

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt

Ludwigs-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Untersuchungen zur Expression von Interleukin-15 an der
feto-maternalen Grenzzone und seine Bedeutung für
vermehrte Aborte**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Thomas Haufe

aus Wasserburg a. Inn

-2011-

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitbereichterstatter: Prof. Dr. Andreas Holzinger
PD Dr. Albrecht Bergner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Bettina Toth

Dekan: Prof. Dr. med. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung 13.10.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | |
| 1.1 Das maternale Immunsystem während der Schwangerschaft | 1 |
| 1.2 Definition und Epidemiologie des Aborts | 2 |
| 1.3 Das Interleukin-15 | 6 |
| 1.4 Das Th ₁ /Th ₂ Paradigma und die T-Zellen | 11 |
| 1.5 Die natürlichen Killerzellen | 13 |
| 1.6 Die Trophoblasten und die Ausbildung des feto-plazentaren Kreislaufs | 16 |
| 2 Fragestellung | 20 |
| 3 Material und Methoden | |
| 3.1 PCR Versuchsteil | |
| 3.1.1 RNA-Isolierung | 21 |
| 3.1.2 DNase Verdau und Transkription in cDNA | 23 |
| 3.1.3 Real Time RT-PCR | 26 |
| 3.1.4 Quantitative RT PCR | 27 |
| 3.2 Immunhistochemischer Versuchsteil | |
| 3.2.1 Aufbereitung für die immunistochemische Färbung | 28 |
| 3.2.2 Die Immunhistochemische Färbung | 29 |
| 3.2.3 Durchführung der Immunhistochemischen Färbung | 29 |
| 3.2.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbung | 34 |
| 3.2.5 Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung | 35 |
| 3.2.6 Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung | 36 |
| 3.3 Statistik | 38 |
| 4 Ergebnisse | |
| 4.1 RT ² Profiler PCR Array | 39 |
| 4.2 Immunhistochemie | 39 |
| 4.2.1 Extavillöse Trophoblasten | 39 |
| 4.2.2 Synzytiotrophoblasten | 42 |
| 4.3 Real Time RT-PCR | 44 |
| 4.4 Immunfluoreszenz Doppelfärbung | 44 |
| 5 Diskussion | |
| 5.1 IL-15 im Wandel der Zeit | 46 |
| 5.2 IL-15 als ein Modulator und Stimulator des Th ₁ Systems | 48 |
| 5.3 Die erhöhte IL-15 Expression als Selbstschutz der Trophoblasten | 51 |
| 5.4 IL-15 und sein Einfluss auf die NK-Zellen in Bezug auf Aborte | 54 |
| 6 Therapeutische Ansätze | 58 |
| 7 Zusammenfassung | 63 |
| 8 Anhang | 64 |
| 9 Literaturverzeichnis | 69 |
| 10 Danksagung | 77 |
| 11 Curriculum Vitae | 78 |
| 12 Publikation | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| AK | Antikörper |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| C | Celsius |
| CD | Cluster of differentiation |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CK | Cytokeratin |
| CT | Threshold Cycle (Schwellenwertzyklus) |
| DAB | 3,3-Diaminobenzidin |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat |
| et al. | und andere (Et alii) |
| EVT | Extravillöser Trophoblast |
| Fa. | Firma |
| g/dL | Gramm / Deziliter |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| G-CSF | Granulozyten colony-stimulating factor |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen colony-stimulating factor |
| hCG | humanes Choriongonadotropin |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| GvHD | Graft versus Host Disease |
| Ig | Immunglobulin |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| IRS | Immunoreaktiver Score nach Stegner |
| IT | intermediärer Trophoblast |
| JAK | Janus Kinase |
| kDa | Kilo Dalton |
| L | Liter |
| min | Minute |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| µL | Mikroliter |
| mRNA | messenger RNA |
| mU/ml | Milliunits / Milliliter |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| Na | Natrium |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen |
| p.c. | post conceptionem |
| PBS | phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) |
| PCOS | polyzystisches Ovarialsyndrom |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| pH | Potentia hydrogenii |
| -R | Rezeptor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RSA | rezidivierender spontaner Abort |
| RT | Raumtemperatur |
| SA | Spontanabort |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| STAT | signal transducers and activators of transcription |
| ST | Syncytiotrophoblast |
| Th | T-Helferzelle |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| uNK-Zellen | Uterine Natürliche Killer Zellen |
| VT | Villöser Trophoblast |
| WHO | World Health Organization |

1. Einleitung

Der Verlust einer Schwangerschaft durch eine Fehlgeburt ist ein sehr schmerzliches und gravierendes Ereignis. Besonders tragisch und belastend für die Eltern sind wiederholte Implantationsversagen, bei denen es zwar jeweils zu einer Befruchtung der Eizelle kommt, die Schwangerschaft dann jedoch wiederholt in einem Abort abgeht. Die medizinischen Fortschritte in den letzten Jahrzehnten erlauben eine zunehmend bessere Aufklärung der Ursachen und basierend auf diesen Erkenntnissen in manchen Fällen sogar eine rationelle Therapie. Aber auch heute noch kann etwa die Hälfte aller habituellen Aborte ätiologisch nicht geklärt werden. In letzter Zeit treten jedoch zunehmend immunologische Aspekte der Schwangerschaft bei der Ursachenforschung dieser ungeklärten habituellen Aborte in den Vordergrund.

1.1 Das maternale Immunsystem während der Schwangerschaft

Die erfolgreiche Implantation stellt eine der Grundvoraussetzungen für die Reproduktion einer Spezies dar (van Mourik, Macklon et al. 2009). Anhand der hohen Spontanabortraten der befruchteten Blastozyste von bis zu 75% (Hatasaka, Varner et al. 1994) und somit fehlgeschlagener potentieller Schwangerschaften lässt sich bereits erahnen, dass es sich hierbei um einen sehr komplexen und schwierigen Prozess handelt, bei dem das Zusammenspiel und eine strenge Regulation vieler verschiedener mechanischer und biochemischer Vorgänge zwischen dem maternalen und fetalen Organismus notwendig ist. Das mütterliche Immunsystem nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein. Es steht vor der schwierigen Aufgabe einen semi-allogenen eigentlich "feindlichen" Organismus, der halb väterliche, halb mütterliche Antigene trägt, zu akzeptieren und eine immunologische Toleranz gegenüber diesem zu etablieren (van Mourik, Macklon et al. 2009). Bei diesem Prozess handelt es sich tatsächlich um eine „aktive“ Toleranz gegenüber dem semi-allogenen Fötus durch das maternale Immunsystem. So konnten Thellin et al. die These, dass bei schwangeren Frauen eine Immunsuppression besteht, widerlegen (Thellin, Coumans et al. 2000). Der maternale Organismus ist sogar an Vorgängen wie der Adhäsion, Invasion und Implantation der Blastozyste sowie der weiteren Entwicklung der Schwangerschaft aktiv mitbeteiligt. Am Anfang sind die Adhäsionsmoleküle und bestimmte Klassen

von MHC Molekülen von Bedeutung. Diese stellen eine primäre Verbindung zwischen der Blastozyste und dem maternalen Endometrium her. Im weiteren Verlauf der Implantation tritt das Zusammenspiel des maternalen Immunsystems und der fetalen Trophoblasten in den Vordergrund (van Mourik, Macklon et al. 2009).

Bereits vom Beginn der Schwangerschaft an herrscht an der feto-maternalen Grenzzone eine dichte Infiltration von maternalen Immunzellen, wie beispielsweise Populationen von T-Zellen, aber auch den uterinen natürlichen Killer-Zellen (uNK-Zellen). Von fetaler Seite her sind die trophoblastären Zellen von großer Bedeutung. Diese bilden die Plazenta und stehen im direkten Kontakt mit den mütterlichen Immunzellen. Aufgrund dieser trophoblastären Ummantelung des Fötus, die häufig mit einer Art Kokkon verglichen wird, kommt der Fötus selbst niemals in unmittelbare Berührung mit dem mütterlichen Blut und folglich auch nicht mit den maternalen Immunzellen. Die Etablierung der immunologischen Toleranz spielt sich folglich vornehmlich zwischen dem maternalen Immunsystem und den fetalen trophoblastären Zellen ab. Für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist jedoch mehr von Nöten, als eine einfache Toleranz des „fremden semi-allogenen Organismus“ durch das maternale Immunsystem, vielmehr ist es von herausragender Bedeutung, dass sich eine aktive immunologische Kommunikation zwischen der Mutter und dem sich entwickelnden Kind etabliert (van Mourik, Macklon et al. 2009).

In der folgenden Arbeit werden Aspekte dieser immunologischen Kommunikation an der feto-maternalen Grenzzone erläutert und deren fehlregulierte Etablierung in einen Kontext mit bisher ungeklärten rezidivierenden Aborten gestellt.

1.2 Definition und Epidemiologie des Aborts

Definition Als Abort wird eine Schwangerschaft definiert, welche vor dem Erreichen der Lebensfähigkeit des Kindes zum Ende kommt. Die Grenze liegt heute bei der 24. Schwangerschaftswoche (SSW) bzw. 500g Geburtsgewicht. Innerhalb der Aborte wird der Frühabort (bis zur 13. SSW) von dem Spätabort (nach der 13. SSW) unterschieden (Kiechle 2007). Grundsätzlich werden Fehlgeburten aus natürlicher Ursache als Spontanaborte bezeichnet und von artifiziellen Aborten, der vorsätzlichen Beendigung einer Schwangerschaft mit medikamentöser, chemischer oder anderer Unterstützung (Schwangerschaftsabbruch), unterschieden.

Des Weiteren können verschiedene Formen des Aborts unterschieden werden, die v.a. klinische Relevanz haben. Als Abortus imminens (drohender Abort) bezeichnet man ein Abortgeschehen, bei dem der Zervikalkanal noch geschlossen und die Gravidität intakt ist. Es kommt allerdings zu vaginalen Blutungen. Dagegen ist beim Abortus incipiens (in Gang befindlicher Abort) der Zervikalkanal bereits geöffnet (Griebel, Halvorsen et al. 2005). Der Abortus incompletus beschreibt die Ausstoßung von manchen, aber nicht allen, Teilen des Schwangerschaftsproduktes (Chen, Creinin et al. 2007). Der Abortus completus tritt meist in fortgeschrittener Schwangerschaft auf, die dann schon entwickelte Plazenta wird deshalb meistens vollständig ausgestoßen (Stauber et al. 2005). Die sogenannte missed abortion ist definiert als nicht lebensfähige Schwangerschaft, die nach dem Ableben im Uterus verblieben ist, ohne dass sie ausgestoßen wurde (Griebel, Halvorsen et al. 2005).

Definitionen und Einteilung

| | |
|---|--|
| Abortus completus (kompletter Abort): | Alle Schwangerschaftsprodukte wurden ausgestoßen ohne nötige chirurgische oder medizinische Intervention |
| Abortus incompletus (inkompletter Abort): | Einige, aber nicht alle Schwangerschaftsprodukte wurden ausgestoßen; verbliebene Produkte können Teile des Fötus sein, der Plazenta oder der Eihäute |
| Abortus imminens (drohender Abort): | Eine Schwangerschaft mit Blutungskomplikation bei geschlossenem Zervikalkanal |
| Abortus incipiens (beginnender Abort): | Der Muttermund ist geöffnet, aber die Schwangerschaftsprodukte verbleiben noch in der Gebärmutter |
| Missed abortion (verhaltender Abort): | Schwangerschaft mit fetalem Absterben (meist schon vor Wochen) aber keiner uterinen Aktivität, die zum Ausstoß führt |
| RSA (Recurrent spontaneous abortion): | Drei oder mehr aufeinanderfolgende Fehlgeburten |
| Septischer Abort: | Ein Spontanabort kompliziert durch eine uterine Infektion |

Tabelle 1 Definition Abort modifiziert nach Griebel, 2005

Epidemiologie Die Zahl der spontanen Fehlgeburten kann lediglich geschätzt werden, da sie in den ersten Schwangerschaftswochen oft subklinisch verlaufen, d.h. als Unregelmäßigkeit des Menstruationszyklus fehlinterpretiert werden. Es wird angenommen, dass in der Gruppe der 20–29-jährigen Frauen 40–70% der befruchteten Eizellen spontan zu Grunde gehen. Klinisch werden aus den genannten Gründen davon jedoch nur etwa 15% als Fehlgeburten erkannt. Etwa

30% der Frauen sind in ihrem Leben von einer oder mehreren Fehlgeburten betroffen (Bullelli, Flamigni et al. 1996).

Abortus habituais Ein Abortus habituais oder auch rezidivierender spontaner Abort (RSA) wird von der WHO als ein mindestens 3-maliger Abort vor Ende der 20. SSW mit erhöhtem Rezidivrisiko definiert (Griebel, Halvorsen et al. 2005). Die Prävalenz für einen rezidivierenden Abort liegt auf alle Schwangerschaften bezogen bei nur etwa 0,4 bis 1,0% (Hatasaka et al. 1994). Auch wenn dies ein sehr geringer Prozentsatz ist und es sich nur um ein begrenztes Patientenkollektiv handelt, stellen habituelle Aborte für die einzelne Patientin oft eine große psychische Belastung dar. Bei einem Drittel der betroffenen Frauen kommt es zu einer klinisch signifikanten Depression (Craig, Tata et al. 2002).

Das Risiko, nach einem einzelnen Spontanabort die folgende Schwangerschaft erneut zu verlieren, beträgt ca. 10%. Mit jeder weiteren missglückten Schwangerschaft steigt das Risiko für erneute Schwangerschaftsverluste an. Nach zwei aufeinander folgenden Fehlgeburten wird von Abortraten von 24% berichtet, nach drei aufeinanderfolgenden Aborten 30% und nach vier erlittenen Fehlgeburten wird das Abortrisiko auf ca. 40% geschätzt (Baek, Lee et al. 2007).

Ursachen Gründe für einen Abort sind meist chromosomale Anomalien, welche vor allem mit steigendem mütterlichen Alter häufiger auftreten (Toth, Lok et al. 2007). Dies wird für die Medizin immer wichtiger, da die Bevölkerung immer älter wird und auch immer später Familien gegründet werden. In den USA stieg die Geburtenrate bei Frauen zwischen 35 und 39 Jahren von 19,0% im Jahre 1976 auf 37,4 im Jahre 1998 an (Ventura, Taffel et al. 1988) (Guyer, Hoyert et al. 1999). Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch in Deutschland. Waren 1982 nur 7% der Mütter über 35 Jahre alt, sind es heute bereits 27% (Kiechle 2007). Doch auch bei Frauen unter 25 Jahren besteht ein gesteigertes Abortrisiko, das niedrigste Risiko zeigt demnach die Altersgruppe von 25-30 Jahren (Gracia, Sammel et al. 2005). Dass besonders das erste Trimenon eine sehr kritische Phase für den Embryo darstellt, wird durch die folgende Graphik verdeutlicht.

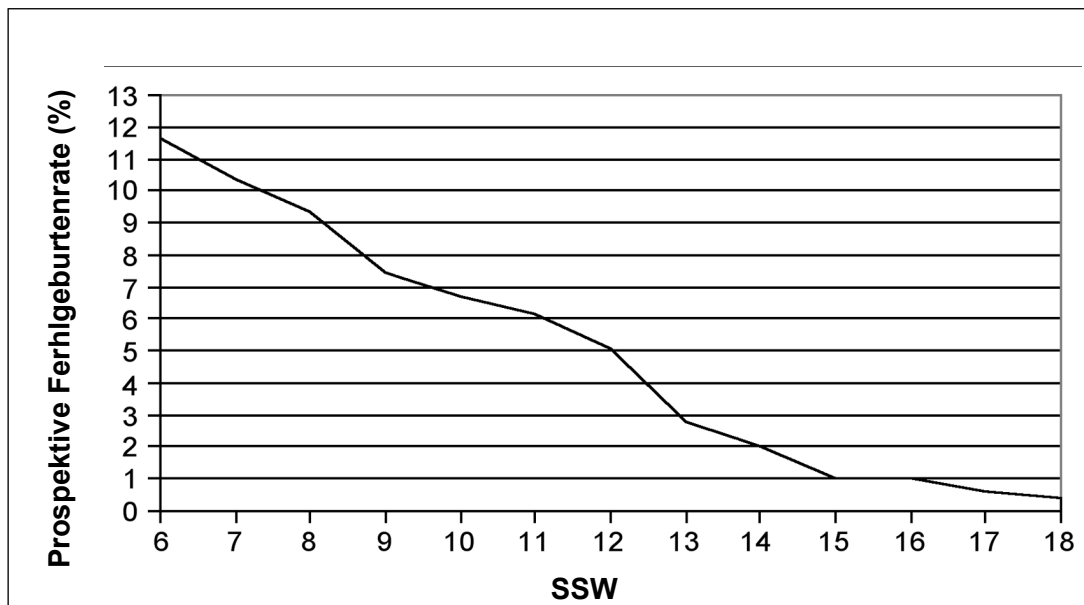


Abbildung 1 Fehlgeburtenrate bezogen auf die SSW (Tien, Tan et al. 2007)

Die wesentlichen Risikofaktoren im ersten Trimenon sind chromosomale Aberrationen, die etwa 50-60% der Fehlgeburten ausmachen. Weiter Faktoren sind maternale Erkrankungen wie z.B. ein unkontrollierter Diabetes mellitus, endokrinologische Erkrankungen, wie die Hyper- und Hypothyreosen sowie das PCO-Syndrom, das Antiphospholipidsyndrom, psychologische Faktoren, Endometriose, Nikotin, Alkohol und andere Drogen. Nach dem ersten Trimenon treten dann anatomische Pathologien des Uterus oder der Zervix, Plazentainsuffizienz, Infektionen, Traumata, Thrombophilien, wie die Faktor-V-Leiden-Mutation, die Prothrombin-Mutation und ein Protein-S-Mangel in den Vordergrund. Jedoch können auch heute noch nur etwa 50% der rezidivierenden Aborte mit den hier benannten prädisponierenden Faktoren erklärt werden; 50% bleiben bisher ungeklärt (Carrington, Sacks et al. 2005). In letzter Zeit werden jedoch zunehmend immunologische Gründe als eine der Hauptursachen für rezidivierende Aborte erkannt.

Hierbei unterscheidet man die autoimmunologischen Faktoren und die alloimmunologischen Faktoren. Unter autoimmunologischen Faktoren versteht man z.B. die Prävalenz von positiven Antikardiolipin-Antikörpern im Rahmen des schon genannten Antiphospholipid-Syndroms. Diese sind häufig mit einer Präeklampsie/HELLP-Syndrom oder einer schweren Plazentainsuffizienz assoziiert. Unter den alloimmunologischen Faktoren versteht man die fehlgesteuerte immunologische Kommunikation zwischen der Mutter und dem sich entwickelnden

Feten bzw. den extraembryonalen Membranen, der fetomaternalen Grenzzone, (Tien and Tan 2007, AWMF).

Diese Alloimmunologie der Schwangerschaft ist der zentrale Bestandteil dieser Arbeit.

1.3 Das Interleukin-15

Interleukine sind körpereigene Substanzen, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems im Rahmen der angeborenen und spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Ihnen kommen dabei entscheidende Funktionen in der Steuerung von Zellfunktionen, insbesondere von Entzündungsreaktionen und deren Mediation zu. Man kann zwischen Interleukinen mit primär proinflammatorischer und solchen mit anti-inflammatorischer Wirkung unterscheiden. Ihre Wirkung wird durch Bindung an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen vermittelt. Die Rezeptorbindung ist dabei hochspezifisch. Interleukine werden unter physiologischen Bedingungen meist nur bei Bedarf produziert bzw. freigesetzt. Sie besitzen eine kurze Halbwertszeit und eine geringe Reichweite im Organismus. Das 1994 entdeckte IL-15 ist ein aus 4 α -Helices aufgebautes Zytokin, das beim Menschen auf Chromosom 4q31 lokalisiert ist. Es gehört damit zu einer großen Zytokinfamilie, zu der nicht nur Interleukine wie IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 and IL-21, sondern auch Wachstumsfaktoren wie der Granulozyten-Makrophagen colony-stimulating factor (GM-CSF), der Granulozyten colony-stimulating factor (G-CSF), Erythropoietin und klassische Hormone, wie der humane Wachstumsfaktor und Prolaktin gehören (Budagian, Bulanova et al. 2006). Die Produktion von aktiven IL-15 ist posttranskriptionell reguliert (Waldmann, Tagaya et al. 1998). Es ist eng verwandt mit dem IL-2. Der IL-15- und IL-2-Rezeptor, Transmembranproteine der Klasse I, besitzen die gleichen β - und γ -Ketten, unterscheiden sich jedoch in einer jeweils spezifischen α -Kette. Zu seiner spezifischen α -Kette bindet IL-15 mit einer hohen Affinität, selbst wenn die IL-2 β - und γ -Rezeptorenkette fehlen (Giri, Ahdieh et al. 1994).

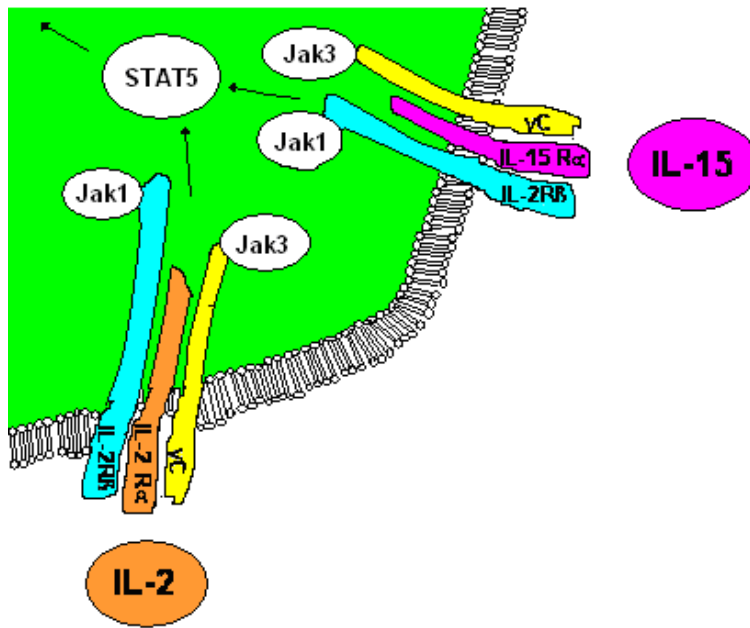


Abbildung 2 Rezeptorweg IL-15/IL-2 (eigene Zeichnung)

Die Signalweiterleitung im IL-15/IL-15-Rezeptor System erfolgt vorwiegend über die Induktion von JAK Kinasen, sowie der Phosphorylierung und Aktivierung von den Transkriptionsfaktoren STAT3, STAT5, und STAT6. Außerdem spielen die Phosphorylierung zyttoplasmatische Thyrosinkinasen der Src-Familie und die Aktivierung von weiteren Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Jedoch scheinen noch weitere Formen der IL-15 Signalvermittlung zu existieren. So konnte gezeigt werden, dass IL-15 auch in membrangebundener Form existiert und somit Signale zusätzlich juxtakrine vermittelt werden können (Budagian, Bulanova et al. 2006).

IL-15 besitzt weitreichende regulatorische Einflüsse auf verschiedene Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems (Lin, Cheng et al. 2006). So hat es beispielsweise Einfluss auf das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von T-Zellen. Hier sind die Signalwege überwiegend über eine Aktivierung der Jak1/3 und STAT3/5 vermittelt (Kovanen, Leonard et al. 2004). Studien mit IL-15 und IL-15-Rezeptor knock out Mäusen ($IL-15^{-/-}$) konnten eine Regulierung besonders von den $CD8^{+}$ T-Zellen durch IL-15 darlegen. Die $IL-15^{-/-}$ Mäuse zeichneten sich hierbei durch eine verminderte Anzahl von naiven $CD8^{+}$ T-Zellen, mit reduzierten Proliferationspotential und ein fast vollständiges Fehlen von $CD8^{+}$ T-Gedächtniszellen aus. IL-15 scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Homeostase von naiven $CD8^{+}$ T-Zellen, Effektor T-Zellen und $CD8^{+}$ T-Gedächtniszellen zu haben (Lodolce, Boone et al. 1998) (Kennedy, Glaccum et al. 2000). Diese Erkenntnis wird durch die hohe Expression der IL-15 Rezeptoruntereinheiten IL-2Rβ (CD122) und IL-15Rα auf den T-Gedächtniszellen

unterstützt (Rochman, Spolski et al. 2009). Obwohl der proliferative Effekt auf CD4⁺ T-Zellen begrenzter zu sein scheint, führt eine experimentelle Verminderung der CD8⁺ T-Zellen jedoch zu einem verbesserten Ansprechen der CD4⁺ T-Zellen auf IL-15 (Purton, Tan et al. 2007).

Außerdem hat IL-15 weitreichende antiapoptotische Fähigkeiten (Bulfone-Paus, Ungureanu et al. 1997). So ließ sich am Mausmodell nachweisen, dass IL-15 über STAT6 zu einer erhöhten Expression des Apoptoseinhibitors BCL2L1/BCL-x(L) führt und somit antiapoptotisches Potential besitzt (Masuda, Matsuguchi et al. 2001). Des Weiteren übt IL-15 indirekte Einflüsse, vermittelt durch autokrine und parakrine Regulation von dendritischen Zellen, auf die T-Zellen aus. So führt IL-15 zu einer Erhöhung der Überlebensrate der dendritischen Zellen, die ihrerseits wiederum eine verstärkte Antigenpräsentation an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zur Folge hat (Rochman, Spolski et al. 2009).

Die besondere Bedeutung von IL-15 für die T-Zellen verdeutlicht die folgende Zusammenstellung, die die Expressionsstärke der drei Untereinheiten des IL-15 Rezeptors auf verschiedenen T-Zellentitäten wiedergibt.

| Rezeptor Kette | Expression | | |
|----------------|---------------|------------------|--------------------|
| | naive T-Zelle | Effektor T-Zelle | Gedächtnis T-Zelle |
| γc (CD132) | mittel | mittel | mittel |
| IL-2Rβ (CD122) | niedrig | hoch | hoch |
| IL-15Rα | niedrig | hoch | hoch |

Tabelle 2 Expressionsstärke von Untereinheiten des IL-15 Rezeptors auf verschiedenen T-Zellentitäten (Rochman, Spolski et al. 2009)

Auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden durch IL-15 stimuliert (Bodnar, Nizsaloczki et al. 2008), ihre Differenzierung reguliert (Allen, Nilsen-Hamilton et al. 1998), ihre Sekretion zytolytischer Mediatoren beeinflusst (Ye, Young et al. 1996) und ihr zytolytisches Potential durch Stimulierung der Sekretion von Granulozyten und Perforinen gefördert (Allen, Nilsen-Hamilton et al. 1998). Bei knock-out Mäusen, die kein IL-15 mehr bilden konnten, zeigte sich eine starke Verminderung der NK-Zellen im Thymus und der peripheren NK-Zellen (Kennedy, Glaccum et al. 2000). Zhang et al. (2008) konnten nachweisen, dass IL-15 die Zytotoxizität der NK-Zellen über die Hochregulierung von NKG2D und zytotoxischen

Effektormolekülen sowie über die STAT1 und ERK1/2 Phosphorylierung verbessert (Zhang et al. 2008). Auch bei den NK-Zellen spielt die IL-15 induzierte Signalvermittlung über eine Aktivierung der Jak1/3 und STAT3/5 eine wichtige Rolle (Kovanen, Leonard et al. 2004). Studien weisen darauf hin, dass IL-15 auch den Erhalt und die sekretorischen Aktivitäten von bestimmten B-Lymphozyten beeinflusst. Bei diesen B-Zellen wurde eine erhöhte Ausschüttung von IgA, IgG1 and IgM durch IL-15 beschrieben (Armitage, Macduff et al. 1995). Zusätzlich spielt IL-15 eine Rolle im Zell-Zell- Kontakt von dendritischen Zellen und B Zellen. In diesem Zusammenhang ist es mitverantwortlich für die B-Zell Proliferation (Park, Yoon et al. 2004). Weitere Zellen, die von IL-15 beeinflusst werden, sind Mastzellen, Monozyten/Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile (Budagian, Bulanova et al. 2006). So wirkt IL-15 als ein Wachstumsfaktor auf Mastzellen im Knochenmark und besitzt antiapoptotische Eigenschaften. Des Weiteren gehören Monozyten und Makrophagen zu den IL-15 produzierenden Zelllinien. Hier konnte eine verstärkte Transkription und Translation von IL-15 RNA durch Zugabe infektionsassoziierten Stimulie wie IFN γ und LPS, sowie bei direkten viralen und bakteriellen Infektionen induziert werden. Auch für die Interaktion zwischen dendritischen Zelle und Makrophagen ist IL-15 von Bedeutung. Des Weiteren spielt IL-15 eine Rolle für die Transformation von Monozyten in dendritischen Zellen. Ähnliche proliferationsfördernde und antiapoptotische Effekte konnten z.B. auch bei Neutrophilen und Eosinophilen gezeigt werden (Budagian, Bulanova et al. 2006). In der folgenden Tabelle sind auszugsweise für einige der genannten Zellen des Immunsystems die IL-15 bedingten Wirkungsspektren und die entsprechenden Signalwege zusammengefasst.

| Zelle | Signalweg | Funktion und Effekt |
|------------------------|---|---|
| B Lymphozyten | Aktivierung der Syk Kinase und PLC γ | Schutz vor Apoptose, Proliferations- und Differenzierungsinduktion, Ig Produktion |
| Mastzellen | Aktivierung von STAT3, Jak2/STAT5, Tyk2/STAT6 und Syk, Induktion von Bcl-x _L und c-Myc Expression | Schutz vor Apoptose, Proliferation, IL-4 Sekretion |
| Neutrophile | Aktivierung von Jak2, Syk, p38, ERK1/2, NF- κ B. Downregulierung von Bax, Erhöhung der Mcl-1 Stabilität, Verminderung der Caspase-3 and -8 Aktivierung | Schutz vor Apoptose, Aktivierung von Phagozytose, Produktion of IL-8 und IL-1R Antagonist, Aktivierung von antimikrobiellen Funktionen |
| Eosinophile | Induktion von NF- κ B Expression | Schutz vor Apoptose, Stimulation von GM-SCF Produktion |
| Monozyten/ Makrophagen | Aktivierung von Lck, ERK1/2 in U937 Zellen Reverse Signaling: Aktivierung von FAK, Rac3, p38, ERK1/2 | Erhöhung der Phagocytose, Induktion von IL-8, IL-12, MCP-1, und Superoxide Produktion. Stimulation von IL-6, IL-8, TNF α Sekretion und Migration via Reverse Signaling |
| Dendritische Zellen | ? | Schutz vor Apoptose, erhöhte Expression von CD86, CD40 und MHC II, IFN γ Abgabe und T Zellstimulation |

Tabelle 3 Wirkung von IL-15 im Organismus (Budagian, Bulanova et al. 2006)

Aufgrund dieses breiten Wirkungsspektrums von IL-15 lässt sich vermuten, dass IL-15 besonders bei Krankheiten, die im Zusammenhang mit einer Fehlregulierung des Immunsystems stehen, eine entscheidende Rolle zukommen könnte. Und tatsächlich wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt etliche Krankheiten, überwiegend aus dem autoimmunen Formenkreis beschrieben, bei denen ein verändertes IL-15 Profil gezeigt werden konnte. Vor allem zu nennen ist hier die Rheumatoide Arthritis, für die IL-15 eine herausragende pathophysiologische Bedeutung hat und

auch schon pharmakologische Therapieversuche in Phase I und II mit IL-15 Antikörpern laufen (McInnes et al. 2004). Weitere Krankheiten die mit einem erhöhten IL-15 Serumspiegel assoziiert sein können, sind z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, systemischer Lupus Erythematosus, entzündliche Synovitis, Psoriasis, Diabetes Mellitus, Asthma bronchiale und autoimmune Vaskulitis (Budagian, Bulanova et al. 2006).

1.4 Das Th₁/Th₂ Paradigma und die T-Zellen

Die T-Zellen entwickeln sich aus pluripotenten haematopoetischen Stammzellen. Die Reifung erfolgt im Thymus (Raulet 1999). In der Dezidua, der entwickelten Funktionsschicht des Endometriums, lassen sich zwei wesentliche T-Zellentitäten unterscheiden: Die CD4⁺ T-Helferzellen und die CD8⁺ T-Zellen.

Für die Hypothese Th₁/Th₂ Paradigmas nimmt die Zytokinproduktion der T-Zellen eine zentrale Rolle ein. Das Th₁/Th₂ Paradigma wurde über Jahre hinweg als die Basis für die Etablierung einer Immuntoleranz gegenüber den semi-allogenen Fötus angesehen (Chaouat et al. 2007). Die T-Zellen produzieren unterschiedliche Interleukine und spielen unterschiedliche Rollen in der Immunantwort (Raghupathy, Makhseed et al. 2000). Je nach der spezifischen Produktion und Sekretion werden hierbei zwei Hauptsäulen dieses Systems unterschieden: die Th₁ und Th₂ Zellpopulation. Den vom Th₁ Pol sezernierten Zytokinen wie z.B. IL-2, TNF- α , und IFN- γ werden vorwiegend proinflammatorische Eigenschaften zugesprochen (Raghupathy, Makhseed et al. 1999). Im Rahmen dieses Paradigmas kann eine erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Th₁ Interleukinen somit einer erfolgreichen Implantation entgegenwirken und zu einem Abortgeschehen beitragen. So hemmt TNF- α beispielsweise die Trophoblastenmotilität (Todt, Yang et al. 1996). Dagegen werden den antiinflammatorischen Zytokinen aus der Th₂ Population wie z.B. IL-4, IL-5, IL-6, und IL-10 positive, schwangerschaftserhaltende Effekte zugesprochen werden (Lin, Mosmann et al. 1993). Es wurde davon ausgegangen, dass das Überleben des Fötus von einer Inhibierung des Th₁ Systems durch das Th₂ System abhängig ist (Wegmann, Lin et al. 1993). Das klassische Th₁/Th₂ Paradigma stützt sich v.a. auf Studien im Mausmodell. So konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, dass die Th₂-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-3 in normaler muriner und humaner Schwangerschaft in hohen Mengen exprimiert werden (Lin, Mosmann et al. 1993) (Arck, Ferrick et al. 1999) und ihre Injektion einen Abort in Mäusen verhindern kann (Chaouat, Assal Meliani et al. 1995). Zusätzlich konnten Th₁-Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und IL-1 bei der

Untersuchung von Aborten in hohen Mengen beobachtet werden (Krishnan, Guilbert et al. 1996) (Raghupathy, Makhseed et al. 1999). Dies konnte durch Ergebnisse in denen die Injektion von Th₁-Zytokinen die Abortrate drastisch steigert, untermauert werden (Chaouat, Menu et al. 1990) (Clark, Merali et al. 1997). Des Weiteren wurden Studien, in denen man die Wirkung von TNF- α und IL-1 mittels Antikörperapplikation neutralisierte, veröffentlicht. Hiermit ließ sich die Abortrate deutlich reduzieren (Arck, Troutt et al. 1997).

Über mehrere Jahre hinweg wurde ein relativ strenges Modell, bei der die Dominanz der Th₂ Zytokine über die Th₁ Zytokine im Mittelpunkt stand, vertreten. Die von Wegmann postulierte „erfolgreiche Schwangerschaft als ein Th₂ Phänomen“ (Wegmann, Lin et al. 1993) wurde als maßgebend betrachtet. Neue Forschungsergebnisse legen jedoch nahe, dass dieses bestehende Th₁/Th₂ Konzept die tatsächliche Komplexität der Vorgänge an der feto-maternalen Grenzzone stark vereinfacht und nur einen Teil der Wirkungen und Wechselwirkungen widerspiegelt (Saito, Nakashima et al. 2008). Bisher wurden zwar viele verschiedene Zytokine im feto-maternalen Zusammenspiel beschrieben, häufig jedoch ohne ihre genaue pathophysiologische Rolle zu kennen. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten auf eine wesentlich komplexere Struktur des Zytokin-Netzwerks hin. So wird momentan eine Erweiterung, das traditionellen Th₁/Th₂ System, postuliert, das ein realistischeres Bild der immunologischen Prozesse während der Implantation und der gesamten Schwangerschaft wiedergeben soll.

Die Rolle der Zytokine an der feto-maternalen Grenzzone hat sich aufgrund neuer Erkenntnisse weit über das bestehende dogmatische Th₁/Th₂ Paradigma hinaus erweitert und zeigt sich vor einem wesentlich komplexeren Hintergrund. Zusätzlich heben aktuelle Forschungen über die embryonale Implantation die Zytokinsekretion anderer Zellpopulationen, wie z.B. den Trophoblasten und v.a. auch die spezifische Rolle der uterinen natürlichen Killerzellen hervor.

1.5 Die natürlichen Killerzellen

Die NK-Zellen (natürliche Killerzellen) stellen eine der Hauptkomponenten des angeborenen Immunsystems dar (Sun, Lanier et al. 2009). Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und reifen im Knochenmark (Raulet 1999). Aufgrund ihrer Fähigkeit der nichtantigenabhängigen zytolytischen Aktivität und Zytokinausschüttung ermöglichen sie einen schnellen und effektiven Schutz gegen virale, bakterielle und parasitäre Infektionen, ohne Notwendigkeit einer vorausgehenden Sensibilisierung (Perricone et al. 2008). Des Weiteren haben sie anti-neoplastische Aktivitäten, sind an der Regulation der Hämatopoiesis beteiligt und mitverantwortlich für den Graft vs. Leukemia Effekt nach einer Knochenmarkstransplantation (Robertson, Ritz et al. 1990). Neben den NK-Zellen mit vorwiegend zytotoxischem Potential finden sich auch NK-Zellpopulationen bei denen die sekretorischen Eigenschaften deutlich im Vordergrund stehen. Des Weiteren kann man zwei Hauptklassen der NK-Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker unterscheiden (Moffett-King et al. 2002). Der überwiegende Anteil der NK-Zellen aus dem peripheren Blut exprimiert stark den „Fc-g-Rezeptor-III“ (CD16), das „Neuronal Cell Adhesion Molecule“ (CD56), jedoch nur sehr schwach (CD16⁺CD56^{dim}). Dahingegen exprimieren die uterinen NK-Zellen (uNK) schwach CD16, dafür jedoch stark CD56 (CD16⁻CD56^{bright}) (Dosiou, Giudice et al. 2005) (Schallhammer, Walcher et al. 1997).

Die NK-Zellen werden durch Hormone reguliert. Dies kann direkt, durch die Expression von Hormonrezeptoren, oder indirekt, vermittelt durch T-Zellen erfolgen (Dosiou, Giudice et al. 2005). Hier scheinen die Zytokine des Th₂ Systems die zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zelle zu vermindern und das Zytokinprofil der NK-Zellen selbst zusätzlich in eine Th₂ gewichtete Richtung zu verschieben. Zytokine aus dem Th₁ System haben einen gegenteiligen Effekt (Robertson, Ritz et al. 1990).

Im peripheren Blut stellen die CD16⁺CD56^{dim} NK-Zellen bis zu 15% der gesamten Leukozyten, wohingegen die zweite NK-Population, die CD16⁻CD56^{bright} NK-Zellen, hier weniger als 1% ausmachen. Die peripheren CD16⁺CD56^{dim} NK-Zellen produzieren im Ruhezustand nur wenige Zytokine (Jokhi, King et al. 1994) (Dosiou, Giudice et al. 2005). Nach vorausgegangener Stimulation können sie jedoch auch Interferon γ (IFN- γ), den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF), das Makrophagen-Inflammatorische Protein (MIP)-1a und MIP-1b 21 exprimieren und so an der Regulation der Immunantwort teilnehmen (Biron, Nguyen et al. 1999) (Shi, Ljunggren et al. 2001).

Im Endometrium jedoch zeigt sich ein anderes Bild. Hier stellen die CD16⁻CD56^{bright} NK-Zellen den Hauptanteil der Leukozyten. In der Proliferationsphase steigt ihr Prozentsatz und erreicht in der frühen Phase einer Schwangerschaft sogar einen Anteil von bis zu 75% (Dosiou, Giudice et al. 2005). Aufgrund ihrer Organspezifität spricht man von uterinen natürlichen Killerzellen (uNK-Zellen). Im Gegensatz zu den peripheren NK-Zellen zeigen die uNK-Zellen nur eine geringe lytische Aktivität (Ferry, Starkey et al. 1990) (King, Birkby et al. 1989). uNK-Zellen haben verglichen mit den peripheren NK-Zellen eine wesentlich höhere sekretorische Aktivität mit einem breiteren Zytokinprofil. Hierzu zählen unter anderem CSF, M-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , TGF- β und leukemia inhibiting factor (LIF) (Saito, Nishikawa et al. 1993) (Jokhi, King et al. 1994).

Viele Aspekte und Funktionen der uNK-Zellen sind noch nicht genau geklärt. Jedoch legt ihre verstärkte Proliferation ab der mittleren Sekretionsphase verbunden mit ihrer perivaskulären und stromalen Lokalisation, einen Zusammenhang mit dem Beginn der Dezidualisation nahe (King et al. 2000). Findet keine Befruchtung statt, gehen die uNK-Zellen zugrunde und es kommt zur Menstruation (King et al. 2000) (Trundley, Moffett et al. 2004).

Ein grundlegender, von den uNK-Zellen mitvermittelter Vorgang, scheint jedoch auch die lokale Immunmodulation in der feto-maternalen Grenzzone zu sein. So exprimieren NK-Zellen immunmodulatorischen Substanzen wie Glycodelin A und Galectin-1 (Koopman, Kopcow et al. 2003). Galectin-1 inhibiert die Proliferation von T-Zellen und verändert das lokale Zytokinprofil indem dem Th₁ System zugehörige Zytokine wie TNF- α und IL-2 vermindert werden (Rabinovich, Baum et al. 2002). Glycodelin, welches auch als plazentares Schutzprotein beschrieben wird, hat weitreichende Einflüsse durch die Verminderung der T-Zell Aktivität (Toth, Roth et al. 2008) (Rachmilewitz, Borovsky et al. 2003). Des Weiteren spielen die uNK-Zellen eine entscheidende Rolle für die Angiogenese, den strukturellen Umbau der Spiralarterien und viele weitere Bereiche der plazentaren Entwicklung (Anne Croy, van den Heuvel et al. 2006). Während der Implantation dringen uNK-Zellen tief in die Dezidua ein und zerstören gezielt Wandschichten der uterinen Spiralarterien, um einen ausreichenden Blutfluss für den sich entwickelnden Fötus zu gewährleisten. Die uNK-Zellen scheinen also auf die Neovaskularisation und das vaskuläre Remodelling Einfluss zu haben (Anne Croy, van den Heuvel et al. 2006). So begünstigt IFN- γ die Bildung neuer Blutgefäße, genauso wie der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), der ebenfalls von uNK-Zellen exprimiert wird. Zusätzlich sezernieren uNK-Zellen Stoffe, welche eine entscheidende Rolle in der Umformung des uterinen Gewebes spielen (Ashkar, Croy et al. 1999).

Außerdem treten die uNK-Zellen an der feto-maternalen Grenzzone in engen Kontakt mit den Trophoblasten. Aufgrund dieser unmittelbaren Nähe zu den Trophoblasten, besonders in den Wänden der Spiralarterien, beeinflussen sie mit Hilfe ihrer sekretorischen Fähigkeiten das Wachstum und die Invasivität der Trophoblasten. So scheinen die uNK-Zellen die Trophoblasten durch ihre spezifischen Zytokine wie z.B. CSF, M-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , TGF- β in verschiedenster Weise zu modulieren (Jokhi, King et al. 1994) (Saito, Nishikawa et al. 1993). CSF1 z.B. fördert die Produktion von hCG im Trophoblasten und stimuliert, wie auch GM-CSF, die Proliferation von dezidualen Zellen (Saito, Motoyoshi et al. 1993) (Athanassakis, Bleackley et al. 1987). Auch IFN- γ schützt Trophoblasten vor Zelllysis durch IL-stimulierte periphere NK-Zellen (King, Loke et al. 1993). Dahingegen inhibiert TNF- α die DNA Synthese in Trophoblasten. (Dosiou, Giudice et al. 2005). Weitere interessante Ergebnisse konnte nach IL-2 Stimulation gezeigt werden. Dieses proinflammatorische Interleukin ist wie schon erwähnt eng verwandt mit IL-15. Nach IL-2 Stimulation konnte das Potential von uNK Zellen dahingehend moduliert werden, dass sie Trophoblasten vermehrt angriffen. Zusätzlich scheinen die uNK-Zellen die Trophoblastinvasivität auch durch ihr zytotoxisches Potential zu regulieren, auch wenn diesem Effekt im Vergleich zu dem sekretorischen Potential nur eine geringe Bedeutung zukommt (King, Loke et al. 1990).

Die NK-Zellen besitzen also ein weitreichendes Spektrum an Möglichkeiten auf die Trophoblasten an der feto-maternalen Grenzzone regulativ einzuwirken. Jedoch werden auch die NK-Zellen durch die Trophoblasten beeinflusst. Die Migration der NK-Zellen in das deziduale Gewebe beispielsweise ist ein von Trophoblasten streng kontrollierter Prozess (Dorling, Monk et al. 2000).

Die NK-Zellen im peripheren Blut unterscheiden sich in ihren Eigenschaften stark von denen im Endometrium. Nicht nur anhand ihrer Lokalisation und Oberflächenmarker sondern v.a. aufgrund ihrer gänzlich verschiedenen Aufgaben und Eigenschaften lässt sich klar zwischen zwei Subpopulationen in der NK-Zellfamilie unterscheiden. Hierbei scheinen den uNK-Zellen, aufgrund ihrer sekretorischen und angiogenetischen Fähigkeiten, wichtige schwangerschaftserhaltende und regulatorische Aufgaben zuzukommen. Eine weitere Eigenschaft, die die Bedeutung der NK-Zellen hervorhebt, ist ihre enge Interaktion und ihre gegenseitige Regulation mit den Trophoblasten in der feto-maternalen Grenzzone.

1.6 Die Trophoblasten und die Ausbildung des feto-plazentren Kreislaufs

Die Blastozyste erreicht den mütterlichen Uterus am 4. Tag post conceptionem (p.c.). Zu diesem Zeitpunkt besteht sie aus den innen gelegenen Embryoblasten und einer äußeren trophoblastären Zellschicht. Ab dem 7. Tag p.c. beginnt die Implantation der Blastozyste. Der embryonale Pol liegt hierbei dem Endometrium an. Bei der trophoblastären Zellschicht unterscheidet man die innen gelegenen Zytotrophoblasten, die als Stammzellreservoir dienen und den Embryoblasten umhüllen, von den Synzytiotrophoblasten, die außen liegen und hauptsächlich in Richtung Dezidua proliferieren und durch Fusion benachbarter Zellen entstehen. In den folgenden Tagen dringt die Blastozyste unter Verdrängung und Zerstörung der Stromabestandteile stetig weiter in die Dezidua ein. Die Chorionzottenbildung beginnt bereits etwa am 8. Tag p.c. (Kiechle 2007). Im Verlauf lassen sich histologisch Primär-Sekundär- und Tertiärzotten unterteilen. Zunächst entstehen durch Einschmelzungen innerhalb des Synzytiums Hohlräume, sog. Lakunen. Die einzelnen Lakunen sind durch synzytiale Trabekel voneinander getrennt. Im Rahmen der Primärzottenbildung sprossen nun Zytotrophoblasten in die Trabekel ein. In diesem Stadium spricht man von den Primärzotten (Schiebler, Kaufmann 1997). Diese bestehen aus zentral gelegenen Zytotrophoblasten, die von einer dicken Schicht Synzytiotrophoblasten umgeben sind (Schmidt 2001). Durch die Arrosion maternaler Blutgefäße, durch die voranschreitende Trophoblasteninvasion, füllen sich die Lakunen mit maternalem Blut. Zunächst kommt es jedoch noch nicht zu einer regulären Blutzirkulation, diese bildet sich erst ab der 12. SSW aus. Vielmehr handelt es sich in dieser Phase um eine Art „stehendes Gewässer“ (Kiechle 2007). Durch das Einwachsen von embryonalem Mesenchym wandeln sich die Primärzotten in die Sekundärzotten um. Von einer tertiären Zotte spricht man etwa ab dem 18. Tag p.c., wenn sich im Inneren der Zotte fetale Blutgefäße ausgebildet haben. Diese tertiären Zotten sind nun charakterisiert durch eine äußere Zellschicht aus Synzytiotrophoblasten, darunter liegende Zytotrophoblasten, einen villösen Kern und fetale Kapillaren. Diese verbinden sich mit den Nabelschnurgefäßen und es kommt somit zur Ausbildung des feto-plazentren Kreislaufs (Kiechle 2007) (Schiebler, Kaufmann 1997).

Von besonderer Bedeutung in der plazentaren feto-maternalen Grenzzone sind die embryonalen extravillösen Trophoblasten (EVT). Im Rahmen der Dezidualisation, die durch die Invasion der Trophoblasten mitgetragen wird, unterliegt das

mütterliche Endometrium einer Umwandlung, wodurch sich der Uterus den Bedürfnissen des Embryos optimal anpasst. Während der ersten 12 Schwangerschaftswochen invadieren die EVT die Dezidua, das erste Drittel des Myometriums und die Wände der Spiralarterien. Diese, sich von Zytotrophoblasten ableitenden Zellen, entstehen in den sog. Haftzotten. Dies sind große, nicht frei flottierende Zotten, die der Dezidua anhaften (Kiechle 2007). In den ersten Wochen der Schwangerschaft lösen sich die zu diesem Zeitpunkt noch als intermediäre Trophoblasten bezeichneten Zellen aus ihrem Zellverband an der Basalmembran und wandern durch die Synzytiotrophoblastenschicht hindurch, um die sog. Zellsäulen zu bilden. Die von hier aus nun in Richtung Dezidua infiltrierenden Zellen werden jetzt als extravillöse Trophoblasten bezeichnet. Generell können die intestinalen von den endovaskulären EVT unterschieden werden. (Huppertz, Kadyrov et al. 2006). Ausgehend von der Trophoblastenzellsäule beginnen die EVT als intestinale EVT die Dezidua und das Myometrium zu invadieren. Das Verlassen des Zellverbandes ist den EVT nur aufgrund einer veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen möglich. Durch die Sezernierung spezieller Matrixmoleküle wie Fibronectin und Kollagen IV bilden sie einen „trophoblast glue“, der zur Verankerung der Plazenta beiträgt (Kiechle 2007). Die endovaskuläre EVT Invasion ist essentiell für die physiologische Differenzierung der Spiralarterien und somit der Etablierung einer suffizienten Versorgung des Fötus mit Nährstoffen und Sauerstoff im feto-maternalen System. Hierbei werden zunächst die präplazentaren mütterlichen Arterien invadiert. Durch die EVT kommt es zu einem Umbau in den Gefäßwänden, indem die muskulären und elastischen Fasern reduziert werden und durch Einlagerungen von Fibronoidmaterial ersetzt werden. Die Arterien transformieren hierdurch in weite, relativ starre Gefäße ohne die Möglichkeit zur Vasokonstriktion (Kiechle 2007) (Huppertz, Kadyrov et al. 2006).

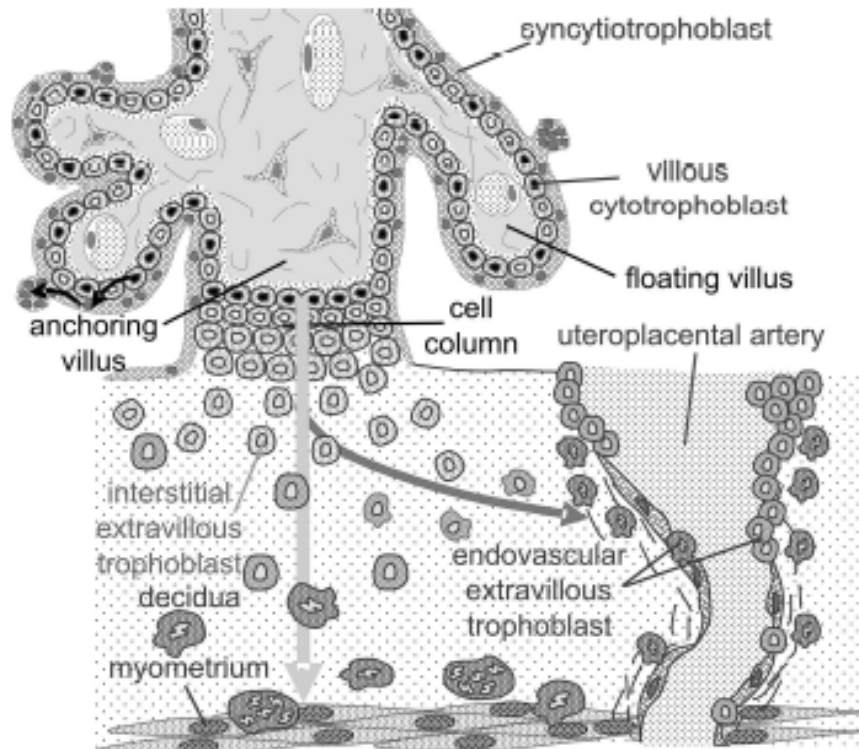


Abbildung 3 EVT in der Plazenta (Huppertz, Kadyrov et al. 2006)

Diese Trophoblasteninvasion durch die EVT ermöglicht somit den Anschluss an das maternale vaskuläre System und somit die suffiziente Versorgung des Fötus mit Nährstoffen und Sauerstoff. Das invasive Potential der EVT ist jedoch so hoch, dass sich der maternale Organismus vor einer „Überinvasion“ schützen muss. Es ist also notwendig ein Gleichgewicht zwischen der Akzeptanz und gleichzeitiger Limitation der invadierenden EVT zu erschaffen. Für dieses Gleichgewicht ist das maternale Immunsystem von großer Bedeutung. Am Beispiel von ektopen Schwangerschaften in den Tuben verdeutlicht sich das hohe invasive Potential der trophoblastären Zellen. Da hier keine gegenregulierenden Maßnahmen seitens des maternalen Immunsystems ergriffen werden können, kann eine solche ektopre Schwangerschaft bis zu einer Tubenruptur führen (von Rango et al. 2008).

Die Regulation der Trophoblastenaktivität ist sehr komplex und wird über autokrine Wege, vom Trophoblasten selbst, und parakrine Wege, durch den maternalen Organismus, gesteuert. Wie bereits beschrieben, spielt sich also auch die Etablierung der immunologischen Toleranz vornehmlich zwischen dem maternalen Immunsystem und den fetalen trophoblastären Zellen ab. Die verschiedenen Trophoblastenentitäten befinden sich also stets an vorderster Front an der feto-maternalen Grenzzone und stehen somit auch ständig im engen Kontakt mit dem maternalen Immunsystem. Auf ihrer Oberfläche exprimieren die Trophoblasten nicht die klassischen „major histocompatibility complex“-Moleküle (MHC-Moleküle),

sondern ein bestimmtes, sonst nirgendwo im Körper anzutreffendes Muster an antigenpräsentierenden Molekülen. Dies schützt sie vor den maternalen Immunzellen und moduliert sie so, dass sie die Implantation und Invasion unterstützen (Apps, Gardner et al. 2008) (Kovats, Main et al. 1990). Die von den Trophoblasten exprimierte Sonderklasse von Oberflächenmolekülen, wie HLA-E und HLA-F anstatt der klassischen HLA-A,-B,-C-Moleküle, sind hierbei zu nennen (Kovats, Main et al. 1990) (King, Hiby et al. 1997) (Verma, King et al. 1997). Von besonderer Bedeutung ist jedoch die Expression von HLA-G (Human Leukocyte Antigen). Dieses Oberflächenmolekül hemmt die Aktivität von CD56 positiven NK-Zellen und T-Zellen (Le Gal, Riteau et al. 1999) und vermindert deren Sekretion von proinflammatorischen Stoffen was wiederum einen Bogen zu den Zytokinprofil an der feto-maternalen Grenzzone spannt (Maejima, Fujii et al. 1997).

Die Trophoblasten sind also aufgrund ihrer maßgeblichen Beteiligung an der Implantation, der Plazentabildung und der engen Verbindung zum maternalen Immunsystem essentieller Bestandteil einer erfolgreichen Schwangerschaft. So stellen gerade die trophoblastären Zellen und deren Expression von IL-15 den zentralen Teil dieser Arbeit dar.

2. Fragestellung

Die Etablierung einer immunologischen Toleranz bzw. Kommunikation zwischen maternalem und fetalem Organismus und die hieran beteiligten Zytokine an der feto-maternalen Grenzzone scheinen für eine erfolgreiche Schwangerschaft von großer Bedeutung zu sein. Es stellt sich somit die Frage, ob dieses Zytokinprofil bei Patientinnen mit vermehrten Aborten verändert ist und welche Auswirkungen dies auf die Vorgänge an der feto-maternalen Grenzzone haben könnte.

3. Material und Methoden

Um einen allgemeinen Überblick über das Zytokinprofil der feto-maternalen Grenzzone zu gewinnen, wurde zunächst in einer PCR Versuchsreihe mit Hilfe eines speziellen PCR Profiler Arrays die Expression verschiedenster Zytokine und weiterer inflammatorischer Faktoren (Tabelle 10) auf der RNA bzw. DNA Ebene analysiert. Basierend auf den hierbei gewonnenen Erkenntnissen schlossen sich der immunhistochemische Versuchsteil und weitere PCR Versuche an. Hiermit konnten die Ergebnisse des PCR Versuchsteils auch auf der Proteinebene bestätigt werden. Die Immunhistochemie ermöglichte zusätzlich eine genauere Lokalisation bzw. Differenzierung der Expressionsorte und zellulären Subtypen, wie z.B. die extravillösen Trophoblasten oder die Synzytiotrophoblasten. Als Studienpopulation wurden Patientinnen in randomisierten Gruppen mit rezidivierenden spontanen Aborten (RSA) und einem bis dato einmaligen spontanen Abort (in dieser Arbeit jeweils als SA bezeichnet), untereinander und mit einer Kontrollgruppe von gesunden Frauen verglichen. Als rezidivierender spontaner Abort wurden, gemäß der WHO, drei oder mehr stattgehabte Aborte vor der 20. SSW definiert. Eingeschlossen wurde die 7.-12. SSW. Alle Proben wurden in gleicher Weise gesammelt, transportiert, verarbeitet, aufbereitet und analysiert. Eine tabellarische Zusammenstellung über demographische und klinische Charakteristika der Studienpopulation, sowie die Anzahl der immunhistologischen Schnitte in Bezug auf die SSW findet sich im Anhang (Tabelle 4 und 5).

3.1 PCR Versuchsteil

Mit Hilfe diverser PCR Techniken ist es möglich die Transkription verschiedener Gene und damit deren Aktivität auf RNA bzw. DNA Ebene zu analysieren. Dies erlaubt Rückschlüsse über die jeweiligen Genprodukte, wie z.B. die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine der feto-maternalen Grenzzone.

3.1.1 RNA-Isolierung mit RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben wurde das RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit der Firma Qiagen (RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Cat.No. 74804) verwendet. Dieses Kit beruht auf dem Grundprinzip, dass das Gewebe, welches mittels einer Quiazol Lysis (Phenol und Guanidin) homogenisiert wurde, auf ein spezielles Tube mit einem semipermeablen Membransystem pipetiert wird. Die Silicat-Gel-Membran des Tubes bindet selektiv RNA, während hingegen Kontaminationen, DNA und Proteine effektiv ausgewaschen werden. Die an die

Membran gebundene, qualitativ hochwertige RNA kann schließlich mit RNase-freiem Wasser eluiert werden.

Die gefrorenen (-20°C) Gewebeproben wurden zunächst mechanisch grob mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend zusammen mit 1 ml Quiazol Lysis Reagenz in ein 15 ml Falcon gegeben. Mit einem Ultraschallzerkleinerer wurden die auf Eis gekühlten Proben homogenisiert. Zur Förderung der Dissoziation der Nukleotidkomplexe wurde das Lysat 5 min bei RT inkubiert. Nachdem anschließend 200 µl Chloroform hinzugefügt wurden, musste die Probe 15 sek kräftig geschüttelt werden um die komplette Auftrennung der Phasen zu gewährleisten. Nach einer 3 minütigen Inkubation bei RT wurde das Zellysate in einem 5 ml Tube bei 12000xg, 15 min bei 4° zentrifugiert. Dadurch kam es zur Auftrennung in drei Phasen.

- Oben: farblose, wässrige Phase (RNA)
- Mitte: weiße Interphase
- Unten: rote, organische Phase

Die obere Phase (ca. 600µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert und Ethanol 70% im Verhältnis 1:1 zugegeben. 700 µl des so entstandenen Probenmaterials (inklusive eines eventuell entstandenen Präzipitats, das die weitere Isolierung allerdings nicht weiter beeinträchtigt) wurden auf eine RNeasy Mini Column® aufgetragen, welche sich in einem 2 ml Sammelgefäß befand. Nach dem Schließen des Deckels wurde die ganze Säule für 15 sek bei 8000xg und RT zentrifugiert und das Durchflussvolumen anschließend verworfen. Diese Schritte wurden mit dem verbliebenen Rest Zellysate-Ethanol-Gemisches wiederholt. Die im Lysat enthaltene RNA war nun an die Membran im Inneren der Säule gebunden. Anschließend wurden 700 µl RW1 Waschpuffer (im RNeasy Mini Kit enthalten) auf die Säule pipettiert und erneut für 15 sek bei 8000xg und RT zentrifugiert (Durchflussvolumen wurde entsorgt und das Sammelgefäß erneuert). Im Folgenden wurden 500 µl RPE Waschpuffer (ebenfalls im RNeasy Mini Kit enthaltenen, allerdings als Konzentrat mitgeliefert und vor Gebrauch mit Ethanol 100% zu verdünnen) auf die Säule pipettiert und 15 sek bei 8000xg und RT zentrifugiert (Durchflussvolumen wurde entsorgt). Dieser Schritt wurde nochmals mit 500 µl RPE Waschpuffer 2 min bei 8000xg und RT wiederholt. (Durchflussvolumen wurde entsorgt). Um die Silica-Gel-Membran vollständig zu trocknen, wurde sie anschließend für 1 min bei 11000xg zentrifugiert (Durchflussvolumen wurde entsorgt). Zur Elution der so gewonnenen und gereinigten RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesteckt und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Gel-Membran pipettiert. Durch

Zentrifugieren für eine 1 min bei 8000xg wurde die an die Membran gebundene RNA in das Sammelgefäß ausgewaschen. Die durch diesen Prozess gewonnene RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80°C aufbewahrt.

Schema

- mechanische Zerkleinerung
- 1 ml Quiazol Lysis Reagenz und Gewebe in ein 15 ml Falcon
- Homogenisierung mit Ultraschall Zerkleinerer
- Lysat 5 min bei RT inkubieren
- 200 µl Chloroform dazugeben
- 15 sek kräftig schütteln
- Zelllysate in einem 5 ml Tube
- 15 min mit 12000xg, bei 4° zentrifugieren
- obere Phase (ca. 600µl) in ein neues Reaktionsgefäß abpipettieren
- mit Ethanol 70% im Verhältnis 1:1 vermischen
- 700 µl Probematerials auf eine RNeasy Mini Column® pipettieren
- 15 sek mit 8000xg und RT zentrifugieren
- diese Schritte mit dem verbliebenen Rest Zelllysate-Ethanol-Gemisches wiederholen
- 700 µl RW1 Waschpuffer auf die Säule pipettieren
- 15 Sekunden bei 8000xg und RT zentrifugieren
- 500 µl RPE Waschpuffer auf die Säule pipettieren
- 15 s bei 8000xg und RT zentrifugieren
- diesen Schritt mit 500 µl RPE 2 min bei 8000xg und RT wiederholen
- Silica-Gel-Membran für 1 min bei 11000xg zentrifugieren
- Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß stecken und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Gel-Membran pipettieren
- 1 min bei 8000xg zentrifugieren
- RNA Eluat bei -80°C aufbewahren

3.1.2 DNase Verdau und Transkription in cDNA

Eine Möglichkeit, um die Aktivität eines Gens analysieren, ist zu messen, in welchem Ausmaß dieses Gen transkribiert wird. Hierfür wird die jeweils abgelesene spezifische mRNA untersucht. Es ist jedoch sehr schwierig, dieses Genprodukt laborchemisch direkt darzustellen. Deshalb bedient man sich eines Umweges, der Polymerasekettenreaktion (PCR). Mit dieser Methode können genau definierte Abschnitte des Erbmateriale vervielfältigt und somit besser analysiert werden. Für

die PCR werden jedoch spezifische DNA-Polymerasen verwendet, die DNA-abhängig sind, d.h. sie sind nicht in der Lage, mRNA zu amplifizieren. Daher wird zuerst eine Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eingesetzt mit deren Hilfe mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. Diese cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet werden. Prinzipiell unterscheiden sich RNA Moleküle nur wenig von DNA Molekülen. Beide sind Polynukleotide, die aus an Zucker gebundenen Nucleobasen bestehen. Bei der RNA handelt es sich bei dem Zucker jedoch um Ribose und nicht um Desoxyribose, wie bei der DNA. Des Weiteren ist bei der RNA die Nucleotidbase Uracil und nicht Thymin, wie bei der DNA, vorzufindenden. Die anderen Nucleotidbasen sind jeweils identisch. Zusätzlich besteht die RNA, im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA, nur aus einem Strang. Für die Transkription wurde das QuantiTec® Reverse Transcription Kit von Qiagen (Cat. No. 74804) verwendet. Für die Umschreibung in cDNA wurde zunächst jeweils zwei Gruppen aus Abort und Abortio gepoolt. Ein Pool bestand aus 9 RNA Proben von je 13 µl. Die Umschreibung mit diesem Kit besteht aus zwei Teilschritten. Zunächst wurden die RNA Proben mit einem DNase haltigen Buffer inkubiert. Dies diente dazu, genomische DNA zu eliminieren. Eine PCR (bei der keine m-Primer verwendet werden) ist nur sinnvoll, wenn die Ausgangsprobe ausschließlich RNA enthalten hat. Sind noch Reste von genomischer DNA vorhanden, so können diese bei der folgenden PCR nicht von der aus der RNA gewonnenen cDNA unterschieden werden. Die PCR würde durch die Kontamination mit genomischer DNA für alle untersuchten Marker falsch-positiv und hätte keinerlei Aussagekraft. Obwohl in diesen Versuchen genau nach dem QuantiTec® Reverse Transcription Handbook vorgegangen wurde, zeigt sich bei der folgenden PCR jedoch eine Kontamination mit genomischer DNA. In Folgeversuchen mit neuen Parametern, wie verlängerten DNase Inkubationszeiten, erhöhten DNase Konzentrationen und die Kombination mit dem DNase Verdauungsschritt aus dem NucleoSpin Kit, konnte schließlich ein modifiziertes Protokoll zu effektiven Elimination der genomischen DNA aus den Proben erstellt werden.

Die Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei RT vorgenommen. Zunächst wurden 50 µl aus dem RNA Pool mit 50 µl RNase freiem Wasser gemischt. Anschließend wurde der RA1-Ethanol Mix mit 300 µl RA1 und 300 µl Ethanol 96% hergestellt. Der RA1-Ethanol Mix wurde zusammen mit den 100 µl RNA-Wasser Eluat in einem Tube durch vortexen vermischt. Im Folgenden wurden 700 µl auf ein Filter Tube (NucleoSpin column blue) pipetiert und für 30 sek bei 8000xg zentrifugiert. (Durchflussvolumen wurde entsorgt und das Sammelgefäß

erneuert). Nun wurden 350 µl MDB Puffer auf den Filter pipetiert und erneut für 30 sek bei 8000xg zentrifugiert. In ein 0,5 ml Tube wurde der DNase Mix aus 10 µl DNase und 90 µl Reaktionspuffer angesetzt. Hiervon wurden 95 µl auf den Filter pipetiert und 15 min inkubiert. Nun folgten drei Waschgänge. Zunächst wurden 200 µl RA2 Puffer auf den Filter pipetiert und für 30 sek bei 11000xg zentrifugiert. (Durchflussvolumen wurde entsorgt). Im zweiten Waschgang wurden 600 µl RA3 Puffer auf den Filter pipetiert und für 30 sek bei 11000xg zentrifugiert. (Durchflussvolumen wurde entsorgt). Im dritten Waschgang wurden nun 250 µl RA3 Puffer auf den Filter pipetiert und für 2 min bei 11000xg zentrifugiert. (Durchflussvolumen wurde entsorgt). Zur Eluation wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesteckt und 60 µl RNase-freies Wasser direkt auf den Filter pipetiert. Durch Zentrifugieren für eine 1 min bei 11000xg wurde die an die Membran gebundene RNA in das Sammelgefäß ausgewaschen. Anschließend wurde der DNase Schritt des QuantiTec® Reverse Transkription Kit angefügt. Jedoch wurde die 4fache DNase Konzentration verwendet. Hierfür wurden 56 µl RNA mit 28 µl DNase und 7 µl Wasser in ein 0,5 ml Tube pipetiert. Dieses Tube wurde im ThermoCycler für 8 min bei 42° inkubiert.

Schema

- 50 µl aus dem RNA Pool mit 50 µl RNase freiem Wasser gemischt
- RA1-Ethanol Mix mit den 100 µl RNA-Wasser Eluat vortexen
- 700 µl von Gemisch auf ein Filter Tube pipetieren
- 30 sek bei 8000xg zentrifugieren
- 350 µl MDB Puffer auf den Filter pipetieren
- 30 sek bei 8000xg zentrifugiert
- 95 µl DNase Mix auf den Filter pipetieren und 15 min inkubieren
- 200 µl RA2 Puffer auf den Filter pipetieren
- 30 sek bei 11000xg zentrifugieren
- 600 µl RA3 Puffer auf den Filter pipetieren
- 30 sek bei 11000xg zentrifugieren
- 250 µl RA3 Puffer auf den Filter pipetieren
- 2 min bei 11000xg zentrifugieren
- Säulenmembran mit 60 µl RNase-freies Wasser durch Zentrifugieren für 1 min bei 11000xg ausgewaschen
- 56 µl RNA mit 28 µl DNase und 7 µl Wasser in Tube vermischen
- ThermoCycler für 8 min bei 42° inkubieren

Im zweiten Schritt erfolgte nun die eigentliche Umschreibung von RNA in cDNA. Hiefür wurden 7 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 7 µl Reverse Transcriptase Primer Mix, 28 µl Reverse Transcriptase Buffer und 84 µl RNA in einem 0,5 ml Tube pipetiert. Dieses wurde im Folgenden für 15 min bei 42° im ThermoCycler inkubiert um ein optimale Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Anschließend wurde der Ansatz auf 95° erhitzt um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die so gewonnene cDNA konnte nun bei 4° gelagert werden.

Schema

- 7 µl Quantiscript Reverse Transcriptase +
7 µl Reverse Transcriptase Primer Mix +
28 µl Reverse Transcriptase Buffer +
84 µl RNA in einem 0,5 ml Tube pipetieren
- Tube für 15 min bei 42° im ThermoCycler inkubieren
- Ansatz auf 95° erhitzen
- gewonnene bei 4° lagern

3.1.3 Real Time RT-PCR nach TaqMan®

Wie bereits erwähnt, ist die PCR eine Methode um DNA in vitro zu vervielfältigen. Hierbei durchlaufen die einzelnen Ausgangs-DNA Moleküle in einer „Kettenreaktion“ mit Hilfe einer DNA-Polymerase, spezifischen Primern und Desoxy-Nukleotiden, zahlreiche, sich ständig wiederholende Vermehrungszyklen. Die Endprodukte eines Zyklus dienen wieder als Vorlage des Nächsten. Mit dieser Technik wird eine exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA möglich. Die Real Time RT-PCR ist eine Erweiterung der RT-PCR. Mit dieser Technik ist zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Diese Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus in „Real Time“ erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Wenn alle PCR-Zyklen beendet sind, wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase numerisch und graphisch dargestellt. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die, meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente, erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung vornehmen. Die für diese Arbeit verwendete Real

Time RT PCR wurde in einer Mikrotiter-Platte mit insgesamt 96 Wells durchgeführt. In jedes Well wurde ein Volumen von 20 μl pipettiert. Dieses setzte sich zusammen aus je 1 μl TaqMan[®] Gene Expression Assay Mix 20fach konzentriert, 10 μl TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix 2fach konzentriert (beide Firma Applied Biosystems, Weiterstadt), 1 μl Template. Auf insgesamt 20 μl Gesamtvolumen wurde mit H₂O (DEPC behandeltes DI Wasser der Firma Sigma, Taufkirchen) aufpipettiert.

Schema

- 1 μl TaqMan[®] Gene Expression Assay Mix +
10 μl TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix +
1 μl Template = Probe +
8 μl H₂O zusammen pipettieren und vermischen
- die jeweils 20 μl Gesamtvolumen auf Mikrotiter-Platte 96 Wells pipettieren

Die Thermozyklen im Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR-Gerät verliefen wie folgt: 20 s bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen Amplifikation mit 3 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C. Um die Assays auszuwerten wurde das ABI PRISM 7500 Fast der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, verwandt. Die Quantifizierung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping-Gen. Da die GAPDH für den Zellerhalt grundsätzlich notwendig ist und immer in konstanter Menge bereitgestellt werden muss, wird dieses Gen weitgehend unabhängig von anderen Einflüssen, den Zelltyp und dem Zellstadium, transkribiert. Es handelt sich hierbei also um ein konstitutiv exprimiertes, nicht-reguliertes Gen. Verrechnet man nun zur Quantifizierung die Werte der GAPDH und des zu analysierenden Genprodukts mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, werden die Werte des gesuchten Gens an den Werten der GAPDH relativiert. Pipettiert wurde davon ebenfalls 1 μl in die entsprechenden Wells.

3.1.4 Quantitative RT PCR mit dem RT² Profiler PCR Array

Die quantitative RNA Expression von insgesamt 84 inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in Lösung bzw. Rezeptorform wurde mit dem RT² Profiler PCR Array PAHS-034 (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD) für Applied Biosystems 7500 Fast durchgeführt. Die RNA stammte aus den oben angeführten plazentaren Geweben aus normalen Schwangerschaften und Aborten. Jeweils die gleiche Menge RNA jeder einzelnen Probe wurde in cDNA umgeschrieben. Die cDNA der Proben wurden in Gruppen von gesunden Schwangerschaften,

spontanen Aborten und rezidivierenden Aborten gepoolt und die PCR Array Analyse entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Als MasterMix wurde der RT² Real-Time SYBR Green PCR Master Mix (SuperArray Bioscience Corporation) verwendet. Die eingesetzte Menge für die PCR betrug 25 µl. Als Parameter für den Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Thermocycler wurden zunächst 1 Zyklus 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 95°C für 15 s und abschließend 60°C für 1 min. Die mRNA Expression wurde entsprechend der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode eingestellt.

3.2 Immunhistologischer Versuchsteil

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, um Proteine, wie z.B. auch Zytokine, mit Hilfe von Antikörpermarkierungen mikroskopisch sichtbar zu machen. Hierfür wurde dasselbe Material wie schon im PCR Versuchsteil verwendet.

3.2.1. Aufbereitung für die Immunhistochemische Färbung

Das gewonnene Gewebe wurde nach Entnahme einem Fixationsprozess unterzogen, um eine Autolyse zu verhindern und eine gute Morphologie zu gewährleisten. Zur Fixation wurde 4%iges neutral gepuffertes Formalin verwendet. Hierbei bildete sich ein starres Gitternetz, indem sich ein Formalinmolekül an ein Protein anlagerte und die Proteine untereinander vernetzt wurden. Eine Denaturierung der Proteine blieb jedoch weitgehend aus, was wichtig für den Nachweis spezifischer Antigenstrukturen war. Die ca. 0,5x1 cm große Abradate wurden 24 h in Formalin fixiert. Nach der Fixierung musste das Formalin ausgewaschen werden. Zum Entwässern wurde ein organisches Lösungsmittel, das eine hohe Affinität zu Wasser hat, benutzt. Das Gewebe durchlief dazu eine Reihe aus einem 70%igem und mehreren absoluten Ethanolen. Als Intermedium (Flüssigkeit, die sich sowohl mit Ethanol, als auch mit Paraffin mischt) fungierte Xylol. Dieses wusch die letzten Reste des Alkohols aus dem Gewebe. Anschließend wurden die fixierten Abradate in Paraffinblöcke eingebettet. Bei diesem Vorgang durchdrang das auf 60°C erhitzte und dadurch flüssige Paraffin das Gewebe und lagerte sich überall dort ab, wo sich ursprünglich Wasser befand, welches im Einbettungsvorgang im vorangehenden Schritt entfernt wurde. Das Gewebe wurde nun mit weiterem Paraffin in Form eines Blocks gegossen. Nach dem Erkalten dieser Paraffinblöcke wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms jeweils 2-3 µm dicke Gewebeschnitte gewonnen und nach Glättung im Streckbad in 45°C warmen Aqua dest. auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete

Objektträger (Superfrost Plus, Fa. Langenbrinck) aufgezoogen. Um eine besser Haftung zu gewährleisten, wurden die Schnitte zusätzlich zur Beschichtung über Nacht bei 56-58°C im Brutschrank getrocknet. Bis zur eigentlichen immunhistochemischen Versuchsreihe wurden die Schnitte nummeriert und in Objektträgermappen aufbewahrt.

3.2.2 Die Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbeverfahren basieren auf der Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an ein von der Zelle exprimiertes, spezifisches Antigen. Diese Bindung kann durch unterschiedliche Detektionsverfahren sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode verwendet. Hierzu wurde ein spezifischer Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser war über eine Vitamin/Glykoproteinverbindung an eine Peroxidase gekoppelt. Nach Hinzugabe eines Chromogens wurde eine enzymatische Reaktion zwischen diesem und der Peroxidase gestartet, in deren Verlauf sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbniederschlag bildet. Diese Farbreaktion konnte im Lichtmikroskop analysiert werden.

3.2.3 Durchführung der Immunhistochemischen Färbung

Bevor eine immunhistochemische Färbung begonnen wurde, musste zunächst das Paraffin aus dem Gewebe entfernt werden (Entparaffinierung). Anschließend wurden die durch Aldehydvernetzung maskierte Epitopen durch Hitzebehandlung demaskiert (Antigendemaskierung im Schnellkochtopf) und eine unspezifische Anlagerung der Antikörper durch ein Blockierserum verhindert (Blockierung). Nach der Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper wurde die eigentliche Färbereaktion zwischen dem AB-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex) und einem Substrat (Chromogen) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte noch gegengefärbt (Gegenfärbung) und eingedeckt (Dehydrierung und Eindeckung). Die immunhistochemische Färbung erfolgte grundsätzlich in einer feuchten Kammer, damit während der einzelnen Inkubationsschritte die Schnitte nicht austrocknen konnten.

Entparaffinierung

Um mit der immunhistochemischen Färbung beginnen zu können, musste zunächst das Paraffin aus dem Schnitt mit Xylol herausgelöst werden. Die Paraffinschnitte wurden für 15 Minuten in Xylol (J. T. Baker, Deventer, Holland) entparaffiniert und anschließend je 2 mal 2 Minuten in 100%igen Ethanol (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität, München, Deutschland) gespült. Die

endogene Peroxidase wurde durch 20-minütiges Einwirken in 3%igem H₂O₂ in Methanol (= 3 ml 30%iges H₂O₂ + 97 ml Methanol-Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland) blockiert, da diese bei der späteren Färbereaktion stören und zu unspezifisch positiven Ergebnissen hätte führen können. Im Folgenden wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%igen, 96%igen und 70%igem Ethanol durch zweimaliges, zweiminütiges Spülen rehydriert und Ethanolreste mit Aqua dest. heraus gewaschen.

Antigendemaskierung im Schnellkochtopf

Zur Darstellung bestimmter Antigene war es unumgänglich eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung vorzunehmen. Durch diese Art der Antigendemaskierung können Antikörper auch Epitope erkennen, die zuvor durch Aldehydvernetzung maskiert waren. Die durch Formalin verursachte Proteinvernetzung wurde durch das Erhitzen der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung (Citrat-Puffer pH 6,0) wieder aufgehoben. Die Antigenmaskierung erfolgte durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit einem Na-Citratpuffer, pH 6,0. Der Dampfkochtopf wurde mit Puffer gefüllt und die Platte auf maximale Temperatur gestellt. Nach 7 Minuten fing der Puffer an zu kochen und die Schnitte wurden eingestellt, der Deckel verschlossen. Nach 4 Minuten konnte die Herdplatte auf ein Viertel der maximalen Temperatur heruntergeregelt werden. Nach weiteren 5 Minuten wurde der Topf in ein Wasserbecken gestellt und konnte langsam abkühlen. Nach Öffnen des Deckels wurde vorsichtig Leitungswasser zum Puffer gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua. dest gespült und 2 mal 2 Minuten in PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen.

Blockierung

Der Blockiervorgang sättigte mit Hilfe eines Normalserums elektrostatische Ladungen im Gewebe und verhinderte, dass Immunoglobuline sich durch hydrophobe Bindungen unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe banden. Somit wurde eine unspezifische Anlagerung der Antikörper und dadurch eine unspezifische Anfärbung verhindert. Zunächst wurde ein Blockierserum mit einer Einwirkzeit von 20 Minuten aufgetragen und danach wieder abgeschüttet.

Primär-und Sekundärantikörper

Anschließend wurde der Primärantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte 2 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper für 30 Minuten Einwirkzeit aufgetragen und anschließend wieder 2 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Die

optimale Antikörperkonzentration und Inkubationszeit wurde in Vorversuchen ausgetestet und gemessen.

Avidin-Biotin-Komplex

Nach Waschen in PBS (2 mal 2 Minuten) wurde im Folgenden der ABC-Komplex (Einwirkzeit 30 Minuten) aufgetragen und in PBS gewaschen (2 mal 2 Minuten). Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) basiert auf der Affinität zwischen dem niedermolekularen Vitamin Biotin und dem Glykoprotein Avidin, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Tetramer. Es besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Da es teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, wurde auf gentechnischem Weg ein reineres Produkt gewonnen, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isolierte Streptavidin. Über einen gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper wird der Primärantikörper, wie z.B. IL-15, mit dem vorgeformten Avidin-Biotin-Enzymkomplex (AB-Complex) verbunden. Das Avidin-Molekül hat eine sehr hohe Affinität für Biotin. Die Bindung ist irreversibel. Der Komplex wird so produziert, dass an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird.

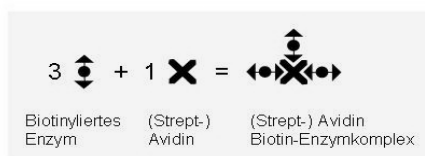
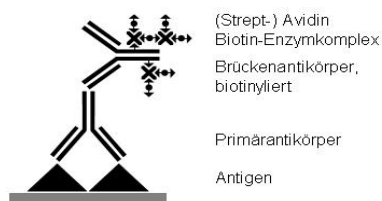


Abbildung 4 ABC-Komplex (Noll, Schaub-Kuhnen 2000)

Chromogen

Die Substratfärbung erfolgte mit dem Chromogen DAB (Dako North America, Carinteria, USA). An den Avidin-Biotin-Komplex ist ein Enzym gekoppelt, in diesem Fall die Peroxidase. Durch Hinzugabe der Substrat/Chromogenlösung (3-4 min) wurde eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase gestartet, in deren Verlauf sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbniederschlag bildet. Diese im Lichtmikroskop sichtbare Farbreaktion entstand, indem das Enzym

Peroxidase mit dem Substratpuffer H_2O_2 als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen (DAB) ein farbiges Endprodukt bildete. Im Falle von DAB war dieses in organischen Lösungsmitteln unlöslich.

Danach wurden die Schnitte 2 mal 2 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Die Substrat-Chromogen-Reaktion konnte nicht unterscheiden, ob die Peroxidase endogen, d.h. im Gewebe lokalisiert ist, oder ob sie nachträglich zugegeben wurde (ABC-System mit Peroxidase). Um endogene Peroxidase außer Kraft zu setzen wurden die Schnitte in H_2O_2 inkubiert. Das Chromogen (DAB 3,3 Diaminobenzidin) konnte mit Hilfe des Substratpuffers und des Katalysators H_2O_2 einen Farbkomplex bilden.

Gegenfärbung

Um eine Übersicht über die gesamte Zellmorphologie zu erhalten, erfolgt noch eine Gegen- bzw. Übersichtsfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland). Dabei handelt es sich um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung mit einem pH-Wert von 4,5. Die Schnitte wurden hierfür für 2 Minuten gegengefärbt. In dem sauren Milieu werden nur die Kerne angefärbt, da diese negative Ladungen besitzen. Dabei lagern sich die positiv geladenen basischen Farbstoffe an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNS im Kern an. Das Auswaschen der Säurereste und das Bläuen erfolgte mit Leitungswasser (alkalisches Milieu).

Dehydrierung und Eindecken

Zum Schluss wurden die fertig gefärbten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem, 96%igem und absolutem Ethanol dehydriert. Anschließend erfolgte die Aufhellung in Carbolxylol (Apotheke, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland) und Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland). Zur Haltbarmachung wurden die Präparate luftdicht mit dem Einschlussmittel „Consul-Mount“ (Shandon, Pittsburgh, USA) eingedeckt und verschlossen. Für das Einschlussmittel gilt, dass es den gleichen Brechungsindex wie Glas haben muss, damit die Färbung nicht beeinflusst wird. Positive Zellen zeigten eine bräunliche Färbereaktion, die Negativkontrollen waren blau. Alle Inkubationen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und in der feuchten Kammer durchgeführt.

(Noll, Schaub-Kuhnen 2000)

Schema

- Entparaffinieren für 15 min im Xylol
- 2 x 100% Alkohol
- 20 min in 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase
- 2 x 70% + 2 x 50% Alkohol
- Aqua dest. spülen
- Demaskierung durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer mit Lsg. A, Lsg. B, Na-Citratpuffer GebrauchsLsg, pH 6,0
(siehe: Allgemeine Chemikalien und Lösungsansätze)
- in Aqua dest. spülen
- 2x2 min in PBS waschen
- 20 min Blockierungsserum
(siehe: Allgemeine Chemikalien und Lösungsansätze)
- Abschütten des Blockierungsserums
- Primärantikörper bei 4°C über Nacht, IL-15 Verd.: 1:75 in PBS
- am nächsten Tag 2x2 min in PBS waschen
- 30 min Sekundärantikörper
(siehe: Allgemeine Chemikalien und Lösungsansätze)
- währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes
(siehe: Allgemeine Chemikalien und Lösungsansätze)
- 2x2 min in PBS waschen
- 30 min ABC-Komplex
- 2x2 min in PBS waschen
- 3-4 min Substratfärbung mit DAB (3,3 Diaminobenzidin)
(siehe: Allgemeine Chemikalien und Lösungsansätze)
- 2x2 min in Aqua dest. waschen
- 2 min Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
- 5 min in Leitungswasser bläuen
- aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
- Eindecken mit „Eukitt“

| | | | | |
|-----------------------------|----------|------------|------|--|
| IL-15 (Immunohistchemie) | Maus IgG | monoklonal | 1:75 | R&D Systems, Minneapolis, USA |
|-----------------------------|----------|------------|------|--|

Tabelle 4 verwendeter Primärantikörper, Immunfluoreszenz

3.2.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops (Leica, Solms, Deutschland) durch zwei unabhängige Begutachter, einschließlich einer Pathologin (PD Dr. Doris Mayer, Pathologische Institut der LMU, München). Zunächst wurde das Tumorgewebe bei Lupenvergrößerung (10-fach) aufgesucht und anschließend bei stärkerer Vergrößerung (25-fach) beurteilt. Mitgeführte Positiv- und Negativkontrollen aus jeder Färbereihe bestätigten die immunhistochemische Färbereaktion. Hierbei wurde Lymphknotengewebe von gesunden Frauen als Positivkontrolle verwendet. Zur Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch Negativkontroll-IgG1 in derselben Konzentration ersetzt (DARKO, Glostrup, Denmark).

Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach dem immunoreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner (Remmele, Stegner 1987). Dieser semiquantitative immunoreaktive Score berücksichtigt die Parameter Färbeintensität (Staining Intensity = SI) und den Prozentsatz der immunhistochemisch positiven Zellen (PP) und wird aus dem Produkt dieser beiden Parameter errechnet.

Die Färbeintensität (SI) wird wie folgt unterteilt:

- 0 = keine Färbereaktion
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) wird eingeteilt in:

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = < 10% positive Zellen
- 2 = 10-50% positive Zellen
- 3 = 51-80% positive Zellen
- 4 = > 80% positive Zellen

Durch Multiplikation beider Parameter kann der IRS - Score einen Wert zwischen 0 und einem Maximalwert von 12 annehmen.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab folgende Expressionsgrade:

- 0 = keine Expression
- 1 - 3 = geringe Expression
- 2 - 8 = mäßige Expression
- 9 -12 = starke Expression

Mit Hilfe einer digitalen Kamera (Olympus, Tokyo, Japan) konnten Abbildungen gemacht werden. Der IRS-Score von IL-15 wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests nach Rangwerten (Kruskal and Wallis) verglichen. Der Mann-Whitney Rangsummen-Test wurde genutzt, um die Mittelwerte der Färbeintensität (SI) zu vergleichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ beidseitig festgelegt. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows® (Social Sciences computer software version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.2.5 Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Auch die Immunfluoreszenz basiert auf der Bindung eines Primärantikörpers an ein nachzuweisendes Antigen. Anders als bei der Immunhistologie wird diese Bindung über Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) sichtbar gemacht. Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ist eine Erweiterung dieser Färbemethode. Hierbei werden, um eine Simultanexpression zweier Proteine an der gleichen Zelle nachzuweisen, in einem Färbvorgang zwei verschiedene Primärantikörper unterschiedlicher Spezies verwendet, die jeweils mit ihrem spezifischen Antigen eine Antigen-Antikörper Bindung eingehen. Somit werden zwei verschiedenen Antigene, parallel, mittel Fluoreszenz detektiert. Die Eigenfluoreszenz eines Stoffes bezeichnet man als primäre Fluoreszenz, das sekundäre Aufleuchten eines Fluorochroms durch Energieanregung als sekundäre Fluoreszenz. Fluorochrome sind Stoffe mit der Fähigkeit, Licht einer bestimmten Wellenlänge aufzunehmen (Absorption) und anschließend Photonen mit einem anderen Wellenlängenbereich wieder abzugeben (Emission). Zum Mikroskopieren wird ein spezielles Mikroskop verwendet, das mit Hilfe einer Quecksilberlampe ein sogenanntes diskontinuierliches Licht erzeugt, das heißt, dass die Lampe ein definiertes Lichtspektrum, also nur ausgesuchte Wellenlängen abgibt. Innerhalb des Mikroskops gibt es Anregungsfilter, deren Aufgabe es ist, nur Licht einer definierten Wellenlänge zum Präparat durchzulassen. Somit wird nur das Fluorochrom angeregt, welches für die Reaktion entscheidend ist. Daneben gibt es Emissionsfilter, welche das Anregungslicht zurückhalten und nur die Emission durchlassen. Es ist daher wichtig die Wellenlänge eines Fluorochroms sowohl für das Absorptions- als auch das Emissionsspektrum zu kennen, da sonst eine falsche Filterauswahl getroffen wird und man kein positives Signal erhält. Für Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden acetonfixierte Gefrierschnitte der gleichen Gewebereihen wie auch schon im PCR Versuchsteil und im

immunhistochemischen Färbeteil verwendet. Die angegebenen Inkubationen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

3.2.6 Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die bei -80°C gelagerten Objektträger wurden in Alufolie zugedeckt 10 min lang bei RT aufgetaut und dann ungefähr 20 min getrocknet. Nach der Fixierung mit Aceton für 5 min wurden die Präparate erstmals mit PBS 3-mal für 2 min gespült.

Blockierung

Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mit Ultra V Block für 15 min. Nach diesem Schritt wurden die Präparate nicht mit PBS gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen nicht wieder freizulegen.

Primär-und Sekundärantikörper

Der Primär-Ak 1 (IL-15) wurde zugegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Vor dem nächsten Schritt wurden die Objektträger erneut 3-mal für 2 min mit PBS gespült. Anschließend wurde der jeweilige Primär-Ak 2 (Prolaktin oder CK7) hinzugegeben und wiederum für 3 mal 2 min mit PBS gespült. Ab diesem Zeitpunkt muss möglichst ohne Lichteinwirkung gearbeitet werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind, im Sonnenlicht schnell zerfallen. Der mit dem Farbstoff Cy 2 (grün) markierte Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG (Fa. Dianova), welcher mit dem polyklonalen Antikörper Inhibin A reagiert, wurde verdünnt. Der mit dem Farbstoff Cy3 (rot) markierte Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper wurde verdünnt und auf die Präparate mit dem monoklonalen Primärantikörper aufgetragen. Die Präparate inkubierten anschließend 30 min bei RT. Der Sekundärantikörper wurde dann in einer letzten PBS-Spülung (3 x 2min) abgewaschen und die Präparate trockneten im Dunkeln.

Eindecken

Das Eindecken erfolgte mit einem Mounting Medium der Fa. Vector, welches DAPI (4,6 Diamino-2-Phenylindol) enthält. Dieser blau leuchtende Fluoreszenzfarbstoff bindet spezifisch an DNA und dient der Anfärbung der Zellkerne.

| | | | | |
|-----------------------|---------------|------------|-------|-----------------------------|
| CK 7 | Maus IgG | monoklonal | 1:30 | Novocastra, Berlin, Germany |
| Prolaktin | Maus IgG | monoklonal | 1:500 | Serotec, Oxford, UK |
| IL-15 (Doppelfärbung) | Kaninchen IgG | polyklonal | 1:100 | Serotec, Oxford, UK |

Tabelle 5 verwendete Primärantikörper, Immunfluoreszenz

| | | | | |
|---------------------------|-----------|------------|-------|---------------------------|
| Ziege-anti-Maus Cy3 | Ziege IgG | polyklonal | 1:500 | Dianova, Hamburg, Germany |
| Ziege-anti-Kanienchen Cy2 | Ziege IgG | polyklonal | 1:100 | Dianova, Hamburg, Germany |

Tabelle 6 verwendete Sekundärantikörper, Immunfluoreszenz

Schema

- Präparat 20 min trocknen lassen
 - Fixierung mit Aceton für 5 min bei RT
 - Präp. Trocknen lassen
 - Spülen mit PBS 3 x2 min
 - Ultra V Block für 15 min bei RT
 - abklopfen
 - Primär-Ak 11 (IL-15) 1:100 verdünnen in Verdünnungsmedium
Primär-Ak (Dako S322)
 - 60 min bei RT inkubieren
 - dPBS spülen für 3 x2 min
 - Primär-Ak 2 (Prolaktin 1:500 oder CK7 1:30)
verdünnen in Verdünnungsmedium (Dako S3222)
 - 60 min bei RT inkubieren
 - PBS spülen für 3 x 2 min
 - Sekundär Ak 1 Ziege-Anti-Maus IgG Cy 3 markiert 1:500
 - Verdünnen Verdünnungsmedium (Dako S3022)
 - Sekundär AK 2 Ziege-Anti-Kanienchen IgG Cy2 markiert 1:100
mit Verdünnungsmedium (Dako 3022)
 - Beide Sekundär-AK mischen und 30 min bei RT inkubieren
 - PBS spülen für 3 x 2 min
 - Präparate im Dunkeln trocknen lassen
 - Eindecken mit mounting medium for fluorescence mit DAPI
(Fa.: Vectashield H-1200)
- (Noll, Schaub-Kuhnen 2000)

3.3 Statistik

Statistisch ausgewertet wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows® (Social Sciences computer software version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden die ΔCt -Werte der einzelnen Wells der Kontrollen mit den Werten der Aborte verglichen. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

4.1 RT² Profiler PCR Array

Die RT² Profiler PCR Array Analyse zeigte zahlreiche relative Veränderungen im Zytokin und Zytokinrezeptorprofil zwischen der Kontrollgruppe und den Aborten. Für diese Arbeit relevante Faktoren, die sich bei den Aborten relativ zu der Kontrollgruppe erhöht zeigten, waren TNF, JAK2, IL-2, FASLG und IL-15. Dahingegen waren bei den Kontrollgruppen IL-18, der IL-6 Rezeptor, IL-6 und IL-12 relativ zur Abortgruppe erhöht.

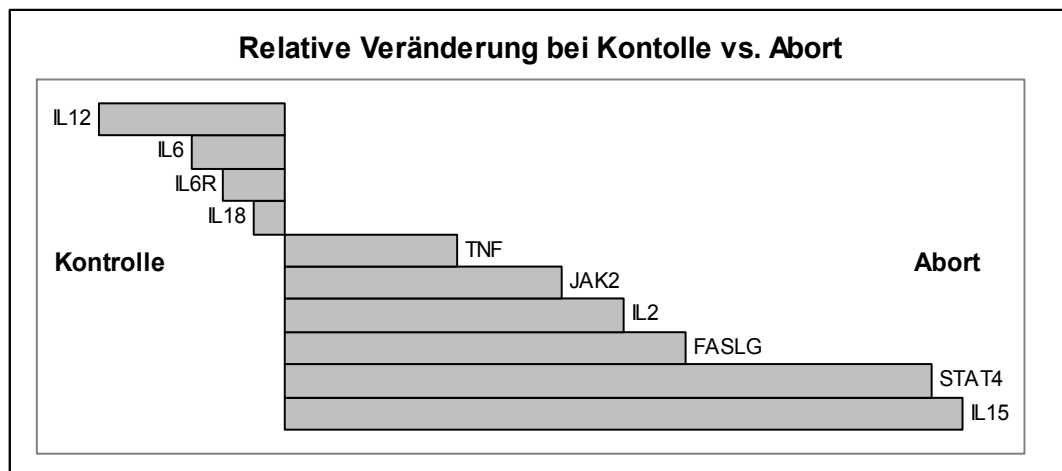


Abbildung 5 Relative Veränderungen im mRNA Expressionsprofil bei Kontrolle vs. Aborte

4.2 Immunhistochemie

Die Expression von IL-15 konnte im Zytoplasma der betrachteten Zellen sowohl bei der Kontrollgruppe, den bis dato einmaligen „spontanen“ Aborten (SA), als auch bei den rezidivierenden Aborten (RSA) nachgewiesen werden. Betrachtet wurden jeweils die extravillösen Trophoblasten, die Synzytiotrophoblasten sowie die epitheliale Stromazelle der Dezidua.

4.2.1 Extravillöse Trophoblasten

Die extravillösen Trophoblasten (EVT) zeigten in der Kontrollgruppe immunhistochemisch nur eine schwache Färbereaktion für IL-15. Im Vergleich dazu konnte bei den spontanen Aborten und den rezidivierenden Aborten eine erhöhte Expression nachgewiesen werden.

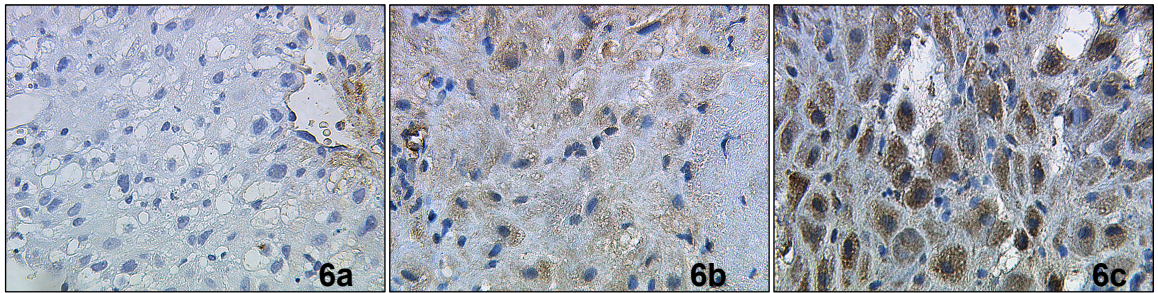


Abbildung 6a-c Expression von IL-15 in extravillösen Trophoblastenzellen der Kontrollgruppe (6a), der Spontanabortgruppe (6b) und der Gruppe der rezidivierenden Aborte (6c), 25 x Objektiv.

Anhand des IRS-Scores konnte für die extravillösen Trophoblasten (EVT) eine signifikant erhöhte Färbedetektion in der Gruppe der rezidivierenden Aborte und der Spontanaborte im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. ($p=0.001$)

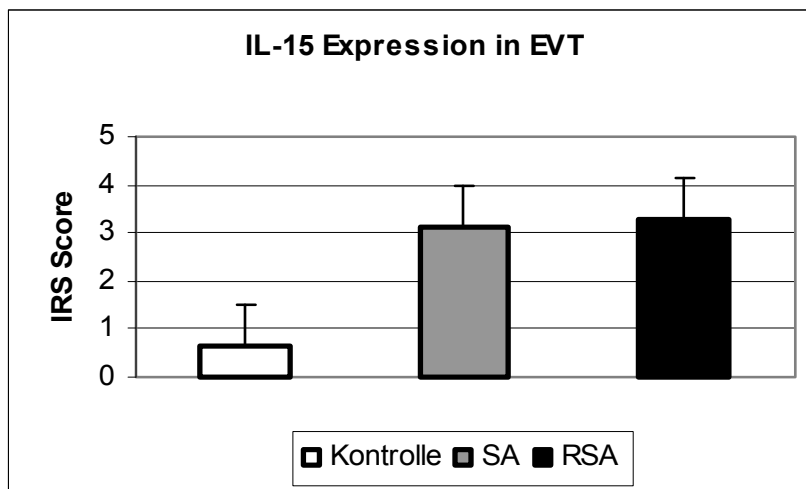


Abbildung 6d Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung (IRS-Scores) für die Lokalisation der IL-15 Färbedetektion in in extravillösen Trophoblastenzellen von spontanen Aborten (SA) rezidivierenden Aborten (RSA) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) im ersten Trimester (mean+SEM).

Die Paaranalyse für die 7. bis 12. SSW zeigte eine relativ konstante Expression von IL-15 in den EVT.

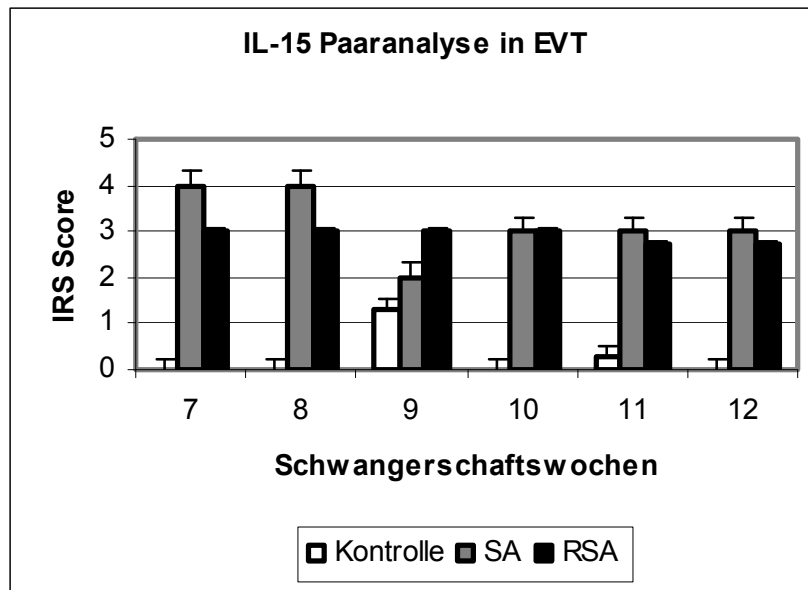


Abbildung 6e Paaranalyse für IL-15 Expression im EVT von der 7. bis 12. SSW für Kontrolle, SA und RSA

Hieraus ergab sich für die Gruppe RSA eine 5,5 fach erhöhte und für die Gruppe der SA eine 5,2 fach erhöhte IL-15 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

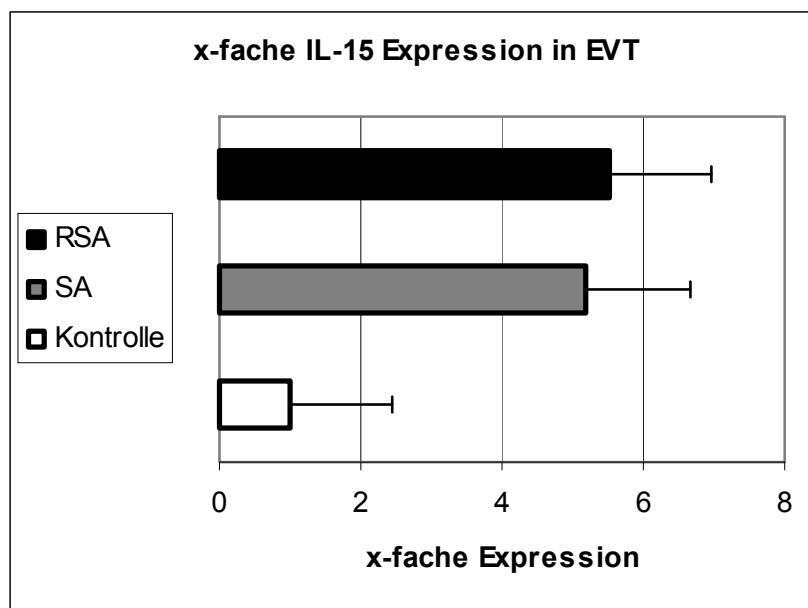


Abbildung 6f x-fache Expression von IL-15 in den EVT für Kontrolle, SA und RSA anhand des IRS Scores

4.2.2. Synzytiotrophoblasten

Auch die Synzytiotrophoblasten (ST) zeigten in der Kontrollgruppe immunhistochemisch nur eine schwache Färbedetektion für IL-15. Im Vergleich dazu konnte bei den rezidivierenden Aborten eine erhöhte Expression nachgewiesen werden.

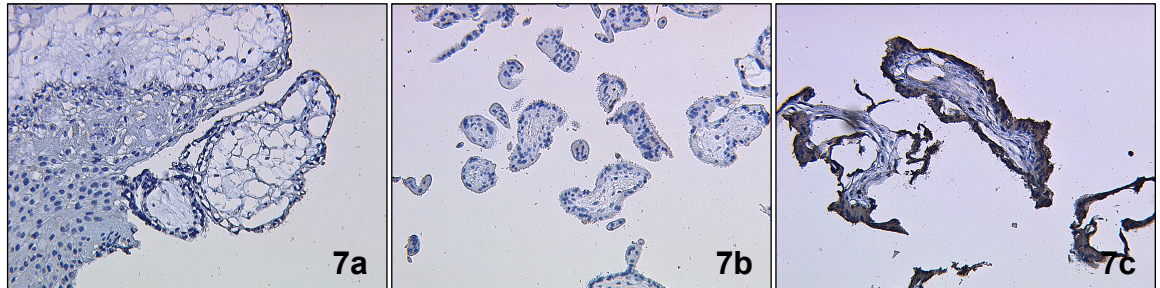


Abbildung 7a-c Expression von IL-15 in Synzytiotrophoblastenzellen der Kontrollgruppe (7a), der Spontanabortgruppe (7b) und der Gruppe der rezidivierenden Aborte (7c), 10x Objektiv.

Anhand des IRS-Scores konnte für die Synzytiotrophoblasten (ST) eine signifikant erhöhte Färbedetektion in der Gruppe der rezidivierenden Aborte im Vergleich zur Kontrollgruppe gesehen werden ($p=0.046$). Die Spontanaborte zeigten keine erhöhte Expression (ohne Signifikanzniveau).

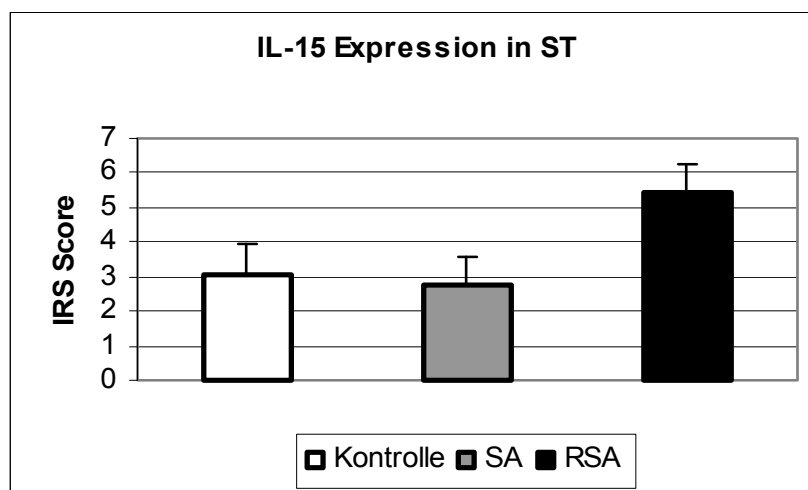


Abbildung 7d Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung (IRS-Scores) für die Lokalisation der IL-15 Färbedetektion in in Synzytiotrophoblastenzellen von spontanen Aborten (SA) rezidivierenden Aborten (RSA) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) im ersten Trimester (mean+SEM).

Die Paaranalyse für die 7. bis 12. SSW zeigte eine relativ konstante Expression von IL-15 in den Syncytiotrophoblasten bei den RSA.

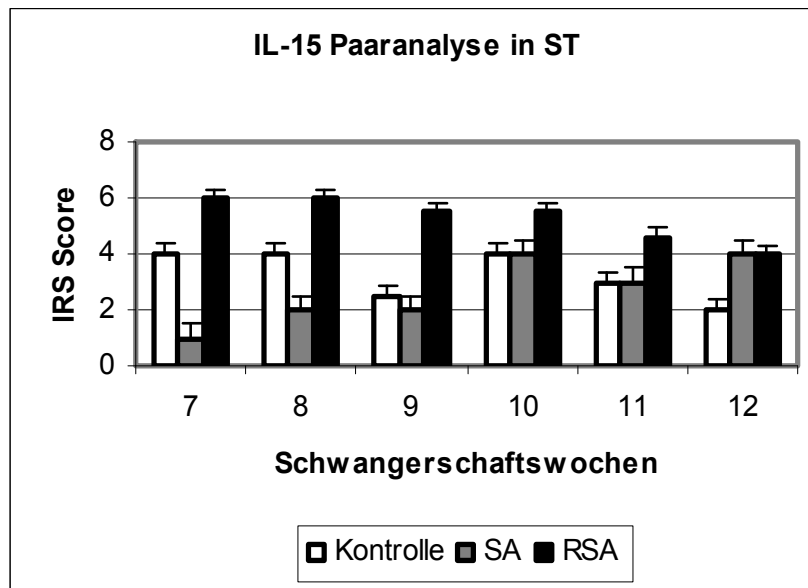


Abbildung 7e Paaranalyse für IL-15 Expression im Synzytiotrophoblasten von der 7. bis 12. SSW für Kontrolle, SA und RSA

Hieraus ergab sich für die Gruppe RSA eine 1,7 fach erhöhte IL-15 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

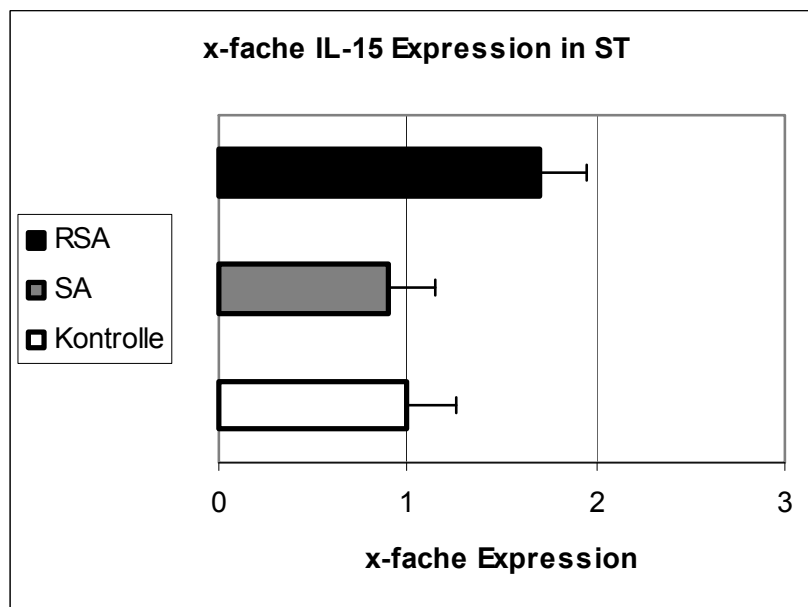


Abbildung 7f x-fache Expression von IL-15 im Synzytiotrophoblasten für Kontrolle, SA und RSA anhand des IRS Scores

Die epithelialen Stromazellen unterschieden sich in keiner der drei Gruppen und zeigten eine gleich schwache Färbedetektion für IL-15.

4.3 Real Time RT PCR

Die Expression von IL-15 im Kontroll- und Abortgewebe wurde auf mRNA-Ebene mittels einer quantitativen RT-PCR nachgewiesen. Dies bestätigte die in der Immunhistochemie gefundenen Ergebnisse. Hierbei ergab sich im Vergleich mit den Kontrollen ebenfalls eine vermehrte Expression der untersuchten Parameter im Abortgewebe.

Für IL-15 war die Expression in der Gruppe der rezidivierenden Aborte 31,7fach signifikant erhöht. Auch im Spontanabortgewebe war die Expression 16,4fach signifikant erhöht.

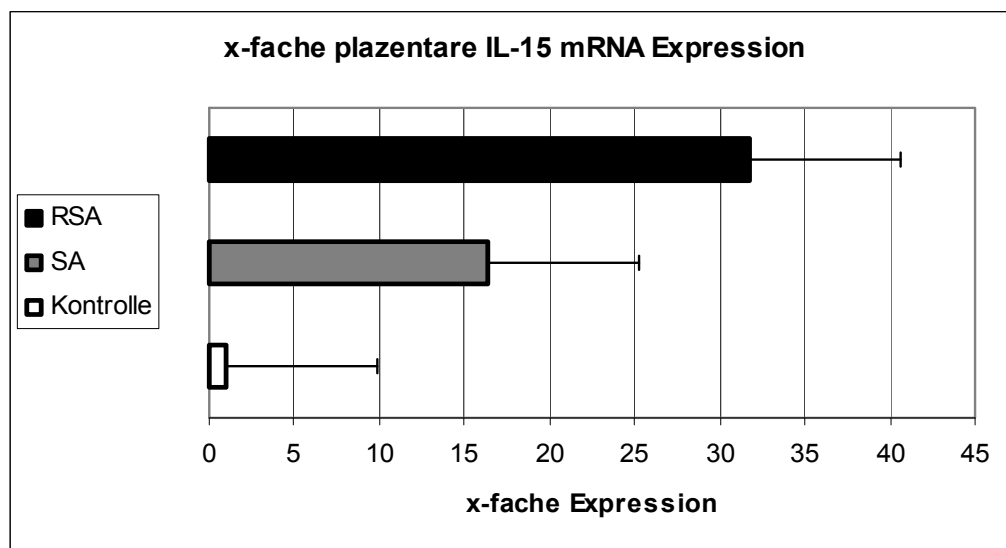


Abbildung 8 Expression von IL-15 mRNA in plazentaren Gewebe von rezidivierenden Aborten, Spontanaborten und der Kontrollgruppe

4.4 Immunfluoreszenz Doppelfärbung

Cytokeratin 7 (CK7) diente als spezifischer Marker für Zellen des extravillösen Trophoblasten. Die Gefrierschnitte wurden jeweils mit CK7 und den einzelnen zu untersuchenden Antikörpern (IL-15) inkubiert.

Die Abbildungen 5a-c zeigen die IL-15 markierenden Antikörper grün, die CK7 markierenden Antikörper rot abgebildet. Bei der Triple filter excitation wurden alle Filter übereinander gelegt. Gelb bedeutet hierbei, dass der rot und grün markierte Antikörper an genau derselben Stelle, also innerhalb einer Zelle, detektiert. Somit werden die Loci der EVT mit gleichzeitiger Expression von IL-15 sichtbar. Die

Zellkerne sind blau angefärbt. Mit Hilfe dieser Immunfluoreszenz Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den IL-15 exprimierenden Zellen um die extravillösen Trophoblasten handelt.

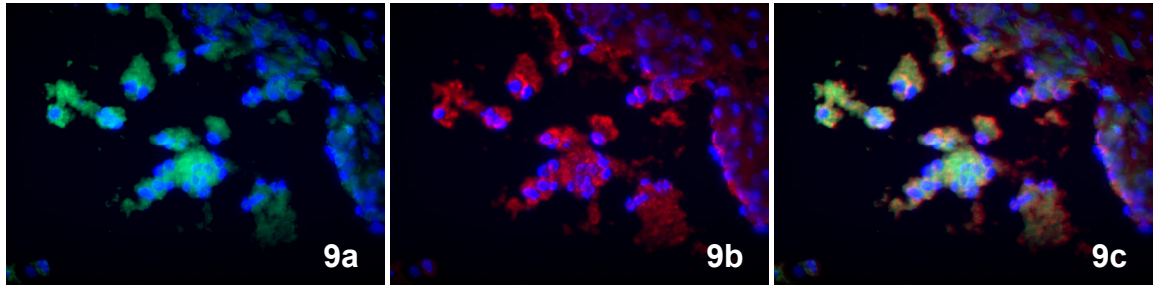


Abbildung 9a-c IL-15 (9a) und CK7 (9b) werden im extravillösen Trophoblasten (EVT) exprimiert. Die Triple filter extraktion (9c) zeigt eine simultane Expression von IL-15 and CK7 in derselben Zellentität, 40x Objektiv

In weiteren Färbereihen diente Prolaktin als spezifischer Marker für deziduale Stromazellen. Die Gefrierschnitte wurden jeweils mit Prolaktin und den einzelnen zu untersuchenden Antikörper (IL-15) inkubiert. Die angefärbten Zellen zeigten keine simultane Expression von IL-15 und Prolaktin.

Die Abbildungen 6a-c zeigen die IL-15 markierenden Antikörper grün, die Prolaktin markierenden Antikörper rot abgebildet. Bei der Triple filter exctation wurden alle Filter übereinander gelegt und somit ist die gleichzeitige Detektion der Antikörper sichtbar. In analoger Auswertung zur vorherigen Färbereihe konnte somit nachgewiesen werden, dass die dezidualen Stromazellen kein IL-15 exprimieren.

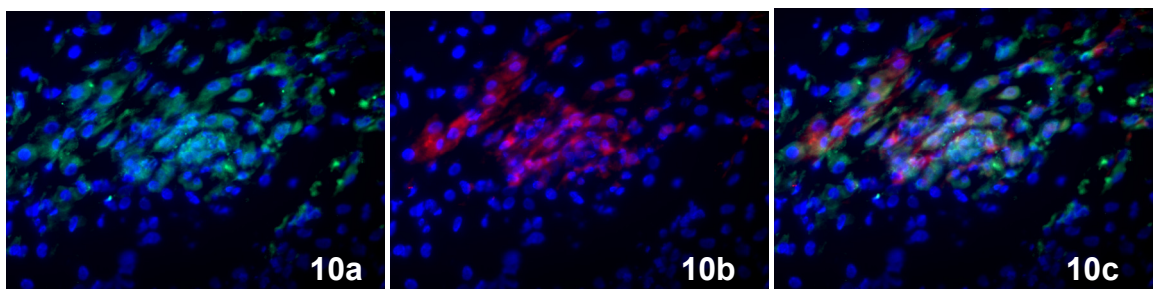


Abbildung 10a-c IL-15 (10a) und Prolaktin (10b) werden in der dezidualen Stromazelle exprimiert. Die dreifachfilter Extraktion (10c) zeigt keine simultane Expression von IL-15 and Prolaktin in derselben Zellentität, 40x Objektiv

5. Diskussion

Der RT² Profiler PCR Array zeigte eine Deregulierung von 14 Komponenten des Th1/Th2 Systems wobei ein Zytokin, IL-15, besonders hervorstach. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Expression von IL-15 im plazentaren Gewebe von physiologischen Schwangerschaften und solchen, die in einem Abort endeten, mit Hilfe der Real Time RT-PCR auf RNA Ebene und verschiedenen immunhistochemischen Methoden auf Proteinebene untersucht. IL-15 mRNA war im plazentaren Gewebe von Abortgeschehen im Vergleich zu den physiologischen Schwangerschaften signifikant erhöht. Diese Ergebnisse konnten in Folge auch immunhistochemisch auf Proteinbasis bestätigt werden. Die höchste Expression von IL-15 auf mRNA und Proteinbasis zeigte sich hierbei in der Gruppe der Patientinnen mit rezidivierenden Aborten. In der Aufschlüsselung der einzelnen Zellpopulationen erwiesen sich die EVT signifikant als der Hauptexpressionsort von IL-15. Diese Ergebnisse wurden mit der Immunfluoreszenz Doppelfärbung bestätigt.

5.1 IL-15 im Wandel der Zeit

Aufgrund der breiten Spanne an regulativem Potential auf viele essentielle Zellen der feto-maternalen Grenzzone, stellt IL-15 ein entscheidendes Zytokin in der Schwangerschaft dar. In Bezug auf das Abortgeschehen konnte bisher jedoch nur ein allgemeiner Zusammenhang zwischen vermehrten Aborten und einer Dysregulation von IL-15 aufgezeigt werden. Die tatsächliche Rolle, die dieses Interleukin im Abortprozess spielt und welche physiologischen Aufgaben es an der feto-maternalen Grenzzone besitzt, sind zu großen Teilen noch ungeklärt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gab es nur zwei Studien, in denen IL-15 isoliert zum Thema fehlgesteuerter Schwangerschaften betrachtet wurde. So beschrieben Fortunato et al. (1998) eine erhöhte IL-15 Produktion in humanen fetalen Membranen und im Fruchtwasser bei Patientinnen mit Frühgeburten (Fortunato, Menon et al. 1998). In einer anderen Studie konnten Chegini et al. (2002) Unterschiede in der Expression von IL-15 im Menstruationszyklus im Endometrium von gesunden fertilen Frauen und Patientinnen, die von rezidivierenden spontanen Aborten betroffen waren, beobachten. Hierbei zeigte sich kurz nach und vor dem Auftreten der Regelblutung ein Gipfel der IL-15 Sekretion auf mRNA- und Proteinbasis. Die IL-15 Expression war hierbei bei nicht schwangeren RSA Patientinnen höher als bei gesunden fertilen Frauen (Chegini, Ma et al. 2002). Zourbas et al (2001) beschrieben schließlich noch eine allgemein erhöhte Expression verschiedener pro- und

antiinflammatorischer Zytokine in verschiedenen Schwangerschaftsstadien bei Mäusen auf immunhistochemischer Ebene. Hierbei ließ sich auch die Expression des proinflammatorischen IL-15 in der frühen Implantationsphase, der mittleren Gestationsdezidua und Plazenta, sowie in den fetalen Gefäßen nachweisen. Die späte Plazenta zeigte jedoch keine streng lokalisierte IL-15 Färbereaktion (Zourbas, Dubanchet et al. 2001).

Nachdem sich in den Versuchsreihen der hier diskutierten Arbeit IL-15 auf mRNA und Proteinebene bei Patientinnen mit RSA als signifikant erhöht gezeigt hatte, war das Ziel, mögliche Erklärungsmodelle für diese vermehrte Expression vor dem zellulären Hintergrund verschiedener Akteure an der feto-maternalen Grenzzone herauszuarbeiten. Trotz der wenigen Arbeiten in denen IL-15, isoliert betrachtet, in Zusammenhang mit Aborten gebracht wird, stößt man in der Pathophysiologie von Aborten bei Untersuchungen an der feto-maternalen Grenzzone sehr häufig auf Zellentitäten, die mit IL-15 in enger regulativer Verbindung stehen und somit eine mögliche Brücke zwischen IL-15 und dem Abortgeschehen schlagen können. In der Zusammenschau der eigenen Ergebnisse und der aktuellen Literatur, kristallisierten sich drei verschiedene Zellsysteme, die alle eine Schlüsselrolle für eine erfolgreiche Schwangerschaft darstellen und zugleich in engen Zusammenhang mit IL-15 gebracht werden können, heraus. Dies sind zunächst einmal die T-Zellen und die NK-Zellen als Vertreter des maternalen Immunsystems und als Vertreter der embryonalen Zellpopulation die Trophoblasten, die ihrerseits in engen Kontakt mit dem maternalen Immunsystem treten.

Bei der Annäherung an dieses Thema ist es zunächst einmal wichtig, zwei "Epochen" der Zytokinforschung in Bezug auf Schwangerschaft und Abortgeschehen zu unterscheiden. Als einer der Ersten postulierte Chaouat bereits in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts das Th₁/Th₂ Paradigma (Chaouat, Tranchot Diallo et al. 1997). Für etliche Jahre wurde eine erfolgreiche Schwangerschaft als ein „Th₂ Phänomen“ betrachtet (Wegmann, Lin et al. 1993). In Bezugnahme auf das traditionelle Th₁/Th₂ Paradigma taucht IL-15 als ein „proinflammatorisches schwangerschaftsgefährdendes Zytokin aus dem Th₁ System“ in Arbeiten zu Aborten auf. Bezeichnenderweise war es dann Chaouat selbst, der, als er zu einer Stellungnahme zu der auf dem Th₁/Th₂ Paradigma basierenden allogenen Immuntherapie gebeten wurde, 2003 dieses in Frage stellt (Chaouat et al. 2003). Das relativ starre und dogmatische Th₁/Th₂ Paradigma wurde nun im Laufe der Jahre revidiert, teilweise erweitert und insgesamt vor einem komplexeren Hintergrund gesehen. Mit dem Verwischen der engen Grenzen des Th₁/Th₂ Paradigmas erschien auch die starre Rolle des IL-15 als

proinflammatorisches schwangerschaftsgefährdendes Interleukin nicht mehr zeitgemäß.

In Bezug auf RSA trat im folgenden Jahrzehnt v.a. eine Zellpopulation zunehmend in den Vordergrund, die NK-Zellen. Im Zuge der Identifizierung der Subpopulation der uNK-Zellen und dem besseren Verständnis für deren entscheidende Rolle in der Plazentation kam auch dem IL-15 aufgrund seiner weitreichenden regulativen und modulatorischen Einflüsse auf die NK-Zellen ein ganz neues Bedeutungsfeld zu. Als dritte und letzte Zellpopulation sind natürlich noch die Trophoblasten zu nennen. Ihre essentielle Rolle für die Plazentation ist bekannt und steht außerhalb jeder Frage. Umso interessanter ist es, dass in dieser Studie zum ersten Mal in den Trophoblasten von RSA Patientinnen eine signifikant erhöhte Expression von IL-15 gefunden werden konnte. Dies gab Anlass, diese Zellen genau in ihrer Eigenschaft als zytokinexprimierende und zytokinabhängige Zellen zu betrachten. Des Weiteren wurde versucht einen Zusammenhang zwischen den Trophoblasten und den NK-Zellen und die Rolle des IL-15 in dieser Interaktion herauszuarbeiten.

Im Folgenden werden, ausgehend jeweils von einer dieser drei Zellpopulationen, verschiedene Erklärungsmodelle und Annäherungen an den Themenkomplex „IL-15 an der fetomaternalen Grenzzone im Zusammenhang mit vermehrten Aborten“ herausgearbeitet und diskutiert.

5.2 IL-15 als ein Modulator und Stimulator zugunsten des Th₁ Systems

Eine Schwangerschaft stellt für den gesamten maternalen Organismus und hier v.a. für das maternale Immunsystem eine außergewöhnliche Situation dar. Ein für das Immunsystem "feindlicher" Organismus, der semi-allogene Fötus, muss toleriert und sogar in den maternalen Organismus integriert werden. Die Etablierung dieser Toleranz ist ein höchst komplexer Vorgang. Es kann davon ausgegangen werden, dass es bei kleinsten Störungen in diesem Prozess zu einer Rückkehr der Zellen des maternalen Immunsystems zu ihrer eigentlichen Aufgabe, nämlich der Eliminierung von allen nicht körpereigenen Zellen und somit auch des semi-allogenen Fötus, kommt.

IL-15 nimmt eine Schlüsselrolle in der T-Zell Regulierung ein. Es ist für die T-Zell Homeostase, für deren Aktivierung, Proliferation und Überleben von besonderer Bedeutung (Kovanen, Leonard et al. 2004). Aufgrund der hohen Expression der IL-15 Rezeptoruntereinheiten IL-2R β (CD122) und IL-15R α bei naiven CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Gedächtniszellen (Rochman, Spolski et al. 2009) kommt diesem Interleukin eine essentielle Rolle in der Entwicklung, dem Proliferationspotential und dem Überleben dieser Zellen zu (Lodolce, Boone et al. 1998) (Kennedy,

Glaccum et al. 2000). Auch die CD4⁺ T-Zelle Homeostase wird, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie die CD8⁺T-Zellen Homeostase, durch IL-15 beeinflusst (Purton, Tan et al. 2007). Des Weiteren führt IL-15 zu einem verbesserten Überleben der dendritischen Zellen, die ihrerseits wiederum eine verstärkte Antigenpräsentation an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zur Folge hat und beeinflusst somit auch indirekt die T-Zellen (Rochman, Spolski et al. 2009). Schließlich hat IL-15 noch weitreichende anti-apoptotische Fähigkeiten (Bulfone-Paus, Ungureanu et al. 1997).

Jedoch sind die T-Zellen nicht die einzigen Zellen des Immunsystems, die von IL-15 mitbeeinflusst werden. So reguliert es beispielsweise auch die sekretorischen Aktivitäten von bestimmten B-Lymphozyten (Armitage, Macduff et al. 1995) und moduliert deren Zell-Zell Kontakt mit dendritischen Zellen. In diesem Zusammenhang ist es mitverantwortlich für die B-Zell Proliferation (Park, Yoon et al. 2004). Des Weiteren werden Mast-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen von IL-15 mitreguliert (Budagian, Bulanova et al. 2006). Dies deckt sich mit einem klinischen Fallbericht einer Patientin mit Hypereosinophilie, bei der im Serum erhöhte Werte von IL-15 gemessen wurden (Means-Markwell, Burgess et al. 2000). Zusammengefasst kommen hier überwiegend proliferative und anti-apoptotische Effekte des IL-15 auf die Zellen zum Tragen. Für die T-Zellen des maternalen Immunsystems im feto-maternalen System besitzt IL-15 offensichtlich entscheidende aktivierende, proliferative, modulatorische und anti-apoptotische Eigenschaften. Somit scheint der Einfluss von IL-15 auf diese Zellen und hier v.a. auf die zellvermittelten Immunreaktionen durch die T-Zelle als gesichert.

Ein Zusammenhang zwischen IL-15 und vermehrten Aborten konnte, wie schon in verschiedenen anderen Studien, auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. In Bezugnahme auf das traditionelle Th₁/Th₂ Paradigma lässt sich nun vermuten, dass bei Patientinnen mit RSA das Gleichgewicht in dem komplexen feto-maternalen Zytokinnetzwerk gestört sein könnte und sich das maternale Immunsystem, stimuliert durch ein pathologisch erhöhtes IL-15, gegen den semi-allogenen Fötus richtet und somit zu einem Abortgeschehen führt. Die T-Zellen sind also durch den IL-15 Stimulus pathologisch weit in Richtung des Th₁ Pols differenziert und tragen durch ihre zytolytischen und sekretorischen Eigenschaften zu einem abortiven, inflammatorischen Milieu bei. Einen weiteren Anhaltspunkt bieten zwei Arbeiten, in denen nachgewiesen wurde, dass bestimmte maternale Immunzellen durch Interleukin-2 dahingehend aktiviert und angeregt werden, dass die Trophoblasten, die normalerweise nicht als feindlich erkannt werden, doch angegriffen werden und Apoptose induziert wird (King, Loke et al. 1990) (Abadia-Molina, Ruiz et al. 1996).

In Anbetracht der engen Verwandtschaft des IL-15 mit dem IL-2 und deren ähnlicher Rezeptorkonfiguration wäre es auch denkbar, dass IL-15 einen ähnlichen Effekt haben könnte.

Ein Ergebnis, das die These des reaktivierten maternalen Immunsystems welches sich gegen den semi-allogenen Fötus richtet, weiter unterstützt, findet sich in einem ganz anderen Bereich der Medizin, der Onkologie. Eine, zwar nur unter Einschränkungen, vergleichbare Situation zeigt sich hier bei der Stammzelltransplantation. Eine gefürchtete Komplikation in der Transplantationsmedizin ist die Graft versus Host Disease (GvHD). Hierbei richten sich zwar die Spenderzellen gegen den Empfänger und nicht anderes herum, wie bei einem Abortgeschehen, jedoch kommt es auch hier zum Aufeinandertreffen zweier unterschiedlicher fremder Zellorganismen, was wiederum das Immunsystem auf den Plan ruft. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei Patienten, die von einer GvHD betroffen waren, in der frühen posttransplantations Phase erhöhte Werte von IL-15 auftraten. Bei Patienten ohne GvHD wurden keine erhöhten Werte von IL-15 festgestellt (Chik, Li et al. 2003).

Dass die Einteilung nach dem dogmatischen ursprünglichen Th₁/Th₂ Paradigma jedoch kritisch zu sehen ist, wurde eingangs bereits erwähnt. Ein vermehrtes Abortgeschehen pauschal auf eine erhöhte Zytokinexpression und Sekretion aus dem Th₁ System zurückzuführen, wäre sicherlich eine starke Vereinfachung, die den tatsächlichen physiologischen Vorgängen während der verschiedenen Stadien einer Schwangerschaft nicht gerecht würde. Tatsächlich ist ein sich in jeder Phase der Schwangerschaft veränderndes Zytokinprofil für den Erhalt einer Schwangerschaft notwendig. In diesem Punkt findet das klassisch postulierte Th₁/Th₂ Paradigma, indem das Th₁ System als alleinig schwangerschaftsgefährdend und das Th₂ System als protektiv angesehen wird, seine Grenzen.

Bisher wurden viele verschiedene Zytokine im feto-maternalen Zusammenspiel beschrieben, häufig jedoch ohne ihre genaue pathophysiologische Rolle zu kennen. Offensichtlich kann ein und dasselbe Zytokine im komplexen Zytokinnetzwerk vor unterschiedlichen zellulären Hintergründen je nach Bedarf vollkommen divergierende Funktionen übernehmen (Whiteside et al. 1994). Außerdem scheint das Zytokinnetzwerk im hohen Maße synergistisch und redundant aufgebaut zu sein. Zusätzlich wurden sogenannte neue Zytokine entdeckt, die nicht in das bisherige Th₁ /Th₂ Paradigma zu passen schienen (Chaouat et al. 2007). So konnten beispielsweise Mäuse, die nicht in der Lage waren die Th₂ Interleukine 4 und 10 zu exprimieren, trotzdem normale

Schwangerschaften austragen (Svensson, Arvola et al. 2001). Ähnliche Ergebnisse zeigten Fallon et al, bei denen IL-5, 9 und 13 knock out Mäuse ebenfalls Schwangerschaften austragen konnten (Fallon, Jolin et al. 2002). Die von Wegemann postulierte Schwangerschaft als ein Th₂ Phänomen ließ sich aufgrund dieser Ergebnisse nur noch schwer halten. Außerdem scheint sich die Th₁/Th₂ Balance in den einzelnen Stadien einer Schwangerschaft zu verschieben. So konnten zwei Studien die „schwangerschaftsgefährdenden Th₁ Zytokine TFN α und IFN γ “ als essentiell im Stadium der Implantation identifizieren (Hunt, Atherton et al. 1990).

Diese Ergebnisse lassen das Zytokinnetzwerk vor einem wesentlich komplexeren Hintergrund erscheinen. So ist wohl eher ein unphysiologisches verschobenes Th₁:Th₂ Verhältnis für einen Abort von kausaler Bedeutung (Chaouat, Ledee-Bataille et al. 2004). Komplexere Modelle des Th₁/Th₂ System soll ein realistischeres Bild der immunologischen Prozesse während der Implantation und der gesamten Schwangerschaft wiedergeben. Das Bild über die Rolle und den Zusammenhang der Zytokine an der feto-maternalen Grenzzone hat sich aufgrund wachsender Erkenntnisse weit über das ursprüngliche Th₁/Th₂ Paradigma hinaus erweitert und zeigt sich vor einem wesentlich komplexeren Hintergrund.

Aktuelle Forschungen über die embryonale Implantation heben zunehmend die Bedeutung der Zytokinsekretion anderer Zellpopulationen, wie z.B. der Trophoblasten und v.a. auch die spezifische Rolle der uterinen NK-Zellen an der feto-maternalen Grenzzone hervor.

5.3 Die erhöhte IL-15 Expression als Selbstschutz der Trophoblasten

Das Abortgeschehen ist mit Sicherheit ein multifaktorielles Ereignis. In den gängigen immunologischen Erklärungsmodellen spielen die Trophoblasten häufig eine Schlüsselrolle. Die Regulation der Trophoblastenaktivität ist sehr komplex und wird über autokrine Wege, vom Trophoblasten selbst, und parakrine Wege, durch den maternalen Organismus, gesteuert. Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist ein entscheidender pathophysiologischer Faktor im Abortgeschehen eine verminderte Invasion der Trophoblasten in das deziduale Gewebe (Hustin, Jauniaux et al. 1990) (Michel, Khong et al. 1990). Hieraus resultiert ein ungenügender und fehlerhafter struktureller Umbau der Spiralarterien, was wiederum zu einer mangelhaften feto-maternalen Konnexion, gefolgt von einem fehlgesteuerten Einstrom von maternalem Blut in den intervillösen Raum, führt. Aufgrunddessen kann es zu einem vorzeitigen oxidativen Stress durch freie Radikale beim Fötus kommen (Burton, Jauniaux 2004). Dies geschieht in einer

Phase der plazentaren Entwicklung, in der deren antioxidative Schutzmöglichkeiten noch nicht im ausreichenden Maße gebildet sind (Watson, Palmer et al. 1997) (Jauniaux, Watson et al. 2000). Der oxidative Stress bedingt in der Folge eine mangelhafte Plazentaentwicklung, die wiederum in einem Abort enden kann (Hempstock, Jauniaux et al. 2003). Diese Hypothese zum Abortgeschehen steht für eine große Anzahl von Aborten, ungeachtet deren letztendlicher Ätiologie, als ursächlich im Verdacht (Jauniaux, Burton et al. 2005). Auch für andere schwangerschaftsbedingte Komplikationen, in denen eine verminderte Trophoblasteninvasion eine Rolle spielt, bietet diese Hypothese ein Erklärungsmodell. So scheint nach aktuellen Erkenntnissen nicht nur dem spontanen Abort, sondern auch der Präeklampsie ursächlich eine mangelhafte Trophoblasteninvasion und daraus resultierender oxidativer Stress zugrunde zu liegen (Burton, Jauniaux et al. 2004). Die entscheidende, eingangs erläuterte, Rolle die gerade der Subpopulation der EVT in diesem Modell zukommt, unterstreicht ihre essentielle Bedeutung an der feto-maternalen Grenzzone.

Ein weiteres Erklärungsmodell zum Abortgeschehen ist, dass die semi-allogenen Zellen des Fötus, wie z.B. die EVT, beim Abortgeschehen vom maternalen Immunsystem als fremd erkannt werden. Normalerweise wird dies durch die spezifische HLA Expression der Trophoblastenzellen verhindert. Ein entscheidender pathophysiologischer Faktor könnte eine fehlerhafte Expression von HLA-G auf den EVT sein. Diese Oberflächenmoleküle hemmen die Aktivität des maternalen Immunsystems, v.a. der NK-Zellen und T-Zellen (Le Gal, Riteau et al. 1999). Basierend auf der sogenannten „missing-self Hypothese“ (Ljunggren, Karre et al. 1990) kann das Fehlen von HLA-G auf den Trophoblasten und der damit ausgebliebenen immunsuppressiven Eigenschaften zu der Abstoßung des Embryos führen (Vince, Johnson et al. 1995). Auch für die Malimplantation bei Präeklampsie könnte eine verminderte HLA-G-Expression des Trophoblasten ein Erklärungsmodell bieten.

Nun konnten in der vorliegenden Arbeit die Trophoblasten und hier besonders die EVT bei Patientinnen mit RSA als der Hauptexpressionsort für IL-15 identifiziert werden. Stellt man nun diese Ergebnisse in einen Kontext mit der herausragenden Bedeutung der EVT für eine erfolgreiche Schwangerschaft, so scheint dieser Zell/Interleukin Interaktion hier eine besondere Bedeutung zuzukommen. Generell fördert IL-15 proinvasive, promigrative (Bischof, Meisser et al. 2000) (Bischof, Campana et al. 2000) und antiapoptotische (Bulfone-Paus, Ungureanu et al. 1997) Eigenschaften. Dieses „maligne“ Potential von IL-15, welches an der feto-maternalen Grenzzone natürlich erwünscht ist, zeigt sich jedoch auch in anderen

Prozessen, in denen es zu einem invasiven Wachstum kommt. So konnte eine erhöhte Expression von IL-15 in Kolonkarzinomzellen deren Wachstum, Überleben, invasives-und angiogenetisches Potential, kurz deren Malignität, steigern (Kuniyasu, Oue et al. 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten bei bestimmten Formen der T-Zell Leukämie aufgezeigt werden. Hier wurde eine Exprimierung des IL-15 Rezeptors auf den Tumorzellen nachgewiesen werden. IL-15 stimuliert auch hier die Invasion und Proliferation der malignen Zellen (Yamada, Sugawara et al. 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IL-15 RNA in verschiedenen neoplastischen Zelltypen, wie dem kutanen T-Zell Lymphom, Melanom, soliden Tumoren wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom, Glioblastom, Nierenzellkarzinom, Neuroblastom und Mesotheliom, exprimiert wird (Budagian, Bulanova et al. 2006).

Führt man sich nun die beiden Aborthypothesen der „mangelhaften Trophoblasteninvasion“ und der „Bedrohung der Trophoblasten durch das maternale Immunsystem“ vor Augen und beachtet man im Hinblick hierauf den Einfluss von IL-15 auf die EVT, so zeigt sich ein enger Zusammenhang mit dem Abortgeschehen. Möglicherweise spiegelt die erhöhte Expression von IL-15 einen kompensatorischen Selbstschutzmechanismus der EVT wieder, die aufgrund verschiedenster möglicher ätiologischer Faktoren, wie z.B. der verminderten Expression von HLA-G, durch das maternale Immunsystem bedroht werden. Im EVT erhöht IL-15 das Invasionspotential und die Migrationsfähigkeit (Bischof, Meisser et al. 2000) (Bischof, Campana et al. 2000). Falls nun eine nur mangelhafte Invasion und Migration der Trophoblasten stattgefunden hat, könnten die EVT durch eine erhöhte IL-15 Expression versuchen, die defizitäre Invasion und Migration zu forcieren und damit die Gefahr einer insuffizienten feto-maternalen Konnexion zu vermindern.

Erweitert wird diese Hypothese noch durch die weitreichenden antiapoptotischen Eigenschaften von IL-15. Minas et al. konnten aufzeigen, dass Aborte mit einer durch maternale Immunzellen induzierten Apoptose von EVT assoziiert sind. Diese wird unter anderem durch die Induktion lymphozytärer Eigenschaften wie z.B. der vermehrten Expression des proapoptotischen FasL vermittelt (Minas, Jeschke et al. 2007). In Bezug auf das bekannte gesteigerte anti-apoptotische Potential von IL-15 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass in vitro die Apoptoseinduktion durch proapoptotische Faktoren wie anti-CD3, Dexamethason, und/oder anti-IgM in aktivierten menschlichen T-und B-Zellen durch IL-15 inhibiert werden kann (Bulfone-Paus, Ungureanu et al. 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass die EVT mittels der IL-15 Expression ihr anti-apoptotisches Potential zu erhöhen

versuchen, um sich vor einem maternalen Immunsystem, welches sie fehlerhafterweise als „fremd“ erkennt oder anderen abortinduzierenden Faktoren, wie oxidativen Stress, zu schützen.

Die Hypothese des „von den Trophoblasten zum Selbstschutz“ exprimierten IL-15 passt nun kaum in das traditionelle Th₁/Th₂ Paradigma, indem IL-15 dem schwangerschaftsgefährdenden Th₁ System angehört. So scheinen diesem Interleukin in dem eben erläuterten Zusammenhang sogar schwangerschaftsprotective „Th₂ Eigenschaften“ zuzukommen. Doch wie bereits beschrieben, weichen die starren dogmatischen Grenzen dieses Paradigmas immer mehr auf. Der hier aufgeführte Zusammenhang zwischen IL-15 und Trophoblasten stellt einen weiteren Verweis zu einem wesentlich komplexeren Interleukinnetzwerk an der feto-maternalen Grenzzone dar. Diese Mehrschichtigkeit des Zytokinwirkungsspektrums zeigt sich auch vor dem Hintergrund der Interaktion von IL-15 mit den NK-Zellen.

5.4 IL-15 und sein Einfluss auf die NK-Zellen in Bezug auf Aborte

Die NK-Zellen haben aufgrund immer neuerer Erkenntnisse über die Vorgänge an der feto-maternalen Grenzzone im Laufe der letzten zehn Jahre stark an Bedeutung gewonnen. Sie sind durch ein komplexes Zytokinnetzwerk in der Kontrolle der Trophoblasteninvasion, der Trophoblastendifferenzierung, dem strukturellen Umbau der Spiralarterien und dem Plazentaaufbau involviert (Varla-Leftherioti et al. 2005). Aufgrund dieser weitreichenden Aufgaben an der feto-maternalen Grenzzone rücken sie zunehmend auch in den Fokus der Abortforschung. So konnten Lachapelle et al. bereits 1996 zeigen, dass nach einer genaueren Differenzierung in die beiden Subpopulationen der NK Zellen bei Patientinnen die von rezidivierenden spontanen Aborten betroffen waren, ein erhöhter Anteil von CD16⁺CD56^{dim} Zellen im Endometrium festzustellen war. Der Prozentsatz der CD16⁻CD56^{bright} NK-Zellen war jedoch erniedrigt. Dies untermauert die protektiven Eigenschaften der CD16⁻CD56^{bright} NK-Zellen (Lachapelle, Miron et al. 1996). Von dem ursprünglichen eindimensionalen Bild der schwangerschaftsgefährdenden „Killer“ NK-Zellen ist man längst abgekommen. Vielmehr ist das physiologische Gleichgewicht aus „Killer“ NK-Zellen und „sekretorischen“ NK-Zellen in der dezidualen Basalis für den Erhalt einer Schwangerschaft von essentieller Bedeutung. Im Folgenden soll nun die Rolle von IL-15 auf die NK-Zelle und das NK-Zell/Trophoblasten Regelsystem näher erläutert werden.

Zhang et al konnten nachweisen, dass IL-15 einen Hauptwachstumsfaktor für NK-Zellen darstellt (Zhang et al. 2008). Es nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der NK-Zellen ein (Verma, Hiby et al. 2000) (Bodnar, Nizsaloczki et al. 2008). So ist es mitunter verantwortlich für die Differenzierung von NK-Vorläuferzellen in uNK-Zellen und für das Einwandern peripherer NK-Zellen in die Dezidua (Santoni, Carlino et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass IL-15 auch die Differenzierung und Sekretion zytolytischer Mediatoren beeinflusst (Allen, Nilsen-Hamilton et al. 1998) (Ye, Young et al. 1996) und somit das zytolytische Potential dieser Zellen durch Stimulierung der Sekretion von Granulozyten und Perforinen fördert (Laskarin, Strbo et al. 2005). Zhang et al. konnten zusätzlich nachweisen, dass IL-15 diese Zytotoxizität der NK-Zellen über die Hochregulierung von NKG2D und zytotoxischen Effektormolekül sowie über die STAT1 und ERK1/2 Phosphorylierung verbessert (Zhang et al. 2008). IL-15 nimmt also offensichtlich eine Schlüsselrolle in der NK-Zellregulation ein. Kennedy et al. konnten dies in einem Versuch mit knock-out Mäusen, die kein IL-15 mehr bilden konnten, untermauern. Bei diesen Mäusen zeigte sich eine starke Verminderung der NK-Zellen im Thymus und der peripheren NK-Zellen (Kennedy, Glaccum et al. 2000). Bei der histologischen Untersuchung der Plazenten der IL-15^{-/-} knock-out Mäusen konnten diverse Veränderungen im strukturellen Aufbau im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Spiralarterien zeigten dickere Wandschichten mit einer höheren Wand/Volumen Ratio. Auch die deziduale Integrität war vermindert und stellte sich im Vergleich zur Kontrolle hypozellulär dar (Ashkar, Black et al. 2003). Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von IL-15 als Mediator für den durch die uNK-Zellen mitgestalteten strukturellen Umbau der Spiralarterien und der plazentaren Entwicklung und somit der adäquaten Versorgung des Fötus mit Nährstoffen und Sauerstoff (Anne Croy, van den Heuvel et al. 2006). Hier zeigen sich wiederum zahlreiche mögliche Verbindungen zum Abortgeschehen.

Das breite Spektrum an regulativen Einfüssen von IL-15 auf die NK-Zellen hebt die Bedeutung dieses Interleukins an der feto-maternalen Grenzzone nun noch vor dem zellulären Hintergrund der NK Zellen hervor. Jedoch sind die Interaktionen von IL-15 und den NK-Zellen bei Weitem noch vielschichtiger. In der Einleitung wurde bereits auf die enge Verbindung zwischen Trophoblasten und NK-Zellen eingegangen. Schon allein durch die enge Nachbarschaft der NK-Zellen und der Trophoblasten zueinander und hier v.a. der EVT an den Spiralarterien, vermutete man schon früh eine gegenseitige Beeinflussung in einem Regelsystem.

Wie bereits erläutert, kommen den NK-Zellen an der feto-maternalen Grenzzone entscheidende Aufgaben zu, mit denen sie auch Einfluss auf die Trophoblasten haben. Sei es nun indirekt durch die lokale Immunmodulation (Koopman, Kopcow et al. 2003), oder mediiert durch ihre sekretorischen Fähigkeiten, scheinen die NK-Zellen die maternale Immunantwort mitzuregulieren und auch das Wachstum, die Differenzierung und die Invasivität der Trophoblasten zu beeinflussen. V.a. die CD16⁻CD56^{bright} NK-Zellen im Endometrium haben aufgrund ihrer sekretorischen Eigenschaften die Fähigkeit direkt mit dem Trophoblasten zu interagieren. Sie können eine Reihe von Zytokinen und andere Mediatoren sezernieren, die für die Invasion und Differenzierung des Trophoblasten von großer Bedeutung sind (Varla-Leftherioti et al. 2005). Durch diese können sie die Trophoblasten in verschiedenster Weise modulieren (Jokhi, King et al. 1994) (Saito, Nishikawa et al. 1993). Sie scheinen dabei sowohl proliferative (Saito, Motoyoshi et al. 1993) (Athanasakis, Bleackley et al. 1987), protektive (King, Loke et al. 1993) wie auch hemmende Signale an die Trophoblasten zu vermitteln (Dosiou, Giudice et al. 2005). Einige Autoren stellten die Vermutung an, dass die uNK-Zellen die EVT als fetale Zellen erkennen und ihr invasives Potential während der Plazentabildung regulieren. Zusätzlich scheinen die uNK-Zellen die Trophoblastinvasivität auch durch ihr zytotoxisches Potential zu regulieren, auch wenn diesem Effekt im Vergleich zu dem sekretorischen Potential nur eine geringe Bedeutung zukommt (Santoni, Carlino et al. 2008). Die NK-Zellen besitzen also ein weitreichendes Spektrum an Möglichkeiten auf die Trophoblasten an der feto-maternalen Grenzzone regulativ einzuwirken. Somit können sie beitragen eine regelrechte Plazentation zu gewährleisten und zugleich eine trophoblastäre Überinvasion der Plazenta verhindern.

Das Trophoblasten/NK-Zell Regelsystem ist jedoch bidirektional. So werden auch die NK-Zellen durch die Trophoblasten beeinflusst. Ein Beispiel hierfür sind die dezidualen Inhibitionsrezeptoren der NK-Zellen. Diese interagieren mit den HLA Oberflächenmolekülen der Trophoblasten und vermitteln so Signale zur Inhibierung der NK-Zellen. Bei Patientinnen die von RSA betroffen waren ließ sich basierend auf diesen Erkenntnissen ein Mangel an dezidualen Inhibitionsrezeptoren feststellen (Varla-Leftherioti, Spyropoulou-Vlachou et al. 2005). Ein weiteres Beispiel ist die durch die Trophoblasten regulierte NK-Zelladhäsion und Migration in die Dezidua. Die NK-Zellen wandern aktiv in das deziduale Gewebe ein. Die Migration der NK-Zellen kann wiederum durch HLA-G limitiert werden (Dorling, Monk et al. 2000). Eine vermehrte Expression von HLA-G wirkt also einer NK-Zell Migration entgegen. Zusätzlich scheint der Kontakt mit HLA-G Apoptosevorgänge

in den NK-Zellen auszulösen (Emmer, Steegers et al. 2002) (Croy, McBey et al. 1997). Beachtenswert ist jedoch, dass IL-10, welches von uNK-Zellen selbst produziert wird, im Trophoblasten erst zu dieser Erhöhung der HLA-G Produktion führt. Die NK-Zellen können also, durch eine vermehrte IL-10 Sekretion über das NK-Zelle/Trophoblastenregelsystem ihre eigene Migration vermindern (Vigano, Gaffuri et al. 2001). Hier findet sich auch wieder eine Querverbindung zu dem Th₁/Th₂ Paradigma nachdem es sich bei dem IL-10 um ein Interleukin des Th₂ Systems handelt. Dieses Beispiel verdeutlicht das enge gegenseitige Zusammenwirken der Trophoblasten und der NK-Zellen und untermauert wiederum die Notwendigkeit eines funktionalen Regelsystems zwischen diesen beiden Zellentitäten. Dieses Regelsystem ist zu großen Teilen noch nicht genau verstanden. Berücksichtigt man nun die hier aufgezeigte starke Expression von IL-15 in den EVT und die weitreichenden regulatorischen Einflüsse, die IL-15 sowohl auf die NK-Zellen als auch auf die Trophoblasten hat, ist es sehr wahrscheinlich, dass IL-15 einen entscheidenden Signalvermittler dieses Trophoblasten/NK-Zell Regelsystems darstellt.

Anhand vieler Arbeiten geht der weitreichende Einfluss von IL-15 auf die NK-Zellen, v.a. die Modulation des sekretorischen und zytolytischen Potentials, hervor. In Bezug auf die NK-Zellen kann eine Dysregulation des IL-15 Zytokinprofils v.a. durch eine Veränderung ihrer sekretorischen Eigenschaften und ihres zytolytischen Potentials schwerwiegende Folgen haben. Hierbei wären ihre Aufgaben in der Etablierung eines schwangerschaftsfördernden immunologischen Milieus, der Plazentation und v.a. dem Remodelling der Spiralarterien schwerwiegend betroffen. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass ein verändertes IL-15 Profil zu einer massiven Störung der Interaktion zwischen Trophoblasten und NK-Zellen führt. Aufgrund dieses gestörten Trophoblasten/NK Regelsystems wäre es denkbar, dass die NK-Zellen die Trophoblasten angreifen und somit eine Schwangerschaft zusätzlich gefährden. Diese zentrale Rolle von IL-15 bei so entscheidenden Faktoren an der feto-maternalen Grenzzone legt einen Zusammenhang mit bisher ungeklärten rezidivierenden Aborten nahe.

6. Therapeutische Ansätze

Richtlinien für die Diagnostik und Therapie auf der Basis "Evidenz"-basierter Methoden zu standardisieren und verlässliche Diagnostik- und Therapieempfehlungen zu geben, ist bei wiederholten Spontanaborten sehr schwierig. Die Zahl der Patientinnen, die einer expliziten Ätiologie zuzuordnen sind, ist naturgemäß sehr klein und somit lassen sich kaum Patientinnen für randomisierte Doppelblindstudien in ausreichender Zahl rekrutieren (Leitlinien, (DGGG) et al. 2008). Im Folgenden ist die klinische Vorgehensweise gemäß der Europäischen Leitlinien der ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) für Patientinnen mit RSA zusammengefasst.

Untersuchungen sind bei Patientinnen mit RSA (Empfehlungsgrad B):

- Abklärung angeborener thrombophiler Faktoren (Faktor-V-Leiden-Mutation, Prothrombin-Mutation, Protein-C und -S, Antithrombin)
- Abklärung autoimmunologischer Probleme (z.B. Antiphospholipid-Syndrom)
- Ausschluss endokriner Ursachen (TSH, TPO-AK, ggf. ein OGTT [75 g] mit gleichzeitiger Bestimmung von Insulin nüchtern, nach ein und zwei Stunden zur Beurteilung einer Insulinresistenz)
- Ausschluss genetischer Ursachen (humangenetische Beratung des Ehepaares, Karyotypisierung des Abortmaterials)
- Ausschluss anatomischer Ursachen (Hysteroskopie als Diagnostik der Wahl, alternativ Hysterosalpingographie)
- Ausschluss vaginaler Infektionen
- Untersuchung der alloimmunologischen Faktoren (nur unter Studienbedingungen)

Tabelle 7 klinisches Untersuchungen bei RSA (Leitlinien (DGGG) 2008)

Aus der Vielfalt der möglichen ursächlichen Pathologien bei RSA ergibt sich auch ein breites heterogenes Therapiespektrum. Zunächst können hierbei die interventionellen von den nicht-interventionellen Therapiekonzepten unterschieden werden. Diese gliedern sich wiederum in spezifische und nicht-spezifische Interventionen (Tien, Tan et al. 2007).

Für eine adäquate Therapie bei RSA ist eine Differenzierung der Patientinnen in Bezug auf ihre individuelle Pathologie von Nöten, um ein effektives individuelles Therapiekonzept zu entwickeln. So existieren beispielsweise Daten, dass Patientinnen mit Antiphospholipidsyndrom von einer low-dose Aspirin+Heparin Therapie profitieren. Weiterhin gibt es Daten, die einen Benefit für eine Metformingabe beim PCO Syndrom aufzeigen. Die folgende Aufzählung zeigt einen Überblick verschiedener Therapieinterventionen:

| |
|--|
| <p><u>Spezifische Interventionen</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Aspirin+Heparin • Antikörper • Metformin • Bromocriptin • Luteinisierendes Hormon Supression <p><u>Nicht-spezifische Interventionen</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Supportive care • Progesteron/Progesteronderivate • immunmodulative Therapie • Vitamine • Verzicht auf Geschlechtsverkehr • hCG • medikamentöse Uterusrelaxantien • Bettruhe |
|--|

Tabelle 8 Therapieinterventionen (Tien, Tan et al. 2007) (Clark et al. 2008)

Wie bereits erwähnt, existieren auf dem Gebiet der RSA bisher noch wenige evidenzbasierte standardisierte Richtlinien. Im Folgenden sind die klinischen Therapieempfehlungen gemäß den Europäischen Leitlinien der ESHRE für Patientinnen mit RSA zusammengefasst.

| |
|--|
| <p><u>Therapieoptionen (Empfehlungsgrad B):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • bei Vorliegen einer angeborenen Thrombophilie Applikation von niedermolekularem Heparin • bei Vorliegen eines Antiphospholipid-Syndroms Gabe von niedermolekularem Heparin zusammen mit 100 mg Aspirin/täglich • Behandlung einer Endokrinopathie • operative Korrektur einer uterinen Anomalie • bei rezidivierenden Spätaborten und zervikaler Verschlussinsuffizienz ggf. Cerclage/totaler Muttermundverschluss, gegebenenfalls mit gezielter antibiotischer Behandlung • Progesteronunterstützung im ersten Trimenon (v.a. beim Fehlen offensichtlicher anderer Ursachen) |
|--|

Tabelle 9 Therapieoptionen (Leitlinien (DGGG) 2008)

Ungeachtet dessen, ob eine spezifische Pathologie auszumachen ist oder ob es sich um noch ungeklärte, ideopathische Aborte handelt, sollte jedoch jeder Patientin zusätzlich „supportiv care“ zukommen. Hier ist durch Studien belegt, dass

begleitende Beratung, engmaschige Ultraschallüberwachung in spezialisierten Zentren und emotionale Betreuung die Fehlgeburtenrate von 50% auf 25% reduzieren kann (Tien, Tan et al. 2007)

Um einen Bogen zurück zu dem eigentlichen Thema, den immunologischen Aspekten der Schwangerschaft, zu spannen sind in der folgenden Ausführung Therapieansätze erläutert, die im direkten Zusammenhang mit dem immunologischen Zytokinnetzwerk und Zellen an der feto-maternalen Grenzzone stehen.

Ein noch experimentelles Therapiekonzept zielt auf eine der schwangerschaftsprotektiven Eigenschaften von Progesteron ab. Im Mausexperiment zeigten sich durch Stress induzierbare erhöhte Abortraten, die mit einer Verringerung des Progesteronspiegels und einer Dysbalance des Th₁/Th₂ Systems einherzugehen schienen. Dieser Zusammenhang zwischen Progesteron und dem Th₁/Th₂ System wird über die CD8⁺ T-Zellen vermittelt. Diese spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation der Th₁/Th₂ Balance. Der stressinduzierte Progesteronabfall hatte eine Verringerung der CD8⁺ T-Zellen zur Folge. Nach Applikation eines Progesteronderivats konnte diese verringerte CD8⁺ T-Zellzahl wieder ein physiologisches Niveau erreichen. Die CD8⁺ T-Zellen scheinen also unter einem weitreichenden regulatorischen Einfluss von Progesteron zu stehen. Es zeigte sich, dass Progesteron, vermittelt via den CD8⁺ T-Zellen, ein schwangerschaftsprotektives Th₂ gewichtetes Zytokinprofil induzieren kann. Die Tatsache, dass eine experimentelle Reduzierung der CD8⁺ T-Zellen den protektiven Effekt des Progesteronderivats verschwinden lässt, verdeutlicht noch einmal diese enge schwangerschaftsprotektive Regulation (Blois, Joachim et al. 2004).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz mit Kortikosteroiden zielt nun nicht auf das Zytokinprofil, sondern direkt auf die NK-Zellen ab. Eine erhöhte präkonzeptionelle Anzahl von NK-Zellen wurde als ein prädikativer Faktor für eine weitere Fehlgeburt im Kollektiv der Patientinnen mit RSA entdeckt (Aoki, Kajiura et al. 1995) (Ntrivalas, Kwak-Kim et al. 2001). Zusätzlich unterschieden sich die Zellen phänotypisch von denen gesunder Schwangerschaften (Emmer, Steegers et al. 2002). Diese exprimieren Glukokortikoidrezeptoren und Östrogen B1, was die Möglichkeit der hormonellen klinischen Beeinflussung bot (Henderson, Saunders et al. 2003). Es existiert ein klinischer Fallbericht einer Patientin mit RSA, bei der es nach immunmodulatorischer Therapie mit Prednisolon zur Inhibierung der NK-Zellen zu

einer erfolgreichen Schwangerschaft kam (Quenby, Farquharson et al. 2003). Dieser Ansatz erscheint jedoch aufgrund der komplexen Funktion der NK-Zellen und der Tatsache, dass im System der NK-Zellen ein physiologische Gleichgewicht der Subpopulationen und nicht primär die absolute Konzentration (Saito, Nakashima et al. 2008) von Bedeutung ist, als nicht haltbar.

Einen sehr kontrovers diskutierten Ansatz stellen die immunmodulatorischen Therapiekonzepte dar. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden drei immunmodulatorische Möglichkeiten diskutiert. Die Gabe von intravenösen Immunglobulinen, die allogene Lymphozytenimmunisation mit paternalen Lymphozyten, und das humane Leukozytenultrafiltrat (LeukoNorm®). Grundlage dieser Konzepte ist die Annahme, dass die passive „Immunisierung“ mittels i.v.-Gabe gepoolter Immunglobuline einen positiven immunmodulativen Effekt haben, bzw. die Exposition des mütterlichen Immunsystems mit paternalen bzw. Spenderlymphozyten zur Aktivierung nicht eindeutig definierter Schutzmechanismen für die Schwangerschaft führen könnte (Beydoun, Saftlas et al. 2005) (Clark et al. 2008). In verschiedenen Studien zeigte sich eine Veränderung des Th₁/Th₂ Zytokinprofils zugunsten einer Th₂ verstärkten und einer Th₁ verringerten Zytokinsekretion (Szpakowski, Malinowski et al. 2000). Des Weiteren belegen Studien, dass die immunmodulative Therapie einen suppressiven Effekt auf die Zytotoxizität von NK-Zellen hat (Kwak, Gilman-Sachs et al. 1998). Zu diesem Zweck werden den Patientinnen gepoolte Immunglobuline intravenös appliziert. Im Rahmen umfangreicher klinischer und experimenteller Studien wurde dieses Konzept überprüft. Die Ergebnisse sind jedoch sehr widersprüchlich. Einzelne Subpopulationen von RSA Patientinnen schienen von einer immunmodulativen Therapie zu profitieren (Stricker, Winger et al. 2005) (Hutton, Sharma et al. 2007) (Christiansen, Pedersen et al. 2002). Jedoch zeigen mittlerweile 10 adäquat kontrollierte Studien keinen Vorteil für die sogenannte Lymphozytenimmunisierung. Entsprechend fand sich auch in einer Cochrane-Metaanalyse (Porter, LaCoursiere et al. 2006) aus dem Jahr 2006 kein Benefit für diesen Therapieansatz.

Aufgrund dieser Ergebnisse und wegen möglicher Infektionsrisiken und maternalen Komplikationen bei der Lymphozytenimmunisierung ist dieser Therapieansatz sehr kritisch zu sehen und sollte ausschließlich gemäß der Richtlinien der DGGG und unter Studienbedingungen und strengen Einschlusskriterien zum Einsatz kommen.

Die verschiedene immunologischen Therapieansätze für Patientinnen mit ungeklärten ideopatischen, rezidivierenden Aborten sind bisher noch rein empirisch und Gegenstand aktueller Forschung. Sie tragen jedoch mit Sicherheit Potential in sich, um in Zukunft eine Rolle in der Therapie für diese Patientinnen zu spielen. Hierfür ist jedoch weiter Forschung für ein besseres Verständnis um die Vorgänge an der feto-maternen Grenzzone unabdingbar.

7. Zusammenfassung

Eine Schwangerschaft stellt den maternalen Organismus in vielerlei Hinsicht vor große Herausforderungen. Ein fundamentaler Faktor für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist das maternale Immunsystem. Nicht nur eine bloße immunologische Toleranz gegenüber dem semi-allogenen Fötus, sondern vielmehr die Etablierung einer aktiven Kommunikation und Interaktion zwischen maternalem und fetalem Organismus stellt einen sehr komplexen und zugleich unabdingbaren Prozess für eine erfolgreiche Schwangerschaft dar. Hierbei ist eine strenge Regulation der verschiedenen Mitspieler der feto-maternalen Grenzzone von Nöten. Von besonderer Bedeutung für diese Regulation sind die Zytokine, die als Signalüberträger die Kommunikation fast aller an dieser feto-maternalen Grenzzone beteiligten Zellen steuern. Hervorzuheben sind hierbei zum Einen die fetalen trophoblastären Zellen und zum Anderen, als Hauptvertreter des maternalen Immunsystem, die T-Zellen und NK-Zellen. Aufgrund der zentralen Stellung der Zytokine, als regulatorische und modulatorische Botenstoffe dieser Zellen, beschäftigt sich die vorliegende Dissertation mit der Frage, ob Teile dieses Zytokinprofils der feto-maternalen Grenzzone bei Patientinnen mit vermehrten Aborten verändert sind und welche Auswirkungen dies auf das Abortgeschehen haben könnte.

Verglichen wurde plazentares Material aus der 7. bis 12. SSW von bis Dato einmaligen spontanen Aborten, rezidivierenden Aborten und einer gesunden Kontrollgruppe. Durch eine quantitative Real Time RT-PCR Analyse wurde zunächst ein Überblick über das Zytokinprofil der feto-maternalen Grenzzone gewonnen. Hierbei wies ein Interleukin, das Interleukin-15, den stärksten relativen Unterschied zwischen der Kontroll- und der Abortgruppe auf. Immunhistochemische Untersuchungen und weitere spezifische RT-PCR Analysen ergaben eine signifikante Erhöhung von IL-15 auf mRNA- und Proteinbasis bei den Abortgruppen. Hierbei zeigten die rezidivierenden Aborte die stärkste Expressionssteigerung. Bei der genaueren Differenzierung der IL-15 exprimierenden Zellen, zeigten sich besonders die extravillösen Trophoblasten als die IL-15 exprimierende Zellentität. Die Ergebnisse wurden jeweils mit Hilfe der Immunfluoreszenz Doppelfärbung bestätigt. Basierend auf diesen Ergebnissen und dem Wissen um die weitreichenden Einflüsse von IL-15 auf die T-Zellen, die NK-Zellen und die fetalen Trophoblasten werden in dieser Dissertation mögliche Zusammenhänge und Erklärungsmodelle für dieses veränderte Zytokinprofil im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von Aborten diskutiert.

8. Anhang

Abbildungen

Abbildung 1 Fehlgeburtenrate (in%) bezogen auf die SSW

Abbildung 2 Rezeptorweg IL-15/IL-2

Abbildung 3 EVT in der Plazenta

Abbildung 4 ABC-Komplex

Abbildung 5 Relative Veränderungen im mRNA Expressionsprofil bei Kontrolle vs. Aborte

Abbildung 6a-c Expression von IL-15 in extravillösen Trophoblastenzellen der Kontrollgruppe (6a), der Spontanabortgruppe (6b) und der Gruppe der rezidivierenden Aborte (6c), 25 x Objektiv.

Abbildung 6d Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung (IRS-Scores) für die Lokalisation der IL-15 Färbereaktion in in extravillösen Trophoblastenzellen von spontanen Aborten (SA) rezidivierenden Aborten (RSA) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) im ersten Trimester (mean+SEM)

Abbildung 6e Paaranalyse für IL-15 Expression im EVT von der 7. bis 12. SSW für Kontrolle, SA und RSA

Abbildung 6f X-fache Expression von IL-15 in den EVT für Kontrolle, SA und RSA anhand des IRS Scores

Abbildung 7a-c Expression von IL-15 in Synzytiotrophoblastenzellen der Kontrollgruppe (7a), der Spontanabortgruppe (7b) und der Gruppe der rezidivierenden Aborte (7c), 10x Objektiv.

Abbildung 7d Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung (IRS-Scores) für die Lokalisation der IL-15 Färbedetektion in in Synzytiotrophoblastenzellen von spontanen Aborten (SA) rezidivierenden Aborten (RSA) und der Kontrollgruppe (Kontrolle) im ersten Trimester (mean+SEM).

Abbildung 7e Paaranalyse für IL-15 Expression im Synzytiotrophoblasten von der 7. bis 12. SSW für Kontrolle, SA und RSA

Abbildung 7f X-fache Expression von IL-15 im Synzytiotrophoblasten für Kontrolle, SA und RSA anhand des IRS Scores

Abbildung 8 Expression von IL-15 mRNA in plazentren Gewebe von rezidivierenden Aborte, Spontanaborten und der Kontrollgruppe

Abbildung 9a-c IL-15 (9a) und CK7 (9b) werden im extravillösen Trophoblasten (EVT) exprimiert. Die Triple filter extraktion (9c) zeigt eine simultane Expression von IL-15 and CK7 in derselben Zellentität, 40x Objektiv

Abbildung 10a-c IL-15 (10a) und Prolaktin (10b) werden in der dezidualen Stromazelle exprimiert. Die Dreifachfilterextraktion (10c) zeigt keine simultane Expression von IL-15 and Prolaktin in derselben Zellentität, 40x Objektiv

Tabellen

Tabelle 1 Definition des Spontanaborts

Tabelle 2 Expressionsstärke von Untereinheiten des IL-15 Rezeptors auf verschiedenen T-Zellentitäten

Tabelle 3 Wirkung von IL-15 im Organismus

Tabelle 4 verwendeter Primärantikörper, Immunfluoreszenz

Tabelle 5 verwendete Primärantikörper, Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Tabelle 6 verwendete Sekundärantikörper, Immunfluoreszenz- Doppelfärbung

Tabelle 7 klinische Untersuchungen bei RSA

Tabelle 8 Therapieinterventionen

Tabelle 9 Therapieoptionen

| | Kontrolle n=15 | SA n=9 | RSA n=12 | p value (Kruskal- Willis- Test) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| Alter der Mutter | 33.0 ± 6.7 (22-41) | 31.5 ± 8.8 (19-43) | 34.3 ± 4.6 (25-39) | 0.813 |
| SSW | 9.0 ± 2.0 (4-11) | 9.84 ± 1.4 (7-12) | 8.7 ± 2.2 (7-11) | 0.370 |
| Gravidität | 3.1 ± 2.0 (1-7) | 2.2 ± 2.6 (1-9) | 2.9 ± 0.8 (2-4) | 0.077 |
| Parität | 1.2 ± 1.2 (0-4) | 1.2 ± 2.6 (0-8) | 0.7 ± 10.8 (0-2) | 0.475 |

Tabelle 10 Demographische und klinische Charakteristika der Studienpopulation

| SSW | Anzahl der Schnitte | | |
|---------|---------------------|------------|-------------|
| | Kontrolle | SA | RSA |
| 7. SSW | 1 | 0 | 2 |
| 8. SSW | 3 | 1 | 1 |
| 9. SSW | 4 | 1 | 2 |
| 10. SSW | 2 | 5 | 2 |
| 11. SSW | 3 | 1 | 3 |
| 12. SSW | 1 | 1 | 1 |
| | n=15 | n=9 | n=12 |

Tabelle 11 Anzahl der Immunhistologischen Schnitte in Bezug auf die SSW

| | | | | | |
|-----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| IL17A A01 | CCL11 A02 | CCL5 A03 | CCL7 A04 | CCR2 A05 | CCR3 A06 |
| CD80 B01 | CD86 B02 | CEBPB B03 | CREBBP B04 | CSF2 B05 | CTLA4 B06 |
| HAVCR2 C01 | ICOS C02 | IFNG C03 | IGSF6 C04 | IL10 C05 | IL12B C06 |
| IL1R1 D01 | IL1R2 D02 | IL2 D03 | IL2RA D04 | IL4 D05 | IL4R D06 |
| INHBA E01 | IRF1 E02 | IRF4 E03 | JAK1 E04 | JAK2 E05 | LAG3 E06 |
| NFATC2IP F01 | PCGF2 F02 | PTPRC F03 | SFTPD F04 | SOCS1 F05 | SOCS2 F06 |
| TFCP2 G01 | TGFB3 G02 | TLR4 G03 | TLR6 G04 | TMED1 G05 | TNF G06 |
| B2M H01 | HPRT1 H02 | RPL13A H03 | GAPDH H04 | ACTB H05 | HGDC H06 |
| CCR4 A07 | CCR5 A08 | CD28 A09 | CD4 A10 | CD40LG A11 | IL23A A12 |
| CXCR3 B07 | FASLG B08 | GATA3 B09 | GFI1 B10 | GLMN B11 | GPR44 B12 |
| IL12RB2 C07 | IL13 C08 | IL13RA1 C09 | IL15 C10 | IL18 C11 | IL18R1 C12 |
| IL5 D07 | IL6 D08 | IL6R D09 | IL7 D10 | IL9 D11 | INHA D12 |
| LAT E07 | MAF E08 | MAP2K7 E09 | MAPK8 E10 | NFATC1 E11 | NFATC2 E12 |
| SOCS5 F07 | SPP1 F08 | STAT1 F09 | STAT4 F10 | STAT6 F11 | TBX21 F12 |
| CD27 G07 | TNFRSF8 G08 | TNFRSF9 G09 | TNFSF4 G10 | TYK2 G11 | YY1 G12 |
| RTC H07 | RTC H08 | RTC H09 | PPC H10 | PPC H11 | PPC H12 |

Tabelle 12 Pippetierschema/Untersuchte Faktoren RT2 Profiler

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|------------|-------|----------------------------------|
| IL-15 (Immunohistchemie) | Maus IgG | monoklonal | 1:75 | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| CK 7 | Maus IgG | monoklonal | 1:30 | Novocastra, Berlin, Germany |
| Prolaktin | Maus IgG | monoklonal | 1:500 | Serotec, Oxford, UK |
| Ziege-anti-Maus Cy3 | Ziege IgG | polyklonal | 1:500 | Dianova, Hamburg, Germany |
| Ziege-anti-Kaninchen Cy2 | Ziege IgG | polyklonal | 1:100 | Dianova, Hamburg, Germany |
| IL-15 (Doppelfärbung) | Kanin- chen IgG | polyklonal | 1:100 | Serotec, Oxford, UK |

Tabelle 13 alle verwendeten Antikörper

Verwendete Chemikalien und Lösungsansätze

- Lösung A: 21.01g 0,1M Zitronensäure (Merck#244, Darmstadt, Deutschland))
1l Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Lösung B: 29, 41g 0,1M Na-Citrat (Merck #6448, Darmstadt, Deutschland) +
1l Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Vectatain Elite mouse-IgG-Kit:
 - ABC-Komplex = Ansetzten aus 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10ml steriles PBS (die Lösung muss 30 Minuten vor Gebrauch ruhen)
 - Blockierserum = 3 Tropfen Normalserum auf 10 ml steriles PBS
 - Sekundärantikörper = biotinierter Link-Anikörper, der den ABC-Komplex bindet = 3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Antimouse-Ig (blaue Flasche) + 10 ml PBS
- DAB (3,3 Diaminobenzidin) = 2 Tropfen Pufferkonzentrat
+2 Tropfen DAB Chromogen + 2 ml Aqua dest.
- Na-Citratpuffer-Gebrauchslösung: 18ml Lösung A + 82ml Lösung B +900ml Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte
= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol

9. Literaturverzeichnis

- Abadia-Molina, A. C., C. Ruiz, et al. (1996). "Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast." J Reprod Immunol 31(1-2): 109-23.
- Abrahams, V. M., P. B. Aldo, et al. (2008). "TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan." J Immunol 180(9): 6035-43.
- Allen, M. P. and M. Nilsen-Hamilton (1998). "Granzymes D, E, F, and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells." J Immunol 161(6): 2772-9.
- Anderson, P., A. Sundstedt, et al. (2003). "Differential activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 and induction of suppressors of cytokine signalling in T(h)1 and T(h)2 cells." Int Immunol 15(11): 1309-17.
- Anne Croy, B., M. J. van den Heuvel, et al. (2006). "Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones." Immunol Rev 214: 161-85.
- Aoki, K., S. Kajiuura, et al. (1995). "Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage." Lancet 345(8961): 1340-2.
- Apps, R., L. Gardner, et al. (2008). "A critical look at HLA-G." Trends Immunol 29(7): 313-21.
- Arck, P. C., D. A. Ferrick, et al. (1999). "Murine T cell determination of pregnancy outcome." Cell Immunol 196(2): 71-9.
- Arck, P. C., A. B. Troutt, et al. (1997). "Soluble receptors neutralizing TNF-alpha and IL-1 block stress-triggered murine abortion." Am J Reprod Immunol 37(3): 262-6.
- Armitage, R. J., B. M. Macduff, et al. (1995). "IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation." J Immunol 154(2): 483-90.
- Ashkar, A. A., G. P. Black, et al. (2003). "Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy." J Immunol 171(6): 2937-44.
- Ashkar, A. A. and B. A. Croy (1999). "Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy." Biol Reprod 61(2): 493-502.
- Athanassakis, I., R. C. Bleackley, et al. (1987). "The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells." J Immunol 138(1): 37-44.
- Baek, K. H., E. J. Lee, et al. (2007). "Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms." Trends Mol Med 13(7): 310-7.
- Bazan, J. F. (1991). "Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold." Neuron 7(2): 197-208.
- Beydoun, H. and A. F. Saftlas (2005). "Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions." Tissue Antigens 65(2): 123-35.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol 17: 189-220.
- Bischof, P. and A. Campana (2000). "Molecular mediators of implantation." Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 14(5): 801-14.
- Bischof, P., A. Meisser, et al. (2000). "Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review." Placenta 21 Suppl A: S55-60.

- Blois, S. M., R. Joachim, et al. (2004). "Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile." J Immunol 172(10): 5893-9.
- Bodnar, A., E. Nizsaloczki, et al. (2008). "A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions." Immunol Lett 116(2): 117-25.
- Budagian, V., E. Bulanova, et al. (2006). "IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe." Cytokine Growth Factor Rev 17(4): 259-80.
- Bulfone-Paus, S., D. Ungureanu, et al. (1997). "Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo." Nat Med 3(10): 1124-8.
- Bulletti, C., C. Flamigni, et al. (1996). "Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage." Hum Reprod Update 2(2): 118-36.
- Bulmer, J. N. and G. E. Lash (2005). "Human uterine natural killer cells: a reappraisal." Mol Immunol 42(4): 511-21.
- Burton, G. J. and E. Jauniaux (2004). "Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia." J Soc Gynecol Investig 11(6): 342-52.
- Carrington, B., G. Sacks, et al. (2005). "Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome." Curr Opin Obstet Gynecol 17(6): 591-7.
- Chaouat, G. (2003). "Should we re-examine the status of lymphocyte alloimmunization therapy for recurrent spontaneous abortion?" Am J Reprod Immunol 50(6): 433-8.
- Chaouat, G. (2007). "The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy?" Semin Immunopathol 29(2): 95-113.
- Chaouat, G., A. Assal Meliani, et al. (1995). "IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau." J Immunol 154(9): 4261-8.
- Chaouat, G., N. Ledee-Bataille, et al. (2004). "TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm." Int Arch Allergy Immunol 134(2): 93-119.
- Chaouat, G., E. Menu, et al. (1990). "Kontrolle of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy." J Reprod Fertil 89(2): 447-58.
- Chaouat, G., J. Tranchot Diallo, et al. (1997). "Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revisited: a (very) personal tribute to Tom Wegmann." Am J Reprod Immunol 37(6): 427-34.
- Chegini, N., C. Ma, et al. (2002). "Differential expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 throughout the menstrual cycle in endometrium of normal fertile women and women with recurrent spontaneous abortion." J Reprod Immunol 56(1-2): 93-110.
- Chen, B. A. and M. D. Creinin (2007). "Contemporary management of early pregnancy failure." Clin Obstet Gynecol 50(1): 67-88.
- Chik, K. W., K. Li, et al. (2003). "Elevated serum interleukin-15 level in acute graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation." J Pediatr Hematol Oncol 25(12): 960-4.
- Christiansen, O. B., B. Pedersen, et al. (2002). "A randomized, double-blind, placebo-Kontrollierte trial of intravenous immunoglobulin in the prevention of recurrent miscarriage: evidence for a therapeutic effect in women with secondary recurrent miscarriage." Hum Reprod 17(3): 809-16.
- Clark, D. A. (2008). "Immunological factors in pregnancy wastage: fact or fiction." Am J Reprod Immunol 59(4): 277-300.

- Clark, D. A., F. S. Merali, et al. (1997). "Decidua-associated suppressor cells in abortion-prone DBA/2-mated CBA/J mice that release bioactive transforming growth factor beta2-related immunosuppressive molecules express a bone marrow-derived natural suppressor cell marker and gamma delta T-cell receptor." Biol Reprod 56(5): 1351-60.
- Contini, P., M. Ghio, et al. (2003). "Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation." Eur J Immunol 33(1): 125-34.
- Craig, M., P. Tata, et al. (2002). "Psychiatric morbidity among patients with recurrent miscarriage." J Psychosom Obstet Gynaecol 23(3): 157-64.
- Croy, B. A., L. J. Guilbert, et al. (1991). "Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells." J Reprod Immunol 19(2): 149-66.
- Croy, B. A., B. A. McBey, et al. (1997). "Characterization of the cells that migrate from metrial glands of the pregnant mouse uterus during explant culture." J Reprod Immunol 32(3): 241-63.
- Dorling, A., N. J. Monk, et al. (2000). "HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells." Eur J Immunol 30(2): 586-93.
- Dosiou, C. and L. C. Giudice (2005). "Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives." Endocr Rev 26(1): 44-62.
- Emmer, P. M., E. A. Steegers, et al. (2002). "Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies." Hum Reprod 17(4): 1072-80.
- Fallon, P. G., H. E. Jolin, et al. (2002). "IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13." Immunity 17(1): 7-17.
- Ferry, B. L., P. M. Starkey, et al. (1990). "Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes." Immunology 70(4): 446-52.
- Fortunato, S. J., R. Menon, et al. (1998). "IL-15, a novel cytokine produced by human fetal membranes, is elevated in preterm labor." Am J Reprod Immunol 39(1): 16-23.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, et al. (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." Embo J 13(12): 2822-30.
- Gracia, C. R., M. D. Sammel, et al. (2005). "Risk factors for spontaneous abortion in early symptomatic first-trimester pregnancies." Obstet Gynecol 106(5 Pt 1): 993-9.
- Griebel, C. P., J. Halvorsen, et al. (2005). "Management of spontaneous abortion." Am Fam Physician 72(7): 1243-50.
- Guyer, B., D. L. Hoyert, et al. (1999). "Annual summary of vital statistics--1998." Pediatrics 104(6): 1229-46.
- Hatasaka, H. H. (1994). "Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence." Clin Obstet Gynecol 37(3): 625-34.
- Hatasaka, H. H. and M. W. Varner (1994). "Recurrent pregnancy loss." Curr Opin Obstet Gynecol 6(6): 503-9.
- Hempstock, J., E. Jauniaux, et al. (2003). "The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure." Hum Pathol 34(12): 1265-75.
- Henderson, T. A., P. T. Saunders, et al. (2003). "Steroid receptor expression in uterine natural killer cells." J Clin Endocrinol Metab 88(1): 440-9.

- Hunt, J. S., R. A. Atherton, et al. (1990). "Differential responses of rat trophoblast cells and embryonic fibroblasts to cytokines that regulate proliferation and class I MHC antigen expression." J Immunol 145(1): 184-9.
- Huppertz, B., M. Kadyrov, et al. (2006). "Apoptosis and its role in the trophoblast." Am J Obstet Gynecol 195(1): 29-39.
- Hustin, J., E. Jauniaux, et al. (1990). "Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion." Placenta 11(6): 477-86.
- Hutton, B., R. Sharma, et al. (2007). "Use of intravenous immunoglobulin for treatment of recurrent miscarriage: a systematic review." Bjog 114(2): 134-42.
- Jauniaux, E. and G. J. Burton (2005). "Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss." Placenta 26(2-3): 114-23.
- Jauniaux, E., A. L. Watson, et al. (2000). "Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure." Am J Pathol 157(6): 2111-22.
- Jokhi, P. P., A. King, et al. (1994). "Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction." J Immunol 153(10): 4427-35.
- Kaufmann, P. (1997). "Entwicklung der Plazenta " Entwicklung der Plazenta Verh Dtsch Ges Path
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, et al. (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." J Exp Med 191(5): 771-80.
- Kiechle, M. (2007). "Gynäkologie und Geburtshilfe München, Elsevier GmbH." Gynäkologie und Geburtshilfe München, Elsevier GmbH.
- King, A. (2000). "Uterine leukocytes and decidualization." Hum Reprod Update 6(1): 28-36.
- King, A., C. Birkby, et al. (1989). "Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast." Cell Immunol 118(2): 337-44.
- King, A., S. E. Hiby, et al. (1997). "Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules." Am J Reprod Immunol 37(6): 459-62.
- King, A. and Y. W. Loke (1990). "Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2-stimulated decidual NK cells." Cell Immunol 129(2): 435-48.
- King, A. and Y. W. Loke (1993). "Effect of IFN-gamma and IFN-alpha on killing of human trophoblast by decidual LAK cells." J Reprod Immunol 23(1): 51-62.
- Koopman, L. A., H. D. Kopcow, et al. (2003). "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential." J Exp Med 198(8): 1201-12.
- Kovanen, P. E. and W. J. Leonard (2004). "Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways." Immunol Rev 202: 67-83.
- Kovats, S., E. K. Main, et al. (1990). "A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts." Science 248(4952): 220-3.
- Krishnan, L., L. J. Guilbert, et al. (1996). "T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells." J Immunol 156(2): 653-62.
- Kuniyasu, H., N. Oue, et al. (2001). "Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells." Pathobiology 69(2): 86-95.

- Kwak-Kim, J. and A. Gilman-Sachs (2008). "Clinical implication of natural killer cells and reproduction." Am J Reprod Immunol 59(5): 388-400.
- Kwak, J. Y., A. Gilman-Sachs, et al. (1998). "Natural killer cell cytotoxicity and paternal lymphocyte immunization in women with recurrent spontaneous abortions." Am J Reprod Immunol 40(5): 352-8.
- Lachapelle, M. H., P. Miron, et al. (1996). "Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome." J Immunol 156(10): 4027-34.
- Laskarin, G., N. Strbo, et al. (2005). "Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface." Chem Immunol Allergy 89: 10-25.
- Le Bouteiller, P. and M. P. Piccinni (2008). "Human NK cells in pregnant uterus: why there?" Am J Reprod Immunol 59(5): 401-6.
- Le Gal, F. A., B. Riteau, et al. (1999). "HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes." Int Immunol 11(8): 1351-6.
- Ledee-Bataille, N., K. Bonnet-Chea, et al. (2005). "Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure." Fertil Steril 83(3): 598-605.
- Leitlinien, "Diagnostik und Therapie beim wiederholten Spontanabort." <http://www.awmf.org/leitlinien/deteil/ll/015-050.html>
- Lin, H., T. R. Mosmann, et al. (1993). "Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface." J Immunol 151(9): 4562-73.
- Lin, S. J., P. J. Cheng, et al. (2006). "Effect of interleukin-15 on effector and regulatory function of anti-CD3/anti-CD28-stimulated CD4(+) T cells." Bone Marrow Transplant 37(9): 881-7.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today 11(7): 237-44.
- Lodolce, J. P., D. L. Boone, et al. (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." Immunity 9(5): 669-76.
- Maejima, M., T. Fujii, et al. (1997). "Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines." Am J Reprod Immunol 38(2): 79-82.
- Masuda, A., T. Matsuguchi, et al. (2001). "Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression." J Biol Chem 276(28): 26107-13.
- McInnes I, M. R., Zimmerman-Gorska I et al. (2004). "Safety and efficacy of human monoclonal antibody to IL-15 (AMG 714) in patients with rheumatoid arthritis (RA): results from a multicenter, randomized, double blind, placebo-Kontrollierte trial. Arthritis Rheum."
- Means-Markwell, M., T. Burgess, et al. (2000). "Eosinophilia with aberrant T cells and elevated serum levels of interleukin-2 and interleukin-15." N Engl J Med 342(21): 1568-71.
- Michel, M. Z., T. Y. Khong, et al. (1990). "A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage." Br J Obstet Gynaecol 97(11): 984-8.
- Minas, V., U. Jeschke, et al. (2007). "Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin." Mol Hum Reprod 13(9): 663-73.
- Moffett-King, A. (2002). "Natural killer cells and pregnancy." Nat Rev Immunol 2(9): 656-63.

- Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen (2000). Praxis der Immunhistochemie. München, Jena, Urban & Fischer Verlag 17-18.
- Ntrivalas, E. I., J. Y. Kwak-Kim, et al. (2001). "Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology." Hum Reprod 16(5): 855-61.
- Park, C. S., S. O. Yoon, et al. (2004). "Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form." J Immunol 173(11): 6676-83.
- Perricone, R., C. Perricone, et al. (2008). "NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system." Autoimmun Rev 7(5): 384-90.
- Piccinni, M. P. and S. Romagnani (1996). "Regulation of fetal allograft survival by a hormone-Kontrollierte Th1- and Th2-type cytokines." Immunol Res 15(2): 141-50.
- Porter, T. F., Y. LaCoursiere, et al. (2006). "Immunotherapy for recurrent miscarriage." Cochrane Database Syst Rev(2): CD000112.
- Puppo, F., P. Contini, et al. (2002). "Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction." ScientificWorldJournal 2: 421-3.
- Purton, J. F., J. T. Tan, et al. (2007). "Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent." J Exp Med 204(4): 951-61.
- Quenby, S., R. Farquharson, et al. (2003). "Successful pregnancy outcome following 19 consecutive miscarriages: case report." Hum Reprod 18(12): 2562-4.
- Rabinovich, G. A., L. G. Baum, et al. (2002). "Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?" Trends Immunol 23(6): 313-20.
- Rachmilewitz, J., Z. Borovsky, et al. (2003). "Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45." J Biol Chem 278(16): 14059-65.
- Raghupathy, R., M. Makhseed, et al. (1999). "Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions." Cell Immunol 196(2): 122-30.
- Raghupathy, R., M. Makhseed, et al. (2000). "Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion." Hum Reprod 15(3): 713-8.
- Raulet, D. H. (1999). "Development and tolerance of natural killer cells." Curr Opin Immunol 11(2): 129-34.
- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." Pathologe 8(3): 138-40.
- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood 76(12): 2421-38.
- Rochman, Y., R. Spolski, et al. (2009). "New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines." Nat Rev Immunol 9(7): 480-90.
- Saito, S., K. Motoyoshi, et al. (1993). "Localization and production of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) in human placental and decidual tissues." Lymphokine Cytokine Res 12(2): 101-7.
- Saito, S., A. Nakashima, et al. (2008). "The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy." J Reprod Immunol 77(1): 14-22.
- Saito, S., K. Nishikawa, et al. (1993). "Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua." Int Immunol 5(5): 559-63.

- Sanders, S. K., P. A. Giblin, et al. (1991). "Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class 1 molecule on cytotrophoblasts." J Exp Med 174(3): 737-40.
- Santoni, A., C. Carlino, et al. (2008). "Uterine NK cell development, migration and function." Reprod Biomed Online 16(2): 202-10.
- Schallhammer, L., W. Walcher, et al. (1997). "Phenotypic comparison of natural killer cells from peripheral blood and from early pregnancy decidua." Early Pregnancy 3(1): 15-22.
- Schiebler, T. and P. Kaufmann (1997). "Reife Plazenta." Reife Plazenta Verh Dtsch Ges Path
- Schmidt, Georg Thieme Verlag KG (2001). "Farbdopplersono in Gynäkologie und Geburtshilfe Stuttgart." Farbdopplersono in Gynäkologie und Geburtshilfe Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 107-109.
- Shi, F. D., H. G. Ljunggren, et al. (2001). "Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction." Trends Immunol 22(2): 97-101.
- Stauber, M. a. T. W. (2005). "Duale Reihe. Gynäkologie und Geburtshilfe." Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 480-496.
- Stewart, C. L., P. Kaspar, et al. (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature 359(6390): 76-9.
- Stricker, R. B. and E. E. Winger (2005). "Update on treatment of immunologic abortion with low-dose intravenous immunoglobulin." Am J Reprod Immunol 54(6): 390-6.
- Sun, J. C. and L. L. Lanier (2009). "Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?" Eur J Immunol 39(8): 2059-64.
- Svensson, L., M. Arvola, et al. (2001). "The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice." J Reprod Immunol 51(1): 3-7.
- Szpakowski, A., A. Malinowski, et al. (2000). "[The influence of paternal lymphocyte immunization on the balance of Th1/Th2 type reactivity in women with unexplained recurrent spontaneous abortion]." Ginekol Pol 71(6): 586-92.
- Thellin, O., B. Coumans, et al. (2000). "Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months." Curr Opin Immunol 12(6): 731-7.
- Tien, J. C. and T. Y. Tan (2007). "Non-surgical interventions for threatened and recurrent miscarriages." Singapore Med J 48(12): 1074-90; quiz 1090.
- Todt, J. C., Y. Yang, et al. (1996). "Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility." Am J Reprod Immunol 36(2): 65-71.
- Toth, B., C. A. Lok, et al. (2007). "Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy." Am J Reprod Immunol 58(5): 389-402.
- Toth, B., K. Roth, et al. (2008). "Glycodelin protein and mRNA is downregulated in human first trimester abortion and partially upregulated in mole pregnancy." J Histochem Cytochem 56(5): 477-85.
- Trundley, A. and A. Moffett (2004). "Human uterine leukocytes and pregnancy." Tissue Antigens 63(1): 1-12.
- van Mourik, M. S., N. S. Macklon, et al. (2009). "Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment." J Leukoc Biol 85(1): 4-19.
- Varla-Leftherioti, M. (2005). "The significance of the women's repertoire of natural killer cell receptors in the maintenance of pregnancy." Chem Immunol Allergy 89: 84-95.

- Varla-Leftherioti, M., M. Spyropoulou-Vlachou, et al. (2005). "Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion." Hum Immunol 66(1): 65-71.
- Ventura, S. J., S. M. Taffel, et al. (1988). "Estimates of pregnancies and pregnancy rates for the United States, 1976-85." Am J Public Health 78(5): 506-11.
- Verma, S., S. E. Hiby, et al. (2000). "Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15." Biol Reprod 62(4): 959-68.
- Verma, S., A. King, et al. (1997). "Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells." Eur J Immunol 27(4): 979-83.
- Vigano, P., B. Gaffuri, et al. (2001). "Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma." Mol Hum Reprod 7(10): 971-7.
- Vince, G. S. and P. M. Johnson (1995). "Materno-fetal immunobiology in normal pregnancy and its possible failure in recurrent spontaneous abortion?" Hum Reprod 10 Suppl 2: 107-13.
- von Rango, U. (2008). "Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion." Immunol Lett 115(1): 21-32.
- Waldmann, T., Y. Tagaya, et al. (1998). "Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors." Int Rev Immunol 16(3-4): 205-26.
- Watson, A. L., M. E. Palmer, et al. (1997). "Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age." Placenta 18(4): 295-9.
- Wegmann, T. G., H. Lin, et al. (1993). "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?" Immunol Today 14(7): 353-6.
- Whiteside, T. L. (1994). "Cytokine measurements and interpretation of cytokine assays in human disease." J Clin Immunol 14(6): 327-39.
- Yamada, Y., K. Sugawara, et al. (1998). "Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells." Blood 91(11): 4265-72.
- Ye, W., J. D. Young, et al. (1996). "Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes." Cell Immunol 174(1): 54-62.
- Zhang, C., J. Zhang, et al. (2008). "Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation." Cytokine 42(1): 128-36.
- Zourbas, S., S. Dubanchet, et al. (2001). "Localization of pro-inflammatory (IL-12, IL-15) and anti-inflammatory (IL-11, IL-13) cytokines at the foetomaternal interface during murine pregnancy." Clin Exp Immunol 126(3): 519-28.

10. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Udo Jeschke bedanken. Bei anfallenden Problemen stand er mir nicht nur in fachspezifischen, sondern auch in privaten Gesprächen immer mit einem offenen Ohr gegenüber und konnte mir mit wertvollen Ratschlägen weiterhelfen. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Bettina Toth, meiner Betreuerin, bedanken die mir organisatorisch und fachlich immer beiseite stand. Ein weiterer großer Dank gebührt Frau Irmi Wiest, ohne deren tatkräftige Unterstützung, Anregung, konstruktiver Kritik und Beistand diese Arbeit in dieser Form sicherlich nicht möglich gewesen wäre. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Chistine Friedl bedanken, die mir oft seelisch, moralisch, geistig zur Seite stand und mir, zusammen mit meinem Doktorvater, immer wertvolle Ratschläge auch abseits meiner eigentlichen Arbeit mit auf den Weg gab. Ganz besonders möchte ich mich auch bei dem ganzen Laborteam, Frau Simone Hofmann, Frau Christina Kuhn und Frau Susi Kunze bedanken. Sie konnten mir fachlichen und organisatorischen Fragen stets hochengagiert mit Rat und Tat zu Seite stehen. Herausragender Dank gebührt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung von allen Seiten und zu jeder Zeit ein Studium und diese Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären. Nun möchte ich noch unendlich meiner zukünftigen Frau danken, die mir während den wohl schwierigsten Teil der Doktorarbeit, „den Endspurt“, beigestanden hat, die immer für mich da war und so viel mehr getan hat als sie eigentlich weiß...

11. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 05.01.1982 in Wasserburg a. Inn

Konfession: evangelisch

Schulbildung

09/1988 - 07/1992 Grundschule Oberbergkirchen (Bayern)

09/1992 - 07/1993 Hauptschule Zangberg (Bayern)

09/1993 - 07/2002 Gymnasium der Maria-Ward Schulstiftung, Altötting (Bayern)

Zivildienst

07/2002 - 05/2003 Behindertenwerkstätte Ecksberg (Bayern)

Studium

10/2003 - 07/2005 Studium Humanmedizin, LMU München/TU München

08/2005 1. Staatsexamen

10/2005 - 08/2009 Studium Humanmedizin, LMU München/TU München

06/2010 2. Staatsexamen

Famulaturen

09/2005 - 10/2005 Unfallchirurgie (Krankenhaus Antsirabe, Madagaskar)

03/2006 - 04/2006 Anästhesie (Kreiskrankenhaus Mühldorf a. Inn)

09/2006 - 10/2006 Sportorthopädie (Klinikum Recht der Isar, München)

09/2007 - 10/2007 Orthopädische Praxis Dr. Czernicki (München)

03/2008 - 04/2008 Allgemeinmedizinische Praxis Dr. Pleier (Aschau a. Inn)

Praktisches Jahr

- 08/2008 - 12/2008 Unfallchirurgie/Viszeralchirurgie
(Klinikum Rechts der Isar, München)
- 12/2008 - 04/2009 Sportorthopädie/ Orthopädie
(Klinikum Rechts der Isar, München)
- 04/2006 - 07/2009 Innere Medizin
(Klinikum Rechts der Isar/
Centre Hospitalier Universitaire Guadeloupe, Frankreich)

Promotion

Promotionsthema: Untersuchungen zur Expression von Interleukin-15
an der feto-maternalen Grenzzone und seine
Bedeutung für vermehrte Aborte

Veröffentlichungen

Erstautor im American Journal of Reproductive Immunology
2010 Dec;64(6):402-10

Sprachkenntnisse

Englisch: fließend in Wort und Schrift
Französisch: fließend in Wort und Schrift
Türkisch: Grundkenntnisse in Wort und Schrift

Interessen

Triathlon, Mountainbike, Klavier