Verlustes von Mcpt5-exprimierenden Zellen auf die Schwangerschaft zu analysieren, wurde die SA Umwandlung als weiteres Kriterium herangezogen. Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Implantationsschnittpräparaten vom 10. Gestationstag kam es zur Ermittlung des Umfangs der gesamten SA und des Lumens von drei bis zehn SA pro Weibchen und zur Berechnung der Wanddicke sowie des Wand-zu-Lumen Verhältnisses. Die Daten ergaben, dass die SAs von Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich schlechter modifiziert waren, was sich in einer signifikant erhöhter Wanddicke (Abbildung 40A) sowie einem signifikant erhöhtem Wand-zu-Lumen Verhältnis (Abbildung 40B) der Arterien zeigt. Erkennbar sind die dickeren Wände und kleineren Lumen von SAs Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen in den repräsentativen Ausschnitten aus der *decidua basalis* (Abbildung 40C). Die *in vivo* Daten belegen eindeutig, dass Mcpt5-exprimierende Zellen einen fördernden Einfluss auf die SA Umwandlung haben.

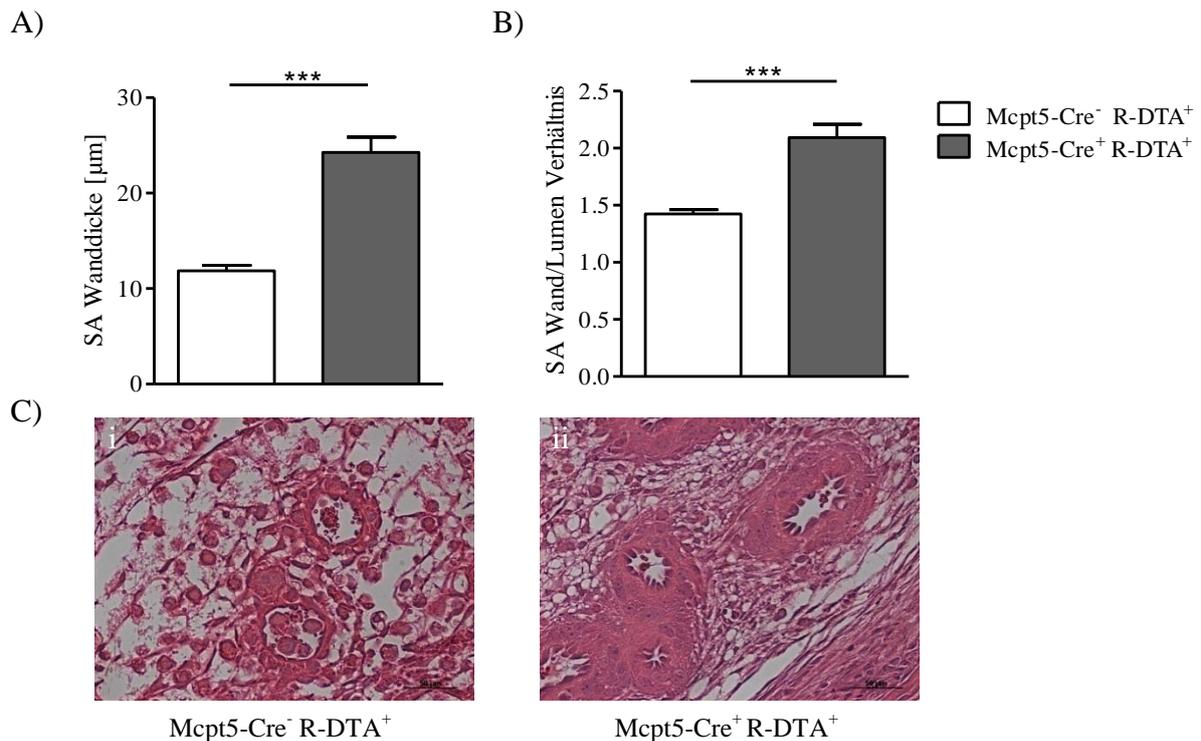


Abbildung 40: Spiralarterien (SA) von Mcpt5-Cre⁺R-DTA⁺ Weibchen sind schlechter modifiziert als SA von Kontrollweibchen. Am 10. Gestationstag wurde jeweils der Umfang des Lumens und der gesamten SA von drei bis zehn SA von BABL/c verpaarten Mcpt5-Cre⁻R-DTA⁺ (n = 6) Kontrollmäusen und von Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ (n = 7) Mäusen (ohne Mcpt5-exprimierende Zellen) gemessen. Anschließend wurden die Durchmesser von Lumen und Arterien bestimmt. Aus diesen Werten konnte die SA Wanddicke (A), sowie das SA Wand-zu-Lumen Verhältnis (B) berechnet werden. Abgebildet sind die Mittelwerte mit SEM der Mittelwerte der SA aller Tiere einer Gruppe sowie die statistische Signifikanz, die mit dem ungepaarten t-Test ermittelt wurde (**p<0,001). (C) Dargestellt sind repräsentative Bilder von SA in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (Messbalken = 50 µm) Implantation im Bereich der *decidua basalis*.

3.4.4 Die mRNA Expression der Matrix Metalloprotease 9 ist signifikant verringert in Deziduaprobe von Mäusen ohne Mcpt5-exprimierende Zellen

Trächtige Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Mäuse, die durch die Abwesenheit Mcpt5-exprimierender Zellen charakterisiert sind, zeigen eine unzureichende Modifikation der SA im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass MMPs die SA Umwandlung beeinflussen^{181,182}. Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass Chymase dazu fähig ist, MMP9 zu aktivieren^{139,183}. Bezug nehmend auf diese Studien war die Untersuchung ob MMP9 auch in unserem Modell eine ähnliche Rolle spielen könnte, ein weiteres Ziel der Arbeit.

Deziduaprobe von Mcpt5-Cre⁻ R-DTA⁺ und Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen wurden in der vorliegenden Arbeit am 10. Gestationstag mittels real-time PCR auf die Expression von

MMP9 untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die mRNA Expression von MMP9 in Deziduaprobe von Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen, die keine Mcpt5-positiven Zellen besitzen, im Vergleich zu Mcpt5-Cre⁻ R-DTA⁺ Weibchen signifikant reduziert war (Abbildung 41).

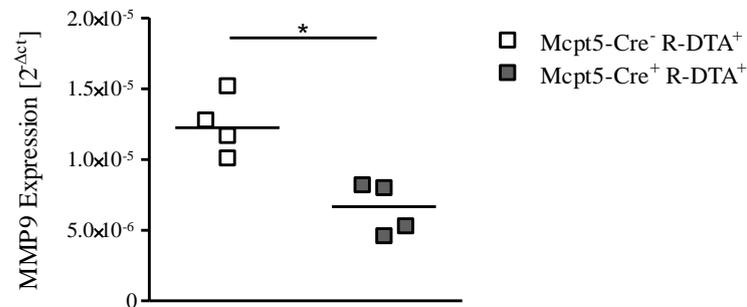


Abbildung 41: Die Abwesenheit von Mcpt5-exprimierenden Zellen in Mcpt5-Cre⁺R-DTA⁺ Mäusen ist mit einer signifikant geringen mRNA Expression der Matrix Metalloprotease (MMP) 9 assoziiert. Dargestellt ist die relative mRNA Expression von MMP9 in Deziduaprobe von BALB/c verpaarten Mcpt5-Cre⁻R-DTA⁺ (n = 4) und Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ (n = 4) Weibchen am Gestationstag 10. Gezeigt ist der Median der Einzelwerte der Tiere. Der Vergleich der Gruppen erfolgte paarweise mit dem Mann-Whitney-U Test (*p<0,05).

3.4.5 Der Verlust Mcpt5-exprimierender Zellen in Muttertieren ist mit einem zu geringeren Geburtsgewicht der Nachkommen assoziiert

In dem folgenden Teil der Arbeit wurden die Nachkommen von Mcpt5-Cre⁺R-DTA⁺ Weibchen auf Wachstumseinschränkungen untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass die Nachkommen von Mcpt5-Cre⁺R-DTA⁺ Müttern im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringeres Geburtsgewicht aufwiesen (Abbildung 42A). 13,2% der Nachkommen lagen mit ihrem Gewicht zwischen dem 5. und der 10. Perzentile und 26,3% unter der 5. Perzentile im Vergleich zu Nachkommen der Kontrollgruppe (Abbildung 42B). Die Daten bestätigen, dass Mcpt5-exprimierende Zellen wichtig für die SA Umwandlung sowie die Entwicklung der Nachkommen sind und erklärt, warum NK/MC-defiziente Tiere den dargestellten Phänotyp aufweisen.

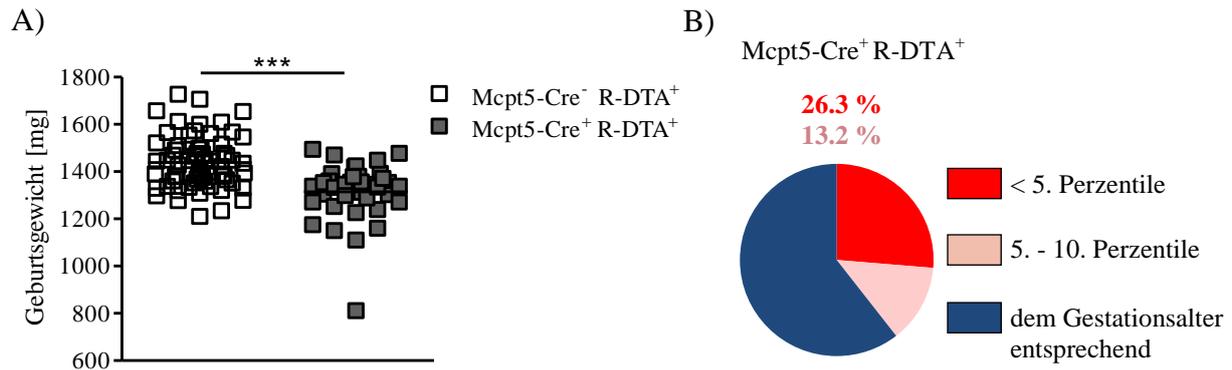


Abbildung 42: Nachkommen von Mcpt5-Cre⁺ R-DTA Mäusen besitzen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringeres Geburtsgewicht. Dargestellt ist das Geburtsgewicht der Nachkommen (A) von BALB/c verpaarten Mcpt5-Cre⁻ R-DTA (Mütter: n = 8, Nachkommen: n = 66) bzw. Mcpt5-Cre⁺ R-DTA (Mütter: n = 5, Nachkommen: n = 38) Mäusen. Gezeigt sind die Einzelwerte aller Nachkommen sowie deren Mittelwert. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem ungepaarten t-Test (**p<0,001). Weiterhin sind die prozentualen Anteile (B) der Nachkommen aus Abbildung 42A gezeigt, deren Geburtsgewichte unterhalb der 5. Perzentile (rot) oder zwischen der 5. und der 10. Perzentile (rosa) liegen und somit zu klein für ihr Alter sind bzw. der Norm entsprechen (blau). Die Geburtsgewichte der Nachkommen wurden dabei auf die der Kontrollgruppe bezogen.

4 Diskussion

Eine Schwangerschaft ist ein hochregulierter, komplexer Mechanismus, der in die Prozesse Befruchtung, Implantation, Dezidualisierung, Plazentation und Geburt eingeteilt wird. Eine Vielzahl an Faktoren wirkt für das Gelingen des Gesamtprozesses, dem Heranreifen eines gesunden Kindes, zusammen. Dennoch kann es bei jedem einzelnen dieser Prozesse, beispielsweise durch eine fehlerhafte oder ungenügende Anpassung des mütterlichen Immunsystems, zu Unstimmigkeiten kommen, die in verschiedenen Schwangerschaftskomplikationen resultieren können. Dazu zählen Infertilität, Fehl- oder Frühgeburt, Präeklampsie sowie IUGR des Nachwuchses. Auch das steigende Alter von Frauen die sich für eine Schwangerschaft entscheiden, erhöht das Risiko für Komplikationen im Verlauf der Schwangerschaft sowie bei der Geburt^{184,185}. Neben der hohen psychischen Belastung der betroffenen Personen und der Angehörigen, entstehen enorme Kosten für das Gesundheitssystem¹⁰⁶, die somit eine Belastung für die gesamte Bevölkerung darstellen. Grundlagenforschung sowie klinische Forschung auf dem Gebiet der Reproduktionsimmunologie sind erforderlich, um diese Probleme zu lösen.

Eine Voraussetzung für das Überleben und eine uneingeschränkte Entwicklung des Nachwuchses während der Schwangerschaft ist die immunologische Toleranz des mütterlichen Organismus gegenüber dem semiallogenen Fetus. Zur Etablierung und Aufrechterhaltung dieser Toleranz ist eine Anpassung des mütterlichen Immunsystems notwendig. Eine maßgebliche Rolle spielt dabei das fein modulierte Zusammenspiel der mütterlichen Immunzellen.

4.1 Die Rolle von uterinen Natürlichen Killerzellen und uterinen Mastzellen während der Schwangerschaft

uNKs, die häufigste Immunzellpopulation an der feto-maternalen Grenzfläche, sind an wichtigen reproduktiven Prozessen, wie beispielsweise der Umwandlung der SA, die eine gewaltige Zunahme des zum Fetus fließenden Blutstromes bewirkt, maßgeblich beteiligt⁶⁹. Die Mechanismen, die dazu beitragen, sind noch nicht eindeutig geklärt. Zur Aufklärung dieser Mechanismen wird unter anderem das NK-defiziente IL-15^{-/-} Mausmodell⁷⁶ verwendet. Mäuse sind aufgrund ihrer grundlegenden anatomischen, physiologischen und immunologischen Gemeinsamkeiten mit dem Menschen zur Erforschung und Aufklärung von Schwangerschaftsmechanismen von enormer Bedeutung. Die Vielzahl transgener Mauslinien

ermöglicht die Untersuchung der Funktion nahezu jeder einzelnen Immunzellpopulation während der Schwangerschaft *in vivo*. Neben NK-defizienten Mausmodellen gibt es auch verschiedene Modelle für MC-Defizienz. Die älteren Kit-Mutationsstämme, zu denen auch das W-sh Modell¹⁴⁹ gehört, werden von neueren Modellen wie dem heterozygoten Cpa3^{Cre/+}, Cre-Master-Modell¹⁵⁶ oder dem Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Modell¹⁶⁰ zunehmend abgelöst. Murine uMCs akkumulieren bereits während der rezeptiven Phase des Zyklus im Uterus. Kommt es zur Schwangerschaft, steigt die Anzahl weiter an¹¹⁶. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die Rolle von MCs während der Schwangerschaft in der Literatur kontrovers diskutiert. Frühe Studien zeigen die Bedeutsamkeit von Histamin, ein von MC sekretierter Mediator, für die Implantation^{186,187}. Auch Veröffentlichungen aus den Jahren 2004 und 2007 konnten zeigen, dass die MC Degranulation einen positiven Einfluss auf die Angiogenese hat^{115,125}. Außerdem wurde eine erhöhte Uteruskontraktilität durch MC-Aktivierung gezeigt, die insbesondere eine Bedeutung für die Geburt hat^{188,189}. Demgegenüber stehen Studien die belegen, dass MC keine maßgebliche Rolle für die Implantation¹⁹⁰ sowie für die Einleitung der Geburt¹⁹¹ spielen. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe konnten eine entscheidende Beteiligung von MCs bei reproduktiven Prozessen belegen. So besaßen MC-defiziente W-sh Mäuse eine geringere Anzahl an Implantationen, eine reduzierte Plazentagröße und ebenso wie NK-defiziente Mäuse, suboptimal umgewandelte SA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise wiesen die Tiere verglichen mit der WT Gruppe eine erhöhte Anzahl von uNKs in der Dezidua auf¹¹⁶. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde eine mögliche Gegenregulation von uNKs und uMCs an der feto-maternalen Grenzfläche im IL-15-defizienten Mausmodell untersucht. Des Weiteren wurden erstmals die Auswirkungen der kombinierten Abwesenheit von uNKs und uMCs auf die Schwangerschaft und die Entwicklung der Nachkommen in einem eigens dafür etablierten Mausmodell analysiert und bewertet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblick in die Bedeutung von uNKs und uMCs für eine erfolgreiche Schwangerschaft und eine gesunde Entwicklung des Fetus zu erlangen und die Mechanismen aufzuklären, die für die Rolle von uNKs und uMCs bei reproduktiven Prozessen verantwortlich sind. Die genaue Kenntnis der Funktion von Immunzellen und deren zugrundeliegenden Mechanismen während einer gesunden Schwangerschaft, sind eine Voraussetzung für die gezielte Korrektur einer Fehlfunktion der Zellen, wie es bei einigen Schwangerschaftspathologien der Fall ist. Langfristig soll somit betroffenen Schwangeren geholfen und die Kosten für das Gesundheitssystem gesenkt werden.

4.2 Natürliche Killerzell-defiziente IL-15^{-/-} Mäuse zeigen Einschränkungen bei der Spiralarterienumwandlung sowie ein erhöhtes Plazentagewicht

Infolge der Notwendigkeit des IL-15 für das Überleben und die Differenzierung von NKs, sind NKs in IL-15-defizienten Mäusen nicht vorhanden. IL-15-defiziente Mäuse⁷⁶ sind demnach ein beliebtes Modell zur Analyse der Funktion von NKs *in vivo*. Ein abgestimmter und regulierter Austausch von Nährstoffen, Gasen und Abfallprodukten zwischen Fetus und Mutter ist die Grundlage einer optimalen fetalen Entwicklung. In diesem Zusammenhang stellt die SA Umwandlung einen sehr bedeutenden Prozess dar, da die Blutmenge die zur fetoplacentaren Einheit transportiert wird, sich nicht nur um ein Zehnfaches erhöht²⁶, sondern der Druck und die Geschwindigkeit, mit welcher das mütterliche Blut in den intravillösen Raum gelangt, zugleich herabgesetzt wird²¹. Da diese SA Umwandlung für eine uneingeschränkte Entwicklung des Fetus wichtig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Umwandlung der SA in trächtigen IL-15^{-/-} Weibchen analysiert. Dies geschah mittels lichtmikroskopischer Analyse HE-gefärbter Implantationsquerschnitte. Entnommen wurden die Implantationen hierfür am Gestationstag 10, da Umwandlungen in den dezidualen Arterien bis Mitte der Schwangerschaft abgeschlossen sind²⁵. Es konnte eine unzureichende SA Umwandlung in den IL-15^{-/-} Weibchen im Vergleich zum WT festgestellt werden, was in einem höheren Wand-zu-Lumen Verhältnis erkennbar war. Dieses resultierte aus kleineren Lumen und dickeren Wänden der Arterien im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Daten bestätigen eine Studie von Ashkar und Kollegen. Sie beschrieben unmodifizierte SA infolge der NK Abwesenheit, die durch eine dickere Blutgefäßwand und eine reduzierte Lumengröße gekennzeichnet sind, woraus ein erhöhtes Wand-zu-Lumen Verhältnis resultiert⁷⁷. Gleiches konnte auch von Barber und Pollert gezeigt werden⁷³. Grund für die Hemmung der Gefäßerweiterung kann der fehlende Abbau von glatten Muskelzellen in den Wänden der SA sein¹⁹. Hier konnte durch fluoreszenzgefärbte Implantationsquerschnitten dargestellt werden, dass mehr Aktin, welches von glatten Muskelzellen exprimiert und als Indikator für die Schichtdicke glatter Muskelzellen genutzt wird, in den Arterien IL-15^{-/-} Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe verblieb. Eine Studie von Kieckbusch und Kollegen konnte zeigen, dass eine MHC-abhängige Inhibierung von uNKs die Arterienumwandlung in der Dezidua hindert. Rag2^{-/-} Mäuse (T- und B-Zell defizient) wurden dabei mit B6 oder D8 Mäusen verpaart. Ein zusätzliches allogenes MHC I Gen mit hoher Affinität für einen inhibitorischen NK Rezeptor sorgte in der D8 Verpaarung für eine stärkere Inhibierung der uNKs im Vergleich zur syngenen B6 Verpaarung. Bei D8-verpaarten Rag2^{-/-} Weibchen verblieb auffallend mehr Aktin in den SA. Im Vergleich dazu zeigte die Aktin Färbung keine MHC abhängigen

Unterschiede in der Abwesenheit in B6 oder D8-verpaarten Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} Weibchen, die neben der T- und B-Zell-Defizienz ebenfalls NK-defizient sind¹⁹². Ausgehend von der beschriebenen Studie und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die Inaktivierung oder Abwesenheit von NKs zu einem verminderten Abbau von glatten Muskelzellen in den mütterlichen Arterien des Plazentabettes und somit zu Defekten in der SA Umwandlung führt. Die unzureichende Umwandlung von mütterlichen Arterien ist in Patienten mit der Entstehung der hypertensiven Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie oder der Entwicklung von zu kleinen Nachkommen assoziiert^{21,30,193}. Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass schlecht modifizierte SA einen Einfluss auf die Entstehung von schwangerschaftsbedingtem Bluthochdruck und IUGR ausüben können³⁸. Auf Grundlage dieser Studien wurde im Rahmen der Promotionsarbeit der Blutdruck der IL-15^{-/-} Weibchen vom Tag der Befruchtung bis zum 18. Gestationstag aller zwei Tage gemessen. Obwohl die systolischen Blutdruckwerte der IL-15-defizienten Tiere im Vergleich zu C57BL/6N Weibchen ab Gestationstag 4 signifikant höher waren, konnte zu keinem Trächtigkeitzeitpunkt Bluthochdruck (> 140 mmHg) festgestellt werden. Übereinstimmend damit konnten auch Croy und Kollegen beim Vergleich von trächtigen Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} (NK-, B-, T-Zell-defizient) mit BALB/c Mäusen keinen direkten Einfluss der SA Umwandlung auf die Regulation des Blutdruckes während der Schwangerschaft zeigen¹⁹⁴. Weiterhin wurde die Reproduktionseffizienz der Versuchsgruppen während der Promotionsarbeit analysiert. Beide Gruppen zeigten am 10. Gestationstag eine vergleichbare Anzahl an Implantationen und Aborten. Ähnliche Ergebnisse konnten Barber und Pollert in ihren Untersuchungen feststellen. Sie belegten, dass die Reproduktionseffizienz in IL-15^{-/-} Mäusen nicht eingeschränkt ist. Dabei dokumentierten sie neben einer normalen Gestationsdauer, eine vergleichbare Anzahl und ein vergleichbares Gewicht der Neugeborenen⁷³. Ebenso zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede im fetalen Gewicht, das genau wie das Plazentagewicht am Gestationstag 18 bestimmt wurde. Interessanterweise war das Plazentagewicht in den IL-15^{-/-} Tieren signifikant erhöht. Auch in verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen NKs und der Plazentaentwicklung dokumentiert werden^{173,195}. Grund für das erhöhte Plazentagewicht in NK-defizienten IL-15^{-/-} Tieren könnte der Versuch eines Ausgleiches des reduzierten Blutflusses in der fetoplazentaren Einheit aufgrund der eingeschränkten SA Modifikation sein. Auf Grundlage der Gewichte von Feten und Plazenten ergab sich ein signifikant reduzierter FPI in IL-15-defizienten Weibchen im Vergleich zur Kontrolle. Zusammenfassend belegen die Untersuchungen, dass uNKs für eine

effiziente SA Umwandlung wichtig sind, für die Geburt gesunder Nachkommen jedoch nicht unbedingt benötigt werden.

4.3 Natürliche Killerzell-defiziente IL-15^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl an uterinen Mastzellen auf

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe legten eine erhöhte Anzahl an uNKs in der Dezidua MC-defizienter W-sh Mäusen dar. Die Rekonstitution von W-sh Mäusen mit BMMCs führte zu einem Abfall der uNKs (pro Flächeneinheit) auf das Niveau der WT, was eine Gegenregulation von uNKs und uMCs an der feto-maternalen Grenzfläche vermuten lässt¹¹⁶. Ein Ziel der Arbeit bestand folglich darin, die Gegenregulation von uNKs und uMCs in einem NK-defizienten Mausmodell zu überprüfen. Hierfür wurde die Anzahl an uMCs in NK-defizienten IL-15^{-/-} Mäusen evaluiert. Am Gestationstag 5 wurden zu diesem Zweck Uterusproben bzw. am Gestationstag 10 Deziduaprobe entnommen und mittels Toluidinblau-gefärbter Uterusquerschnitte (Gestationstag 5) bzw. durchflusszytometrischer Analyse (Gestationstag 5 und 10) die Menge an uMCs bestimmt. Sowohl am Gestationstag 5 als auch am Gestationstag 10 zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an uMCs in den NK-defizienten IL-15^{-/-} Tieren. uMCs stellen eine inhomogene Population aus CTMCs, MMCs und Zellen, die Charakteristika beider Subpopulationen aufweisen, dar¹¹⁶. Insbesondere MC-assoziierte Proteasen, wie Trypsasen und Chymasen, sind an der Funktion von MCs beteiligt¹⁹⁶. Während Mcpt1 als Chymase vorrangig von MMCs gebildet wird, sezernieren CTMCs die Trypsase Mcpt6^{131,132}. Die Expression beider Proteasen wurde in der Arbeit mittels real-time PCR ermittelt. Am Gestationstag 5 zeigten die Versuchsgruppen keine Unterschiede in der Expression der Proteasen. Am 10. Gestationstag war die Expression von sowohl Mcpt1 als auch Mcpt6 in IL-15^{-/-} Weibchen signifikant höher als in WT. Die erhöhte Aktivität der MCs erst nach dem 5. Gestationstag kann folgenden Hintergrund haben. Normalerweise akkumulieren und proliferieren uNKs ab dem 4. Gestationstag sehr stark in der *decidua basalis* und im MLAp und beeinflussen wichtige Prozesse wie die SA Umwandlung und die Plazentation¹⁹⁷. Da das massive Auftreten von uNKs an der feto-maternalen Grenzfläche in IL-15^{-/-} Mäusen ausbleibt, stellt die signifikant erhöhte Anzahl und Aktivität von uMCs möglicherweise einen Kompensationsmechanismus dar, um die fehlenden uNKs auszugleichen. Diese Theorie wird durch das Vorhandensein eines ähnlichen Mediatorenspektrum von uNKs und uMC gestützt^{148,176,177}. In der Literatur gibt es ebenso andere Beispiele für eine gegenseitige Beeinflussung verschiedener Zellpopulationen an der

feto-maternalen Grenzfläche und eine damit verbundene positive Wirkung auf die Schwangerschaft. So konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Tregs in ein Abort-Mausmodell die Expansion von uMCs erhöht und somit die Angiogenese und andere wichtige Parameter der frühen Schwangerschaft wie die SA Umwandlung, die Plazentaentwicklung als auch die Level der löslichen fms-ähnlichen Tyrosinkinase 1 normalisiert¹⁹⁸. Eine andere Veröffentlichung zeigt, dass die Manipulation des normalen DC/NK-Verhältnisses durch eine gestörte deziduale Umwandlung zu Fehlgeburt führt. Dies belegt die Notwendigkeit eines ausbalancierten Verhältnisses von DCs und NKs während der frühen Schwangerschaft¹⁹⁹.

4.4 Reproduktionsmerkmale von weiblichen Mäusen, die weder Natürliche Killerzellen noch Mastzellen besitzen

Die Existenz eines möglichen Komensationsmechanismus von uNKs und uMCs zur Vollziehung wichtiger Prozesse an der feto-maternalen Grenzfläche sowie die Gemeinsamkeiten zwischen den Zellen, die in verschiedenen Mausmodellen aufgezeigt wurden, eröffneten die Frage, wie sich die gleichzeitige Abwesenheit von NKs und MCs auf die Schwangerschaft im Mausmodell auswirkt. Da zur Beantwortung dieser Fragestellung kein geeignetes Mausmodell vorhanden war, wurde im Rahmen der Promotionsarbeit ein solches Modell etabliert und untersucht. Genutzt wurden dafür Cpa3-Cre MC-defiziente Mäuse und ein NK-depletierender Antikörper. Das c-Kit-unabhängige Cpa3-Cre Mausmodell¹⁵⁵ zeichnet sich durch eine konstitutive CTMC- und MMC-Defizienz infolge eines gentoxischen Mechanismus aus. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem erstmals die Abwesenheit von uMCs in Cpa3^{Cre/+} im Vergleich zur Cpa3^{+/+} Kontrollgruppe anhand Toluidinblau-gefärbter Uterusquerschnitte experimentell gezeigt. Als NK-depletierender Antikörper wurde zunächst der polyklonale Antikörper anti-asialo GM1²⁰⁰ getestet, da er laut Literatur NKs in vielen Mausstämmen effektiv depletiert^{83,195,201,202}. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit ein reduzierter Anteil an pNKs in Milz, Blut, mesenterischen und inguinalen LK am Gestationstag 10 nachgewiesen werden. Ausgereifte murine uNKs exprimieren die Kohlenhydratstruktur Asialo ganglio-N-tetraosylceramide (asialo GM1), gegen welche anti-asialo GM1 gerichtet ist, auf ihrer Oberfläche²⁰³. Demnach wurde neben einer Depletion von pNKs, eine wirksame Depletion von uNKs *in vivo* erwartet. Entgegen der Erwartung zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Depletion von uNKs bei einer aller zwei Tage wiederholten i.p. Injektion des Antikörpers. Dies ist ein wichtiges Ergebnis für zukünftige reproduktionsbasierte Untersuchungen. Auch eine Studie aus dem

Jahr 2015 demonstrierte eine unerwartete Spezifität der Depletion verschiedener NK Subpopulationen durch anti-asialo GM1. So konnte gezeigt werden, dass ortsansässige NKs nicht von anti-asialo GM1 depletiert werden, da sie eine reduzierte anti-asialo GM1 Expression aufweisen²⁰⁴. Möglicherweise ist auch die Expression von asialo GM1 auf uNKs zu gering, um seine Wirksamkeit zu entfalten. Um zum gewünschten Ziel einer effektiven NK Depletion zu gelangen, wurde im Folgenden der monoklonale, NK-depletierende Antikörper anti-CD122 (TM-β1), der gegen IL-2Rβ gerichtet ist⁸¹, auf seine Fähigkeit pNKs und uNKs zu depletieren, untersucht. Obwohl eine effektive NK-Depletion durch die Injektion des Antikörpers anti-CD122 von dem Verlust von CD8⁺CD122⁺Tregs begleitet wird^{205,206}, kam der Antikörper zum Einsatz, denn die Ergebnisse bestätigten eine effektive Depletion von sowohl pNKs als auch uNKs nach einmaliger i.p. Injektion von anti-CD122 (0,25 mg) sowohl in C57BL/6 als auch in Cpa3^{+/+} und Cpa3^{Cre/+} Mäusen. Die Depletion von pNKs wurde mit durchflusszytometrischen Analysen in Milz, Blut, mesenterischen und inguinalen LK am Gestationstag 10 nachgewiesen. Ebenfalls am Gestationstag 10 erfolgte der Nachweis der Depletion von uNKs mittels DBA Lektin Färbung von Implantationsquerschnitten. Mit der Injektion von anti-CD122 in Cpa3^{Cre/+} Weibchen wurde das Ziel der Etablierung eines Mausmodelles, welches sich durch die gemeinsame Abwesenheit von uNKs und uMCs auszeichnet, erreicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die einmalige Injektion die pNKs effektiv mindestens bis zum Gestationstag 18 depletierte (Daten nicht gezeigt). Wie weit über den genannten Zeitraum hinaus die Depletion anhielt wurde nicht getestet, da dies für die vorliegenden Untersuchungen nicht relevant war. Die erfolgreiche Depletion von uNKs wurde am Gestationstag 10 überprüft. Es ist wichtig, dass uNKs nach Antikörpergabe bis zu diesem Zeitpunkt abwesend sind, da sie SA Umwandlung bis Mitte der Schwangerschaft abgeschlossen sein sollte.

4.4.1 Die gleichzeitige Abwesenheit von Natürlichen Killerzellen und Mastzellen führt zu einer dramatischen Verschlechterung der Umwandlung von Spiralarterien

Nach der erfolgreichen Etablierung des benötigten Mausmodelles wurden die Auswirkungen der kombinierten Abwesenheit von uNKs und uMCs auf die Schwangerschaft evaluiert. Gleichfalls konnte mit Hilfe der entsprechend verwendeten Kontrollgruppen die alleinige Abwesenheit von NKs bzw. MCs in diesem Modell evaluiert werden. Untersucht wurden die Implantations- und Abortrate, die SA Umwandlung, der Blutdruck im Verlauf der

Schwangerschaft sowie die Entwicklung der Nachkommen. Am Gestationstag 10 wiesen alle Versuchsgruppen eine vergleichbare Anzahl an Implantationen auf, so dass bestätigt werden konnte, dass keine dieser Zellen die Implantation beeinflusst. Auch die Abortrate war vergleichbar zwischen den Gruppen, abgesehen von der erhöhten Abortrate der anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$ Tiere. Die SA Analyse am Gestationstag 10 zeigte, dass sowohl NK-depletierte, anti-CD122-behandelte $Cpa3^{+/+}$ sowie MC-defiziente, PBS-behandelte $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen im Vergleich zu PBS-behandelten $Cpa3^{+/+}$ WT Weibchen suboptimal umgewandelte SA besaßen, was sich in einer höheren Wanddicke, einem höheren Wand-zu-Lumen Verhältnis und einer stärkeren Expression des Aktins glatter Muskelzellen zeigte. Die Daten der anti-CD122-behandelten $Cpa3^{+/+}$ Tiere bestätigen zum einen die zuvor in den $IL-15^{-/-}$ Tieren gewonnenen Daten und unterstreichen zum anderen die Relevanz von uNKs für die SA Umwandlung, da diese hiermit in einem weiteren Mausmodell gezeigt wurde. Die Daten der PBS-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Tiere unterstreichen die Bedeutsamkeit von uMCs für die SA Umwandlung, welche hiermit im $Cpa3$ -Modell nochmal bewiesen werden konnte. Die Auswirkungen einer kombinierten Abwesenheit wurden bisher erstmalig in der vorliegenden Arbeit untersucht. NK/MC-defiziente Mäuse wiesen deutlich die am schlechtesten umgewandelten SA auf. Sie zeigten nach Auswertung HE-gefärbter Implantationsquerschnitte die höchste Wanddicke sowie das höchste Wand-zu-Lumen Verhältnis im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Des Weiteren zeigte sich eine starke Aktinexpression glatter Muskelzellen. Alle drei Parameter verdeutlichen die suboptimale SA Umwandlung. Diese Daten zeigen erstmals, dass die Anwesenheit beider Zellpopulationen für die SA Umwandlung notwendig ist. Wie auch im $IL-15$ Mausmodell konnte hier trotz der extremen Einschränkungen der SA Umwandlung zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft in keiner der Gruppen Bluthochdruck (> 140 mmHg) festgestellt werden. Dies belegt erneut, dass die SA Umwandlung im Mausmodell nicht unbedingt mit Bluthochdruck assoziiert sein muss. In Patienten kann IUGR als Folge einer schlechten SA Umwandlung auch ohne erhöhten Blutdruck erfolgen, so dass es sich um zwei verschiedene Ätiologien handelt ²⁰⁷.

4.4.2 Die Abwesenheit von Mastzellen, jedoch nicht von Natürlichen Killerzellen führt zu einer suboptimalen fetalen Entwicklung; beim Fehlen beider Zelltypen kann eine dramatische Wachstumsretardierung und ein zu geringes Geburtsgewicht beobachtet werden

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob sich die Abwesenheit von NKs, MCs oder die kombinierte Abwesenheit beider Zelltypen auf die Entwicklung der Nachkommen auswirkt, wurden am Gestationstag 18 das fetale Gewicht, das Plazentagewicht und der FPI bestimmt. Außerdem wurde das Geburtsgewicht der Nachkommen aller Versuchsgruppen ermittelt. Die Feten NK-depletierter, anti-CD122-behandelter $Cpa3^{+/+}$ Weibchen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein vergleichbares Gewicht. Das Plazentagewicht war signifikant erhöht. Die Daten der NK-depletierten Gruppe bestätigen damit die im Rahmen der Arbeit gewonnenen Ergebnisse des NK-defizienten $IL-15^{-/-}$ Mausmodells, welches ebenfalls am Gestationstag 18 ein vergleichbares Gewicht und ein höheres Plazentagewicht aufwies. Im $IL-15^{-/-}$ Mausmodell war zudem der FPI signifikant verringert. Dies war im NK-depletierten Modell nicht der Fall, da das Plazentagewicht zwar signifikant erhöht, insgesamt jedoch geringer als das der $IL-15^{-/-}$ Tiere war. 4,8 % der Nachkommen wiesen am Gestationstag 18 ein Gewicht unter der 5. Perzentile auf. Das Geburtsgewicht der Nachkommen aller anti-CD122-behandelter $Cpa3^{+/+}$ Weibchen war jedoch vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe.

Die Feten MC-defizienter, PBS-behandelter $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein vergleichbares Plazentagewicht sowie einen normalen FPI. Das fetale Gewicht am Gestationstag 18 war jedoch signifikant niedriger als das der Kontroll- und der NK-depletierten Gruppe. Zudem lag das Gewicht von 3,8 % der Feten unter der 5. Perzentile und das Gewicht von 7,5 % zwischen der 5. und dem 10. Perzentile. Auch nach der Geburt zeigten die Nachkommen ein auffallend geringeres Gewicht. Insgesamt kamen 25,8 % zu klein auf die Welt (16,1 % unter der 5. Perzentile, 9,7 % zwischen der 5. und der 10. Perzentile). Noch dramatischer waren die Auswirkungen der kombinierten Abwesenheit von NKs und MCs in anti-CD122-behandelten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen. Am Gestationstag 18 zeigten sich ein viel geringeres Gewicht der Nachkommen im Vergleich zu allen anderen Gruppen, das trotz gleichem Plazentagewicht zu einem signifikant reduzierten FPI führte. Am Gestationstag 18 wiesen 19 % der Nachkommen ein Gewicht unter der 5. Perzentile und 11 % ein Gewicht zwischen der 5. und dem 10. Perzentile auf. Bei der Geburt waren 52,6 %, also mehr als die Hälfte, zu klein im Vergleich zur Kontrollgruppe (42,1 % unter der 5. Perzentile, 10,5 % zwischen der 5. und der 10. Perzentile). Um auszuschließen, dass das geringere Gewicht die Folge einer erhöhten Anzahl an geborenen Weibchen ist, die eventuell bereits bei

der Geburt leichter sind als Männchen, wurde bei einem Alter von etwa einem Monat das Geschlecht der Nachkommen bestimmt. Interessanterweise wurden in der Gruppe mit dem geringsten Geburtsgewicht nicht mehr, sondern sogar weniger Weibchen geboren als in der WT Gruppe. Dies unterstreicht die schlechte Entwicklung der Nachkommen in der NK/MC-defizienten Gruppe. Daraus kann man schlussfolgern, dass uNKs zwar für eine effiziente SA Umwandlung wichtig, für die Geburt gesunder Nachkommen jedoch nicht unbedingt notwendig sind. MCs hingegen werden nicht nur für eine effiziente SA Umwandlung benötigt, sondern auch für eine uneingeschränkte Entwicklung der Nachkommen. Eine Reihe von Untersuchungen belegen eine übermäßige Aktivierung von MCs bei der Induktion von Asthma²⁰⁸⁻²¹². Interessanterweise besitzen schwangere Frauen mit Asthma ein erhöhtes Risiko, Babies mit einem geringen Geburtsgewicht (< 2500 g) zur Welt zu bringen²¹³⁻²¹⁶. Eine andere Studie belegt daneben einen Zusammenhang zwischen mütterlichem Asthma und Wachstumseinschränkungen der Nachkommen sowie die Entwicklung von Präeklampsie und Frühgeburt²¹⁷. Ein geringes Geburtsgewicht (< 2500 g) führt seinerseits zu einem erhöhten Risiko, in jungen Jahren an Asthma zu erkranken^{214,218,219}. Die Symptome der Erkrankung Mastozytose unterliegen einer unnormalen Anhäufung von MCs in verschiedenen Geweben sowie der lokalen und systemischen Freisetzung von MC-Mediatoren²²⁰. Die Auswirkungen einer Schwangerschaft auf den Gesundheitszustand von Mastozytose Patientinnen ist unterschiedlich. In einer Studie aus dem Jahr 2011 zeigten 22 % der Frauen eine Verschlechterung, 33 % eine Verbesserung und der restliche Anteil keine Veränderungen der MC-bezogenen Symptome²²¹. Eine andere Veröffentlichung belegt, dass abgesehen von einem erhöhten Risiko von frühzeitig einsetzenden Uteruskontraktionen, die jedoch mit Antihistamin gut kontrollierbar sind, keine Komplikationen während der Schwangerschaft bestehen²²⁰. Kommt es zu einer Verschlechterung der Symptome, basiert dies meist auf dem Herabsenken der Medikamente während der Schwangerschaft. Der Nachwuchs wird im Normalfall gesund geboren²²², nur einige Fälle berichten von Komplikationen wie Frühreife oder einem zu geringen Geburtsgewicht²²¹. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass auch die Abwesenheit von MCs mit Wachstumsretardierung bis hin zu einem zu geringeren Geburtsgewicht assoziiert ist. Die kombinierte Abwesenheit von uNKs und MCs hatte drastische, negative Auswirkungen auf die SA Umwandlung und führte zu einem noch geringeren Gewicht des Nachwuchses, von dem mehr als die Hälfte von Wachstumseinschränkungen betroffen war. Dies bestätigt die Relevanz beider Zellpopulationen an der feto-maternalen Grenzfläche.

4.5 Die Mastzellprotease 5 fungiert als Mediator von uterinen Mastzellen und uterinen Natürlichen Killerzellen

Die kombinierte Abwesenheit von NKs und MCs war mit einer erheblichen Beeinträchtigung des fetalen und des Geburtsgewichtes der Nachkommen sowie mit einer suboptimalen SA Umwandlung assoziiert. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand folglich darin aufzuklären, wodurch die Zellen ihren positiven Effekt auf die SA Umwandlung bewirken. Neben dem Abbau von glatten Muskelzellen und der elastischen Schicht in der Arteriengefäßwand ist das Einwandern und Ersetzen von mütterlichen Zellen durch Trophoblasten für die Erweiterung des SA Lumens verantwortlich ¹⁹. Whitley und Cartwright fassten zusammen, dass diese Trophoblasteninvasion von einer Reihe von Faktoren beeinflusst werden kann. Dies umfasst neben Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und MMPs auch die lokal vorhandenen Zellen, die entweder durch direkte Interaktion oder lösliche Faktoren sowohl den invasiven Prozess als auch den Phänotyp von Trophoblasten beeinflussen können ²². Studien von Ashkar und Kollegen belegten beispielsweise einen Einfluss des von NKs sekretierten, pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ im Rahmen einer erfolgreichen SA Umwandlung ⁷⁴. Daraufhin wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit ein Zusammenhang zwischen der SA Umwandlung und löslichen Faktoren, die von MCs oder NKs exprimiert werden, untersucht. Trypsasen und Chymasen, beispielsweise Mcpt5, werden in den Granula von MCs exprimiert ¹³³. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von Mcpt5 (murine α -Chymase) bzw. Cma1 (humane α -Chymase) für die murine MC-Linie MC/9 sowie murine PCMCs, als auch für die humane MC-Linie HMC-1 durch Proteinanalyse belegt werden. Wie zu erwarten, war die Abwesenheit von MCs *in vivo* mit einer signifikant reduzierten Expression der MC Chymase Mcpt5 assoziiert. Erstaunlicherweise war die Mcpt5 Expression in NK-depletierten Cpa3^{+/+} Weibchen geringer, als die PBS-behandelten Cpa3^{+/+} Weibchen. Ebenso wiesen MC-defiziente Weibchen, deren NKs depletiert wurden, im Vergleich zu MC-defizienten Weibchen ohne NK-Depletion eine signifikant geringere Mcpt5 Expression auf, die mit suboptimal umgewandelten SA assoziiert war. Dies konnte mit mRNA- und Proteinanalysen am Gestationstag 10 gezeigt werden. Dieses Ergebnis war in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen zeigte es, dass NKs einen Einfluss auf die Mcpt5 Expression an der feto-maternalen Grenzfläche nehmen. Zum anderen ließ es einen Zusammenhang zwischen Mcpt5 Expression und SA Umwandlungseffizienz vermuten. Der Einfluss von uNKs auf die Mcpt5 Expression an der feto-maternalen Grenzfläche ist über zwei Wege möglich. Entweder exprimieren uNKs selbst Mcpt5 oder sie beeinflussen die Mcpt5

Expression in der Dezidua indirekt. Studien belegen, dass die Expression von Mcpts nicht immer MC spezifisch ist. So galt Mcpt8 1998 als MC-spezifisch ²²³. Im Jahr 2010 wurden Mcpt8^{DTR} Mäuse zur selektiven und induzierbaren Entfernung von Basophilen generiert ²²⁴. Des Weiteren konnte 2009 gezeigt werden, dass Mcpt11 hauptsächlich von Basophilen und nur in geringem Maße von MCs exprimiert wird ²²⁵. Bezug nehmend auf diese Daten ist auch die Expression von Mcpt5 durch andere Zellen nicht komplett ausgeschlossen. Chen und Kollegen konnten sowohl in DBA⁻ als auch in DBA⁺ uNKs Cma1 (hier Synonym für Mcpt5 verwendet) auf mRNA Basis nachweisen. Untersuchungen über die mRNA Basis hinaus folgten nicht, da zum damaligen Zeitpunkt kein Antikörper zur immunhistochemischen Detektion zur Verfügung stand ⁶⁸. Interessanterweise belegen die Ergebnisse der Promotionsarbeit die Expression von Mcpt5 durch uNKs mittels Doppelfluoreszenzfärbung in Implantationen von MC-defizienten Cpa3^{Cre/+} sowie PBS-behandelten WT Cpa3^{+/+} Mäusen am Gestationstag 10. Des Weiteren konnte die Expression von Mcpt5 durch uNKs mittels Doppelfluoreszenzfärbung in Implantationen am Gestationstag 10 von MC-defizienten W-sh Mäusen sowie C57BL/6J Kontrolltieren nachgewiesen werden (unpublizierte Daten). Dies bestätigt, dass uNKs Mcpt5 exprimieren.

4.6 Mastzellprotease 5-positive Zellen beeinflussen die Schwangerschaft und die fetale Entwicklung positiv

MCs und NKs sind während der murinen Schwangerschaft in erhöhter Menge an der fetomaternalen Grenzfläche lokalisiert ^{60,61,116}. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sind beide Zellpopulationen in der Lage, Chymase zu exprimieren. Die Chemotrypsin-ähnliche Protease beeinflusst viele biologische Prozesse. *In vivo* induziert sie die Anhäufung von Neutrophilen, Eosinophilen und anderen inflammatorischen Zellen ¹³⁷. Außerdem ist die Chymase in der Lage, die Gewebeumwandlung zu beeinflussen. Durch die Spaltung von Vorläufern werden verschiedene Mediatoren wie Angiotensin I ^{138,226}, Endothelin-1 ²²⁷ und Metalloproteasen ^{228,229} durch die Chymase aktiviert. Des Weiteren werden Proteine der extrazellulären Matrix degradiert ^{142,143,230}. Damit hat die Chymase auch einen Einfluss auf glatte Muskelzellen. Sie inhibiert beispielsweise die Proliferation von humanen glatten Muskelzellen in der Lunge ²³¹. Andere Studien dokumentieren die Induktion von Apoptose in glatten Muskelzellen der humanen Kranzarterie ¹⁴⁵ sowie die Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques in Mäusen ebenfalls durch Apoptoseinduktion ¹⁴⁶ durch die Aktivität von Chymase. Die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen, welche die SA des

Uterus auskleiden, ist ein wichtiger Prozess während der SA Umwandlung im Rahmen einer erfolgreichen Schwangerschaft ²². Welchen Prozessen und Mediatoren die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen unterliegt, ist nicht ausreichend geklärt. So stellte sich die Frage, ob die von uMCs oder uNKs exprimierte Chymase in der Lage ist, die Apoptose von glatten Muskelzellen des Uterus zu beeinflussen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden uterine glatte Muskelzellen mit Mcpt5-exprimierenden MC/9 Zellen kokultiviert. Die 48 stündige Kokultivierung erfolgte in einem Transwellsystem, um einen direkten Zellkontakt auszuschließen und lediglich den Effekt von löslichen Faktoren zu bewerten. Als Ergebnis zeigte sich, dass Mcpt5-exprimierende MC/9 Zellen den prozentualen Anteil an Annexin V-positiven und somit die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen signifikant erhöhen. Dies konnte durch die Zugabe des Chymaseinhibitors STBI ¹⁶⁷⁻¹⁷¹ verhindert werden. Anhand dieses Versuches konnte erstmalig eine Beteiligung von Mcpt5-exprimierenden Zellen an der Umwandlung der SA durch Erhöhung der Apoptose uteriner glatter Muskelzellen durch die Aktivität von Chymasen nachgewiesen werden. Dies stellt einen bisher unentdeckten, Trophoblasten-unabhängigen SA Umwandlungsmechanismus dar. Um eindeutig eine Rolle der Chymase Mcpt5 nachzuweisen, müsste ein spezieller Inhibitor für die Chymase eingesetzt werden, der nach derzeitigem Kenntnisstand nicht verfügbar ist. Eine weitere Möglichkeit für den direkten Nachweis wäre der Knockdown von Mcpt5 in Mcpt5-exprimierenden Zellen. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde eine siRNA Transfektion von MC/9 Zellen als auch PCMCs mittels Elektroporation mehrmals durchgeführt. Leider war die erreichte Knockdownrate (maximal 38 %) zu gering, um den entsprechenden Versuch durchzuführen. Dennoch lassen die Ergebnisse des Kokultivierungsversuches den Einfluss von Chymasen auf die SA Umwandlung durch Erhöhung der Apoptose uteriner glatter Muskelzellen stark vermuten. Außerdem spricht die suboptimale SA Umwandlung in Verbindung mit geringen Mcpt5-Expressionswerten in den NK-depletierten, MC-defizienten oder NK/MC-defizienten Tieren *in vivo* dafür. Demnach ist die geringere Mcpt5 Expression in NK-depletierten, anti-CD122-behandelten Cpa3^{+/+} Weibchen sowie MC-defizienten Cpa3^{Cre/+} Weibchen, vor allem aber die fehlende Mcpt5 Expression in NK/MC-defizienten anti-CD122-behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen, die Grundlage der schlechteren SA Umwandlung. Die Abwesenheit von NKs in anti-CD122-behandelten Cpa3^{+/+} Weibchen im Vergleich zur Abwesenheit von MCs in PBS-behandelten Cpa3^{Cre/+} Weibchen war mit einem geringeren Verlust der Mcpt5-Expression an der feto-maternalen Grenzfläche verbunden. Dies spricht für eine höhere Mcpt5 Expression von uMCs im Vergleich zu uNKs. Da verhältnismäßig eine sehr viel höhere Menge an uNKs als uMCs im Uterus lokalisiert ist, scheinen nicht alle uNKs, sondern nur ein gewisser Anteil,

Mcpt5 zu exprimieren. Grund für die suboptimale SA Umwandlung in Assoziation mit Einschränkungen des Geburtsgewichtes der Nachkommen in MC-defizienten Mäusen kann neben einer verringerten Mcpt5 Expression, auch der fehlende Einfluss weiterer Chymasen sein. Diese Theorie ist in unserem experimentellen Setting leider nicht zu überprüfen. Es existieren auch keine Mäuse, bei denen mehrere Chymasen ausgeschaltet wurden. W-sh Mäuse, die aufgrund einer c-Kit Mutation unter anderem keine MC besitzen, haben ebenfalls eine suboptimale SA Umwandlung¹¹⁶. Die fehlende Mcpt5-Sekretion in NK/MC-defizienten Tieren war mit dramatischen Auswirkungen auf die SA Umwandlung sowie einer höheren Anzahl an wachstumsretartierten Nachkommen assoziiert. Das beschriebene Szenario, bestehend aus den in der Arbeit gewonnenen Ergebnissen, ist in Abbildung 43 dargestellt.

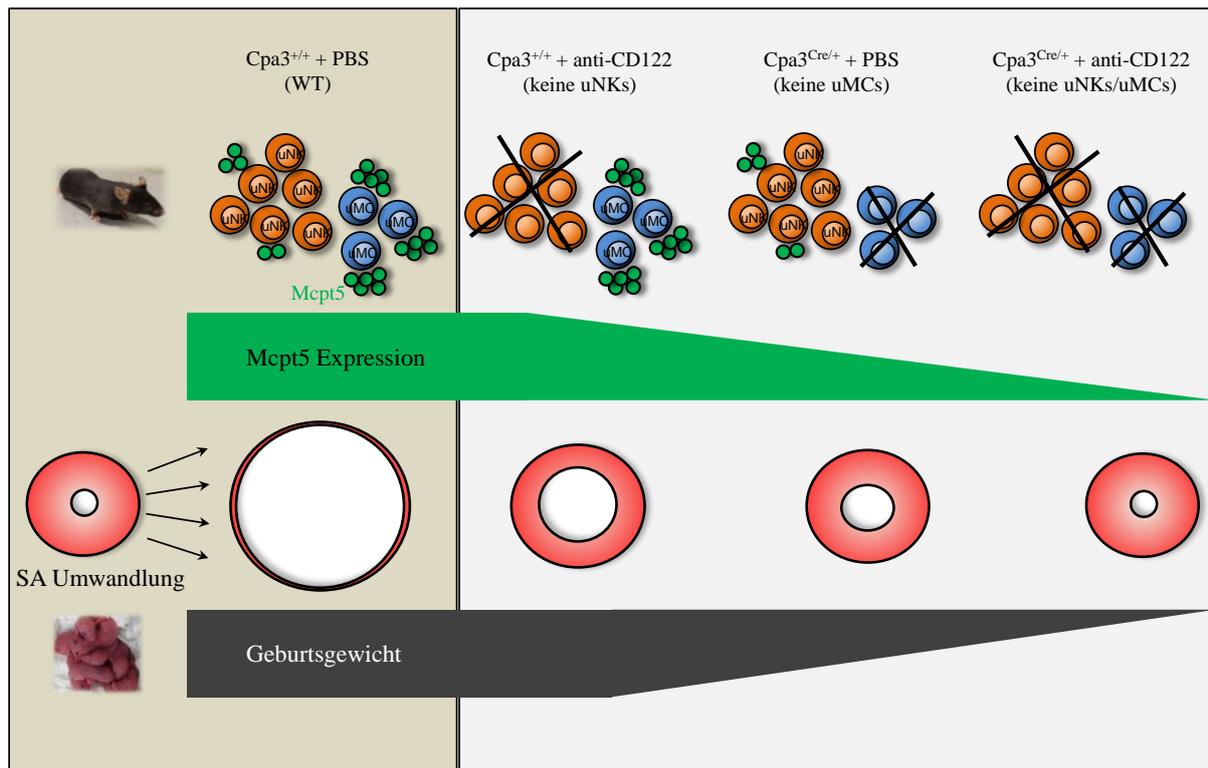


Abbildung 43: Schematische Darstellung der in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses Mastzellprotease (Mcp5) 5-exprimierender Zellen auf die Spiralarterien (SA) Umwandlung und die Entwicklung der Nachkommen. Der linke Teil der Abbildung stellt die Situation in PBS-behandelten $Cpa3^{+/+}$ WT Weibchen dar. Sowohl uMCs als auch uNKs exprimieren Mcp5. Die vor der Schwangerschaft dickwandigen, kleinlumigen SA wandeln sich in venenartige, großlumige Gefäße mit sehr dünnen Wänden, um eine optimale Versorgung der Feten zu gewährleisten. Das Gewicht der Nachkommen ist der Norm entsprechend. Behandelt man $Cpa3^{+/+}$ Weibchen mit anti-CD122, kommt es zum Verlust von NKs *in vivo*. Dies ist mit einer reduzierten Mcp5-Expression an der feto-maternalen Grenzfläche und schlechter umgewandelten SA assoziiert. PBS-behandelte $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen exprimieren aufgrund ihrer MC-Defizienz noch geringere Mengen an Mcp5 als die NK-depletierten Tiere. Dies ist mit einer suboptimalen SA Umwandlung sowie einem signifikant geringerem Geburtsgewicht der Nachkommen assoziiert. Depletiert man durch die Injektion von anti-CD122 NKs in MC-defizienten $Cpa3^{Cre/+}$ Weibchen, kommt es neben einem nahezu vollständigem Verlust der Mcp5-Expression zu einer fast ausbleibenden SA Umwandlung und einer extrem eingeschränkten Gewichtsentwicklung der Nachkommen.

Durch neueste Studien konnte eine Inhibierung der MC Chymase durch Östrogen nachgewiesen werden^{232,233}. Interessanterweise steigt die Östrogenkonzentration ab Mitte der Schwangerschaft, der Zeitpunkt an dem die SA Umwandlung weitgehend abgeschlossen ist, stark an²³⁴. Möglicherweise führt der Anstieg der Östrogenkonzentration Mitte der Schwangerschaft zur Inhibierung der Aktivität der Chymase, die ihre Aufgabe mit der SA Umwandlung erfüllt hat und nicht mehr benötigt wird. Während eine physiologische

Östrogenkonzentration während der Schwangerschaft notwendig ist, steht eine zu hohe Östrogenexposition, beispielweise verursacht durch Umweltöstrogene (Substanzen mit Östrogen-ähnlicher Aktivität), in Verdacht, für Reproduktionsstörungen in Tieren^{235–237} als auch im Menschen^{238–240} verantwortlich zu sein. Möglicherweise führen zu hohe Östrogenkonzentration während der frühen Schwangerschaft zu einer vorzeitigen Inhibierung der Chymaseaktivität, welche somit nicht dazu in der Lage ist, eine optimale SA Umwandlung zu bewirken. Eine unzureichende SA Umwandlung kann wiederum Ursache für unterschiedliche Schwangerschaftspathologien sein.

Aufbauend auf den bisher dargelegten Erkenntnissen folgten weitere Untersuchungen, um den positiven Einfluss von Mcpt5 auf die Schwangerschaft zu bestätigen. Hierfür bediente man sich des Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Mausmodelles¹⁶⁰, welches sich durch die konstitutive Abwesenheit Mcpt5-exprimierender Zellen auszeichnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Modell nach derzeitigem Kenntnisstand erstmalig in Hinsicht auf die Schwangerschaft untersucht. Während die Implantations- sowie die Abortrate durch das Fehlen von Mcpt5-positiven Zellen nicht beeinflusst wurde, wiesen Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ im Vergleich zu Mcpt5-Cre⁻ R-DTA⁺ Kontrolltieren am Gestationstag 10 suboptimal umgewandelte SA auf. Dies wurde anhand einer signifikant höheren Wanddicke sowie einem signifikant höherem SA Wand/ Lumen Verhältnis festgestellt. Die Daten zeigen eindeutig den positiven Einfluss Mcpt5-exprimierender Zellen auf die SA Umwandlung *in vivo*. Dies könnte eine direkte Folge von der fehlenden Apoptose uteriner glatter Muskelzellen sein, wie bereits diskutiert wurde. Mittels real-time PCR konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Mcpt5-exprimierenden Zellen in Deziduaprobe von Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Mäusen mit einer signifikant geringeren Expression von MMP9 am Gestationstag 10 im Vergleich zur WT Gruppe assoziiert ist. Die Gelatinase MMP9 gehört zu der Gruppe proteolytischer Enzyme, die als MMPs bezeichnet werden und nimmt einen wesentlichen Einfluss auf die Degradation von Basalmembranen¹⁸¹. Insbesondere während der Schwangerschaft sind MMPs für den Gewebeumbau wichtig, wobei Membranbestandteile wie Typ IV Collagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykane betroffen sind⁸. So konnte gezeigt werden, dass MMPs in Hündinnen in die uterine Umwandlung während der Schwangerschaft involviert sind²⁴¹. Die Aktivität von MMPs ist abhängig von der Aktivierung ihrer Vorläuferformen²⁴². Interessanterweise konnte in verschiedenen Modellen die Beteiligung von Chymasen an der Funktion von MMP9 durch Aktivierung des Vorläuferproteins belegt werden^{139,183,229,243}. Als Folge der fehlenden Aktivierung von MMP9 konnte beispielsweise in der Studie von Tchougounova und Kollegen ein erhöhter Verbleib von Collagen und Fibronectin in

verschiedenen Geweben beobachtet werden, was in einer gestörten Homeostase der untersuchten Gewebe resultierte¹⁸³. Auch in unserem Modell deuten geringere Werte an MMP9 in Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen auf eine suboptimale SA Umwandlung hin. Ob dies nur ein zufälliger Zusammenhang ist oder ursächlich für die suboptimale SA Umwandlung ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Um zu analysieren, ob sich die SA Umwandlung in Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen auf die Entwicklung der Nachkommen auswirkt, wurde das Geburtsgewicht ermittelt. Es zeigte sich, dass der Verlust Mcpt5-exprimierender Zellen in den Muttertieren mit einem signifikant geringerem Geburtsgewicht der Nachkommen assoziiert war. 13,2 % der Nachkommen lagen zwischen dem 5. und der 10. Perzentile und 26,3 % sogar unter der 5. Perzentile im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Status der SA Umwandlung sowie das Geburtsgewicht von Nachkommen Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ Weibchen war vergleichbar mit den Werten NK/MC-defizienter Tiere. Der prozentuale Anteil an Nachkommen der von Wachstumsretardierung bzw. Wachstumseinschränkung betroffen war, war im Vergleich zu NK/MC-defizienten Weibchen etwas geringer. Ursache könnte die unterschiedliche Anzahl an Nachkommen sein, die in die Auswertung eingegangen sind. Die Tatsache, dass andere Chymasen einen ähnlichen Effekt wie Mcpt5 ausüben können, wurde diskutiert und kann ebenfalls der Grund dafür sein, dass die Nachkommen der doppeldepletierten (ohne NK/MC) Tiere eine höhere IUGR-Rate aufweisen. Insgesamt belegen die Daten eindrucksvoll die Rolle von Mcpt5-exprimierenden Zellen an der SA Umwandlung und dem Wachstum der Nachkommen.

4.7 Neue Erkenntnisse der Rolle uteriner Natürlicher Killerzellen und uteriner Mastzellen im Rahmen einer erfolgreichen Schwangerschaft

In der vorliegenden Arbeit konnte durch das Aufzeigen eines Anstieges von uMCs und MC Mediatoren in NK-defizienten IL-15^{-/-} Mäusen eine Gegenregulation von uNKs und uMCs als möglicher Kompensationsmechanismus an der feto-maternalen Grenzfläche dokumentiert werden. Ferner ist es gelungen Mäuse zu generieren, die uNKs- und uMCs-defizient sind. Dieses Ziel wurde mit Hilfe der MC-defizienten Cpa3^{Cre/+} Mauslinie und der einmaligen i.p. Injektion des NK-depletierenden Antikörpers anti-CD122 erreicht, der im Gegensatz zu anti-asialo GM1 in der Lage war, neben pNKs auch uNKs effektiv zu entfernen. Die Ergebnisse der Arbeit belegen eine suboptimale SA Umwandlung in NK- oder MC-defizienten Mäusen. Erstmals wurden die Auswirkungen der Abwesenheit beider Zelltypen untersucht. Die gleichzeitige Abwesenheit beider Zellpopulationen hatte drastische Effekte auf die SA

Umwandlung, diese wiederum hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck der Weibchen. Interessanterweise bewirkte das Fehlen von MC Wachstumseinschränkungen, die bis hin zu Wachstumsretardierung in den Nachkommen der betroffenen Tiere reichten. Eine zusätzliche Depletion von NKs in MC-defizienten Weibchen verschlimmerte den beobachteten Phänotyp enorm und führte dazu, dass mehr als die Hälfte der Nachkommen im Uterus suboptimal versorgt wurden. Als weiteres Ergebnis der Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der SA Umwandlung und der Expression der α -Chymase Mcpt5 an der feto-maternalen Grenzfläche beobachtet werden. Als wichtiges Ergebnis für zukünftige Studien aller Art zeigte sich, dass die Chymase Mcpt5 nicht wie bisher angenommen nur von MC, sondern auch von uNKs exprimiert wird. Diese Erkenntnis ist insofern wichtig, da neue Mausmodelle für MC-defizienz auf Mcpt5 basieren. Mcpt5 konnte in einem *in vitro* Versuch als Mediator der Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen erkannt werden, ein wichtiger Prozess im Rahmen einer effizienten Umwandlung von SA. Die Bedeutsamkeit von Mcpt5⁺-exprimierenden Zellen für die SA Umwandlung und die fetale Entwicklung konnte außerdem in mehreren *in vivo* Versuchen bestätigt werden. Zusammenfassend belegen die während Promotionsarbeit gewonnenen Daten die Bedeutsamkeit von Chymase-exprimierenden uNKs und uMCs im Rahmen einer erfolgreichen Schwangerschaft und einer gesunden Entwicklung des Fetus durch die Unterstützung der SA Umwandlung und den positiven Einfluss auf das fetale Wachstum.

Durch den Nachweis der Expression der α -Chymase Cma1 in der human MC-Linie HMC-1 ist auch im humanen System ein Einfluss von Chymase-exprimierenden Zellen auf die SA Umwandlung sehr wahrscheinlich. Kooperationsversuche mit Kollegen von der Medizinischen Universität Wien zeigten, dass sowohl der Überstand von Cma1-exprimierenden HMC1 Zellen, als auch die rekombinante humane Chymase Cma1 die Migration von extravillösen Trophoblasten in Plazentaexplants signifikant erhöht. Dies ist ein wichtiger Mechanismus im Rahmen einer effizienten SA Umwandlung. Die humane Chymase Cma1 spielt durch die Erhöhung des Migrationspotentials von extravillösen Trophoblasten höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle während der humanen Schwangerschaft.

5 Zusammenfassung

Mütterliche Immunzellen sind an vielen physiologischen Prozessen im Rahmen der Schwangerschaft beteiligt, die Mechanismen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Während viele Studien einen positiven Einfluss von uterinen Natürlichen Killerzellen (uNKs) belegen, gibt es hinsichtlich der Rolle von uterinen Mastzellen (uMCs) gegensätzliche Beobachtungen. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Fokussierung auf uNKs und uMCs. Während der Promotionsarbeit wurde eine mögliche Gegenregulation von uNKs und uMCs in NK-defizienten IL-15^{-/-} Mäusen untersucht. Neben verschiedenen reproduktiven Einschränkungen konnte sowohl eine signifikant erhöhte Anzahl an uMCs, als auch eine signifikant erhöhte Expression der MC Proteasen (Mcpt) 1 und Mcpt6 in den NK-defizienten Mäusen festgestellt werden, was einen möglichen Kompensationsmechanismus der fehlenden uNKs darstellt. Nachfolgend wurden hier erstmals die Auswirkungen einer kombinierten Abwesenheit von uNKs und uMCs in einem eigens dafür etablierten Mausmodell *in vivo* untersucht. Hierfür wurden MC-defiziente Cpa3-Cre Mäuse mit einem NK-depletierenden anti-CD122 Antikörper behandelt. Die Abwesenheit von NKs oder MCs sowie die kombinierte Abwesenheit beider Zelltypen hatte keinen Einfluss auf die Implantationsrate und den mütterlichen Blutdruck. Das Fehlen beider Zelltypen führte jedoch zu einem sehr auffallenden Phänotyp; Mäuse ohne NKs und MCs hatten eine mangelnde Umwandlung der Spiralarterien (SA). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die alleinige Abwesenheit von MCs, jedoch nicht von NKs, zu Wachstumsretardierung sowie einem signifikant reduzierten Geburtsgewicht der Nachkommen führte. Dieser Phänotyp verstärkte sich auffallend in kombiniert NK/MC-defizienten Mäusen. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass neben uMCs auch uNKs die Chymase Mcpt5 exprimieren. Funktionelle Analysen ergaben weiterhin, dass Mcpt5-exprimierende Zellen die Apoptose von uterinen glatten Muskelzellen induzieren, ein wichtiger Prozess im Rahmen einer physiologischen SA Umwandlung. *In vivo* bewirkte die Abwesenheit Mcpt5-exprimierender Zellen eine mangelhafte SA Umwandlung. Dies hatte ein dramatisch geringeres Geburtsgewicht der Nachkommen zur Folge. Die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass uNKs und uMCs die SA Umwandlung und die Entwicklung der Nachkommen, durch die Sezernierung von Mcpt5 positiv beeinflussen. Diese Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse für das Verständnis der Mechanismen, die zu einer optimalen Entwicklung des Fetus führen. Somit sind die hier beschriebenen Daten nicht nur für zukünftige Forschungsansätze wertvoll, sondern leisten auch einen Beitrag zur Konzeption neuer Therapien zur Behandlung von Schwangerschaftspathologien.

6 Summary

Maternal immune cells are involved in many physiological processes during pregnancy; however the exact mechanisms underlying this are not fully understood. While many studies assigned a positive role for uterine natural killer cells (uNKs) in pregnancy, there are still controversial observations for uterine mast cell (uMCs). Therefore this study focused on uNKs and uMCs and in particular on their complementation for pregnancy success. First, a possible counter-regulation between uNKs and uMCs was analyzed in NK-deficient IL-15^{-/-} mice. Spite reproductive constrictions, a significant increased number of uMCs and a significant higher expression of MC proteases (Mcpt) 1 and Mcpt6 in NK-deficient mice could be found; this may represent a possible compensatory mechanism for the missing uNKs. I next established an *in vivo* mouse model to study the consequences of the combined absence of NKs and MCs for pregnancy outcome. For this, MC-deficient Cpa3-Cre mice were depleted of NKs by anti-CD122 antibody treatment. Neither the absence of a single cell type nor their combined absence affected implantation rate or maternal blood pressure. However, in the absence of both cell types an impaired spiral artery (SA) remodeling could be registered. However, absence of MCs but not of NK derived in pregnancies with fetuses affected by intrauterine growth restriction and pups with significantly reduced birth weight. This phenotype became worse if MC deficient mice were additionally depleted of NK. A further interesting observation was the fact that Mcpt5 is not only expressed by MCs but also by uNKs. Functional *in vitro* analysis revealed further that Mcpt5-expressing cells induce apoptosis of uterine smooth muscle cells, an important process during physiological SA remodeling. The exclusive absence of Mcpt5-expressing cells *in vivo* in Mcpt5-Cre⁺ R-DTA⁺ mice caused impaired SA remodeling as well as significantly lower birth weights of pups that were comparable to the observations done in NK/MC-double deficient mice.

The results obtained in this work indicate that uNKs and uMCs positively influence SA remodeling and fetal growth and development through Mcpt5. These findings provide new insights in understanding the mechanisms underlying placental and fetal development. The described data are valuable for prospective research approaches and contribute to the design of new therapies for the treatments of pregnancy pathologies.

7 Literaturverzeichnis

1. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
2. Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* **291**, 1304–1351 (2001).
3. Waterston, R. H. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).
4. Haley, P. J. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* **188**, 49–71 (2003).
5. EVERETT, J. W. Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* **43**, 389–405 (1948).
6. Pawar, S., Hantak, A. M., Bagchi, I. C. & Bagchi, M. K. Minireview: Steroid-regulated paracrine mechanisms controlling implantation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **28**, 1408–1422 (2014).
7. Wang, H. & Dey, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature reviews. Genetics* **7**, 185–199 (2006).
8. Dey, S. K. *et al.* Molecular cues to implantation. *Endocrine reviews* **25**, 341–373 (2004).
9. Paria, B. C., Huet-Hudson, Y. M. & Dey, S. K. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10159–10162 (1993).
10. Enders, A. C. & Schlafke, S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *The American journal of anatomy* **125**, 1–29 (1969).
11. Cha, J., Sun, X. & Dey, S. K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine* **18**, 1754–1767 (2012).
12. Rossant, J. & Cross, J. C. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nature reviews. Genetics* **2**, 538–548 (2001).
13. Watson, E. D. & Cross, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda, Md.)* **20**, 180–193 (2005).
14. Rohen, J. W. & Lütjen-Drecoll, E. *Funktionelle Histologie. Kurzgefaßtes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten*. 4th ed. (Schattauer, Stuttgart, 2000).
15. Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature reviews. Immunology* **6**, 584–594 (2006).
16. Behringer, R. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 4th ed. (CSH Cold Spring Harbor Laboratory Pr, Cold Spring Harbor, NY, 2014).
17. Drews, U. *Taschenatlas der Embryologie*. 2nd ed. (THIEME, Stuttgart, 2006).
18. Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C. & Burton, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* **23**, 3–19 (2002).
19. Brosens, I., Robertson, W. B. & Dixon, H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *The Journal of pathology and bacteriology* **93**, 569–579 (1967).

20. Kurjak, A. & Schmidt, W. *Farbdopplersonographie in Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1st ed. (THIEME, s.l., 2001).
21. Pijnenborg, R., Vercruyse, L. & Hanssens, M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* **27**, 939–958 (2006).
22. Whitley, G. S. J. & Cartwright, J. E. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* **31**, 465–474 (2010).
23. Burke, S. D. *et al.* Uterine NK cells, spiral artery modification and the regulation of blood pressure during mouse pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* **63**, 472–481 (2010).
24. Kaufmann, P., Black, S. & Huppertz, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of reproduction* **69**, 1–7 (2003).
25. Whitley, G. S. J. & Cartwright, J. E. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *Journal of anatomy* **215**, 21–26 (2009).
26. Moll, W., Künzel, W. & Herberger, J. Hemodynamic implications of hemochorial placentation. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **5**, 67–74 (1975).
27. Davey, D., Macgillivray, I., Roberts, J. & Lilford, R. CLASSIFICATION OF HYPERTENSIVE DISORDERS OF PREGNANCY. *The Lancet* **334**, 112–113 (1989).
28. Dokras, A. *et al.* Severe fetoplacental abnormalities precede the onset of hypertension and proteinuria in a mouse model of preeclampsia. *Biology of reproduction* **75**, 899–907 (2006).
29. Funai, E. F. *et al.* Long-term mortality after preeclampsia. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* **16**, 206–215 (2005).
30. Brosens, I. A., Robertson, W. B. & Dixon, H. G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstetrics and gynecology annual* **1**, 177–191 (1972).
31. Laresgoiti-Servitje, E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *Journal of leukocyte biology* **94**, 247–257 (2013).
32. Chiswick, M. L. Intrauterine growth retardation. *British medical journal (Clinical research ed.)* **291**, 845–848 (1985).
33. Goldenberg, R. L. *et al.* Intrauterine growth retardation: standards for diagnosis. *American journal of obstetrics and gynecology* **161**, 271–277 (1989).
34. Resnik, R. Intrauterine growth restriction. *Obstetrics and gynecology* **99**, 490–496 (2002).
35. Clark, R. H., Thomas, P. & Peabody, J. Extrauterine growth restriction remains a serious problem in prematurely born neonates. *Pediatrics* **111**, 986–990 (2003).
36. Faraci, M. *et al.* Fetal growth restriction: current perspectives. *Journal of prenatal medicine* **5**, 31–33 (2011).
37. Srinivas, S. K. *et al.* Rethinking IUGR in preeclampsia: dependent or independent of maternal hypertension? *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association* **29**, 680–684 (2009).
38. Linzke, N., Schumacher, A., Woidacki, K., Croy, B. A. & Zenclussen, A. C. 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 (2014).
39. Lyall, F., Barber, A., Myatt, L., Bulmer, J. N. & Robson, S. C. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**, 208–219 (2000).
 40. Ahmed, A. *et al.* Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNF α -induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **6**, 391–409 (2000).
 41. Clausson, B., Gardosi, J., Francis, A. & Cnattingius, S. Perinatal outcome in SGA births defined by customised versus population-based birthweight standards. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* **108**, 830–834 (2001).
 42. Godfrey, K. M. & Barker, D. J. Fetal nutrition and adult disease. *The American journal of clinical nutrition* **71**, 1344S–1352 (2000).
 43. Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C. & Thornburg, K. L. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine* **359**, 61–73 (2008).
 44. Thellin, O. & Heinen, E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology* **185**, 179–184 (2003).
 45. Moreau, P. *et al.* Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* **40**, 136–144 (1998).
 46. Moffett, A. & Colucci, F. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunological reviews* **267**, 283–297 (2015).
 47. Coumans, B. *et al.* Lymphoid cell apoptosis induced by trophoblastic cells: a model of active foeto-placental tolerance. *Journal of immunological methods* **224**, 185–196 (1999).
 48. Munn, D. H. *et al.* Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, N.Y.)* **281**, 1191–1193 (1998).
 49. Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L. & Mosmann, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today* **14**, 353–356 (1993).
 50. Zenclussen, A. C. & Hämmerling, G. J. Cellular Regulation of the Uterine Microenvironment That Enables Embryo Implantation. *Frontiers in immunology* **6**, 321 (2015).
 51. Arnon, T. I., Markel, G. & Mandelboim, O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Seminars in cancer biology* **16**, 348–358 (2006).
 52. Strowig, T., Brilot, F. & Münz, C. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 7785–7791 (2008).
 53. Grégoire, C. *et al.* The trafficking of natural killer cells. *Immunological reviews* **220**, 169–182 (2007).

54. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* **17**, 189–220 (1999).
55. Sutton, V. R. *et al.* Serglycin determines secretory granule repertoire and regulates NK cell and CTL cytotoxicity. *The FEBS journal* **283**, 947–61 (2016).
56. Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K. & Kershaw, M. H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology* **89**, 216–224 (2011).
57. Lanier, L. L. NK cell receptors. *Annual review of immunology* **16**, 359–393 (1998).
58. Kärre, K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scandinavian journal of immunology* **55**, 221–228 (2002).
59. Biron, C. A. & Brossay, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Current opinion in immunology* **13**, 458–464 (2001).
60. Peel, S. Granulated metrial gland cells. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* **115**, 1–112 (1989).
61. Croy, B. A. & Kiso, Y. Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microscopy research and technique* **25**, 189–200 (1993).
62. Bulmer, J. N., Morrison, L., Longfellow, M., Ritson, A. & Pace, D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human reproduction (Oxford, England)* **6**, 791–798 (1991).
63. Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nature reviews. Immunology* **2**, 656–663 (2002).
64. Saito, S. *et al.* Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *International immunology* **5**, 559–563 (1993).
65. Kather, A. *et al.* Neither lymphotoxin alpha nor lymphotoxin beta receptor expression is required for biogenesis of lymphoid aggregates or differentiation of natural killer cells in the pregnant mouse uterus. *Immunology* **108**, 338–345 (2003).
66. Croy, B. A. *et al.* Imaging of vascular development in early mouse decidua and its association with leukocytes and trophoblasts. *Biology of reproduction* **87**, 125 (2012).
67. Paffaro, V. A., Bizinotto, M. C., Joazeiro, P. P. & Yamada, A. T. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* **24**, 479–488 (2003).
68. Chen, Z. *et al.* DBA-lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cell subsets with biased gene expression. *Biology of reproduction* **87**, 81 (2012).
69. Hanna, J. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* **12**, 1065–1074 (2006).
70. Lash, G. E. *et al.* Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of leukocyte biology* **80**, 572–580 (2006).
71. Tayade, C. *et al.* Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 4267–4275 (2007).
72. Kalkunte, S. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 4085–4092 (2009).

73. Barber, E. M. & Pollard, J. W. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 37–46 (2003).
74. Ashkar, A. A., Di Santo, J. P. & Croy, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *The Journal of experimental medicine* **192**, 259–270 (2000).
75. Carson, W. E. *et al.* A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *The Journal of clinical investigation* **99**, 937–943 (1997).
76. Kennedy, M. K. *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **191**, 771–780 (2000).
77. Ashkar, A. A. *et al.* Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 2937–2944 (2003).
78. Anderson, D. M. *et al.* Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 29862–29869 (1995).
79. Voss, S. D., Sondel, P. M. & Robb, R. J. Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R. *The Journal of experimental medicine* **176**, 531–541 (1992).
80. Perera, P.-Y., Lichy, J. H., Waldmann, T. A. & Perera, L. P. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **14**, 247–261 (2012).
81. Tanaka, T. *et al.* Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice. *The Journal of experimental medicine* **178**, 1103–1107 (1993).
82. Young, W. W., Hakomori, S. I., Durdik, J. M. & Henney, C. S. Identification of ganglio-N-tetraosylceramide as a new cell surface marker for murine natural killer (NK) cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **124**, 199–201 (1980).
83. Kasai, M. *et al.* In vivo effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* **291**, 334–335 (1981).
84. Habu, S. *et al.* In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **127**, 34–38 (1981).
85. Kitamura, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annual review of immunology* **7**, 59–76 (1989).
86. Gilfillan, A. M., Austin, S. J. & Metcalfe, D. D. Mast cell biology: introduction and overview. *Advances in experimental medicine and biology* **716**, 2–12 (2011).
87. Gibbons, A. F. & Chang, M. C. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. *Biology of reproduction* **6**, 193–203 (1972).
88. Metcalfe, D. D., Baram, D. & Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiological reviews* **77**, 1033–1079 (1997).

89. Galli, S. J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* **6**, 135–142 (2005).
90. Roskoski, R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **337**, 1–13 (2005).
91. Okayama, Y. & Kawakami, T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunologic research* **34**, 97–115 (2006).
92. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. & Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **23**, 16–43 (2005).
93. Asai, K. *et al.* Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* **14**, 791–800 (2001).
94. Kalesnikoff, J. *et al.* Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* **14**, 801–811 (2001).
95. Gounni, A. S. *et al.* High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* **367**, 183–186 (1994).
96. King, C. L. *et al.* Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **158**, 294–300 (1997).
97. Gurish, M. F. *et al.* IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 1139–1145 (2004).
98. Strait, R. T., Morris, S. C., Yang, M., Qu, X.-W. & Finkelman, F. D. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *The Journal of allergy and clinical immunology* **109**, 658–668 (2002).
99. Gould, H. J. & Sutton, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews. Immunology* **8**, 205–217 (2008).
100. Kinet, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annual review of immunology* **17**, 931–972 (1999).
101. Caron, G. *et al.* Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 6000–6006 (2001).
102. McLachlan, J. B. *et al.* Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nature immunology* **4**, 1199–1205 (2003).
103. Lu, L.-F. *et al.* Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* **442**, 997–1002 (2006).
104. Galli, S. J., Grimbaldston, M. & Tsai, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology* **8**, 478–486 (2008).
105. Hiromatsu, Y. & Toda, S. Mast cells and angiogenesis. *Microscopy research and technique* **60**, 64–69 (2003).
106. Rudolph, M. I., Rojas, I. G. & Penissi, A. B. Uterine mast cells: a new hypothesis to understand how we are born. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopía Electronica* **28**, 1–11 (2004).
107. Rao, K. N. & Brown, M. A. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**, 83–104 (2008).

108. Pang, X., Letourneau, R., Rozniecki, J. J., Wang, L. & Theoharides, T. C. Definitive characterization of rat hypothalamic mast cells. *Neuroscience* **73**, 889–902 (1996).
109. Sonoda, S. *et al.* Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/W^v mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **137**, 1319–1322 (1986).
110. Irani, A. M. *et al.* Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **138**, 4381–4386 (1987).
111. SHELESNYAK, M. C. ANTIHISTAMINES AND THE OVUM. *British medical journal* **2**, 1268 (1963).
112. Jeziorska, M., Salamonsen, L. A. & Woolley, D. E. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biology of reproduction* **53**, 312–320 (1995).
113. Mori, A. *et al.* Analysis of stem cell factor for mast cell proliferation in the human myometrium. *Molecular human reproduction* **3**, 411–418 (1997).
114. Cabanillas-Saez, A., Schalper, J. A., Nicovani, S. M. & Rudolph, M. I. Characterization of mast cells according to their content of tryptase and chymase in normal and neoplastic human uterine cervix. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **12**, 92–98 (2002).
115. Varayoud, J., Ramos, J. G., Bosquiazzo, V. L., Muñoz-de-Toro, M. & Luque, E. H. Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. *Reproduction (Cambridge, England)* **127**, 379–387 (2004).
116. Woidacki, K. *et al.* Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency. *Cell death & disease* **4**, e462 (2013).
117. Padilla, L. *et al.* Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus: the effect of sexual hormones, gestation and labor. *Cellular and molecular biology* **36**, 93–100 (1990).
118. Rudolph, M. I. *et al.* Distribution of mast cells and the effect of their mediators on contractility in human myometrium. *British journal of obstetrics and gynaecology* **100**, 1125–1130 (1993).
119. SPICER, S. S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **8**, 18–35 (1960).
120. Letourneau, R., Pang, X., Sant, G. R. & Theoharides, T. C. Intragranular activation of bladder mast cells and their association with nerve processes in interstitial cystitis. *British journal of urology* **77**, 41–54 (1996).
121. Jensen, F. *et al.* Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PloS one* **5**, e14409 (2010).
122. Graziano, F. M. The mast cell in health and disease. Michael A. Kaliner and Dean D. Metcalfe, eds. New York. Marcel Dekker, 1992, 880 pp. *Pediatric Pulmonology* **19**, 192–193 (1995).

123. Cocchiara, R., Bongiovanni, A., Albeggiani, G., Azzolina, A. & Geraci, D. Substance P selectively activates TNF-alpha mRNA in rat uterine immune cells: a neuroimmune link. *Neuroreport* **8**, 2961–2964 (1997).
124. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V. & Guller, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1221**, 80–87 (2011).
125. Bosquiazzo, V. L., Ramos, J. G., Varayoud, J., Muñoz-de-Toro, M. & Luque, E. H. Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)* **133**, 1045–1055 (2007).
126. Rudolph, M. I., Bardisa, L., Cruz, M. A. & Reinicke, K. Mast cells mediators evoke contractility and potentiate each other in mouse uterine horns. *General pharmacology* **23**, 833–836 (1992).
127. Rudolph, M. I., Cabanillas, A., Gomez, P., García, M. A. & Villan, L. On the mechanism of action of ethodin in inducing myometrium contractions. *General pharmacology* **28**, 381–385 (1997).
128. Hegele-Hartung, C., Chwalisz, K., Beier, H. M. & Elger, W. Ripening of the uterine cervix of the guinea-pig after treatment with the progesterone antagonist onapristone (ZK 98.299): an electron microscopic study. *Human reproduction (Oxford, England)* **4**, 369–377 (1989).
129. Spanggaard, H. *et al.* Mast cells in cervical ripening--an immunohistochemical and biomechanical study in rats. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **73**, 91–97 (1997).
130. Gordon, J. R. & Galli, S. J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *The Journal of experimental medicine* **174**, 103–107 (1991).
131. McNeil, H. P., Austen, K. F., Somerville, L. L., Gurish, M. F. & Stevens, R. L. Molecular cloning of the mouse mast cell protease-5 gene. A novel secretory granule protease expressed early in the differentiation of serosal mast cells. *The Journal of biological chemistry* **266**, 20316–20322 (1991).
132. Beaven, M. A. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European journal of immunology* **39**, 11–25 (2009).
133. Caughey, G. H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunological reviews* **217**, 141–154 (2007).
134. Scanduzzi, L. *et al.* Mouse mast cell protease-4 deteriorates renal function by contributing to inflammation and fibrosis in immune complex-mediated glomerulonephritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 624–633 (2010).

135. Tchougounova, E., Pejler, G. & Abrink, M. The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. *The Journal of experimental medicine* **198**, 423–431 (2003).
136. Kunori, Y. *et al.* Rodent alpha-chymases are elastase-like proteases. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**, 5921–5930 (2002).
137. He, S. & Walls, A. F. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *British journal of pharmacology* **125**, 1491–1500 (1998).
138. Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K. S., Bumpus, F. M. & Husain, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *The Journal of biological chemistry* **265**, 22348–22357 (1990).
139. Fang, K. C., Raymond, W. W., Lazarus, S. C. & Caughey, G. H. Dog mastocytoma cells secrete a 92-kD gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *The Journal of clinical investigation* **97**, 1589–1596 (1996).
140. Fang, K. C., Raymond, W. W., Blount, J. L. & Caughey, G. H. Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *The Journal of biological chemistry* **272**, 25628–25635 (1997).
141. Chang, C. & Werb, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology* **11**, S37–43 (2001).
142. Banovac, K. & Forteza, R. de. The effect of mast cell chymase on extracellular matrix: studies in autoimmune thyroiditis and in cultured thyroid cells. *International archives of allergy and immunology* **99**, 141–149 (1992).
143. Leskinen, M. J., Lindstedt, K. A., Wang, Y. & Kovanen, P. T. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by a mechanism involving fibronectin degradation and disruption of focal adhesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 238–243 (2003).
144. Wang, Y., Shiota, N., Leskinen, M. J., Lindstedt, K. A. & Kovanen, P. T. Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression in vitro: transforming growth factor-beta1-dependent and -independent effects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 1928–1933 (2001).
145. Leskinen, M., Wang, Y., Leszczynski, D., Lindstedt, K. A. & Kovanen, P. T. Mast cell chymase induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 516–522 (2001).
146. den Dekker, W. K. *et al.* Mast cells induce vascular smooth muscle cell apoptosis via a toll-like receptor 4 activation pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 1960–1969 (2012).
147. Kitamura, Y., Go, S. & Hatanaka, K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* **52**, 447–452 (1978).
148. Galli, S. J. *et al.* Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annual review of immunology* **23**, 749–786 (2005).
149. Grimbaldston, M. A. *et al.* Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *The American journal of pathology* **167**, 835–848 (2005).

150. Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* **150**, 467–486 (1981).
151. Sauer, B. & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5166–5170 (1988).
152. Rajewsky, K. *et al.* Conditional gene targeting. *The Journal of clinical investigation* **98**, 600–603 (1996).
153. Reynolds, D. S. *et al.* Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family. *The Journal of biological chemistry* **264**, 20094–20099 (1989).
154. Rodewald, H. R., Dessing, M., Dvorak, A. M. & Galli, S. J. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science (New York, N.Y.)* **271**, 818–822 (1996).
155. Feyerabend, T. B. *et al.* Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms. *Immunity* **30**, 67–79 (2009).
156. Feyerabend, T. B. *et al.* Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* **35**, 832–844 (2011).
157. Scholten, J. *et al.* Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic research* **17**, 307–315 (2008).
158. Buch, T. *et al.* A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nature methods* **2**, 419–426 (2005).
159. Voehringer, D., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced "memory-like" T cells in constitutively T cell-depleted mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 4742–4753 (2008).
160. Dudeck, A. *et al.* Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* **34**, 973–984 (2011).
161. Malbec, O. *et al.* Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 6465–6475 (2007).
162. Butterfield, J. H., Weiler, D., Dewald, G. & Gleich, G. J. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia research* **12**, 345–355 (1988).
163. Nilsson, G. *et al.* Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scandinavian journal of immunology* **39**, 489–498 (1994).
164. Sack, U. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (S. Karger, Basel, 2007).
165. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156–159 (1987).
166. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254 (1976).

167. Sommerhoff, C. P. *et al.* Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **142**, 2450–2456 (1989).
168. Sommerhoff, C. P., Ruoss, S. J. & Caughey, G. H. Mast cell proteoglycans modulate the secretagogue, proteoglycanase, and amidolytic activities of dog mast cell chymase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **148**, 2859–2866 (1992).
169. Ware, J. H., Wan, X. S., Rubin, H., Schechter, N. M. & Kennedy, A. R. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. *Archives of biochemistry and biophysics* **344**, 133–138 (1997).
170. He, S., Gaça, M. D., McEuen, A. R. & Walls, A. F. Inhibitors of chymase as mast cell-stabilizing agents: contribution of chymase in the activation of human mast cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **291**, 517–523 (1999).
171. Muramatsu, M., Katada, J., Hattori, M., Hayashi, I. & Majima, M. Chymase mediates mast cell-induced angiogenesis in hamster sponge granulomas. *European journal of pharmacology* **402**, 181–191 (2000).
172. Guimond, M. J. *et al.* Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biology of reproduction* **56**, 169–179 (1997).
173. Greenwood, J. D. *et al.* Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta* **21**, 693–702 (2000).
174. Rätsep, M. T. *et al.* Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction (Cambridge, England)* **149**, R91-102 (2015).
175. Cocchiara, R., Di Trapani, G., Azzolina, A., Albeggiani, G. & Geraci, D. Early embryonic histamine-releasing factor: a new model for human implantation. *Human reproduction (Oxford, England)* **1**, 445–447 (1986).
176. Lash, G. E. & Bulmer, J. N. Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? *Journal of reproductive immunology* **88**, 156–164 (2011).
177. Zhang, J., Chen, Z., Smith, G. N. & Croy, B. A. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cellular & molecular immunology* **8**, 1–11 (2011).
178. Barker, D. J., Martyn, C. N., Osmond, C., Hales, C. N. & Fall, C. H. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ (Clinical research ed.)* **307**, 1524–1527 (1993).
179. Machado, F. C., Vitale, M. S. & Franco, M. Predictors of depression and anxiety symptoms during adolescence: the impact of Birth Weight. *Minerva pediatrica* (2015).
180. Li, M. *et al.* Fetal-derived adrenomedullin mediates the innate immune milieu of the placenta. *The Journal of clinical investigation* **123**, 2408–2420 (2013).
181. Naruse, K. *et al.* Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England)* **24**, 553–561 (2009).
182. Smith, S. D., Dunk, C. E., Aplin, J. D., Harris, L. K. & Jones, R. L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *The American journal of pathology* **174**, 1959–1971 (2009).

183. Tchougounova, E. *et al.* A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *The Journal of biological chemistry* **280**, 9291–9296 (2005).
184. Nybo Andersen, A. M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J. & Melbye, M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ (Clinical research ed.)* **320**, 1708–1712 (2000).
185. Seoud, M. A.-F. *et al.* Impact of advanced maternal age on pregnancy outcome. *American journal of perinatology* **19**, 1–8 (2002).
186. SHELESNYAK, M. C. Some experimental studies on the mechanism of ova-implantation in the rat. *Recent progress in hormone research* **13**, 269-317; discussion 317-22 (1957).
187. SHELESNYAK, M. C. Fall in uterine histamine associated with ovum implantation in pregnant rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **100**, 380–381 (1959).
188. Garfield, R. E., Irani, A.-M., Schwartz, L. B., Bytautiene, E. & Romero, R. Structural and functional comparison of mast cells in the pregnant versus nonpregnant human uterus. *American journal of obstetrics and gynecology* **194**, 261–267 (2006).
189. Bytautiene, E., Vedernikov, Y. P., Saade, G. R., Romero, R. & Garfield, R. E. IgE-independent mast cell activation augments contractility of nonpregnant and pregnant guinea pig myometrium. *International archives of allergy and immunology* **147**, 140–146 (2008).
190. Salamonsen, L. A., Jeziorska, M., Newlands, G. F., Dey, S. K. & Woolley, D. E. Evidence against a significant role for mast cells in blastocyst implantation in the rat and mouse. *Reproduction, fertility, and development* **8**, 1157–1164 (1996).
191. Menzies, F. M., Higgins, C. A., Shepherd, M. C., Nibbs, R. J. B. & Nelson, S. M. Mast cells reside in myometrium and cervix, but are dispensable in mice for successful pregnancy and labor. *Immunology and cell biology* **90**, 321–329 (2012).
192. Kieckbusch, J., Gaynor, L. M., Moffett, A. & Colucci, F. MHC-dependent inhibition of uterine NK cells impedes fetal growth and decidual vascular remodelling. *Nature communications* **5**, 3359 (2014).
193. Khong, T. Y., Wolf, F. de, Robertson, W. B. & Brosens, I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *British journal of obstetrics and gynaecology* **93**, 1049–1059 (1986).
194. Croy, B. A. *et al.* Identification of the primary outcomes that result from deficient spiral arterial modification in pregnant mice. *Pregnancy hypertension* **1**, 87–94 (2011).
195. Chakraborty, D., Rumi, M. A. K., Konno, T. & Soares, M. J. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16295–16300 (2011).
196. Welle, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of leukocyte biology* **61**, 233–245 (1997).

197. Croy, B. A. *et al.* Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *Journal of reproductive immunology* **59**, 175–191 (2003).
198. Woidacki, K. *et al.* Transfer of regulatory T cells into abortion-prone mice promotes the expansion of uterine mast cells and normalizes early pregnancy angiogenesis. *Scientific reports* **5**, 13938 (2015).
199. Tirado-González, I. *et al.* Uterine NK cells are critical in shaping DC immunogenic functions compatible with pregnancy progression. *PloS one* **7**, e46755 (2012).
200. Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K. & Tada, T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *European journal of immunology* **10**, 175–180 (1980).
201. Nishikado, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y. & Karasuyama, H. NK cell-depleting anti-asialo GM1 antibody exhibits a lethal off-target effect on basophils in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 5766–5771 (2011).
202. Christaki, E. *et al.* NK and NKT Cell Depletion Alters the Outcome of Experimental Pneumococcal Pneumonia: Relationship with Regulation of Interferon- γ Production. *Journal of immunology research* **2015**, 532717 (2015).
203. Sheikhi, A. K., Tayade, C., Paffaro, V. A. & Croy, B. A. Are natural killer cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? *Pakistan journal of biological sciences* **10**, 2885–2889 (2007).
204. Victorino, F. *et al.* Tissue-Resident NK Cells Mediate Ischemic Kidney Injury and Are Not Depleted by Anti-Asialo-GM1 Antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **195**, 4973–4985 (2015).
205. Saitoh, O., Abiru, N., Nakahara, M. & Nagayama, Y. CD8+CD122+ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model. *Endocrinology* **148**, 6040–6046 (2007).
206. Lee, Y.-H. *et al.* Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 825–832 (2008).
207. Cartwright, J. E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A. E. & James, J. L. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction (Cambridge, England)* **140**, 803–813 (2010).
208. Connell, J. T. Asthmatic deaths. Role of the mast cell. *JAMA* **215**, 769–776 (1971).
209. Hart, P. H. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunology and cell biology* **79**, 149–153 (2001).
210. Boyce, J. A. The role of mast cells in asthma. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **69**, 195–205 (2003).
211. Bradding, P., Walls, A. F. & Holgate, S. T. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **117**, 1277–1284 (2006).
212. Lieberman, P. & Garvey, L. H. Mast Cells and Anaphylaxis. *Current allergy and asthma reports* **16**, 20 (2016).

213. Perlow, J. H., Montgomery, D., Morgan, M. A., Towers, C. V. & Porto, M. Severity of asthma and perinatal outcome. *American journal of obstetrics and gynecology* **167**, 963–967 (1992).
214. Kelly, Y. J. *et al.* Maternal asthma, premature birth, and the risk of respiratory morbidity in schoolchildren in Merseyside. *Thorax* **50**, 525–530 (1995).
215. Corchia, C., Bertollini, R., Forastiere, F., Pistelli, R. & Perucci, C. Is maternal asthma a risk factor for low birth weight? Results of an epidemiologic survey. *European journal of epidemiology* **11**, 627–631 (1995).
216. Schatz, M. *et al.* The relationship of asthma medication use to perinatal outcomes. *The Journal of allergy and clinical immunology* **113**, 1040–1045 (2004).
217. Murphy, V. E. *et al.* A meta-analysis of adverse perinatal outcomes in women with asthma. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* **118**, 1314–1323 (2011).
218. Seidman, D. S., Laor, A., Gale, R., Stevenson, D. K. & Danon, Y. L. Is low birth weight a risk factor for asthma during adolescence? *Archives of disease in childhood* **66**, 584–587 (1991).
219. Steffensen, F. H. *et al.* Low birth weight and preterm delivery as risk factors for asthma and atopic dermatitis in young adult males. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* **11**, 185–188 (2000).
220. Madendag, I. C., Madendag, Y., Tarhan, I., Altinkaya, S. O. & Danisman, N. Mastocytosis in pregnancy. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* **49**, 192–196 (2010).
221. Matito, A. *et al.* Clinical impact of pregnancy in mastocytosis: a study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in 45 cases. *International archives of allergy and immunology* **156**, 104–111 (2011).
222. Worobec, A. S., Akin, C., Scott, L. M. & Metcalfe, D. D. Mastocytosis complicating pregnancy. *Obstetrics and gynecology* **95**, 391–395 (2000).
223. Lützelshwab, C., Huang, M. R., Kullberg, M. C., Aveskogh, M. & Hellman, L. Characterization of mouse mast cell protease-8, the first member of a novel subfamily of mouse mast cell serine proteases, distinct from both the classical chymases and tryptases. *European journal of immunology* **28**, 1022–1033 (1998).
224. Wada, T. *et al.* Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *The Journal of clinical investigation* **120**, 2867–2875 (2010).
225. Ugajin, T. *et al.* Basophils preferentially express mouse Mast Cell Protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *Journal of leukocyte biology* **86**, 1417–1425 (2009).
226. Wintroub, B. U., Schechter, N. B., Lazarus, G. S., Kaempfer, C. E. & Schwartz, L. B. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *The Journal of investigative dermatology* **83**, 336–339 (1984).
227. Nakano, A. *et al.* Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **159**, 1987–1992 (1997).

228. Johnson, J. L., Jackson, C. L., Angelini, G. D. & George, S. J. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **18**, 1707–1715 (1998).
229. Oyamada, S., Bianchi, C., Takai, S., Chu, L. M. & Sellke, F. W. Chymase inhibition reduces infarction and matrix metalloproteinase-9 activation and attenuates inflammation and fibrosis after acute myocardial ischemia/reperfusion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **339**, 143–151 (2011).
230. Tchougounova, E., Forsberg, E., Angelborg, G., Kjéllen, L. & Pejler, G. Altered processing of fibronectin in mice lacking heparin. a role for heparin-dependent mast cell chymase in fibronectin degradation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 3772–3777 (2001).
231. Lazaar, A. L. *et al.* Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 1014–1020 (2002).
232. Li, J., Jubair, S. & Janicki, J. S. Estrogen inhibits mast cell chymase release to prevent pressure overload-induced adverse cardiac remodeling. *Hypertension* **65**, 328–334 (2015).
233. Zhao, Z., Wang, H., Lin, M. & Groban, L. GPR30 decreases cardiac chymase/angiotensin II by inhibiting local mast cell number. *Biochemical and biophysical research communications* **459**, 131–136 (2015).
234. Chung, E., Yeung, F. & Leinwand, L. A. Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **112**, 1564–1575 (2012).
235. Rodríguez, H. A., Santambrosio, N., Santamaría, C. G., Muñoz-de-Toro, M. & Luque, E. H. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **30**, 550–557 (2010).
236. Stoker, C. *et al.* The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) are associated with the egg burden of organochlorine compounds. *Ecotoxicology and environmental safety* **98**, 191–195 (2013).
237. Rivera, O. E. *et al.* Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction (Cambridge, England)* **149**, 645–655 (2015).
238. Colborn, T., Vom Saal, F. S. & Soto, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives* **101**, 378–384 (1993).
239. Sharpe, R. M. & Skakkebaek, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet (London, England)* **341**, 1392–1395 (1993).
240. Fisch, H., Hyun, G. & Golden, R. The possible effects of environmental estrogen disrupters on reproductive health. *Current urology reports* **1**, 253–261 (2000).
241. Chu Py, P.-y., Salamonsen, L. A., Lee, C. S. & Wright, P. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction (Cambridge, England)* **123**, 467–477 (2002).
242. Nagase, H. & Woessner, J. F. Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* **274**, 21491–21494 (1999).

243. Ishida, K. *et al.* Role of chymase-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **324**, 422–426 (2008).

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plazentastrukturen von Maus und Mensch	5
Abbildung 2: Ursprung und Lokalisation der Spiralarterien	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Mauskombinationen, Behandlung, Tötungstag und Art der Untersuchungen	40
Abbildung 4: Bikornealer Uterus am Gestationstag 10	42
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Untersuchung der Wirkdauer von anti-asialo GM1	44
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Anwendung von anti-asialo GM1	44
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Untersuchung einer wirksamen Konzentration von anti-CD122.....	45
Abbildung 8: Schematische Darstellung des der Anwendung von anti-CD122.....	45
Abbildung 9: Darstellung der Vorbereitung einer Implantation zur Fixierung und Positionierung bei der Einbettung in Paraffin	50
Abbildung 10: Spiralarterien (SA) in der <i>decidua basalis</i> einer Implantation	51
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer optimalen sowie suboptimalen Spiralarterienumwandlung	52
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Kokultivierung uteriner glatter Muskelzellen (uSMs) und MC/9 Zellen unter Anwendung des Transwellsystems.....	65
Abbildung 13: IL-15-defiziente Mäuse weisen eine signifikant geringere Anzahl an peripheren NKs (pNKs) im Vergleich zur C57BL/6N Kontrollgruppe auf.....	69
Abbildung 14: Implantationen von IL15-defizienten Weibchen besitzen keine Dolichos biflorus agglutinin (DBA)-positiven uterinen NKs (uNKs).....	70
Abbildung 15: Vergleichbare Anzahl an Implantationen und Aborten in C57BL/6N und IL15-defizienten Tieren.....	70
Abbildung 16: IL15-defiziente Mäuse besitzen im Vergleich zum WT signifikant schlechter umgewandelte Spiralarterien (SA).	72
Abbildung 17: IL15-defiziente Mäuse weisen keinen Bluthochdruck während der Schwangerschaft auf.	73
Abbildung 18: IL15-defiziente Tiere wiesen ein signifikant höheres Plazentagewicht und einen reduzierten Feto-Plazentaren Index (FPI) auf.....	74
Abbildung 19: IL-15-Defizienz ist mit einer signifikant erhöhten Anzahl an uterinen MCs (uMCs) verbunden.....	75

Abbildung 20: Trächtige IL-15 ^{-/-} Mäuse besitzen einen signifikant höheren Anteil an CD117 ⁺ FcεRα ⁺ uterinen MCs (uMCs) verglichen mit C57BL6N Mäusen	76
Abbildung 21: IL-15-Defizienz in trächtigen Mäusen ist am Gestationstag 10 mit einer signifikant erhöhten mRNA Expression der Mastzellproteasen (Mcp1) 1 und 6 assoziiert.....	77
Abbildung 22: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit dem Antikörper anti-asialo GM1 führt zur Depletion von peripheren NKs (pNKs)	79
Abbildung 23: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit anti-asialo GM1 führt zu keiner Depletion von uterinen NKs (uNKs)	80
Abbildung 24: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit dem Antikörper anti-CD122 führt zur Depletion von peripheren NKs (pNKs)	81
Abbildung 25: Die Behandlung von trächtigen C57BL/6 Mäusen mit anti-CD122 führt zur Depletion von uterinen NKs (uNKs).....	82
Abbildung 26: Uterusproben von Cpa3 ^{Cre/+} Weibchen zeigen im Vergleich zu Proben von Cpa3 ^{+/+} Weibchen keine uterine MCs	83
Abbildung 27: Die Verabreichung des Antikörpers anti-CD122 bewirkt eine signifikante Reduktion von peripheren NKs (pNKs) in trächtigen Cpa3 ^{+/+} und Cpa3 ^{Cre/+} Mäusen.....	84
Abbildung 28: Die Injektion des anti-CD122 Antikörpers bewirkt einen Verlust von uterinen NKs (uNKs) in schwangeren Cpa3 ^{+/+} und Cpa3 ^{Cre/+} Weibchen.....	85
Abbildung 29: Vergleichbare Anzahl an Implantationen in PBS- oder anti-CD122-behandelten Cpa3 ^{+/+} und Cpa3 ^{Cre/+} Mäusen sowie erhöhte Abortrate in anti-CD122-behandelten Cpa3 ^{+/+} Mäusen	86
Abbildung 30: Anti-CD122-behandelte Cpa3 ^{+/+} , PBS-behandelte Cpa3 ^{Cre/+} , insbesondere aber anti-CD122-behandelte Cpa3 ^{Cre/+} Mäuse weisen im Vergleich zur WT Kontrollgruppe eine signifikant schlechtere Umwandlung der Spiralarterien (SA) auf.....	88
Abbildung 31: PBS-oder anti-CD122-behandelte Cpa3 ^{+/+} und Cpa3 ^{Cre/+} Mäuse zeigen keinen Bluthochdruck während der Trächtigkeit.....	89
Abbildung 32: Feten PBS-behandelter Cpa3 ^{Cre/+} , besonders aber anti-CD122-behandelter Cpa3 ^{Cre/+} Weibchen weisen ein signifikant niedrigeres Gewicht im Vergleich PBS- oder anti-CD122-behandelten Cpa3 ^{+/+} Weibchen auf.....	91
Abbildung 33: Nachkommen von PBS-behandelten Cpa3 ^{Cre/+} Mäusen, insbesondere aber von anti-CD122-behandelten Cpa3 ^{Cre/+} Mäusen haben ein signifikant geringeres Geburtsgewicht.	93

Abbildung 34: Geringere mRNA Expression der Mastzellprotease (Mcpt) 5 in Deziduaprogenen von PBS-behandelten, insbesondere aber von NK-depletierten Cpa3 ^{Cre/+} Mäusen	95
Abbildung 35: Deziduaprogenen NK-depletierter Cpa3 ^{Cre/+} Mäuse besitzen eine signifikant reduzierte Proteinexpression der Mastzellprotease (Mcpt) 5	96
Abbildung 36: Uterine NKs (uNKs) exprimieren die Mastzellprotease (Mcpt) 5	97
Abbildung 37: Mastzellen exprimieren die Mastzellprotease (Mcpt) 5	98
Abbildung 38: Mastzellprotease (Mcpt) 5-exprimierende MC/9 Zellen induzieren Apoptose in uterinen glatten Muskelzellen (uSMs)	100
Abbildung 39: Vergleichbare Implantations- und Abortrate in Mcpt5-Cre ⁺ R-DTA ⁻ und Kontrollmäusen	101
Abbildung 40: Spiralarterien (SA) von Mcpt5-Cre ⁺ R-DTA ⁺ Weibchen sind schlechter modifiziert als SA von Kontrollweibchen	102
Abbildung 41: Die Abwesenheit von Mcpt5-exprimierenden Zellen in Mcpt5-Cre ⁺ R-DTA ⁺ Mäusen ist mit einer signifikant geringen mRNA Expression der Matrix Metalloprotease (MMP) 9 assoziiert	103
Abbildung 42: Nachkommen von Mcpt5-Cre ⁺ R-DTA Mäusen besitzen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringeres Geburtsgewicht	104
Abbildung 43: Schematische Darstellung der in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses Mastzellprotease (Mcpt) 5-exprimierender Zellen auf die Spiralarterien (SA) Umwandlung und die Entwicklung der Nachkommen	119

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene Plazentatypen.....	4
Tabelle 2: Verwendete PCR Zyklen.....	58
Tabelle 3: Ansetzen des Trenn- und Sammelgels für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
Tabelle 4: Anteil der weiblichen/männlichen Nachkommen	94

Selbstständigkeitserklärung

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

„Untersuchung der Beteiligung
von uterinen Mastzellen und uterinen Natürlichen Killerzellen
an einer erfolgreichen Schwangerschaft und einer gesunden Entwicklung des Fetus“

selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.
Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken, Textausschnitte oder Zitate sind als
solche gekennzeichnet.

Magdeburg, den 16.06.2016

Nicole Meyer

Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz besonders Frau Prof. Dr. Ana Claudia Zenclussen für die wunderbare Möglichkeit, meine Dissertation an Ihrem Institut auf dem spannenden Gebiet der Reproduktionsimmunologie anfertigen zu können. Ihre professionelle Unterstützung sowie ihr Einverständnis zur Präsentation meiner Daten auf zahlreichen Kongressen und zur Teilnahme an einer Vielzahl von Weiterbildungen, ermöglichten meine wissenschaftliche sowie persönliche Weiterentwicklung.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Schüler, der mich mit seinem kompetenten Wissen, viel Engagement und wertvollen Einblicken im Rahmen langer Gespräche als Mentor hervorragend begleitet hat.

Meinen Gutachtern bin ich für ihre Zeit und Mühe, die sie in die Erstellung der Gutachten investiert haben, sehr dankbar.

Besonders danken möchte ich auch meinen Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die konstruktiven Diskussionen und die schönen Momente in- und manchmal auch außerhalb des Labors. Insbesondere danke ich Frau Dr. Katja Woidacki für die produktive Zusammenarbeit, die hilfreichen Ratschläge und ihre Betreuung während meines ersten Jahres am Institut und darüber hinaus.

Auch Herrn Prof. Dr. Jürgen Pollheimer und Herrn Prof. Dr. Martin Knöffler der Medizinischen Universität Wien möchte ich für die gelungene Zusammenarbeit im Rahmen unserer Kooperation danken.

Einen ganz besonderen Dank richte ich vor allem an meine Eltern, meinen Freund, meine Familie sowie an alle meine Freunde, die mich stets liebevoll unterstützen und mein Leben auf eine fabelhafte Weise bereichern.