

Aus dem Institut der Experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Der Einfluss der Hämoxygenase-1 auf die LPS induzierte Immunantwort
in der Schwangerschaft

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Kristina Kahlo

aus Halle / Saale

Magdeburg 2013

Dokumentationsblatt

Kahlo, Kristina

Der Einfluss der Hämoxygenase-1 auf die LPS induzierte Immunantwort in der Schwangerschaft. – 2013. – 91 Bl. : 17 Abb., 7 Tab., 4 Anl.

Der protektive und immunmodulierende Effekt der Hämoxygenase-1 (HO-1) wurde in der Sepsis- und Transplantatforschung mehrfach bewiesen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss dieses Enzyms auf das angeborene Immunsystem während der Schwangerschaft untersucht. Trophoblastzellen von Abbrüchen und spontanen Aborten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und auf die HO-1, Bag-1 und Zytokinproduktion untersucht. Im Mausmodell wurde schwangeren Tieren mit unterschiedlichem Genotyp für das *Hmox1* Gen LPS injiziert. Anschließend wurde die Verteilung von Immunzellen und die Zytokinproduktion in der Milz ermittelt, sowie die HO-1, Bag-1 und Zytokinexpression in der Plazenta bestimmt. Trophoblasten von pathologischen Schwangerschaften zeigten geringere Proteinkonzentrationen der HO-1 und des anti-apoptotischen Moleküls, Bag-1. Die LPS Behandlung bewirkte einen Anstieg der HO-1, dieser fiel in Trophoblastzellen von Aborten geringer aus als in Zellen von normalen Schwangerschaften. In beiden Gruppen war die Immunantwort auf LPS durch einen Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α gekennzeichnet. Im Mausmodell zeigten HO-1 defiziente Tiere unabhängig von LPS erhöhte T-Zellzahlen in der Milz, als auch eine verstärkte TNF- α Expression in der Milz und der Plazenta. LPS bewirkte abhängig vom HO-1 Mangel eine verminderte Expression von Bag-1 in der Plazenta. Die Ergebnisse vermitteln eine Marker Funktion der HO-1 für eine erfolgreiche Schwangerschaft, sowie einen Einfluss des Enzymes auf die angeborene Immunantwort. Diese könnte *in vivo* durch eine Regulation der Bag-1 und Zytokinproduktion charakterisiert sein und den Schwangerschaftsausgang während einer Infektion maßgeblich beeinflussen.

Schlüsselwörter

Schwangerschaft – Abort – angeborene Immunantwort – LPS – HO-1 – Bag-1 – Zytokine

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einführung	7
2.1	Die Schwangerschaft	7
2.1.1	Abort	7
2.1.2	Immunologische Grundlagen der Schwangerschaft	8
2.2	Lipopolysaccharide	9
2.2.1	LPS in der Schwangerschaft	11
2.3	Hämoxygenase	11
2.3.1	Funktion und Bedeutung der HO-1	12
2.3.2	HO-1 in der Schwangerschaft	13
2.3.3	HO-1 in Wechselwirkung mit dem Immunsystem	14
2.4	Zielstellung	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.2	Methoden	19
3.2.1	Trophoblastzellisolierung aus Plazentagewebe	19
3.2.2	Zytokeratinfärbung primärer Trophoblastzellen	19
3.2.3	Stimulation primärer Trophoblastzellen mit LPS	19
3.2.3.1	Immundetektion spezifischer Proteine im Western Blot	20
3.2.4	Aufkonzentration von Zellkulturüberständen	21
3.2.5	Verpaarung und Behandlung der Mäuse	21
3.2.6	Präparation und Probenaufarbeitung	22
3.2.6.1	Lymphozyten Bestimmung mittels Durchflusszytometrie	23
3.2.6.2	Zytokinbestimmung mittels Durchflusszytometrie	24
3.2.7	Real-Time PCR	25
3.2.8	Statistik	25
4	Ergebnisse	26
4.1	<i>In vitro</i> Versuchskomplex	26
4.1.1	Die Kultur primärer humaner Trophoblastzellen erreichte einen hohen Reinheitsgrad	26
4.1.2	HO-1 ist in Trophoblastzellen spontaner Aborte geringer exprimiert als in Schwangerschaftsabbrüchen und wird durch LPS induziert	27
4.1.3	Die LPS Stimulation bewirkt einen Anstieg der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine im Überstand primärer Trophoblasten	28

4.1.4	Bag-1 ist in Trophoblasten spontaner Aborte geringer exprimiert als in Schwangerschaftsabbrüchen	30
4.2	<i>In vivo</i> Versuchskomplex	33
4.2.1	Untersuchung des Einflusses der HO-1 Genexpression und LPS Behandlung auf das Verhältnis von Immunzellen in unterschiedlichen Mausorganen	33
4.2.1.1	HO-1 defiziente Mäuse haben erhöhte CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellzahlen in der Milz.....	33
4.2.1.2	HO-1 Expressionsunterschiede und LPS Stimulation haben keinen Einfluss auf die CD4 ⁺ , CD8 ⁺ oder CD11c ⁺ MHCII ⁺ Zellzahl in lokalen Lymphknoten	34
4.2.1.3	HO-1 Expressionsunterschiede und LPS Stimulation haben keinen Einfluss auf die CD4 ⁺ , CD8 ⁺ oder CD11c ⁺ MHCII ⁺ Zellzahl in der Dezidua.....	35
4.2.2	Die Konzentrationen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in der Milz sind abhängig von der HO-1 Expression	36
4.2.3	Die HO-1 Expression an der fetal-maternalen Grenzregion allogon verpaarter Mäuse wird durch LPS Stimulation induziert.....	37
4.2.4	Die Expression von TNF- α nimmt mit abnehmenden HO-1 Gehalt in der Plazenta zu	39
4.2.5	Der HO-1 Mangel bedingt eine verminderte Bag-1 Expression nach LPS Stimulation	40
5	Diskussion.....	42
5.1	Spontane Aborte scheinen mit einer verminderten Fähigkeit der HO-1 Produktion einherzugehen.....	43
5.2	Trophoblastzellen reagieren unabhängig von der HO-1 Proteinkonzentration auf LPS mit einer verstärkten IL-6 und TNF- α Produktion	44
5.3	Das anti-apoptotische Molekül Bag-1 wird in Trophoblastzellen von spontanen Aborten vermindert exprimiert.....	45
5.4	HO-1 Defizienz bedingt <i>in vivo</i> eine erhöhte T-Zellzahl in der Milz	46
5.5	Die Immunantwort auf LPS hat keinen Einfluss auf die Anzahl an Dendritischen Zellen und T-Zellen in lymphoiden Organen und an der fetal-maternalen Grenzfläche	47
5.6	Die Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in der Milz ist HO-1 abhängig.....	48
5.7	<i>In vivo</i> wird die HO-1 Expression in der Plazenta unter dem systemischen Einfluss von LPS verstärkt.....	49

5.8 Die TNF- α Produktion an der fetal-maternalen Grenzregion korreliert negativ mit der HO-1 Expression	50
5.9 <i>In vivo</i> vermindert die LPS Stimulation die Bag-1 Expression in der Plazenta von <i>Hmox1</i> ^{+/-} Mäusen	52
5.10 Zusammenfassung und Ausblick	53
6 Zusammenfassung	55
7 Literaturverzeichnis	56
8 Danksagung	67
9 Lebenslauf	68
10 Ehrenerklärung	70
11 Anhang	71
11.1 Material	71
11.2 Methoden	80
11.3 Zytokinkonzentrationen in Überständen primärer Trophoblasten nach LPS Stimulation	89
11.4 Bag-1 Expression in Plazenten von <i>Hmox1</i> ^{-/-} Mäusen	90

1 Abkürzungsverzeichnis

Bag-1	BCL-2 associated athanogene (BCL-2 assoziiertes Athanogen)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsmuster)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-basierte Zellsortierung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hCG	human chorionic gonadotropin (humanes Choriongonadotropin)
HMOX1	Gen der Hämoxygeanse-1 des Menschen
<i>Hmox1</i>	Gen der Hämoxygenase-1 der Maus
HO-1	Hämoxygenase-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Nukleärer Faktor- kappa-Leichtketten Erhöher- aktivierter B-Zellen)
NK	Natürliche Killerzelle
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assozierte molekulare Muster)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction (Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion)
SSW	Schwangerschaftswoche
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α (Tumor-Nekrosefaktor- α)

2 Einführung

2.1 Die Schwangerschaft

Die Schwangerschaft des Menschen dauert vom Tag der Befruchtung bis zur Geburt im Durchschnitt 38 Wochen oder 266 Tage. Dieser Zeitraum wird in Trimester eingeteilt, wobei das erste Trimester den ersten bis dritten Schwangerschaftsmonat, das zweite Trimester den vierten bis sechsten und das dritte Trimester den siebten bis neunten Schwangerschaftsmonat umfasst. Während der Schwangerschaft kommt der Plazenta eine besondere Bedeutung zu. Sie wird durch die Trophoblastzellen gebildet und garantiert die Versorgung des Ungeborenen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Des Weiteren stellt sie die direkte Kontaktstelle zwischen Mutter und Kind dar und ermöglicht die Interaktion zwischen beiden [1].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben humanen Plazentagewebe auch mit trächtigen Mäusen gearbeitet. Die Schwangerschaft der Maus hat eine Zeitdauer von ca. 20 Tagen. Die Stufen der Entwicklung und Differenzierung ähneln in ihren Grundzügen denen des Menschen. So kommt es auch im Laufe der murinen planzentaren Entwicklung zu einem direkten Kontakt zwischen mütterlichen Organismus und den kindlichen Trophoblasten. [2-3].

2.1.1 Abort

Der Abort (Fehlgeburt) beschreibt den Verlust des Schwangerschaftsproduktes vor Eintritt der extrauterinen Lebensfähigkeit, beim Menschen ca. bis zur 22. SSW. Dabei wird der spontane Abort vom künstlich herbeigeführten, legalen Schwangerschaftsabbruch unterschieden [4]. 15 bis 25 % aller Schwangerschaften enden in einem spontanen Abort, der sich klinisch durch Blutungen äußern kann und mittels Ultraschall sonographisch diagnostiziert wird [5]. Diese durch klinische Symptome ermittelte Abortrate muss nach oben korrigiert werden, denn einige Schwangerschaften enden unerkannt unmittelbar nach der Empfängnis. Viele Frauen sind sich zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft noch nicht bewusst, da noch keine Zyklusveränderungen aufgetreten sind. Schwangerschaft bzw. Fehlgeburt bleiben dann unbemerkt oder werden als Zwischenblutung verkannt. Mittels der kontinuierlichen Messung des Schwangerschaftshormones β -hCG über mehrere Zyklen fruchtbarer Frauen wurden realistische Abortraten zwischen 43 bis 60 % ermittelt [6-7]. Der Großteil der Aborte ereignet sich im ersten Trimester und ist durch chromosomale Veränderungen bedingt [8]. Viele weitere Risikofaktoren für eine spontane Fehlgeburt sind beschrieben, darunter Zigarettenkonsum, Chemikalienexpo-

sition, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und Infektionen [9-12]. Wiederholte oder habituelle Aborte liegen vor, wenn eine Frau drei oder mehr spontane Aborte erleidet. Anders als bei einmaligen Aborten sind die Ursachen hier vorwiegend in einer immunologischen Fehlregulation zu suchen [13].

2.1.2 Immunologische Grundlagen der Schwangerschaft

Der Fetus besitzt Genomanteile des Vaters und präsentiert diese als fremde Antigene dem mütterlichen Immunsystem. Die Schwangerschaft kann vor diesem Hintergrund als eine Art Allotransplantation betrachtet werden. Anders als bei einem Organtransplantat erfährt der Fetus aber keine Abstoßungsreaktion, sondern wird vom mütterlichen Immunsystem trotz direktem Kontakt toleriert [14]. Der erste Kontakt des mütterlichen Immunsystems mit väterlichen Antigenen findet vermutlich bereits bei der Insemination statt. Unsere Arbeitsgruppe zeigte im Mausmodell, dass mütterliche, Antigen präsentierende Dendritische Zellen (MHCII⁺ CD11c⁺) in der vaginalen Flüssigkeit in Verbindung mit Antigenen des männlichen Samens zur Expansion regulatorischer T-Zellen führen. Diese spezifischen T-Zellen bewirken eine frühe Toleranz der väterlichen Antigene, die später auch das Ungeborene präsentiert [15]. Die Akzeptanz des Feten ist somit nicht durch eine verminderte Immunaktivität bedingt, sondern Ergebnis aktiver Regulationsprozesse von Seiten mütterlicher Immunzellen und später auch der fetalen Trophoblastzellen. Ab dem frühen Stadium der Implantation finden sich an der fetal-maternalen Grenzregion weitere Immunzellen. Diese werden in der frühen Schwangerschaft von Zellen des angeborenen Immunsystems dominiert, neben den Dendritischen Zellen gehören dazu uterine natürliche Killer Zellen (NK-Zellen), Makrophagen und Mastzellen [16-18] (unveröffentlichte Daten von Katja Woidacki). Jede dieser Zellpopulationen erfüllt eine spezifische Rolle für die erfolgreiche Implantation, Plazentaentwicklung und Differenzierung [19-21]. *In vitro* Studien zeigten, dass Trophoblasten selbst die Migration von NK-Zellen und Makrophagen bewirken können und als Modulatoren des angeborenen Immunsystems agieren [19,22].

Die Zellinteraktion muss dabei genau kontrolliert werden und wird durch extrazelluläre Signalmoleküle, wie den Zytokinen gesichert. Hierbei handelt es sich um lösliche Proteine und Glykoproteine, die von Leukozyten und anderen Körperzellen produziert werden. Sie sichern die Zellinteraktion, indem sie an spezifischen Rezeptoren binden und über diese intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Unter Berücksichtigung funktioneller Aspekte ist eine Einteilung der Zytokine abhängig von deren Produktion durch T-Zellen in Th1 und Th2 Zytokine ge-

bräuchlich. T-Zellen gehören dem adaptiven, spezifischen Immunsystem an. Sie werden nach ihren Oberflächenmarkern in zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$) und T-Helfer Zellen ($CD4^+$) eingeteilt. Während Erstere die Zielzelle direkt bekämpfen, agieren die T-Helfer Zellen indirekt durch die Aktivierung anderer Immunzellen. Sie werden wiederum in die Gruppe der T-Helfer Zellen Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2) unterteilt. Unter anderem gehören Interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) zur Gruppe der Th1 Zytokine. Sie bedingen eine zelluläre Immunantwort, die durch Aktivierung von Makrophagen und anderen Immunzellen ein entzündliches Milieu generiert. Th2 Zytokine, darunter IL-10 und IL-4 bedingen eine humorale, durch Antikörperproduktion charakterisierte Immunantwort [23-25]. In älteren Studien wurde ein starres Konzept postuliert, in dem inflammatorische Th1 Zytokine die Schwangerschaft gefährden, Th2 Zytokine dagegen eine erfolgreiche Schwangerschaft ermöglichen [26-27]. Zeitnahe Studien zeigen, dass diese starre Zytokin-Balance nicht ausreichend ist die Ursachen von Schwangerschaftskomplikationen zu erklären und eine zu starke Vereinfachung darstellt. So können auch IL-10 und IL-4 defiziente Mäuse erfolgreiche Schwangerschaften austragen [28]. IFN- γ ist nicht nur schwangerschaftsgefährdend, sondern ermöglicht in moderaten Konzentrationen die frühe Differenzierung der Trophoblastzellen. Des Weiteren hat dieses Zytokin über die Reifung von uterinen NK-Zellen Einfluss auf die Ausbildung der Plazenta versorgenden Arterien [29-30]. Es hat sich also gezeigt, dass die Signalkontrolle an der fetal-maternalen Grenzregion nicht einfach in gefährlich und protektiv eingeordnet werden kann. Vielmehr müssen die Konzentrationen der einzelnen Moleküle im Kontext zum Schwangerschaftszeitpunkt und der Situation betrachtet werden. Die Faktoren, die diese feine Einstellung der Immunbalance über die Zytokine ermöglichen und wann und warum diese gestört werden, sind Thema aktueller Forschung.

2.2 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und gelten als potente Induktoren des angeborenen Immunsystems. Gramnegative Bakterien umfassen eine heterogene, zum Teil auch humanpathogene Gruppe von Mikroorganismen, wie *Escherichia coli*, *Klebsellia pneumoniae* oder *Chlamydia trachomatis* [31]. LPS sind amphiphile Moleküle, die aus einem lipophilen Lipid A, einer verbindenden Kernregion und einem hydrophilen Poly- bzw. Oligosaccharid, dem O-Antigen bestehen. Das O-Antigen ragt in die Umgebung außerhalb des Bakteriums und unterscheidet sich zwischen verschiedenen Bakterienarten [32]. Das Lipid A stellt den relevanten, das Immunsystem aktivierenden Be-

standteil dar [33]. Es wird bei Zelllyse, -tod oder -teilung aus der Membran freigesetzt und aus diesem Grund auch als Endotoxin bezeichnet [34]. LPS wird ohne vorherige Sensibilisierung direkt vom angeborenen Immunsystem als Pathogen erkannt und gehört somit zu den *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs). Als spezifisch LPS bindender Rezeptor wurde der *Toll-like Rezeptor 4* (TLR4) charakterisiert [35]. Dieser transmembrane Rezeptor findet sich nicht nur in Zellen des Immunsystems, sondern auch in nicht immunologischen Zellen wie Endothelzellen, Myozyten oder Fibroblasten [36-39]. Er vermittelt über verschiedene intrazelluläre Adaptermoleküle und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Bildung inflammatorischer Immunmodulatoren wie TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, Prostaglandinen und Wachstumsfaktoren für Immunzellen (Abbildung 1). Es kommt zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und zur sofortigen Bekämpfung des Pathogens [31,40].

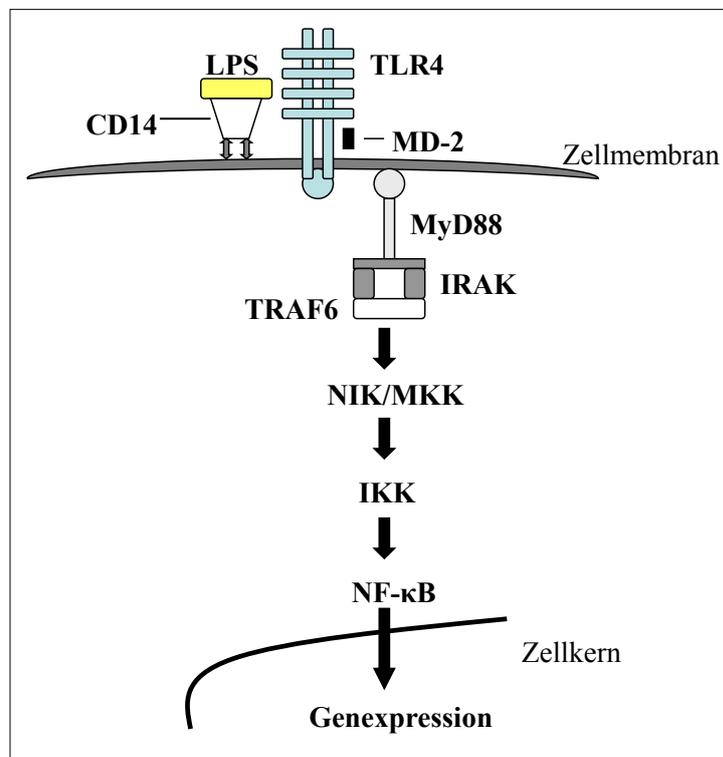


Abbildung 1: Schematische Darstellung der LPS induzierten intrazellulären Signalkaskade. LPS wird im Komplex mit CD14 durch den TLR4 erkannt. Dieser liegt in Verbindung mit MD-2 vor und generiert eine intrazelluläre Signalkaskade, welche über verschiedenen Adaptermoleküle zur Aktivierung von NF- κ B führt. Die Expression immunmodulierender Botenstoffe wird so induziert und eine Immunantwort in die Wege geleitet. MyD88 = myeloid differentiation primary gene (88), IRAK = IL1 receptor associated kinase, TRAF6 TNF receptor associated factor 6, NIK/MKK = NF- κ B inducing kinase/mitogen activated protein kinase kinases, IKK = inhibitory κ B kinase. Modifiziert nach *Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG: Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? Chest. 121. 1329-1336 (2002)*

2.2.1 LPS in der Schwangerschaft

Beim Menschen konnte in einer Reihe klinischer Studien gezeigt werden, dass eine vaginale Fehlbesiedlung mit gramnegativen Bakterien in der frühen Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko für Fehl- bzw. Frühgeburten einhergeht [41-43]. In Tiermodellen wurde die Rolle von LPS als schwangerschaftgefährdendes Agens verifiziert. Schon kleine Mengen in der frühen Schwangerschaft führen zu Fehlbildungen bis hin zur fetalen Resorption, wobei die Muttertiere keine gesundheitliche Beeinträchtigung zeigen [44-45]. LPS wirkt dabei selbst nicht direkt toxisch auf das Ungeborene. So zeigt die LPS Behandlung der Embryokultur keine toxischen oder letalen Effekte. Es ist vielmehr die LPS bedingte mütterliche Immunantwort, die die erfolgreiche Schwangerschaft bedroht [46]. Diese wird durch die Trophoblastzellen vermittelt. Sie exprimieren den LPS erkennenden Rezeptor TLR4 während der gesamten Schwangerschaft in steigenden Konzentrationen [47]. Dass die fetale Letalität indirekt von LPS durch den TLR4 vermittelt wird, zeigt sich im Mausmodell mit einem Defekt für diesen Rezeptor. Diese Tiere weisen keine pathologischen Schwangerschaftsverläufe nach der Behandlung mit abgetöteten gramnegativen Bakterien auf [48]. Der TLR4 vermittelt die Produktion immunmodulierender Moleküle durch die Trophoblastzellen. Hierbei handelt es sich einmal um extrazelluläre Signalstoffe, die eine Migration von Leukozyten an die fetal-maternale Grenzregion und Infiltration in die Plazenta bewirken [49]. Weiterhin kommt es zur vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und TNF- α . Im Gegenzug wird die Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 vermindert [50-51]. Die Trophoblastzellen selbst sind nun wiederum hoch sensibel gegenüber der zytotoxischen Wirkung zu hoher inflammatorischer Zytokinkonzentrationen und reagieren auf diese mit dem programmierten Zelltod [52]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Reaktionen an der fetal-maternalen Grenze auf LPS die Immunbalance soweit stören kann, dass die Schwangerschaft nicht weiter aufrecht erhalten wird. LPS selbst hat dabei keine toxischen Eigenschaften, es impliziert dem Immunsystem eine Infektion, auch ohne das Vorhandensein eines eigentlichen Krankheitserregers. Die dabei generierte Immunantwort stellt die eigentliche Gefährdung der Schwangerschaft dar.

2.3 Hämoxygenase

Die Hämoxygenase (HO) ist ein Enzym, das die erste und geschwindigkeitsbestimmende Reaktion des Häm-Abbaus katalysiert [53]. Hämproteine sind im Körper ubiquitär, fungieren als Elektronentransporter in Cytochrom c oder als Sauerstofftransporter im Hämoglobin und

Myoglobin. Freies Häm ist durch Bildung freier Sauerstoffradikale und Generierung oxydativen Stresses zytotoxisch und der schnelle Abbau somit obligat [54-55]. Dabei wird Häm von der HO zu äquimolaren Mengen Kohlenmonoxid (*carbon monoxid*, CO), Biliverdin und Eisen abgebaut [56] (Abbildung 2). Als Produkte unterschiedlicher Gene sind 3 Isoformen dieses Enzyms bekannt. Die HO-1 und HO-2 sind hochkonserviert und lassen sich in Pilzen, Pflanzen und Säugetieren finden. Ihre Gene zeigen eine Sequenzhomologie bei Ratten, Mäusen und Menschen die bei 80-90% liegt [57]. Die HO-3 konnte nur in Tieren nachgewiesen werden und ist wenig beschrieben [58].

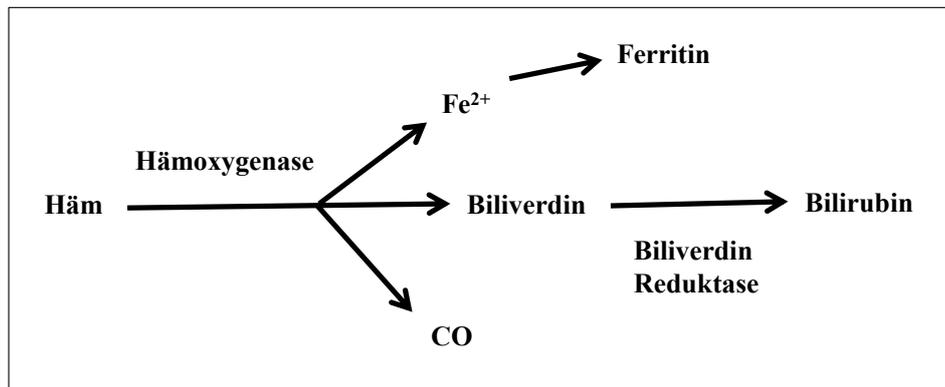


Abbildung 2: Enzymatische Reaktion der Hämoxigenase. Häm wird durch die Hämoxigenase zu äquimolaren Mengen von CO, Biliverdin und freiem Eisen abgebaut. Im direkten Anschluss wird Biliverdin zu Bilirubin reduziert und das freie Eisen durch das Speichermolekül Ferritin gebunden. Modifiziert nach Otterbein LE, Choi AM: *Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279. L1029-1037 (2000)

2.3.1 Funktion und Bedeutung der HO-1

Die auch als *Heat Shock Protein 32* (HSP 32) bekannte HO-1 ist durch verschiedene endogene und exogene zelltoxische Stimuli induzierbar. Dazu zählen verschiedene inflammatorische Zytokine, Ischämie, Hypoxämie, Schwermetalle, ultraviolette Strahlung und Endotoxine [59-63]. In diesem Zusammenhang erfüllt die HO-1 nicht nur die Funktion eines Häm degradierenden Enzyms. Ihm wurden, auch nicht zuletzt durch die Wirkung seiner Abbauprodukte, anti-inflammatorische, anti-apoptotische, anti-oxidative und gefäßregulierende Eigenschaften zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass CO in den von der HO-1 produzierten Mengen als Signalmolekül Apoptose in Fibroblasten und Endothelzellen verhindern kann [64]. Es hat gefäßerweiternde Eigenschaften, vermindert die Plättchenaktivierung und verfügt über entzündungshemmende Fähigkeiten durch die Regulation der Zytokinproduktion [63,65-68]. Das

von der HO erzeugte Biliverdin wird durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert und ist ein potentes Antioxidant [69].

2.3.2 HO-1 in der Schwangerschaft

In vielen Studien und Tiermodellen konnte belegt werden, dass HO-1 in der Schwangerschaft eine große Rolle spielt. Als Hauptressource dieses Enzyms an der fetal-maternalen Grenze erwiesen sich die Trophoblastzellen. Diese exprimieren abhängig vom Differenzierungsgrad und Trimester HO-1 in unterschiedlichen Mengen [70-71]. Ist die Konzentration der HO-1 an der fetal-maternalen Grenze vermindert, ist die Schwangerschaft gefährdet. So zeigt ein Polymorphismus des HMOX1-Genes beim Menschen, der zu einer verminderten Expression des Enzyms führt, eine Korrelation zu wiederholten Fehlgeburten [72]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine zu Fehlgeburten neigende Verpaarungskombination von Mäusen ebenfalls durch verminderte HO-1 Level in der Plazenta gekennzeichnet ist [73]. Durch die Gabe von Zinkprotoporpherin, ein Inhibitor der HO-1 und HO-2 Isoform waren wir in diesem Mausmodell in der Lage, die Abortrate sogar weiter zu steigern. Im Gegenzug dazu erreichten wir durch die HO-1 Hochregulation einen schwangerschaftsprotektiven Effekt. So konnte mittels Kobaltprotoporpherin, ein bekannter Induktor der HO-1 Expression, die Fehlgeburtenrate signifikant gesenkt werden [74]. Das gleiche Ergebnis ließ sich durch den Transfer des HO-1 kodierenden Gens und der dadurch erhöhten Expression des Enzyms erreichen. Die verminderte Rate an Fehlgeburten ging hier mit dem verminderten Zelltod plazentarer Zellen und einer erhöhten Th2 zu Th1 Zytokin Ratio einher [75].

In diesen beiden Studien untersuchte unsere Arbeitsgruppe des Weiteren die Rolle von Bag-1 (*BCL-2 associated athanogene*) im Zusammenhang mit der HO-1. Bag-1 ist ein intrazellulär lokalisiertes Molekül, das Zellen vor dem programmierten Zelltod schützt [76-77]. Im Zusammenhang mit der HO-1 fand es erstmals in der Transplantationsforschung Beachtung. So ging die Hochregulation von HO-1 durch Gentherapie mit verlängertem Transplantatüberleben und erhöhten Bag-1 Konzentrationen einher [78]. In der Schwangerschaft wurde ebenfalls mit HO-1 Induktion eine Steigerung der Bag-1 Konzentration in der Plazenta erreicht und damit eine verringerte Apoptoserate plazentarer Zellen. Die Mechanismen mit denen die HO-1 über eine Bag-1 Induktion wirkt und somit das Zellüberleben fördert sind nicht vollständig verstanden. Diese Signalkaskade zeigt aber einen Weg über den die HO-1 ihren zytoprotektiven und anti-apoptischen Charakter verwirklicht [74-75]. Im Tiermodell konnte mittels genetisch veränderter Mäuse eine unentbehrliche Rolle der HO-1 für die Schwangerschaft bestä-

tigt werden. Dabei unterscheidet man Tiere, die das Allel des HO-1 kodierenden Gens *Hmox1* zweifach besitzen, also dem normalen Wildtypen entsprechen (*Hmox1^{+/+}*), von solchen die dieses nur einfach besitzen und somit heterozygot sind (*Hmox1^{+/-}*) und Tiere, die es gar nicht haben, so genannte knockout Mäuse (*Hmox1^{-/-}*). Dieses Modell für eine HO-1 Defizienz lässt erkennen, dass der Mangel des Enzyms die Schwangerschaft maßgeblich beeinflusst. So werden aus der Verpaarung von *Hmox1* heterozygoten Tieren nur 7,33 % anstatt der nach der Mendel'schen Regel erwarteten 25 % HO-1 knockout Tiere geboren. Dabei zeigen die Tiere keine Unterschiede in der Anzahl der Implantationen im Vergleich zur reinen *Hmox1^{+/+}* Verpaarung. In diesem Mausmodell kommt es aber mit abnehmender HO-1 Expression und damit auch Aktivität zum vermehrten Fetal Tod im Verlauf der Schwangerschaft. Dieser erreicht 100 % in der reinen *Hmox1^{-/-}* Verpaarung, aus der keine überlebendigen Nachkommen hervorgehen [79]. Unsere Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus die Erkenntnisse über den Einfluss der HO-1 Expression auf die Differenzierung und Entwicklung der Plazenta und damit den Schwangerschaftsausgang weiter vervollständigen. Die Plazenta zeigt mit verminderter HO-1 Konzentration eine veränderte Morphologie, sowie vermehrt fibrotische und hämorrhagische Zonen. Als ursächlich für diese pathologischen Veränderungen ist der vermehrte Anfall freien Häms zu sehen. Es induzierte in bestimmten Konzentrationen die gleichen Effekte in trächtigen *Hmox1^{+/+}* und *Hmox1^{+/-}* Tieren wie der reine HO-1 Mangel. Durch die dosierte Verabreichung von CO konnten wir dagegen den HO-1 Mangel ausgleichen und die damit einhergehenden Plazentaveränderungen vermindern [79]. Ein weiteres, gut etabliertes Mausmodell ist die CBA/J und DBA/2J Verpaarung, welches durch Aborte und intrauterine Wachstumsretardierung gekennzeichnet ist. Auch hier liegt eine verminderte Expression der HO-1 im placentaren Gewebe vor und auch hier konnten wir durch die Behandlung mit CO den protektiven Effekt der HO-1 imitieren. Die dosierte Gabe von CO in einem bestimmten Zeitfenster der frühen Schwangerschaft erhöhte das Plazentagewicht und verminderte die Fehlgeburtenrate. Diese Wirkung von CO ging mit einer reduzierten Konzentration zirkulierenden Häms und einer Verschiebung des immunologischen Gleichgewichtes zur anti-inflammatorischen Seite einher [79-80]. Zusammenfassend erlangt die HO-1 für die Schwangerschaft somit in zweierlei Hinsicht eine besondere Bedeutung. Das Enzym schützt die Plazenta und den Fetus durch den Abbau des toxischen Häms und verwirklicht gleichzeitig durch das entstehende Abbauprodukt CO den erfolgreichen Schwangerschaftsausgang.

2.3.3 HO-1 in Wechselwirkung mit dem Immunsystem

Der regulierende Einfluss der HO-1 auf das Immunsystem wurde früh im Zusammenhang mit der Transplantationsmedizin erkannt. Das Überleben verschiedener Organtransplantate im Tiermodell ist dabei von der Expression des Enzyms abhängig [81-83]. Der hemmende Effekt der HO-1 auf das Immunsystem und damit der Schutz vor einer Abstoßungsreaktion werden durch CO vermittelt. Dieses hemmt bei dosierter Applikation lungentransplantierte Mäuse die Expression pro-inflammatorischer Gene [84]. Weitere Erkenntnisse konnten am HO-1 defizienten Tiermodell gewonnen werden. *Hmox1*^{-/-} Mäuse leiden neben einer Anämie und Eisenüberladung verschiedener Organe auch an einer chronischen systemischen Entzündung. Diese ist durch vergrößerte Lymphknoten, Splenomegalie und erhöhte Immunzellzahlen im Blutkreislauf gekennzeichnet [85]. Die Relevanz von HO-1 in Bezug auf eine adäquate Immunantwort zeigt sich aber vor allem im Falle einer Infektion. Eine durch LPS induzierte Sepsis bewirkt bei *Hmox1*^{-/-} Tieren eine erhöhte Mortalität, einhergehend mit einer Leber und Nierendysfunktion. Ein solches Ausmaß einer LPS stimulierten Immunantwort lässt sich bei *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Tieren nicht feststellen [86]. Die verstärkte Immunantwort *Hmox1*^{-/-} Tiere auf LPS war in den Studien von Kaptureczak und Kollegen durch eine erhöhte Th1 Zytokinproduktion in der Milz gekennzeichnet. Es zeigten sich dabei aber keine Unterschiede in den Zellpopulationen von Makrophagen, B- oder T-Zellen [87]. Tracz und Mitarbeiter konnten ebenfalls eine vermehrte, Endotoxin bedingte Produktion von Th1 und Th2 Zytokinen, sowie Chemokinen in HO-1 defizienten Mäusen nachweisen. Diese war durch eine fehlende Hemmung der LPS induzierten Signalkaskade auf Ebene des Transkriptionsfaktors NF-κB bedingt [88]. Im Gegenzug zu diesen HO-1 defizienten Modellen kann die Induktion des Enzyms vor einer unkontrolliert starken Immunantwort schützen. Die vermehrte Expression von HO-1 in humanen und murinen Makrophagen bedingt eine verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF-α aber auch des anti-inflammatorischen IL-10 [89]. Der gleiche immunmodulierende Effekt kann durch ein erhöhtes CO Angebot vor der LPS Behandlung bei Endothelzellen beobachtet werden. Die Kontrolle der Immunantwort durch CO wurde in diesem Modell ebenfalls auf eine verminderte Aktivierung von NF-κB zurückgeführt [90]. Wie oben bereits erwähnt, induziert LPS selbst die Expression der HO-1. In der Mausleber ist diese Induktion auch von endogenen Faktoren wie dem Zytokin TNF-α beeinflusst [91]. HO-1 bzw. CO wiederum hemmt die LPS induzierte Signalkaskade auf mehreren Ebenen. So wird neben der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB die Aktivierung des LPS bindenden Rezeptors TLR4 an der Membran reguliert [92]. Durch dieses System der Induktion und Hemmung schließt sich ein Kreis, der eine adäquate Immunantwort auf

LPS bedingt und in dessen Mittelpunkt HO-1 und CO stehen (Abbildung 3).

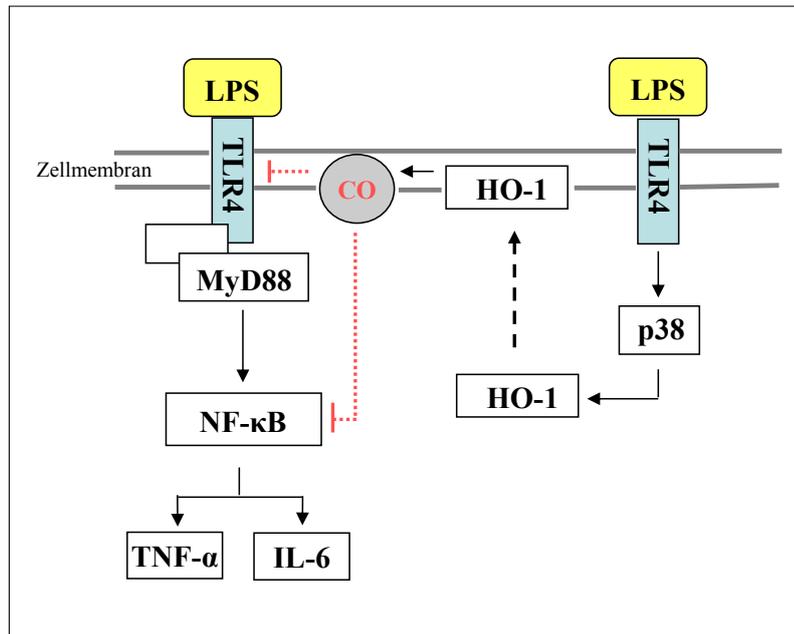


Abbildung 3: Einfluss von HO-1/CO auf die LPS induzierte Signalkaskade. LPS induziert die Expression der HO-1. Diese bedingt durch ihre enzymatische Aktivität eine vermehrte Produktion von CO. CO hemmt direkt den TLR4 und greift regulierend in die LPS induzierte Signalkaskade ein. Es kommt somit zur verminderten Produktion pro-inflammatorischer Moleküle und eine Kontrolle der Immunantwort auf LPS. MyD88 = myeloid differentiation primary gene (88). Modifiziert nach Wang XM, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM: *The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1.* *J Immunol.* 182. 3809-3818 (2009)

2.4 Zielstellung

In der Schwangerschaft kommt den regulierenden Mechanismen des Immunsystems eine besondere Bedeutung zu. So muss eine Infektion durch eine angemessene Immunreaktion bekämpft werden, um die Mutter als auch den Feten zu schützen. Sie darf aber gleichzeitig nicht zu stark ausfallen und so das Ungeborene gefährden. Das komplexe System der Hemmung und Induktion pro- und anti-inflammatorischer Moleküle während der Schwangerschaft, sowie der Einfluss exogener Pathogene ist nicht vollends verstanden. Eine mögliche Schlüsselrolle in der Regulation dieser Immunbalance könnte HO-1 einnehmen. Dieses Enzym, das die Immunreaktion im Falle einer Sepsis nachweislich kontrolliert, könnte auch in der Schwangerschaft Mutter und Ungeborenes vor einer unkontrollierten Immunantwort schützen. LPS imitiert für das Immunsystem eine bakterielle Fehlbesiedlung und wird in dieser Arbeit als Modell für eine Infektion in der Schwangerschaft genutzt. Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss der HO-1 auf diese LPS bedingte Immunantwort zu untersuchen. Dazu wurden ein *in vitro* Versuchskomplex mit menschlichen Trophoblastzellen entworfen. Weiterführende Versuche *in vivo* wurden im Mausmodell mit mutationsbedingter HO-1 Defizienz durchgeführt. Folgende Fragestellungen standen dabei im Fokus der Untersuchungen.

***In vitro* Versuchskomplex**

1. Unterscheiden sich humane Trophoblasten aus spontanen Aborten und Schwangerschaftsabbrüchen in ihrer HO-1 Expression?
2. Hat LPS einen Einfluss auf die HO-1 Synthese in humanen Trophoblasten?
3. Unterscheidet sich die Zytokinsekernierung humaner Trophoblasten von spontanen Aborten und Abbrüchen nach LPS Behandlung in Abhängigkeit von ihrer HO-1 Produktion?
4. Wird das anti-apoptotische Molekül Bag-1 durch die LPS Behandlung moduliert und hängt diese mit der HO-1 Expression zusammen?

***In vivo* Versuchskomplex**

1. Wird die Anzahl Dendritischer Zellen und T-Zellen systemisch und lokal während der Schwangerschaft durch die HO-1 Expression oder die LPS Behandlung in der Maus beeinflusst?

2. Ist die Produktion von Zytokinen in der Milz trächtiger Mäuse von der HO-1 Expression abhängig und welchen Einfluss hat LPS darauf?
3. Ist die Zytokinproduktion an der fetal-maternalen Grenzfläche abhängig von der HO-1 Expression und wird diese durch die LPS Behandlung modifiziert?
4. Wird die Bag-1 Expression in der Maus an der fetal-maternalen Grenzfläche von der HO-1 Expression oder LPS beeinflusst?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Das Material und die Tiere zur Erstellung dieser Arbeit wurden durch das Institut der Experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe bereitgestellt. Gewebe zur Gewinnung primärer Trophoblasten erhielten wir von der Landesfrauenklinik in Magdeburg (Details siehe Anhang 11.1).

3.2 Methoden

3.2.1 Trophoblastzellisolierung aus Plazentagewebe

Primäre Trophoblastzellen wurden aus placentarem Gewebe der 6. bis 12. Schwangerschaftswoche isoliert. Das Gewebe wurde von Frauen gespendet, die aus persönlichen Gründen einen Abbruch vornehmen ließen oder eine spontanen Fehlgeburt erlitten. Das Gewebe wurde mittels einer Verdaulösung aufgespalten und die Trophoblastzellen durch anschließende Dichtezentrifugation separiert und in Kultur genommen (Details siehe Anhang 11.2.1).

3.2.2 Zytokeratinfärbung primärer Trophoblastzellen

Primäre Trophoblasten in Kultur wurden gegen Zytokeratin gefärbt, um sie von Fibroblasten, die kein Zytokeratin exprimieren, abzugrenzen und die Reinheit der Kultur zu bestimmen. Hierfür wurde Zytokeratin als gesuchtes Antigen in den primären Zellen mittels indirekter Immunhistochemie nach Standardprotokoll visualisiert (Details siehe Anhang 11.2.2). Die Färbung der Zellen wurde mit Hilfe des Mikroskops Axio Observer A1 ausgewertet und die Dokumentation erfolgte mittels des Axio Vision Programmes. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe des Zählokulars.

3.2.3 Stimulation primärer Trophoblastzellen mit LPS

Kultivierte Trophoblastzellen (3. - 6. Passage) wurden zur Stimulation mit LPS verwendet und es wurden sieben Zeitspannen für die Dauer der LPS Inkubation festgelegt (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h). Als Kontrolle dienten unbehandelte Trophoblastzellen. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden aus der Kultur in Lösung genommen. 10 μ l der Zellsuspension wurden in eine Neubauerzählkammer überführt, die Zellen ausgezählt und die Gesamtzellzahl mittels folgender Rechnung bestimmt.

Zellzahl = Mittelwert der Zellzahl aus 4 Quadranten \times Verdünnungsfaktor \times Volumen $\times 10^4$

Nach der Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 min bei RT wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml M199 resuspendiert. Es wurden jeweils 250.000 Trophoblastzellen in eine 6-Lochplatte ausplattiert und mit M199 auf 2 ml aufgefüllt und inkubiert. Nachdem die Trophoblastzellen innerhalb von 48 h eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreichten, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellgruppen wurden mit 10 μ g/ml LPS in 2 ml M199 behandelt, bzw. in den Kontrollgruppen mit 2 ml reinem M199. Jeweils nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h wurde der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die adhärennten Trophoblastzellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 700 μ l Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1300 μ l M199 gestoppt und die nun gelösten Zellen konnten in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Es folgte die Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 min bei RT und nach Verwerfen des Überstandes ein erneutes Waschen der Zellen mit 1 ml PBS. Das nach der Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 min bei RT erhaltene Zellpellet wurde bis zur Proteinisolierung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.1 Immundetektion spezifischer Proteine im Western Blot

Aus den primären Trophoblastzellen wurden nach Standardprotokoll Proteine isoliert und nach der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Western Blot erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und auf dieser konnten mittels Immundetektion spezifische Proteine visualisiert werden (Details siehe Anhang 11.2.3-11.2.5). Hierfür wurden die gesuchten Proteine HO-1 bzw. Bag-1 durch die indirekte Immunhistochemie dargestellt. Um eine relative Aussage, über die Konzentration des gesuchten Proteins treffen zu können, wurde zusätzlich auf der gleichen Membran das Proteinprodukt eines Haushaltsgens (*house keeping gene*) mitbestimmt. Die Signale für die gesuchten Proteine und das jeweilige Haushaltsgen wurden mittels der Chemilumineszenzapparatur und des GenSnap- Computerprogrammes aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte anschließend durch das Programm GenTools, welches die Messung der Intensität des Chemilumineszenzsignals der einzelnen Proteinbanden ermöglicht. Die Angaben über die Proteinkonzentration der gesuchten Moleküle erfolgten relativ zur Konzentration des Haushaltsgens.

3.2.4 Aufkonzentration von Zellkulturüberständen

In Vorversuchen waren auf Grund einer zu starken Verdünnung keine Zytokine in den reinen Überständen der Trophoblasten nachweisbar. Aus diesem Grund wurden die Überstände für spätere Zytokinbestimmungen mittels Zellulosefilter durch Zentrifugation aufkonzentriert. Hierzu wurden die Überstände auf Eis aufgetaut und die Filter mit jeweils 500 µl der Probe bestückt. Der Filter wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Probe bei 14000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das im Reaktionsgefäß vorhandene Filtrat wurde verworfen. Der Filter wurde umgedreht in das Reaktionsgefäß gesteckt und das Konzentrat durch eine kurze Zentrifugation bei 3500 rpm für 2 min bei 4 °C in das Reaktionsgefäß überführt. Das Gesamtvolumen einer Probe wurde somit von 2 ml auf 30 - 50 µl konzentriert. Die Konzentrate wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Verpaarung und Behandlung der Mäuse

Es wurden weibliche BALB/c Mäuse mit mutationsbedingter unterschiedlicher Expression der HO-1 verwendet ($Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$, $Hmox1^{-/-}$). Das *Hmox1*-Gen kodiert das Proteinprodukt der HO-1 und durch eine Mutation dieses Genes wird die Expression des Enzymes verhindert [93]. Die Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen bis 12 Wochen mit C57BL/6 Männchen im Alter von 8 bis 36 Wochen verpaart (Abbildung 4). Die Weibchen wurden morgens und abends auf einen Vaginalpfropf hin untersucht. Dieser ist kennzeichnend für Tag null der Schwangerschaft. Den BALB/c Tieren wurde am siebten Tag der Schwangerschaft 0,1 µg LPS in 200 µl PBS oder nur 200 µl PBS intraperitoneal injiziert. Die Herstellung der Lösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

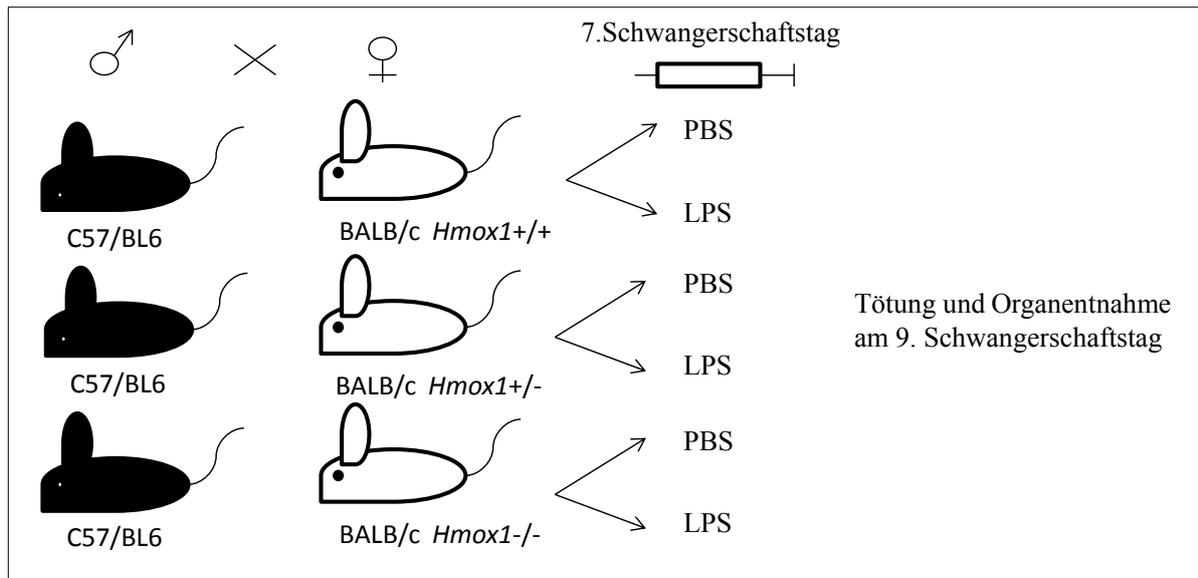


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Mausverpaarung und LPS Behandlung.

3.2.6 Präparation und Probenaufarbeitung

Die Tiere wurden durch Genickbruch am 9. Schwangerschaftstag getötet. Nach Fixierung der Mäuse und gründlicher Desinfektion des Fells mit Ethanol wurde die Bauchdecke vom unteren Abdomen zum Thorax hin eröffnet. Die Bauchhaut wurde seitlich fixiert und die inguinalen Lymphknoten entnommen. Nach Eröffnung der muskulären Bauchwand konnten die iliakalen Lymphknoten, sowie die Milz präpariert und entnommen werden. Der Uterus der Tiere wurde präpariert und in PBS gewaschen. Nach fotografischer Dokumentation der Implantation wurde der Uterus eröffnet und die Implantationen von der Dezidua ab präpariert. Die Plazenten wurden von ihrem Embryo getrennt und in PBS gewaschen. Je nach weiterer Verarbeitung wurden die einzelnen Organe unterschiedlich behandelt. So wurde ein Stück der Milz, sowie zwei Plazenten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff überführt. Für spätere RNA Analysen konnten die Organe so konserviert bei -80 °C gelagert werden. Inguinale und iliakale Lymphknoten und die restliche Milz wurden für Lymphozytenisolierung mit 1 ml sterilem RPMI in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Uterus und Dezidua wurde mit der Schere zerkleinert und in einem 50 ml Probengefäß zusammen mit 5 ml HBSS bis zur Lymphozytenisolierung ebenfalls auf Eis gelagert. Die Lymphozytenisolierung erfolgte nach Standardprotokoll (Details siehe Anhang 11.2.6-11.2.7).

3.2.6.1 Lymphozyten Bestimmung mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurden aus den Mausorganen isolierte Lymphozyten gezählt und das Vorhandensein bestimmter Subpopulationen ermittelt. Die extrazelluläre Färbung der Lymphozyten aus Milz, Dezidua und Lymphknoten erfolgte nach Standardprotokoll unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen CD4, CD8, CD11c, MHCII (Details siehe Anhang 11.2.8). Die Auswertung der mit dem FACS-Calibur ermittelten Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest Pro. Hier wurde die gewünschte Lymphozytenzellpopulation nach ihrem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht in einem FSC-SSC-Diagramm dargestellt und in weiteren Diagrammen nach ihren spezifischen Fluoreszenzsignalen aufgetrennt (Abbildung 5). In den Milz- und Lymphknotenproben wurden jeweils 50.000 Zellen, in der Dezidua 10.000 Zellen pro Probenansatz gemessen.

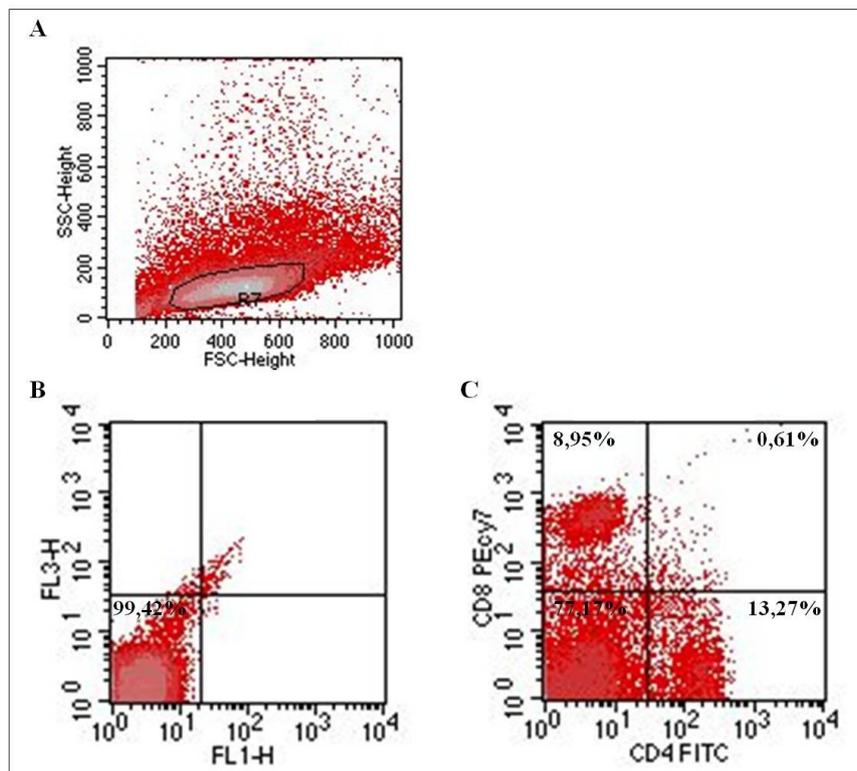


Abbildung 5: Grafische Auswertung der Durchflusszytometrie von Lymphozyten. A: FSC-SSC-Diagramm mit begrenzter Lymphozytenpopulation (R7). B: Ungefärbte Kontrolle von Lymphozyten aus der Milz. C: Gegen die Oberflächenmoleküle CD8 und CD4 gefärbte Probe von Lymphozyten aus der Milz. Prozentangaben für CD8⁺ Zellen im linken oberen Quadranten, CD4⁺ Zellen im rechten unteren Quadranten, CD8 und CD4 doppelt positive Zellen im rechten oberen Quadranten.

3.2.6.2 Zytokinbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die Zytokinbestimmung in den Zellkulturüberständen der primären Trophoblastzellen erfolgte mit Hilfe des Cytometric Bead Arrays. Dieses System ermöglicht die Messung mehrerer Zytokine in einer Probe mittels Durchflusszytometrie. Spezifische Antikörper gegen die zu messenden Zytokine sind an Trägerkügelchen (*capture beads*, Firma BD) gebunden. Nach der Bindung des Antigens an diesen Antikörper, wird ein zweiter freier Antikörper, der mit dem fluoreszierenden Fluorochrom, Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist, an das Antigen gebunden. Der Komplex ergibt durch die Kügelchengröße ein spezifisches Signal für jedes Zytokin und das Fluoreszenzsignal des zweiten Antikörpers ermöglicht eine Aussage über die Konzentration des Antigens. Es wurde mit dem menschlichen Th1/Th2 Zytokin Kit gearbeitet, welches IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α und IFN- γ nachweist und nach Protokoll des Herstellers gearbeitet (Details siehe Anhang 11.2.9). Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit dem FACS-Calibur. Die detektierten Trägermoleküle wurden nach ihrem Vorwärts- und Seitwärtstreulicht in einem FSC-SSC-Diagramm visualisiert und nach Trägergröße und Fluoreszenzstärke aufgeteilt (Abbildung 6). In der anschließenden Auswertung mit dem Computerprogramm FCAP-Array wurden mit Hilfe der Standardreihe die Konzentrationen der einzelnen Zytokine in den Proben über die Stärke des Fluoreszenzsignales errechnet.

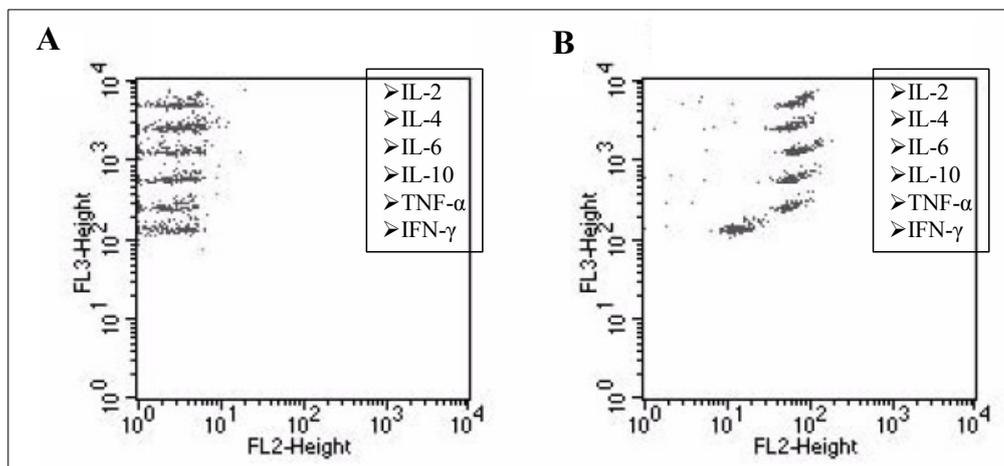


Abbildung 61: Darstellung der grafischen Auswertung der Zytokinbestimmung in Zellüberständen mittels des Cytometric Bead Arrays®. A: Negative Kontrolle und B: Standard mit 80 pg/ml Zytokinen. Auftrennung der Zytokinpopulation IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ (FL3-Height Achse) und der Fluoreszenzstärke (FL2-Height Achse). *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human TH1/TH2 Cytokine Kit II; Instruction Manual Catalog Nr.551809; Seite 28*

3.2.7 Real-Time PCR

Mittels Real-Time PCR wurde die Expression verschiedener Moleküle in der Milz und Plazenta der Mäuse bestimmt. Hierfür wurde zuerst RNA aus dem Gewebe isoliert und mittels eines Thermocycler in cDNA umgeschrieben (Details siehe Anhang 11.2.10-11.2.11). Die Real-Time PCR ist eine Sonderform der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction). Sie ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung kleinster DNA Mengen durch deren Vervielfältigung. Durch die Real-Time PCR wurden HO-1, IL-4, IL-10, TNF- α und Bag-1 in der Mausplazenta und der Milz mittels des TaqMan® quantifiziert. IL-6 wurde mit SYBR®-Green gemessen (Details siehe Anhang 11.2.12-11.2.13). Die Amplifikation, Fluoreszenzmessung und Auswertung wurden mit Hilfe des IQ5 Real Time-PCR Systems und des Programmes IQ5 Software durchgeführt.

3.2.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen, sowie die grafischen Darstellungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 5.0 erstellt. Die an humanen Proben gewonnen parametrischen Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aufgeführt. Sie wurden mit dem Two-Way ANOVA für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen bzw. mit dem Student's *t*-Test für den Vergleich von zwei Gruppen ausgewertet. Für die *in vivo* an Mäusen erhobenen Daten konnte auf Grund der geringen Gruppengröße keine Normalverteilung angenommen werden. Diese Ergebnisse sind als Mediane dargestellt und die Auswertung erfolgte zwischen den Gruppen mit dem nicht-parametrischen Mann Whitney *U*-Test. Es wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ von einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ausgegangen.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Versuchskomplex

4.1.1 Die Kultur primärer humaner Trophoblastzellen erreichte einen hohen Reinheitsgrad

Die Trophoblastzellen formieren die Plazenta und sind damit die Hauptakteure an der fetal-maternalen Grenzfläche. Sie stellen nicht nur die Versorgung des Ungeborenen mit Nährstoffen sicher, sondern treten auch aktiv mit dem mütterlichen Gewebe in Kontakt [1]. Um den Einfluss von LPS auf humane Trophoblasten *in vitro* zu untersuchen, wurden diese aus placentarem Gewebe von frühen Schwangerschaften isoliert und kultiviert. Trophoblastzellen exprimieren Zytokeratin und unterscheiden sich dadurch von anderen Zellen der Plazenta. So ist es möglich zwischen Trophoblasten und vor allem Fibroblasten zu differenzieren [94]. Die von einem Schwangerschaftsabbruch stammenden Trophoblastzellen wurden in der 6. Passage für Zytokeratin gefärbt (Abbildung 7). Die Auszählung der gefärbten Zellen gegenüber den ungefärbten ergab eine Reinheit der Trophoblastzellkultur von 90,2% (Tabelle 1).

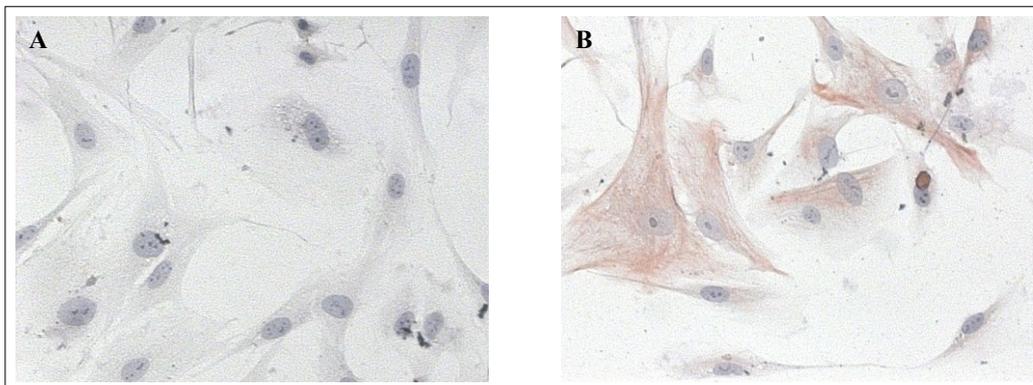


Abbildung 7: Primäre Trophoblastzellen in Kultur sind Zytokeratin positiv. Repräsentative Darstellung primärer Trophoblasten eines Schwangerschaftsabbruches im ersten Trimester (6.Passage) in einer Negativkontrolle (A) und gegen Zytokeratin gefärbt (B). Die Aufnahmen wurden in 200 facher Vergrößerung angefertigt.

Tabelle 1: Primäre Trophoblastzellen in Kultur haben einen sehr hohen Reinheitsgrad. Trophoblastzellen aus placentarem Gewebe eines Schwangerschaftsabbruches im ersten Trimester wurden gegen Zytokeratin gefärbt. Es konnte eine Reinheit der Zellen von 90,2 % festgestellt werden.

	Summe gezählter Zellen in 10 Quadranten	Summe Zytokertin positiver Zellen in 10 Quadranten	Summe Zytokeratin negativer Zellen in 10 Quadranten
Schwangerschaftsabbruch	440	398 (90,2 %)	42 (9,98 %)

4.1.2 HO-1 ist in Trophoblastzellen spontaner Aborte geringer exprimiert als in Schwangerschaftsabbrüchen und wird durch LPS induziert

15 bis 25% aller diagnostizierten Schwangerschaften enden im spontanen Abort. Neben genetischen Veränderungen werden immunologische Fehlregulationen zu den Ursachen gezählt [95]. LPS ist als Bestandteil gramnegativer Bakterien und als Imitator einer Infektion ein starker Induktor einer inflammatorischen Immunantwort. Diese wird an der fetal-maternalen Grenzfläche von den Trophoblastzellen mit bestimmt [96]. So produzieren diese nach LPS Exposition nicht nur vermehrt pro-inflammatorische, sondern auch zytoprotektive Moleküle wie HO-1 [97]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sowohl in der humanen als auch murinen Schwangerschaft verminderte HO-1 Konzentrationen in der Plazenta mit einem pathologischen Schwangerschaftsverlauf assoziiert sind [73,98]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von LPS auf die HO-1 Proteinkonzentration in der Schwangerschaft *in vitro* untersucht. Hierfür wurden kultivierte humane Trophoblasten aus Plazenten spontaner Aborte, somit pathologischer Schwangerschaften und aus Plazenten legaler Abbrüche, also zu diesem Zeitpunkt normaler Schwangerschaften, auf ihre HO-1 Konzentration untersucht (Abbildung 8).

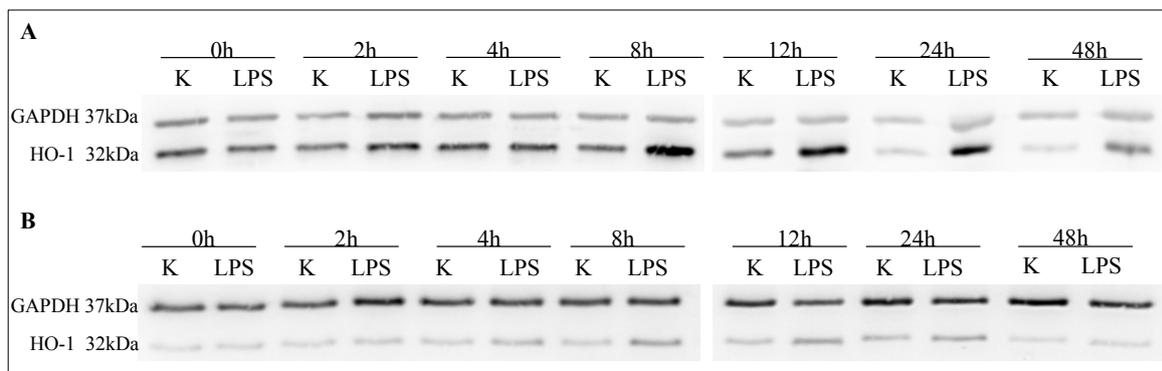


Abbildung 8: Primäre Trophoblastzellen von Aborten exprimieren weniger HO-1 als Zellen von Schwangerschaftsabbrüchen. Es wurden die Banden von HO-1 (32 kDa) und GAPDH (37 kDa) aus Proteinextrakten von primären Trophoblasten von Schwangerschaftsabbrüchen (A) und spontanen Aborten (B) mittels Western Blot detektiert. Die Trophoblasten wurden zuvor für verschiedene Zeiträume (0 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit LPS stimuliert. Für jeden Zeitraum wurde zusätzlich eine Negativkontrolle (K) ohne LPS-Behandlung mitgeführt.

Trophoblastzellen von Abort-Plazenten zeigten zu allen Zeitpunkten eine verminderte HO-1 Expression im Vergleich zu Trophoblastzellen normaler Schwangerschaften. Die LPS Behandlung bewirkte in beiden Gruppen einen zeitabhängigen Anstieg der HO-1 Expression, die

bei 12 h ein Maximum erreichte und dann wieder abnahm. In Trophoblastzellen pathologischer Schwangerschaften konnte dabei eine verminderte Fähigkeit zur HO-1 Hochregulation im Vergleich zu den Zellen von normalen Schwangerschaften nachgewiesen werden (Abbildung 9). Trotz deutlicher Tendenzen konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede festgestellt werden.

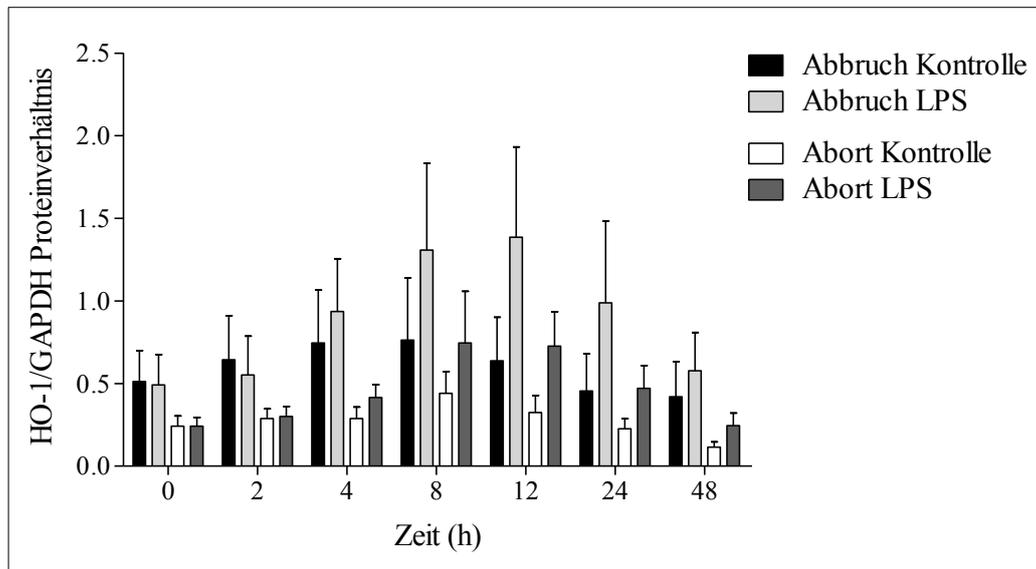


Abbildung 9: Die HO-1 Proteinkonzentration ist in Trophoblastzellen von spontanen Aborten niedriger und zeigt einen geringeren Anstieg nach LPS Stimulation im Vergleich zu Trophoblastzellen von Abbrüchen. Mittels Western Blot wurden die Proteinextrakte primärer Trophoblastzellen aus Schwangerschaftsabbrüchen ($n = 8$) und spontanen Aborten ($n = 7$) auf HO-1 untersucht. Die Zellen wurden zuvor für unterschiedliche Zeiträume (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit LPS stimuliert bzw. als Negativkontrolle belassen. Die relative Expression von HO-1 ist im Verhältnis zu der des Haushaltsgenes GAPDH dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung veranschaulicht. Der Vergleich der Gruppen bezüglich der Behandlung und der Zeit wurde mit dem Two-Way ANOVA Test durchgeführt. Es konnten keine Signifikanzen erhoben werden.

4.1.3 Die LPS Stimulation bewirkt einen Anstieg der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine im Überstand primärer Trophoblasten

Die Balance pro- und anti-inflammatorischer Zytokine spielt in der Schwangerschaft systemisch, als auch an der fetal-maternalen Grenzregion eine große Rolle. So zeigen Frauen mit wiederholten Fehlgeburten während der Schwangerschaft erhöhte Serumlevel an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ [99]. Blutzellen nicht-schwangerer Frauen mit habitueller Abortneigung produzieren nach LPS Stimulation ebenfalls vermehrt diese pro-inflammatorischen Immunmodulatoren [100]. LPS induziert die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ durch Trophoblastzellen und verschiebt die Immunbalance zu einem ent-

zündlichen, die Schwangerschaft gefährdenden Milieu [52]. Im Gegenzug schützen anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 die Schwangerschaft vor der LPS induzierten Immunantwort [101]. HO-1 hat auf die Produktion dieser Moleküle Einfluss und bestimmt somit das Ausmaß der Immunreaktion auf LPS im Sepsismodel [102]. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die LPS induzierte Zytokinproduktion durch Trophoblastzellen von pathologischen und normalen Schwangerschaften ermittelt, um so Aussagen über einen Einfluss von HO-1 auf die Immunantwort treffen zu können. Die Überstände der kultivierten und mit LPS stimulierten Trophoblastzellen wurden hierfür auf die pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-6, TNF- α und IFN- γ , als auch auf die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 hin untersucht. Die Überstände zeigten in beiden Gruppen signifikant höhere Konzentration an IL-6 und TNF- α nach LPS Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen. Der Anstieg der Konzentration dieser inflammatorischen Moleküle verlief dabei zeitabhängig, mit einem Maximum bei 4 bis 12 h, gefolgt von einem langsamen Abfall bis 48 h (Abbildung 10). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Überständen von Trophoblastzellen von spontanen Aborten oder normalen Schwangerschaften. Veränderungen in den Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-10 oder IFN- γ konnten nicht festgestellt werden. Des Weiteren war die LPS Stimulation in beiden Gruppen nicht in der Lage, die Level dieser Moleküle im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant zu verändern (Daten siehe Anhang 11.3 Tabelle 6).

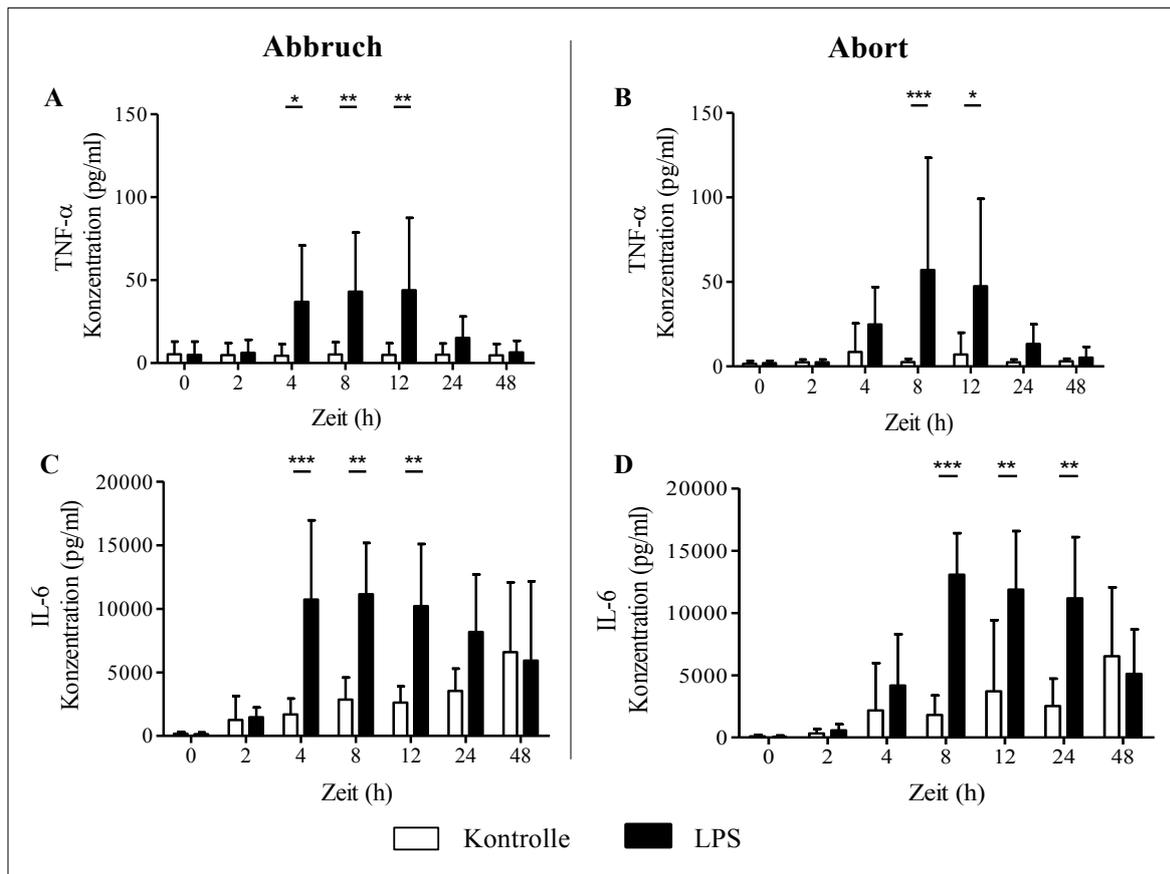


Abbildung 10: LPS erhöht die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine in den Überständen primärer Trophoblastzellkulturen. Humane Trophoblasten in Kultur wurden für unterschiedliche Zeiträume (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit LPS stimuliert und die Überstände auf den Gehalt von Zytokinen untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in den Überständen von Trophoblastzellen aus Gewebe von Abbrüchen (A, C; n = 8) und spontanen Aborten (B, D; n = 7). LPS war in der Lage die Konzentrationen beider Zytokine zeitabhängig zu erhöhen. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet. Der Vergleich der Gruppen bezüglich Behandlung und Zeit wurde mit dem Two-Way ANOVA Test durchgeführt. * = $\rho < 0,05$; ** = $\rho < 0,01$; *** = $\rho < 0,001$

4.1.4 Bag-1 ist in Trophoblasten spontaner Aborte geringer exprimiert als in Schwangerschaftsabbrüchen

LPS ist über die vermehrte Produktion von Zytokinen, insbesondere von TNF- α und IFN- γ , in der Lage die Apoptose von Trophoblasten zu bewirken [52]. Zellprotektive Moleküle, wie Bag-1 verhindern die Apoptose und fördern die Zellproliferation [103]. Wie bereits erwähnt konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Induktion der HO-1 in der Schwangerschaft auch mit einer stärkeren Expression von Bag-1 einhergeht [74]. Im Folgenden wurde geklärt, wie sich die Konzentration von Bag-1 im Vergleich von pathologischen und normalen Schwangerschaften verhält. Vor dem Wissen, dass LPS Einfluss auf die Expression von HO-1

nimmt, wurde weiterhin auch ein Einfluss auf die Bag-1 Konzentration untersucht. Hierfür wurden die Proteinextrakte von primären Trophoblasten auf ihre Bag-1 Konzentration geprüft (Abbildung 11).

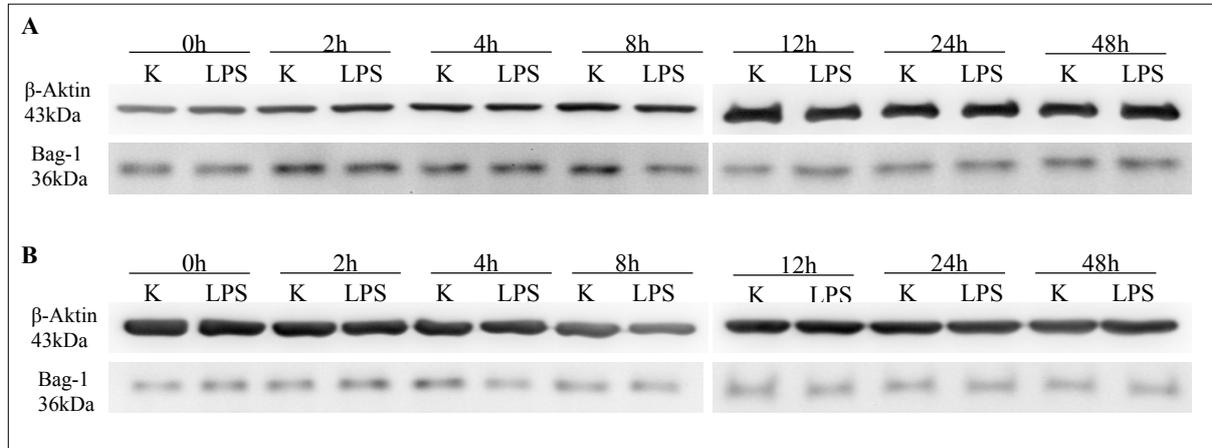


Abbildung 11: Primäre Trophoblastzellen von Aborten exprimieren weniger Bag-1 als Trophoblastzellen von Schwangerschaftsabbrüchen. Es wurden die Banden von Bag-1 (36 kDa) und β -Aktin (43 kDa) aus Proteinextrakten von primären Trophoblasten von Schwangerschaftsabbrüchen (A) und spontanen Aborten (B) mittels Western Blot detektiert. Die Trophoblasten wurden zuvor für verschiedene Zeiträume (0 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit LPS behandelt. In jedem Zeitraum wurde zusätzlich eine Negativkontrolle (K) ohne LPS Behandlung mitgeführt.

In Trophoblastzellen von spontanen Aborten konnte nach 12 h bis 48 h signifikant weniger Bag-1 nachgewiesen werden als in Trophoblastzellen normaler Schwangerschaften. Die LPS Behandlung hatte in keiner der beiden Gruppen einen Einfluss auf die Bag-1 Proteinkonzentration (Tabelle 2; Abbildung 12).

Tabelle 2: Bag-1 zeigt geringere Konzentration in Trophoblastzellen von Aborten im Vergleich zu Schwangerschaftsabbrüchen. Mittels Western Blot wurde das Bag-1/ β -Aktin Proteinverhältnis in Proteinextrakten aus Trophoblasten von Aborten und Abbrüchen bestimmt. Die Zellen wurden zuvor in Kultur für unterschiedliche Zeiträume (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit oder ohne LPS behandelt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Der paarweise Vergleich der Gruppen wurde mittels des Student's *t*-Test durchgeführt. * = $\rho < 0,05$

Zeit (h)	Bag-1/ β -Aktin Proteinverhältnis			
	Abbruch Kontrolle (n = 7)	Abbruch LPS (n = 7)	Abort Kontrolle (n = 6)	Abort LPS (n = 6)
0	0,13 \pm 0,14	0,14 \pm 0,17	0,04 \pm 0,04	0,04 \pm 0,04
2	0,15 \pm 0,1	0,11 \pm 0,09	0,06 \pm 0,1	0,05 \pm 0,04
4	0,15 \pm 0,13	0,14 \pm 0,14	0,05 \pm 0,07	0,05 \pm 0,03
8	0,16 \pm 0,15	0,14 \pm 0,12	0,07 \pm 0,08	0,05 \pm 0,04
12	0,14 \pm 0,07	0,13 \pm 0,08	0,06 \pm 0,08 *zu Abbruch Kontrolle	0,05 \pm 0,07 *zu Abbruch LPS
24	0,15 \pm 0,1	0,15 \pm 0,1	0,07 \pm 0,09 *zu Abbruch Kontrolle	0,07 \pm 0,08 *zu Abbruch LPS
48	0,17 \pm 0,14	0,11 \pm 0,06	0,06 \pm 0,01 *zu Abbruch Kontrolle	0,03 \pm 0,03 *zu Abbruch LPS

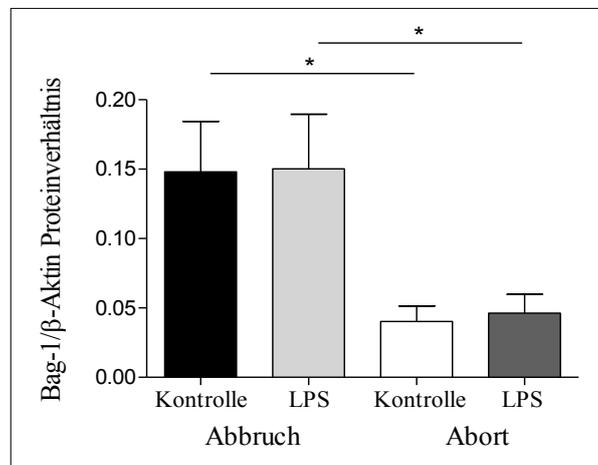


Abbildung 12: Repräsentative Darstellung der erniedrigten Bag-1 Konzentration in Trophoblastzellen von Aborten im Vergleich zu Schwangerschaftsabbrüchen nach 24 h Kulturzeit. Mittels Western Blot wurden die Proteinextrakte von Trophoblasten aus spontanen Aborten (n = 6) und Abbrüchen (n = 7) auf Bag-1 untersucht. Die Zellen wurden zuvor für eine Zeitdauer von 24 h mit LPS stimuliert. Die relative Proteinkonzentration von Bag-1 ist als Verhältnis zum Haushaltsgen β -Aktin veranschaulicht. Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Der paarweise Vergleich der Gruppen wurde mit dem Student's *t*-Test durchgeführt. * = $\rho < 0,05$

4.2 *In vivo* Versuchskomplex

Die *in vitro* am humanen Versuchsmodell gewonnenen Erkenntnisse wurden im Folgenden in einem *in vivo* Mausmodell nachvollzogen und erweitert. Hierfür wurde eine allogene Mausverpaarung von C57BL/6 Männchen und BALB/c Weibchen mit unterschiedlichem mütterlichen Genotyp für das HO-1 Gen ($Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$, $Hmox1^{-/-}$) ausgewählt. Der Vorteil der allogenen Verpaarung ist, dass die Tiere unterschiedliche Genome aufweisen, die im Fetus neu kombiniert werden. Dieses Modell entspricht somit dem natürlichen Reproduktionsprozess und kann besser auf den Menschen übertragen werden, als eine syngene Reproduktion. Den Tieren wurde am 7. Schwangerschaftstag 0,1 µg LPS in 200 µl PBS bzw. als Kontrolle reines PBS intraperitoneal injiziert. Sowohl die Dosierung von LPS als auch das Applikationsschema wurden von uns anhand aktueller Literatur erarbeitet und etabliert. Die Tötung, Präparation und Organentnahme erfolgte am 9. Schwangerschaftstag.

4.2.1 Untersuchung des Einflusses der HO-1 Genexpression und LPS Behandlung auf das Verhältnis von Immunzellen in unterschiedlichen Mausorganen

LPS bedingt über die Aktivierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems, aber auch anderer nicht immunologischer Zellen die Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Diese bewirken die Migration und Proliferation weiterer Immunzellen sowohl des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems und somit die Qualität der Immunantwort [40]. In diesem Teil der Arbeit wurde *in vivo* untersucht, ob das Vorhandensein der HO-1 einen Einfluss auf die Verhältnisse einzelner Immunzellpopulationen systemisch und lokal hat. Hierzu wurden die totalen Zellzahlen Dendritischer Zellen ($CD11c^+ MHCII^+$), zytotoxischer T-Zellen ($CD8^+$) und T-Helfer Zellen ($CD4^+$) in der Milz, in lokalen Lymphknoten und in der Dezidua trächtiger Mäuse untersucht.

4.2.1.1 HO-1 defiziente Mäuse haben erhöhte $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellzahlen in der Milz

Schwangere $Hmox1^{-/-}$ Mäuse, die kein HO-1 exprimieren, zeigten in der Milz eine erhöhte Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen im Vergleich zu $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{+/+}$ Tieren. Unterschiede für $CD11c^+ MHCII^+$ Zellen konnten nicht gefunden werden. Die LPS Injektion hatte keinen Einfluss auf die totalen Zellzahlen (Abbildung 13).

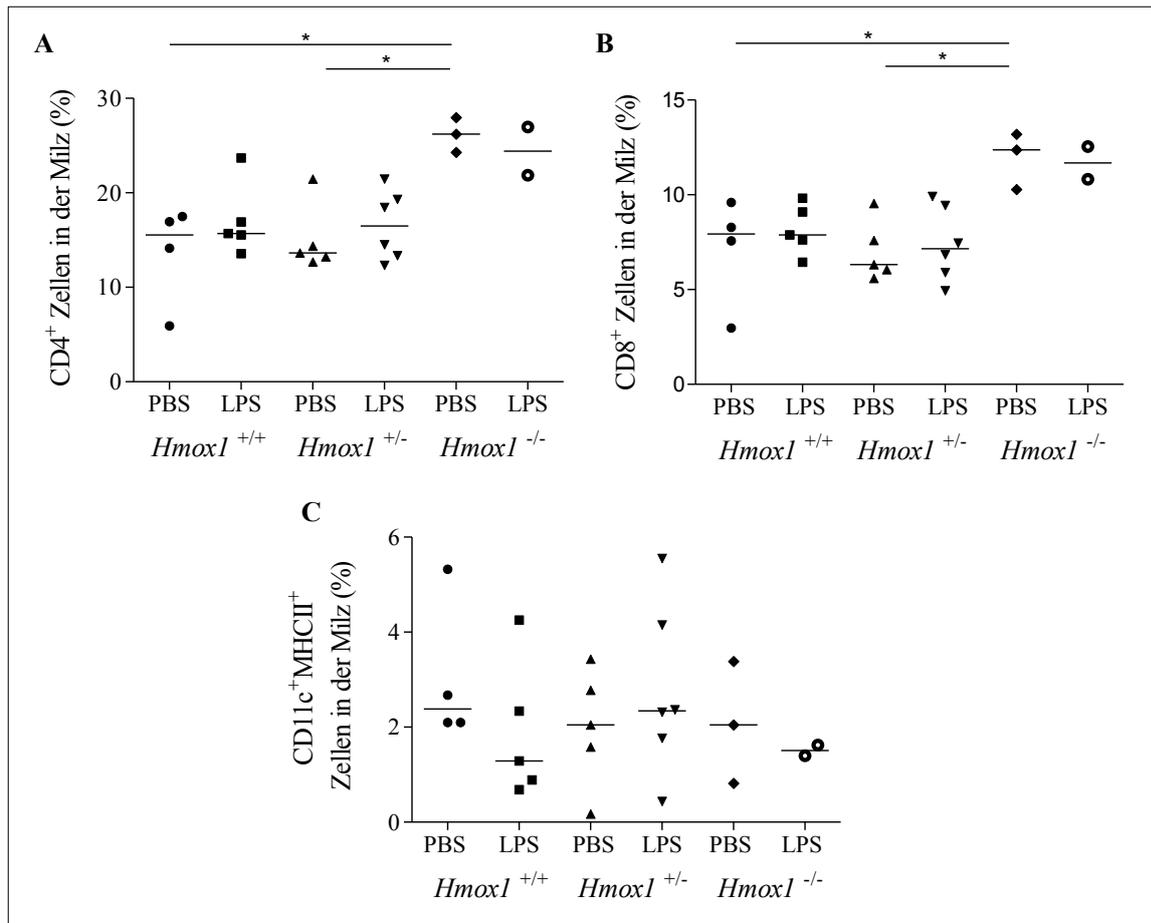


Abbildung 13: Trächtige *Hmox1*^{-/-} Mäuse zeigen erhöhte CD4⁺ und CD8⁺ Zellzahlen in der Milz. Die Anzahlen CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) und CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen (C) wurden mittels Durchflusszytometrie in der Milz von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-}, *Hmox1*^{-/-} Mäusen am 9. Schwangerschaftstag bestimmt. Die Tiere erhielten am 7. Schwangerschaftstag eine LPS oder PBS Injektion i.p.. HO-1 defiziente Tiere zeigten eine erhöhte Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Unterschiede für CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen und LPS gegen PBS Behandlung konnten nicht gefunden werden. Jedes Symbol entspricht den Daten eines Tieres und die Zellzahlen sind als Mediane dargestellt. Die Gruppen wurden paarweise mit Hilfe des Mann Whitney *U*-Testes verglichen. * = $p < 0,05$

4.2.1.2 HO-1 Expressionsunterschiede und LPS Stimulation haben keinen Einfluss auf die CD4⁺, CD8⁺ oder CD11c⁺ MHCII⁺ Zellzahl in lokalen Lymphknoten

In den inguinalen und iliakalen Lymphknoten schwangererer Mäuse mit unterschiedlichem Genotyp für das *Hmox1* Gen (*Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-}, *Hmox1*^{-/-}) konnte abhängig von der LPS Injektion keine Unterschiede in der Anzahl an CD4⁺, CD8⁺ oder CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen gefunden werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: HO-1 Expressionsunterschiede und LPS Stimulation haben keinen Einfluss auf die Anzahl der CD4⁺, CD8⁺ und CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen in inguinalen und iliakalen Lymphknoten. Die Anzahlen an CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie in inguinalen und iliakalen Lymphknoten von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-}, *Hmox1*^{-/-} Mäusen am 9. Schwangerschaftstag bestimmt. Die Tiere erhielten zuvor eine LPS oder PBS Injektion am 7. Schwangerschaftstag. Die Zellzahlen sind als Mediane [Minimum/Maximum] dargestellt. Die Gruppen wurden paarweise mit Hilfe des Mann Whitney *U*-Testes verglichen. Signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden. Lk = Lymphknoten

Inguinale Lk	<i>Hmox1</i> ^{+/+}		<i>Hmox1</i> ^{+/-}		<i>Hmox1</i> ^{-/-}	
	PBS (n = 4)	LPS (n = 5)	PBS (n = 5)	LPS (n = 6)	PBS (n = 3)	LPS (n = 2)
CD4 ⁺ Zellen (%)	47,67 [3,7 / 51,87]	46,67 [29,97/51,89]	41,33 [0,63/53,64]	38,66 [0,18/50,87]	47,78 [36,13/55,87]	28,4 [21,48/35,32]
CD8 ⁺ Zellen (%)	19,99 [11,29/22,55]	17 [14,76/24,43]	22,74 [17,15/27,31]	22,23 [6,81/29,62]	27,68 [20,58/30,97]	13,42 [13,32/13,52]
CD11c ⁺ MHCII ⁺ Zellen (%)	2,72 [0,84/4,53]	0,97 [0,28/7,54]	0,7 [0,1/1,67]	1,04 [0,07/4,13]	1,68 [1,29/5,47]	2,41 [1,52/3,29]
Iliakale Lk	<i>Hmox1</i> ^{+/+}		<i>Hmox1</i> ^{+/-}		<i>Hmox1</i> ^{-/-}	
	PBS (n = 4)	LPS (n = 5)	PBS (n = 5)	LPS (n = 6)	PBS (n = 3)	LPS (n = 2)
CD4 ⁺ Zellen (%)	35,1 [7,02/36,42]	34,45 [30,56/44,55]	39,77 [22,74/46,59]	33,01 [1,3/45,38]	41,36 [27,89/43,7]	29,21 [21,59/36,83]
CD8 ⁺ Zellen (%)	13,26 [6,42/22,79]	17,62 [10,39/21,91]	18,38 [15,63/26,35]	15,97 [0/26,19]	26,02 [14,87/27,24]	15,44 [13,78/17,09]
CD11c ⁺ MHCII ⁺ Zellen (%)	3,34 [1,35/19,36]	5,04 [0,56/5,04]	0,64 [0,08/3,69]	0,99 [0,08/1,31]	1,15 [0,62/14,22]	1,775 [1,4/2,15]

4.2.1.3 HO-1 Expressionsunterschiede und LPS Stimulation haben keinen Einfluss auf die CD4⁺, CD8⁺ oder CD11c⁺ MHCII⁺ Zellzahl in der Dezidua

Die schwangeren Mäuse zeigten abhängig vom Genotyp für *Hmox1* (*Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-}, *Hmox1*^{-/-}) keine Unterschiede in der Zellzahl von CD4⁺, CD8⁺ oder CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen in der Dezidua. Die Behandlung mit LPS hatte keinen Einfluss auf die Zellzahlen der Dendritischen oder T-Zellen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Weder HO-1 Expressionsunterschiede noch die LPS Stimulation haben Einfluss auf die Anzahl der CD4⁺ CD8⁺ und CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen in der Dezidua. Die Anzahl an CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie in der Dezidua von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-}, *Hmox1*^{-/-} Mäusen am 9. Schwangerschaftstag bestimmt. Die Tiere erhielten zuvor eine LPS oder PBS Injektion am 7. Schwangerschaftstag. Die Zellzahlen sind als Mediane [Minimum/Maximum] dargestellt. Die Gruppen wurden paarweise mit Hilfe des Mann Whitney *U*-Testes verglichen. Signifikante Unterschiede konnten nicht gefunden werden.

Dezidua	<i>Hmox1</i> ^{+/+}		<i>Hmox1</i> ^{+/-}		<i>Hmox1</i> ^{-/-}	
	PBS (n = 4)	LPS (n = 5)	PBS (n = 5)	LPS (n = 6)	PBS (n = 3)	LPS (n = 2)
CD4 ⁺ Zellen (%)	8,49 [2,9/13,02]	5,49 [1,96/11,42]	3,93 [0,58/8,91]	8,87 [6,19/14,54]	7,55 [1,79/9,53]	10,86 [3,04/18,68]
CD8 ⁺ Zellen (%)	6,15 [2,45/7,63]	6,43 [0,43/9,25]	2,22 [0,58/7,56]	2,64 [0,72/16,72]	5,09 [1,91/12,98]	11,57 [11,31/11,83]
CD11c ⁺ MHCII ⁺ Zellen (%)	7,5 [5,44/11,84]	8,41 [4,2/22,36]	4,24 [0,2/10,06]	7,36 [2,69/13,32]	8,62 [4,01/37,3]	8,14 [6,25/10,03]

4.2.2 Die Konzentrationen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in der Milz sind abhängig von der HO-1 Expression

In der Milz konnte eine Abhängigkeit der Anzahl zytotoxischer T-Zellen und T-Helfer Zellen von der HO-1 Expression festgestellt werden. T-Zellen sind wichtige Produzenten von Zytokinen und beeinflussen über diese den Charakter der Immunantwort. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob sich die HO-1 Expression neben den Einfluss auf die T-Zellpopulation auch auf die Produktion von Zytokinen in der Milz auswirkt. Des Weiteren wurde überprüft, ob die LPS Stimulation im verwendeten Mausmodell in der Lage war, eine Immunreaktion auszulösen und die Zytokinexpression zu verändern. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Expression sowohl für pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine in der Milz HO-1 defizienter Tiere. Für IL-6, IL-10 und TNF- α wurden dabei signifikante Unterschiede zwischen *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Tieren ermittelt. Die LPS Stimulation zeigte in keiner Gruppe einen Einfluss auf die TNF- α oder IL-6 Produktion. Tiere, die nicht in der Lage sind HO-1 zu produzieren, scheinen dagegen auf LPS mit einer verminderten Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zu reagieren. Im Zeitverlauf dieser Arbeit konnte auf Grund der geringen Geburtenrate von *Hmox1*^{-/-} Tieren keine ausreichende Gruppenstärke in der LPS injizierten *Hmox1*^{-/-} Gruppe erreicht werden, die eine statistische Auswertung erlaubt hätte [85] (Abbildung 14).

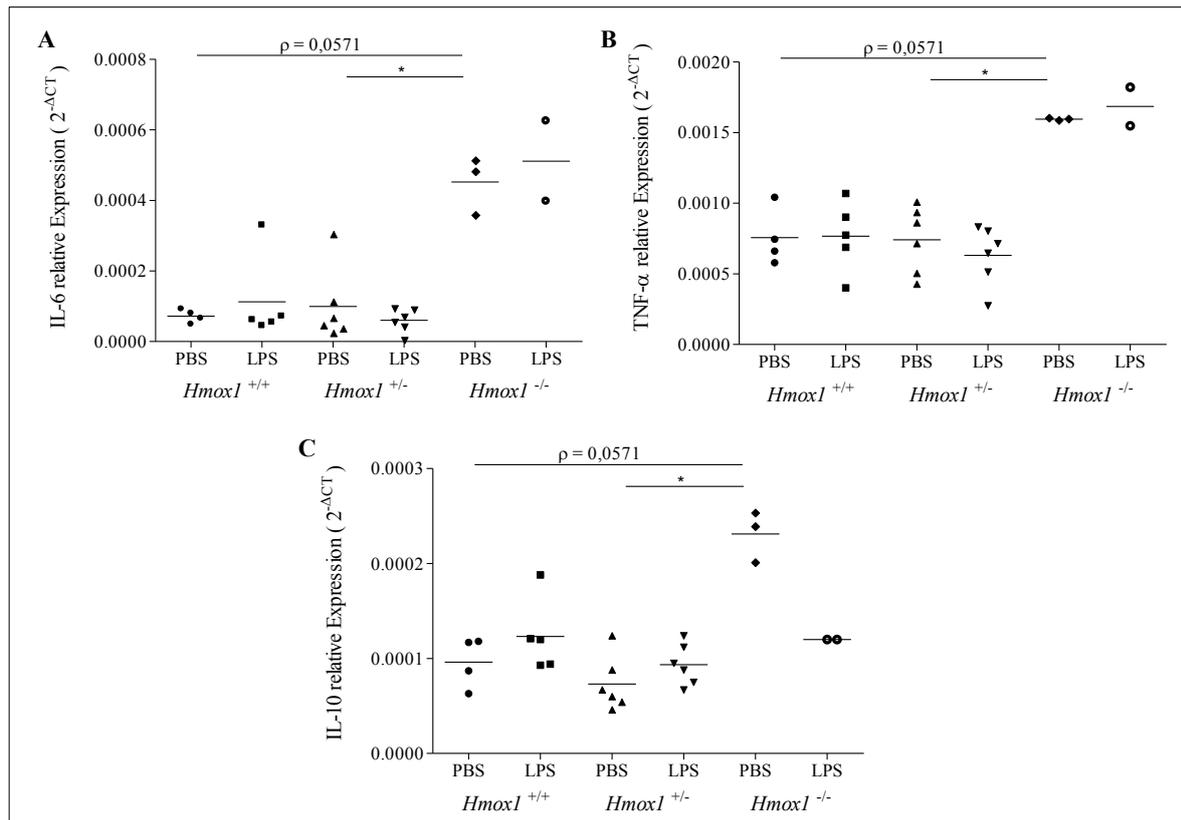


Abbildung 142: Die Expression von IL-6, IL-10 und TNF- α ist in der Milz HO-1 defizienter Tiere erhöht. Die Milz von $Hmox1^{+/+}$, $Hmox1^{+/-}$ und $Hmox1^{-/-}$ Mäusen wurden am 9. Schwangerschaftstag auf die Expression von IL-6, IL-10 und TNF- α untersucht. Die Tiere erhielten am 7. Schwangerschaftstag eine LPS oder PBS Injektion i.p. Die IL-6 (**A**) und die TNF- α (**B**) Expression sind in der Milz von HO-1defizienten Tieren signifikant höher als in $Hmox1^{+/-}$. Die LPS Stimulation konnte in keiner Gruppe eine Veränderung der Zytokin Expression bewirken. (**C**) Die IL-10 Expression war in $Hmox1^{-/-}$ Tieren signifikant höher als in $Hmox1$ Heterozygoten. Dagegen war nach LPS Injektion die Produktion von IL-10 in der Milz dieser knockout Tiere beeinträchtigt. Die Daten eines einzelnen Tieres entsprechen einem Symbol und sind als relative Expression wiedergegeben. In jeder Gruppe ist der Median dargestellt. Der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney U -Testes durchgeführt. * = $\rho < 0,05$

4.2.3 Die HO-1 Expression an der fetal-maternalen Grenzregion allogener verpaarter Mäuse wird durch LPS Stimulation induziert

Das Ungeborene und damit auch die Plazenta erhält sein Genom zu gleichen Teilen von beiden Eltern. In der gewählten allogenen Mausverpaarung unterscheidet sich die Fähigkeit der plazentaren Zellen zur HO-1 Produktion vom Gewebe der Mutter abhängig von deren Genotyp für das $Hmox1$ Gen. So können Trophoblasten in $Hmox1^{-/-}$ Tieren im Gegensatz zum maternalen Organismus HO-1 exprimieren. Um eine genaue Erkenntnis über die Fähigkeit der Trophoblasten zur HO-1 Produktion zu erlangen, wurden die Plazenten der einzelnen Verpaarungskombinationen auf die Expression dieses Enzymes hin untersucht. Es konnte gezeigt

werden, dass die HO-1 Expression in der Plazenta vom *Hmox1* Genotyp des Muttertieres abhängig ist. Plazenten von *Hmox1*^{+/+} Tieren zeigten eine erhöhte ($p = 0,0571$) und von *Hmox1*^{+/-} Tieren eine signifikant höhere HO-1 Expression als Plazenten von HO-1 defizienten Mäusen. Dabei verlieren die plazentaren Zellen aber nicht vollkommen die Fähigkeit zur HO-1 Expression und geringe RNA Mengen der HO-1 konnten auch in Plazenten von *Hmox1*^{-/-} Tieren gefunden werden, was durch den väterlichen Genotyp (*Hmox1*^{+/+}) zu erklären ist. Das gewählte Modell ermöglicht somit die Rekonstruktion eines HO-1 Mangels an der fetal-maternalen Grenze, ohne lokal ein vollkommenes Fehlen des Enzymes zu bewirken. Die LPS Stimulation induzierte in allen Gruppen einen Anstieg der HO-1 Expression, wobei aber keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Dieser Anstieg bestätigt die Ergebnisse des *in vitro* Versuchskomplexes und könnte eine mögliche Schutzfunktion der plazentaren Zellen gegen den LPS Schaden darstellen (Abbildung 15).

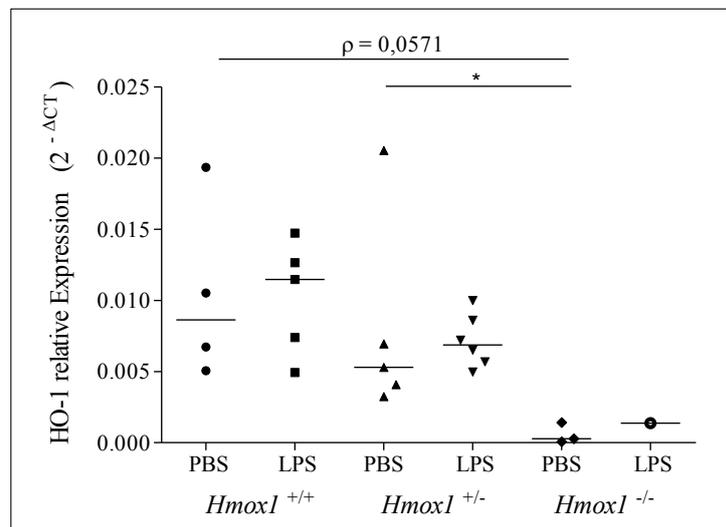


Abbildung 15: Die HO-1 Expression in der Plazenta wird durch LPS induziert. Plazenten von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Weibchen wurden nach allogener Verpaarung mittels Real-Time PCR auf ihren relativen RNA Gehalt für HO-1 untersucht. Die HO-1 Expression ist in Plazenten von *Hmox1*^{+/+} Müttern signifikant höher als in HO-1 defizienten Tieren. Die LPS Stimulation bewirkt in allen Gruppen eine vermehrte HO-1 Expression, aber keine signifikanten Veränderungen. Die Daten eines einzelnen Tieres entsprechen einem Symbol und sind als relative Expression wiedergegeben. In jeder Gruppe ist der Median dargestellt. Der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen gegeneinander wurde mittels des Mann-Whitney *U*-Testes durchgeführt. * = $p < 0,05$

4.2.4 Die Expression von TNF- α nimmt mit abnehmenden HO-1 Gehalt in der Plazenta zu

Im humanen Versuchskomplex konnte gezeigt werden, dass Trophoblasten aus pathologischen und normalen Schwangerschaften gleichermaßen auf LPS mit einer vermehrten TNF- α und IL-6 Produktion reagieren und somit eine Immunantwort generieren. Aus verschiedenen Studien zu septischen Krankheitsmodellen ist bekannt, dass LPS in HO-1 defizienten Tieren eine pathologisch verstärkte Immunreaktionen auslöst [86]. In dieser Arbeit konnte bereits abhängig von der HO-1 Defizienz eine erhöhte Anzahl von T-Zellen und eine vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in der Milz nachgewiesen werden. Die LPS Stimulation zeigte dagegen nur einen Einfluss auf das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, welches in *Hmox1*^{-/-} Tieren vermindert war. Der folgende Versuch hatte das Ziel, den Einfluss der HO-1 auf die Produktion von Zytokinen an der fetal-maternalen Grenze *in vivo* und unter dem Einfluss von LPS zu untersuchen. Hierfür wurden die relativen Expressionen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 in den Plazenten allogener verpaarter Mäuse mit unterschiedlichem Genotyp für das *Hmox1* Gen bestimmt. Hier zeigte sich abhängig von der verminderten HO-1 Expression eine ansteigende Konzentration von TNF- α im plazentaren Gewebe. Plazenten von *Hmox1*^{+/-} Muttertieren hatten signifikant niedrigere und von *Hmox1*^{+/+} Muttertieren deutlich verminderte ($p=0,571$) TNF- α Expressionen als Plazenten von *Hmox1*^{-/-} Tieren. IL-6 wurde ebenfalls in der Mausplazenta exprimiert, zeigte aber keine Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen. Sowohl die TNF- α als auch die IL-6 Konzentration im plazentaren Gewebe blieben von der LPS Stimulation unbeeinflusst (Abbildung 16). IL-10 und IL-4 konnten auf Grund einer zu geringen Expression in der Plazenta in keiner der Gruppen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

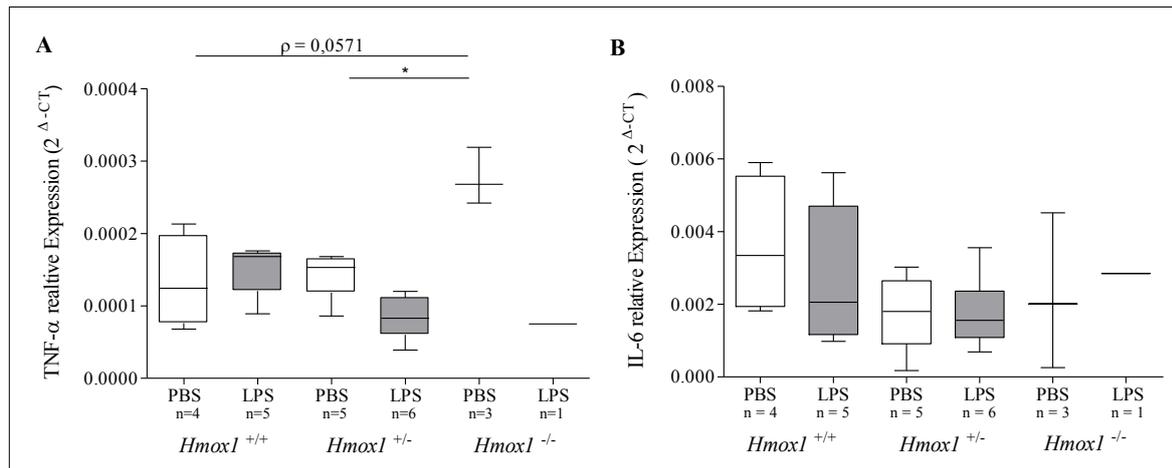


Abbildung 16: Eine verminderte HO-1 Konzentration bedingt eine erhöhte TNF- α Expression an der fetal-maternalen Grenzfläche. Plazenten von *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Weibchen wurden am 9. Schwangerschaftstag mittels Real-Time PCR auf ihre relative Expression von TNF- α und IL-6 untersucht. Die Tiere erhielten am 7. Schwangerschaftstag eine LPS oder PBS i.p. Injektion. **(A)** Die TNF- α Expression ist in Plazenten von *Hmox1*^{+/-} Tieren signifikant höher als in HO-1 defizienten. Die LPS Stimulation konnte in keiner Gruppe eine Veränderung der Zytokinexpression bewirken. **(B)** Für IL-6 konnten weder zwischen den Gruppen noch nach LPS Behandlung signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die Daten geben die relative Expression wieder und sind als Mediane mit Quartilen dargestellt. Der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney *U*-Testes durchgeführt. * = $\rho < 0,05$

4.2.5 Der HO-1 Mangel bedingt eine verminderte Bag-1 Expression nach LPS Stimulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine verminderte Expression der HO-1 mit einer verminderten Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bag-1 in humanen Trophoblasten einhergeht. In diesem *in vitro* Modell konnte kein Einfluss von LPS auf die Bag-1 Expression nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde die Expression von Bag-1 in der Plazenta von Mäusen mit unterschiedlicher Expression der HO-1 untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Moleküls in den Plazenten von *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Mäusen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der humanen Zellen konnte jedoch *in vivo* mit der LPS Stimulation ein Einfluss auf Bag-1 genommen werden. So zeigten die Plazenten von *Hmox1*^{+/-} Tieren eine signifikant verminderte Bag-1 Produktion nach LPS Behandlung. Plazenten von *Hmox1*^{+/+} Tiere wiesen dagegen nur eine geringfügig verringerte Bag-1 Expression nach LPS auf, die keine Signifikanten Unterschiede zur PBS behandelten Gruppe erreichte (Abbildung 17). Auf Grund der geringen Gruppengröße sind Aussagen über den Einfluss von LPS auf dieses Molekül in *Hmox1*^{-/-} Mäusen nicht möglich (Daten siehe Anhang 11.4 Tabelle 7).

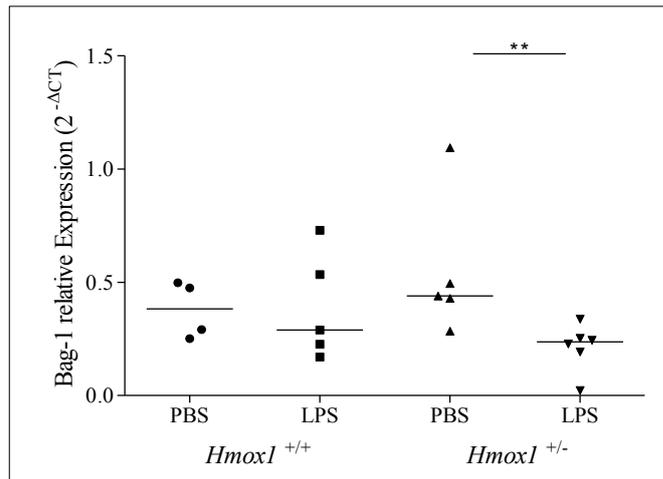


Abbildung 17: LPS vermindert die Expression von Bag-1 in der Plazenta *Hmox1*^{+/-} Mäuse. Plazenten von *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Weibchen wurden am 9. Schwangerschaftstag mittels Real-Time PCR auf ihre relative Expression von Bag-1 untersucht. Die Tiere erhielten am 7. Schwangerschaftstag eine LPS oder PBS i.p. Injektion. Die LPS Stimulation bewirkte in *Hmox1*^{+/-} Mäusen eine signifikante Senkung der Bag-1 Expression. Die Daten eines einzelnen Tieres entsprechen einem Symbol und sind als relative Expression wiedergegeben. In jeder Gruppe ist der Median dargestellt. Der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen gegeneinander wurde mittels des Mann-Whitney *U*-Testes durchgeführt. ** = $\rho < 0,01$

5 Diskussion

Das Immunsystem nimmt während der Schwangerschaft eine besondere Rolle ein. Es toleriert das Ungeborene, obwohl dieses auf Grund seiner väterlichen Genomanteile für den mütterlichen Organismus fremde Antigene präsentiert. Gleichzeitig erfüllt es aber auch seine Funktion in der Abwehr pathogener Mikroorganismen. Die Schwangerschaft ist also nicht durch ein inaktives oder supprimiertes Immunsystem gekennzeichnet, sondern wird vielmehr durch eine immunologische Balance ermöglicht. Die Mechanismen, die dieses Gleichgewicht zwischen der Akzeptanz des Ungeborenen und der Abwehr von Infektionen bewirken und regulieren sind weitestgehend unverstanden. Die Konsequenz ist, dass spontanen Fehlgeburten und Schwangerschaftskomplikationen mit immunologischem Hintergrund hilflos gegenüber gestanden wird. Diese Bedeuten nicht nur hohe finanzielle Kosten für das Gesundheitssystem, sondern vor allem eine enorme psychische Belastung für die betroffenen Frauen. Die Erforschung der Reproduktionsimmunologie erlangt aus diesem Grund nicht nur eine wissenschaftliche sondern auch eine große klinische Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde der HO-1 in den letzten Jahren zunehmend Beachtung geschenkt. Die protektive Wirkung und der positive Einfluss dieses Enzyms auf den Schwangerschaftsausgang wurden in mehreren Studien bestätigt. Unabhängig davon wurden ihre regulierenden Eigenschaften auf das Immunsystem in der Sepsisforschung eingehend untersucht. Die Bedeutung der HO-1 und ihr Einfluss auf die Infekt bedingte Immunantwort während der Schwangerschaft sind dennoch weitgehend ungeklärt und waren Gegenstand dieser Arbeit. Hier konnte gezeigt werden, dass Trophoblasten von Aborten weniger HO-1 exprimieren, als Trophoblasten von normalen Schwangerschaften. LPS bewirkte eine verstärkte Produktion des Enzymes, wobei auch hier Trophoblasten von Aborten verminderte Konzentrationen aufwiesen. HO-1 an der fetal-maternalen Grenze scheint somit nicht nur eine Bedeutung für den Schwangerschaftsausgang zu haben, sondern auch eine Rolle in der immunologischen Antwort auf eine Infektion zu spielen. Dieser Einfluss könnte sich in der HO-1 abhängigen Produktion anti-apoptotischer Moleküle, wie Bag-1 und der Regulation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine wieder spiegeln. *In vivo* zeigten Mäuse mit einer HO-1 Defizienz eine erhöhte Zahl an T-Zellen in Verbindung mit einer vermehrten Zytokin Produktion in der Milz. Diese erhöhte Aktivität des Immunsystems in Form einer verstärkten TNF- α Expression ließ sich unabhängig von LPS auch an der fetal-maternalen Grenze finden. LPS bewirkte hier abhängig vom HO-1 Mangel eine verminderte Produktion des protektiven Bag-1, wobei die Expression pro-inflammatorischer Zytokine unverändert blieb. Die Daten vermitteln, dass die HO-1 ein wich-

tiges Stellglied des immunologischen Gleichgewichts an der fetal-maternalen Grenzregion darstellt. Im Falle einer Infektion könnte sie den Schwangerschaftsausgang durch die Regulation der Zytokinproduktion und Bag-1 Expression maßgeblich beeinflussen.

5.1 Spontane Aborte scheinen mit einer verminderten Fähigkeit der HO-1 Produktion einherzugehen

Die protektiven Effekte von HO-1 und ihre das Immunsystem modulierenden Fähigkeiten wurden zuerst im Zusammenhang mit Organtransplantationen erkannt [83,104-105]. Ausgehend von der Tatsache, dass der Fetus auf Grund seines von der Mutter abweichenden Genoms eine Art Allotransplantat ist, erlangte die HO-1 auch bald Beachtung in der Reproduktionsimmunologie. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die HO-1 Proteinkonzentration in kultivierten Trophoblastzellen von spontanen Aborten vermindert ist. Die Ergebnisse stimmen mit früheren Daten unserer Arbeitsgruppe überein, die verminderte HO-1 Konzentrationen im placentaren Gewebe von spontanen Fehlgeburten im 1. Trimester mittels Immunhistochemie zeigen [98]. Vorangegangene Studien belegen, dass auch andere Formen des pathologischen Schwangerschaftsverlaufes durch eine verminderte HO-1 Expression gekennzeichnet sind. Ahmed und Kollegen konnten sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Basis eine verringerte HO-1 Konzentration in placentarem Gewebe von Präeklampsie-Patientinnen demonstrieren [106]. Dass HO-1 in Fehlgeburten in geringeren Konzentrationen vorliegt als in normalen Schwangerschaften, wird des Weiteren durch Erkenntnisse humaner Genanalysen der HO-1 bestärkt. Hier wurde eine Korrelation zwischen einer mutationsbedingten, verminderten HO-1 Expression und wiederkehrenden Fehlgeburten nachgewiesen [72]. Durch die Isolation und Kultivierung von Trophoblasten konnte diese Arbeit nun zeigen, dass ein Mangel der HO-1 im placentaren Gewebe durch diese Zellen bedingt ist. Diese Mangelproduktion der HO-1 scheint die Schwangerschaft zu gefährden und mit spontanen Aborten in Verbindung zu stehen. Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Trophoblasten untersucht, HO-1 als protektives Molekül auf einen gefährdenden Stimulus hin zu produzieren. LPS als Membranbestandteil gramnegativer Bakterien führt in verschiedenen Zelltypen, aber vor allem in Immunzellen, zu einer Induktion der HO-1 Expression [91,97]. Es wird vom Immunsystem erkannt und mimt auch ohne einen bakteriellen Befall eine Infektion. Während der Schwangerschaft kann durch die Immunantwort auf eine solche vermeintliche Infektion die Akzeptanz des Fetus aufgehoben und dessen Abstoßung bewirkt werden [44]. In dieser Arbeit wurde durch die Stimulation mit LPS eine Konzentrationserhöhung der HO-1 in Trophoblastzellen erreicht. Während dieser LPS Behandlung behielten die Trophoblasten aus spontanen

Aborten die verminderte Fähigkeit zur HO-1 Expression im Vergleich zu normalen Schwangerschaften bei. Diese Hochregulation der HO-1 durch LPS vermittelt eine Rolle des Enzyms in der infektierten Immunantwort während der Schwangerschaft. Die Fähigkeit zur vermehrten Produktion der HO-1 könnte trotz Infektion den normalen Schwangerschaftsverlauf bedingen und ein Mangel des Enzyms diesen gefährden.

5.2 Trophoblastzellen reagieren unabhängig von der HO-1 Proteinkonzentration auf LPS mit einer verstärkten IL-6 und TNF- α Produktion

LPS aktiviert nicht nur das angeborene Immunsystem, sondern wird auch von nicht immunologischen Zellen wie den Trophoblasten erkannt [107]. Diese können ihrerseits unabhängig von Immunzellen eine pro-inflammatorische Reaktion induzieren, die durch die Produktion von Zytokinen gekennzeichnet ist [108]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die verminderte Konzentration von HO-1 in Trophoblastzellen von spontanen Aborten einen Einfluss auf deren Reaktion auf LPS hat. Dafür wurden isolierte Trophoblasten von normalen Schwangerschaften und spontanen Aborten mit LPS bis zu 48 h kultiviert und die Zytokin-Konzentration in den Überständen gemessen. LPS provozierte einen signifikanten Anstieg der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6. Es ließen sich aber keine Unterschiede in den Konzentrationen dieser Moleküle zwischen pathologischen und normalen Schwangerschaftsverläufen erkennen. Es lässt sich somit feststellen, dass die Zytokinproduktion durch Trophoblastzellen nach LPS Exposition unbeeinflusst von der verminderten HO-1 Proteinkonzentration in Aborten blieb. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen über den Einfluss der HO-1 auf die immunologische Antwort. So konnte Roach in einem *in vitro* Modell Makrophagen durch HO-1 Induktion in ihrer LPS provozierten Zytokinproduktion hemmen [89]. Ähnliche regulierende Eigenschaften der HO-1 auf die LPS induzierte Reifung und Zytokinproduktion zeigte Chauveau mit Kollegen an Dendritischen Zellen [109]. Allerdings lassen sich die beobachteten Effekte von HO-1 auf das Abbauprodukt CO zurückführen. So wurde mehrfach gezeigt, dass CO alleine in der Lage ist die intrazelluläre Signalkaskade, die der Erkennung von LPS und der Reaktionsbildung dient, zu hemmen [110-111]. Zusammenfassend ist also nicht allein die Proteinkonzentration sondern auch die enzymatische Aktivität der HO-1 von Bedeutung. Um konkrete Aussagen über den Einfluss von HO-1 auf die LPS induzierte Antwort von Trophoblastzellen treffen zu können, sollte die Aktivität der HO-1 in zukünftigen Studien im Zusammenhang mit der Konzentration betrachtet werden. Unabhängig davon muss diskutiert werden, welche Bedeutung den unterschiedlichen Ätiologien spontaner Aborte im Hinblick auf die Zytokinproduktion zukommt. Etwas

mehr als die Hälfte aller Fehlgeburten im ersten Trimester lassen sich auf genetische Defekte des Fetus zurückführen [112]. Calleja-Agius und Kollegen zeigten, dass die Zytokinproduktion im placentaren Gewebe als auch systemisch in der Mutter abhängig vom Karyotyp des Ungeborenen ist. So gingen Fehlgeburten mit abnormen Karyotyp mit erniedrigten Zytokinserumleveln der Mutter, aber erhöhten Zytokinkonzentrationen in der Plazenta einher [113]. Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben von Aborten wurden nicht auf ihren Karyotyp hin untersucht, weshalb eine Untergliederung der Gruppe nach diesem Kriterium nicht möglich ist. Eine Untersuchung des Einflusses genetischer Defekte auf die Zytokinkonzentration und eine mögliche Abhängigkeit von der HO-1 Aktivität wäre in zukünftigen Studien sinnvoll, um hier mögliche Zusammenhänge aufzudecken.

5.3 Das anti-apoptotische Molekül Bag-1 wird in Trophoblastzellen von spontanen Aborten vermindert exprimiert

Die durch LPS induzierte Antwort primärer Trophoblastzellen beinhaltet die vermehrte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokines TNF- α . Otun und Kollegen konnten zeigen, dass TNF- α nicht nur die Migrationsfähigkeit primärer Trophoblasten hemmt, sondern auch deren programmierten Zelltod fördert [114]. HO-1 ist in der Lage Trophoblasten vor der TNF- α bedingten Zellschädigung zu schützen, wobei die genauen Mechanismen für diesen Schutz nicht bekannt sind [106]. Bag-1 ist ein intrazelluläres Molekül, welches den programmierten Zelltod verhindern kann [76]. Im Rahmen der Forschung zur Transplantationsimmunologie zeigte Coito, dass erhöhte HO-1 Konzentrationen mit einer erhöhten Bag-1 Expression in tolerierten Transplantaten einhergeht [78]. Es wurde untersucht, ob die Unterschiede der HO-1 Proteinkonzentration in normalen und pathologischen Schwangerschaften mit einer veränderten Bag-1 Konzentration im Zusammenhang stehen. Es zeigte sich, dass Bag-1 in primären Trophoblastzellen von Aborten signifikant geringer exprimiert wird als in Zellen normaler Schwangerschaften. Die Bag-1 Proteinkonzentration verhält sich somit ähnlich der HO-1 Konzentrationen. Diese Daten bestätigen frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Wir zeigten im Mausmodell erhöhte Bag-1 Konzentrationen nach HO-1 Induktion [74]. Vergleichbare Ergebnisse erzielten wir durch einen HO-1 Gentransfer in demselben Mausmodell [75]. In dieser Arbeit blieb die Bag-1 Konzentration in isolierten Trophoblasten unbeeinflusst durch die Stimulation mit LPS. Dennoch könnte eine HO-1 abhängige Expression in der Plazenta während einer Infektion eine große Bedeutung haben. So stellt es einen Schutzmechanismus der Zellen vor Apoptose dar, welche durch Zytokine wie TNF- α begünstigt wird. Trophoblasten von spontanen Aborten zeigten eine verminderte Bag-1 Produktion und somit

einen fehlenden Schutz vor der LPS bedingten TNF- α Expression. Bag-1 hat somit, auch ohne direkt von LPS beeinflusst zu werden, einen Einfluss auf das Überleben plazentarer Zellen während einer Infektion und somit eine Bedeutung für den Schwangerschaftsausgang. Es stellt einen protektiven Faktor dar, der abhängig von der HO-1 Expression kontrolliert werden könnte.

5.4 HO-1 Defizienz bedingt *in vivo* eine erhöhte T-Zellzahl in der Milz

HO-1 defiziente Mäuse zeigen eine pathologisch verstärkte Immunantwort auf LPS. Diese ist gekennzeichnet durch erhöhte systemische Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine, vermehrte Immunzellapoptose und Organversagen [88]. Die im *in vitro* Versuchskomplex dieser Arbeit an humanen Trophoblasten gewonnenen Daten vermitteln, dass HO-1 auch in der Schwangerschaft eine Rolle in der Immunantwort auf eine Infektion spielt. Hier bewirkte die LPS Behandlung neben der HO-1 Induktion eine vermehrte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α . Im Mausmodell wurde weiterführend untersucht, ob die Fähigkeit zur HO-1 Produktion die zellulären Komponenten des Immunsystems während der Schwangerschaft beeinflusst. *Hmox1*^{-/-} Tiere zeigten in der Milz signifikant höhere Anzahlen an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Mäusen. Ähnliche Daten fanden Poss und Kollegen in ihrem HO-1 defizienten Mausmodell. Sie zeigten ein erhöhtes CD4⁺ zu CD8⁺ Zellverhältnis in der Milz von *Hmox1*^{-/-} Tieren. Als ursächlich hierfür sahen sie eine systemische Fehlverteilung von Eisen an. So zeigten die Tiere eine Anämie mit verminderten Werten des Serumeisens, während sich im Gewebe eine Eisenakkumulation mit chronischer Entzündung entwickelte. Die Tiere zeigten diese Symptome erst nach der 15. Lebenswoche, folglich mit einer altersabhängig fortschreitenden Eisenablagerung [85]. Diese Schlussfolgerungen finden Bestätigung in einem humanen Fallbericht, in denen eine mutationsbedingte HO-1 Defizites erst im jugendlichen Alter zu Symptomen einer systemischen Entzündung führte [115]. In diesen altersabhängigen Veränderungen könnte begründet sein, warum andere Arbeitsgruppen keine HO-1 abhängigen Unterschiede dieser Zellpopulation gesehen haben. So führte Kapturczak vergleichbare Messungen an jungen Tieren durch ohne Unterschiede der T-Zellzahl in der Milz zu finden [87]. Unabhängig von der chronischen Entzündung die ein HO-1 Mangel bewirkt, könnten die erhöhten Zahlen der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen über die Fähigkeit der HO-1 die T-Zell Proliferation zu hemmen, erklärt werden [116]. Allgemein vertreten T-Zellen die zelluläre Seite des adaptiven Immunsystems. Ihre erhöhten Populationszahlen in einem immunologischen Organ wie der Milz lassen

eine Fehlregulation des Immunsystems in der Schwangerschaft annehmen, welche durch einen HO-1 Mangel bedingt ist.

5.5 Die Immunantwort auf LPS hat keinen Einfluss auf die Anzahl an Dendritischen Zellen und T-Zellen in lymphoiden Organen und an der fetal-maternalen Grenzfläche

LPS führt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die Bekämpfung der vermeintlichen bakteriellen Infektion wird überwiegend durch Leukozyten in einer unspezifischen Immunantwort bewerkstelligt [96]. LPS wird aber auch von nicht immunologischen Zellen, wie Trophoblasten erkannt. Diese sind in der Lage durch die Produktion von Signalmolekülen eine Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten an die fetal-maternale Grenzfläche zu bewirken [49,117]. Durch die Produktion dieser Signalmoleküle könnten auch Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden und eine spezifische Immunantwort zur Bekämpfung der Infektion einleiten. In dieser Arbeit wurde im Mausmodell gezeigt, dass eine HO-1 Defizienz in der Schwangerschaft mit erhöhten T-Zellzahlen in der Milz einhergeht. Dieser Status der erhöhten Aktivität des adaptiven Immunsystems in *Hmox1*^{-/-} Tieren blieb durch die Nachahmung einer Infektion aber unbeeinflusst. Es konnten nach LPS Behandlung keine Unterschiede in der Anzahl von CD4⁺, CD8⁺ und CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen in der Milz, in lokalen Lymphknoten oder der Dezidua festgestellt werden. Dass die Reaktion auf LPS an der fetal-maternalen Grenzfläche alleine von Leukozyten und somit dem angeborenen Immunsystem vertreten wird, konnten Wang und Kollegen in der immunhistochemischen Bearbeitung von Mausuteri nach LPS Injektion darstellen. Die Gruppe fand zu keiner Zeit eine Vermehrung von Lymphozyten im Gewebe [118]. Chung und Kollegen zeigten in einem Mausmodell zur Pathologie der Sepsis, dass *Hmox1*^{-/-} Tiere nach LPS Injektion gleiche Anzahlen systemisch zirkulierender Immunzellen aufweisen wie *Hmox1*^{+/+} Tiere. Mit der Fähigkeit zur HO-1 Expression steigerten die Immunzellen aber die Phagozytose und damit die Fähigkeit zur Bekämpfung der Infektion [102]. Im Falle einer bakteriellen Infektion spielt eher die Aktivität von Immunzellen, als deren totale Anzahlen eine Rolle, wie auch die Ergebnisse von Friebe und Kollegen vermitteln. Sie fanden nach LPS Gabe ebenfalls keine veränderte Zahlen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen oder CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen. Bei der Kontrolle weiterer Oberflächenmoleküle, die Aussagen über die Aktivität der Immunzellen erlauben, fand die Gruppe jedoch Unterschiede in den Subpopulation. So bewirkte LPS einen Anstieg reifer, schwangerschaftsgefährdender dendritischer Zellen und eine Abnahme einer protektiven CD4⁺ T-Zellsubpopulation [119]. Zusammenfassend konnte mit

der gewählten LPS Dosis kein Einfluss auf die totalen Zellzahlen der spezifischen zellulären Immunantwort genommen werden. Eine Aussage über eine mögliche Aktivitätsänderung dieser Immunzellen lässt sich in dieser Arbeit jedoch nicht treffen und erfordert weitere Untersuchungen.

5.6 Die Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in der Milz ist HO-1 abhängig

Im *in vitro* Versuchskomplex wurde durch die LPS Stimulation eine Immunantwort in Form einer Zytokinproduktion durch die kultivierten Trophoblasten provoziert. Im Tiermodell konnte zwar gezeigt werden, dass sich HO-1 defiziente Tiere durch eine erhöhte Anzahl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz auszeichnen, die LPS Behandlung war jedoch nicht in der Lage Einfluss auf die Immunzellpopulationen zu nehmen. Zusätzlich wurde die Milz als immunologisches Organ und somit wichtiger Akteur in der Abwehr systemischer Infektionen auf ihre Zytokinproduktion untersucht. Es zeigte sich hier eine HO-1 abhängige Expression proinflammatorischer als auch antiinflammatorischer Zytokine. Die Expressionen von IL-6, TNF- α als auch IL-10 stiegen mit abnehmender HO-1 Expression. Die erhöhten Zytokinwerte bei HO-1 Defizienz in der Milz zeigen, dass HO-1 einen regulierenden Einfluss auf das Immunsystem nimmt. Das Fehlen des Enzymes bedingt eine erhöhte Aktivität des Immunsystems. Die Abhängigkeit der LPS induzierten Immunantwort von HO-1 konnte aber auch hier nicht eindeutig geklärt werden. So zeigte LPS in keiner Gruppe einen Einfluss auf die TNF- α oder IL-6 Expression. IL-10 dagegen schien nach LPS Injektion in der Milz *Hmox1*^{-/-} Tiere vermindert exprimiert zu werden. Leider ermöglichte hier die geringe Gruppengröße der LPS injizierten *Hmox1*^{-/-} Mäuse keine effiziente statistische Auswertung. Unabhängig dazu stehen die Daten im Widerspruch zu den schon angesprochen Untersuchungen von Kapturczak und Kollegen an HO-1 defizienten Tieren. Sie zeigten, dass Milzzellen von *Hmox1*^{-/-} Mäusen nach LPS Exposition vermehrt IL-6, TNF- α als auch IL-10 produzierten [87]. Der Unterschied zu der Studie ist der Umstand, dass die in dieser Arbeit verwendeten Tiere schwanger waren. Verschiedene Studien belegen, dass die Schwangerschaft mit einem veränderten Immunstatus einhergeht. Luppi und Kollegen zeigten, dass schwangere Frauen höhere Zellzahlen aktivierter Granulozyten als auch Monozyten im Blut aufweisen [120-121]. Für eine Veränderte Aktivität des Immunsystems während der Schwangerschaft sprechen auch die Daten von Vizi. Er und Kollegen demonstrierten eine verstärkte Zytokinproduktion im Serum schwangerer Mäuse im Vergleich zur nicht schwangeren Kontrolle [51]. Es ist möglich, dass der Einfluss der HO-1 auf das Immunsystem von der Schwangerschaft abhängig ist und mit dem nicht-

schwangeren Modell nicht verglichen werden kann. Die Abhängigkeit der IL-10 Expression von HO-1 im Falle einer Infektion hat einen gravierenden Einfluss auf die Schwangerschaft. IL-10 selbst scheint dabei für die erfolgreiche Schwangerschaft nicht ausschlaggebend zu sein, wie an normal fertilen *IL-10^{-/-}* Mäuse demonstriert wurde [122]. Im Zusammenhang mit LPS erlangt das Molekül in der Schwangerschaft aber erhebliche Bedeutung. Robertson und Kollegen zeigten nach LPS Gabe eine erhöhte Abortrate in IL-10 defizienten Tieren einhergehend mit erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine in der Plazenta und im Serum [101]. Die gewonnenen Ergebnisse vermitteln die Möglichkeit, dass die IL-10 Produktion im Rahmen der LPS induzierten Immunantwort von HO-1 abhängig ist. Das Enzym könnte über diesen Weg einen entscheidenden Beitrag zum erfolgreichen Schwangerschaftsausgang trotz einer Infektion beitragen. Zusammenfassend ist in den vorangegangenen Versuchen kein eindeutiger, systemischer Effekt der LPS Injektion gefunden worden. Es sollte daher auch in Betracht gezogen werden, dass die LPS Konzentration zu niedrig gewählt wurde, um eine länger andauernde Immunantwort zu induzieren. Bei der Wahl der LPS Dosis in dieser Arbeit wurde sich an den niedrigsten, in der Literatur als effektiv gefundenen, Konzentrationen orientiert. So erreichte Gendron und Kollegen mit einer Injektion von 0,1 µg LPS am 8. Schwangerschaftstag eine 100% ige Fetusresorption [44]. Zusätzlich zur Konzentration ist die Wirkung von LPS auf die Schwangerschaft auch stark vom LPS Typ und der exponierten Mausgattung abhängig. So induziert LPS von *Salmonella enteritidis*, aber nicht von *Escherichia coli*, den Fetusverlust bei C57BL/6 Mäusen. Beide LPS Arten bewirken Implantationsfehler [123]. In Mäusen vom BALB/c Stamm dagegen bewirkt LPS von *Escherichia coli* Implantationsfehler als auch eine Fetusresorption [124]. Der Einfluss der HO-1 auf die LPS induzierte Immunantwort und vor allem ein möglicher Zusammenhang mit der IL-10 Konzentration sollte in weiteren Versuchen mit größeren Gruppenstärken und unterschiedlichen LPS Dosen überprüft werden.

5.7 *In vivo* wird die HO-1 Expression in der Plazenta unter dem systemischen Einfluss von LPS verstärkt

Eine Fehlbesiedlung des Genitaltrakts mit gramnegativen Bakterien während der Schwangerschaft kann eine Immunantwort stimulieren und das Risiko einer Fehlgeburt signifikant erhöhen [42]. In verschiedenen vorangegangenen Studien konnte diese schwangerschaftsgefährdende Wirkung auf LPS einen Membranbestandteil der gramnegativen Bakterien zurückgeführt werden. Je nach Dosis- und Applikationsschema reichte die LPS Wirkung von Abort und Frühgeburt bis zu fötalen bzw. mütterlichen Tod [125-127] In Tiermodellen zur

Sepsisforschung wurde demonstriert, dass HO-1 vor einer systemischen, LPS induzierten, überschießenden Immunreaktion schützt [102,128]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vivo* in der Milz trächtiger Mäuse ein regulierender Effekt der HO-1 auf das Immunsystem in Bezug auf die Zytokinproduktion und die T-Zellzahl gezeigt werden. Es wurde nun überprüft, ob die HO-1 Expression einen ähnlichen Einfluss auf das Immunsystem an der fetal-maternalen Grenzregion hat. Nach der allogenen Verpaarung mit Männchen mit normaler HO-1 Expression wurde auch in den Plazenten von *Hmox1*^{-/-} Muttertieren eine HO-1 Produktion erreicht. Diese war dennoch signifikant geringer als in der Gruppe der heterozygoten Tiere (*Hmox1*^{+/-}) und diente uns als Modell für eine erniedrigte HO-1 Expression in der Plazenta. Die in dieser Arbeit durchgeführte systemische LPS Injektion bewirkte in den Tieren aller Gruppen eine moderate Verstärkung der HO-1 Expression in der Plazenta. Signifikante Unterschiede konnten hier nicht erreicht werden. Eine Erhöhung der Gruppenstärke der *Hmox1*^{-/-} Tiere könnte in weiteren Untersuchungen genauere Erkenntnisse bringen. *Hmox1*^{+/-} bzw. *Hmox1*^{-/-} sind nicht infertil, wie lange Zeit angenommen wurde, haben aber eine stark erhöhte Anzahl von Fetal-toden im Verlauf der Schwangerschaft [79]. Aus diesem Grund gestaltet sich die Zucht der transgenen Mäuse schwierig und eine größere Gruppenstärke konnte im Zeitraum dieser Arbeit nicht erreicht werden. Die erhobenen Daten finden dennoch Bestärkung in den Ergebnissen anderer Arbeiten. So fand die Arbeitsgruppe um Zhang eine erhöhte HO-1 Proteinkonzentration in den Plazenten von Tieren, die zuvor eine LPS Injektion erhalten hatten. Diese Konzentrationserhöhung konnte 12 h nach Injektion festgestellt werden und war bis 48 h nach der Behandlung nachzuweisen [129]. Die Daten decken sich weiterhin mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* an humanen Trophoblastzellen erhoben wurden. Hier löste LPS ebenfalls eine Hochregulation der HO-1 aus. In ihrer Gesamtheit vermitteln die Ergebnisse den Anschein, dass an der fetal-maternalen Grenzfläche dem schwangerschaftsgefährdenden Signal von LPS HO-1 als potentiell protektives Molekül gegenübersteht.

5.8 Die TNF- α Produktion an der fetal-maternalen Grenzregion korreliert negativ mit der HO-1 Expression

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und ein fester Bestandteil der Immunantwort auf LPS. Dies vermitteln die Ergebnisse des vorangegangenen *in vitro* Versuchskomplex an humanen Trophoblasten und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in verschiedenen Tiermodellen [44,46]. Es wurde in dieser Arbeit *in vivo* gezeigt, dass TNF- α neben IL-6 und IL-10 in der Milz trächtiger *Hmox1*^{-/-} Mäuse vermehrt exprimiert wird. Entgegen der Erwartung blieb es jedoch unbeeinflusst von der LPS Behandlung. Die an den Plazenten der Tiere gewonnen

Daten, zeigen eine TNF- α Expression an der fetal-maternalen Grenzregion, die mit abnehmender HO-1 Konzentrationen ansteigt. Ein Einfluss der LPS Injektion konnte auch hier nach 48 h nicht nachgewiesen werden. Diese Daten stehen im Widerspruch zu Ergebnissen von Carpentier und Kollegen. Sie konnten eine verstärkte TNF- α und IL-6 Expression in der Plazenta und erhöhte Serumkonzentrationen dieser Zytokine 2 h nach LPS Injektion trächtiger Mäuse nachweisen. Darüber hinaus konnten sie durch einen TNF- α Antagonisten den Fetaltod durch LPS verhindern [130]. Auch Silver und Kollegen gelang es, durch die Blockierung von TNF- α , die fatale Wirkung von LPS auf den Schwangerschaftsausgang zu unterdrücken [50]. Diese Ergebnisse vermitteln, dass TNF- α nicht nur Bestandteil der immunologischen Antwort auf LPS ist, sondern auch ein entscheidender ursächlicher Faktor für die Pathogenität von LPS. Ein Grund dafür, dass in dieser Arbeit dennoch keine Unterschiede der TNF- α Expression mittels LPS erreicht werden konnten, kann in dem Zeitraum zwischen der LPS Injektion und der TNF- α Messung begründet sein. Carpentier wählte hierfür einen Zeitabstand von 2 h [130]. Leazer und Kollegen kontrollierten den Zeitverlauf der TNF- α Konzentration im Serum trächtiger Tiere und fanden einen Konzentrationspeak bei 1,5 h nach LPS Injektion [46]. Der Einfluss von LPS auf die TNF- α Expression und Konzentration scheint also unmittelbar nach einer einmaligen Behandlung zu bestehen. Das gleiche Bild vermitteln auch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten der TNF- α Konzentration in den Überständen humaner Trophoblasten. Sie erreichten nach 8 bis 12 h ihre Höchstwerte und fielen dann schnell auf die Anfangswerte zurück. Es kann somit vermutet werden, dass im verwendeten Versuchsmodell die unmittelbare Wirkung von LPS auf TNF- α auf Grund des Zeitabstandes zwischen Injektion und Messung nicht nachgewiesen werden konnte. Der Versuchsablauf wurde so gewählt, dass er Aussagen über den Einfluss von HO-1 auf die LPS induzierte Immunantwort in der frühen Schwangerschaft erlaubt. Dementsprechend wurden die Tiere zu einem Schwangerschaftszeitpunkt getötet, zu dem Fehlgeburten visuell noch nicht festgestellt werden konnten. Direkte Daten zu den Abortraten in den Gruppen in Abhängigkeit von der Behandlung liegen somit nicht vor. Weitere Studien, sollten die Untersuchung der TNF- α Konzentration in einem kürzeren Zeitabstand nach der LPS Injektion beinhalten. Des Weiteren könnten Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft Aufschluss über die Abortraten liefern. Aussagen zu der Auswirkung der erhöhten TNF- α Konzentration in HO-1 Defizienten Tieren auf den Schwangerschaftsausgang wären so möglich. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α an der fetal-maternalen Grenzfläche in Abhängigkeit von der HO-1 Expression moduliert wird, lässt einen interessanten Zusammenhang vermuten.

Es besteht die Möglichkeit, dass HO-1 einen andauernden protektiven Effekt für die Schwangerschaft hat, indem es eine beständige Regulation der TNF- α Konzentration bewirkt.

5.9 *In vivo* vermindert die LPS Stimulation die Bag-1 Expression in der Plazenta von *Hmox1*^{+/-} Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Bag-1 in humanen Trophoblasten von pathologischen Schwangerschaften vermindert exprimiert wird. Das anti-apoptotische Molekül verhält sich somit ähnlich der HO-1 Konzentration in diesen Zellen. Unsere Arbeitsgruppe zeigte in früheren Studien, dass nicht nur die Konzentrationen der beiden zellprotektiven Moleküle korrelieren, sondern Bag-1 direkt durch HO-1 induziert wird [73-74]. Die vorangegangenen *in vitro* Experimente dieser Arbeit ließen aber keinen Zusammenhang zwischen der LPS induzierten Hochregulation der HO-1 in Trophoblasten und der Bag-1 Expression erkennen. Im Gegensatz dazu vermitteln die im Mausmodell gewonnen Ergebnisse eine Abhängigkeit zwischen Bag-1 und der LPS induzierten Immunantwort. Die LPS Behandlung provozierte eine signifikant verringerte Expression des Moleküls im plazentarem Gewebe von trächtigen *Hmox1*^{+/-} Mäusen, die in *Hmox1*^{+/+} Tieren nicht nachzuweisen war. Unabhängig von LPS ließen sich keine Unterschiede der Bag-1 Konzentration zwischen *Hmox1*^{+/+}, *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Tieren nachweisen. Es zeigt sich hier eine Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen, die verdeutlicht, dass die Versuchsmodelle nicht direkt übertragen werden können. So wirken im ganzen Organismus mehr Zellen und Faktoren in einem komplexen Zusammenspiel als in der reinen, kontrollierten Zellkultur. Unabhängig davon zeigen beide Versuchskomplexe einen Zusammenhang zwischen der Bag-1 Produktion und der HO-1 Expression, der im Falle einer Infektion und somit eines schwangerschaftsgefährdenden Zustandes von Bedeutung ist. Unsere Arbeitsgruppe demonstrierte kürzlich welchen protektiven Einfluss die HO-1 bzw. CO über Bag-1 auf die Schwangerschaft nehmen kann. El-Mousleh und Kollegen erreichten durch dosierte CO Applikation eine Induktion von Bag-1 in der Plazenta und damit einhergehend eine verminderte Apoptoserate plazentarer Zellen. In dem verwendeten Mausmodell, welches in der Verpaarung durch intrauterine Wachstumsretardierung gekennzeichnet ist, konnte dadurch ein verminderter Fetalverlust und ein erhöhtes Fetal- und Plazentagewicht induziert werden [80]. Somit gefährdet nicht nur alleine der Mangel der HO-1 die Schwangerschaft, sondern im Falle einer Infektion auch die damit verbundene verminderte Expression anderer anti-apoptotischer und protektiver Moleküle wie Bag-1. Die Ergebnisse ermöglichen aber keine Aussage darüber, in welchem Maße die unterschiedlichen Bag-1 Konzentrationen Einfluss auf die Vitalität der plazentaren Zellen nehmen. Des Weiter-

ren konnte auf Grund einer zu geringen Gruppenstärke keine Ergebnisse über das Verhalten der Bag-1 Konzentration in *Hmox1*^{-/-} Tieren erhoben werden. Diese Thematik sollte in weiteren Studien eingehender untersucht werden, denn der Einfluss der HO-1 auf Bag-1 könnte neben der regulierenden Wirkung auf die Zytokine eine besondere Bedeutung für den erfolgreichen Schwangerschaftsausgang haben.

5.10 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend hat diese Arbeit die Annahme bestätigt, das HO-1 ein wichtiges Molekül für die erfolgreiche Schwangerschaft ist. So zeichneten sich Trophoblastzellen pathologischer Schwangerschaften durch geringere Konzentrationen dieses Enzyms aus. Im Rahmen der Antwort auf LPS wurde HO-1 durch Trophoblastzellen hoch reguliert. Es ist daher anzunehmen, dass es eine Rolle in der Regulation der Infektabwehr an der fetal-maternalen Grenzregion spielt. In welchem Umfang und auf welchen Wegen HO-1 die Immunantwort auf eine Infektion kontrolliert, konnte in der Zellkultur jedoch nicht festgestellt werden. Es zeigten sich weder Einflüsse der HO-1 Proteinkonzentration auf die LPS induzierte Zytokinproduktion durch Trophoblasten, noch wurde das anti-apoptotische Molekül Bag-1 von LPS beeinflusst. *In vivo* konnte dagegen unabhängig von einer Infektion ein Einfluss der HO-1 Expression auf das Immunsystem während der Schwangerschaft demonstriert werden. Der Mangel an HO-1 bedingte in der Milz trächtiger Tiere vermehrte T-Zellzahlen und eine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, als auch des anti-inflammatorischen IL-10. Das mit LPS ein HO-1 abhängiger Einfluss auf das Immunsystem genommen wurde, ließ sich aber nur an IL-10 erkennen. Dieses schwangerschaftsprotective Molekül wurde in der Milz HO-1 defizienter Tiere nach LPS Behandlung vermindert exprimiert. *In vivo* nahm die HO-1 auch an der fetal-maternalen Grenzfläche Einfluss auf den Immunstatus. Ähnlich der Milz war in den Plazenten HO-1 defizienter Tiere eine erhöhte Expression von TNF- α zu finden. Diese schwangerschaftsgefährdende Konstellation blieb auch hier unbeeinflusst von der systemischen LPS Stimulation. Im Gegensatz zu den *in vitro* gewonnenen Daten zeigte LPS jedoch einen Einfluss auf die Bag-1 Konzentration in der Plazenta. Abhängig von einer verminderten HO-1 Expression wurde hier auch Bag-1 nach LPS Stimulation weniger produziert. Von den gewonnenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine verminderte Expression der HO-1 das immunologische Gleichgewicht in der Schwangerschaft gefährdet und es systemisch als auch lokal zur pro-inflammatorischen Seite verschiebt. Im Falle einer Infektion könnte ein HO-1 Mangel durch eine verminderte Produktion anti-inflammatorischer Zytokine

eine überschießende Immunantwort bedingen. Außerdem kann der durch HO-1 Defizienz bedingte Mangel protektiver Moleküle, wie Bag-1, den erfolgreichen Schwangerschaftsausgang noch zusätzlich bedrohen. Weitere Aussagen über den Einfluss der HO-1 auf das Immunsystem besonders im Falle einer Infektion könnten in zukünftigen Studien mittels zusätzlicher Aktivitätsanalysen des Enzyms gewonnen werden. So kann eine verminderte Expression der HO-1 durch eine Aktivitätssteigerung des Enzyms kompensiert werden und dadurch den zum Teil in dieser Arbeit beobachteten fehlenden Einfluss von LPS erklären [129]. Weiterhin könnten komplettierende Aussagen über die Immunantwort in HO-1 defizienten Tieren in der Schwangerschaft in einem erweiterten Studiendesign mit unterschiedlichen LPS Konzentrationen und mehreren Untersuchungszeitpunkten nach Injektion getroffen werden. Trotzdem diese Arbeit Fragen zu der Wirkung von HO-1 auf das Immunsystem offen lässt, vermittelt sie doch die Möglichkeit eines zukünftigen Einsatzes dieses Enzym in der Diagnostik und Therapie von Schwangerschaftskomplikationen. Verminderte HO-1 Konzentrationen an der fetal-maternalen Grenzfläche könnten als früher Marker möglicher Risikoschwangerschaften verwendet werden und als direkte Konsequenz die HO-1 Induktion eine Therapieoption darstellen.

6 Zusammenfassung

In der Schwangerschaft vollführt das Immunsystem einen Balanceakt zwischen aktiver Toleranz des allogenen Feten und Schutz des mütterlichen Organismus vor Infektionen. Zahlreiche Signalmoleküle und Enzyme tragen zur Regulation des immunologischen Gleichgewichts bei, darunter das Enzym Hämooxygenase-1. Ihre immunregulierenden Eigenschaften wurden in der Sepsisforschung bewiesen und ihre protektive Bedeutung für die Schwangerschaft in Tiermodellen aufgezeigt. Diese Arbeit untersuchte die Rolle der HO-1 in der Immunantwort auf eine bakterielle Infektion während der frühen Schwangerschaft. Kultivierte humane Trophoblastzellen aus spontanen Aborten zeigten eine verminderte HO-1 Expression im Vergleich zu Trophoblasten aus normalen Schwangerschaften. Ebenso verlief die Hochregulation der HO-1 Produktion durch LPS in der Abortgruppe eingeschränkt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Konzentration der HO-1 an der fetal-maternalen Grenzregion eine Bedeutung für den Schwangerschaftsverlauf hat. Weiterhin wird eine Rolle des Enzyms in der LPS induzierten Immunantwort angedeutet. Hinweise darauf, über welche Mechanismen die HO-1 die Immunantwort beeinflusst, konnten *in vivo* gefunden werden. Trächtige HO-1 defiziente Mäuse zeichneten sich durch erhöhte T-Zellzahlen und eine erhöhte Expression der Zytokine TNF- α , IL-6 als auch IL-10 in der Milz aus. Nach LPS Stimulation zeigte das anti-inflammatorische und schwangerschaftsprotektive Zytokin IL-10 geringere Konzentrationen in *Hmox1*^{-/-}-Tieren. An der fetal-maternalen Grenze konnte unabhängig von LPS mit abnehmender HO-1 Konzentration eine steigende Expression des schwangerschaftsgefährdenden Zytokins TNF- α gemessen werden. Abhängig von LPS zeigte sich hier in *Hmox1*^{+/-} Mäusen eine verminderte Produktion des anti-apoptotischen Moleküls Bag-1. Diese Arbeit erbringt zusammenfassend den Nachweis, dass die HO-1 einen regulierenden Einfluss auf das Immunsystem während der Schwangerschaft nimmt. Ein Mangel des Enzyms verschiebt das immunologische Gleichgewicht zur schwangerschaftsgefährdenden pro-inflammatorischen Seite. Während einer Infektion könnte eine, durch die HO-1 Defizienz bedingte, verminderte Produktion anti-inflammatorischer Zytokine und anti-apoptotischer Moleküle wie Bag-1 den erfolgreichen Schwangerschaftsausgang zusätzlich bedrohen. Die gewonnenen Ergebnisse ermöglichen ein besseres Verständnis für die Rolle der HO-1 in der Immunantwort während der Schwangerschaft. Sie liefern außerdem Anregungen für weitere Untersuchungen, die die Grundlage einer zukünftigen klinischen Verwendung der HO-1 in der Schwangerschaft darstellen könnten.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Sadler TW: Medizinische Embryologie, Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 10 edn. pp. 25-70. Thieme Verlag. Stuttgart 2003
- 2 Rossant J ,Cross JC: Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2. 538-548 (2001)
- 3 Nagry A, Gertsenstein M, Vintersten K ,Behringer R: Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3 edn. pp. 60-66. Cold Spring Harbor. New York 2003
- 4 Roche Lexikon Medizin. 5 edn. pp. Urban & Fischer Verlag. München 2003
- 5 Roth DB: The frequency of spontaneous abortion. *Int J Fertil.* 8. 431-434 (1963)
- 6 Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E ,Wood PJ: Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril.* 38. 447-453 (1982)
- 7 Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG ,Sykes A: Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet.* 2. 554-556 (1980)
- 8 Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R ,et al.: Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet.* 47. 656-663 (1990)
- 9 Parazzini F, Bocciolone L, Fedele L, Negri E, La Vecchia C ,Acaia B: Risk factors for spontaneous abortion. *Int J Epidemiol.* 20. 157-161 (1991)
- 10 Taskinen H, Kyyronen P, Hemminki K, Hoikkala M, Lajunen K ,Lindbohm ML: Laboratory work and pregnancy outcome. *J Occup Med.* 36. 311-319 (1994)
- 11 Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J ,Siddiqi TA: Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstet Gynecol.* 84. 515-520 (1994)
- 12 Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson D, Morgan DJ, Ison C ,Pearson J: Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ.* 308. 295-298 (1994)
- 13 Coulam CB: Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 26. 23-27 (1991)
- 14 Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B ,Wainscoat JS: Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood.* 88. 4390-4395 (1996)

- 15 Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, Wafula PO, Fest S, Teles A, Leber A, Casalis PA, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC: The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 63. 200-208 (2010)
- 16 Wood GW, Hausmann E, Choudhuri R: Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev.* 46. 62-69; discussion 69-70 (1997)
- 17 Bulmer JN, Pace D, Ritson A: Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev.* 28. 1599-1613 (1988)
- 18 Gardner L, Moffett A: Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod.* 69. 1438-1446 (2003)
- 19 Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, Chavez SL, Romero R, Mor G: Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 57. 55-66 (2007)
- 20 Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med.* 12. 1065-1074 (2006)
- 21 Plaks V, Birnberg T, Berkutski T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Jung S: Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest.* 118. 3954-3965 (2008)
- 22 Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou CL, Zhou Y, Huang L, Fisher SJ: Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *J Exp Med.* 193. 1199-1212 (2001)
- 23 Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE: The cytokine facts book. pp. 3- 14. Academic Press. London 2001
- 24 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie. 5 edn. pp. 421-424. Spektrum Akademischer Verlag. Berlin 2002
- 25 Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, 3rd, Petraglia F: Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci.* 16. 206-215 (2009)
- 26 Raghupathy R: Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.* 18. 478-482 (1997)
- 27 Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG: Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol.* 151. 4562-4573 (1993)

- 28 Svensson L, Arvola M, Sallstrom M, Holmdahl R, Mattsson R: The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol.* 51. 3-7 (2001)
- 29 Athanassakis I, Papadimitriou L, Bouris G, Vassiliadis S: Interferon-gamma induces differentiation of ectoplacental cone cells to phenotypically distinct trophoblasts. *Dev Comp Immunol.* 24. 663-672 (2000)
- 30 Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA: Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 192. 259-270 (2000)
- 31 Alexander C, Rietschel ET: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 7. 167-202 (2001)
- 32 Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET: Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 16. 83-104 (1996)
- 33 Galanos C: Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol.* 149. 214-229 (1975)
- 34 Hellman J, Loisel PM, Tehan MM, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, Andrews DM, Sik Kim K, Warren HS: Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by Escherichia coli bacteria into serum. *Infect Immun.* 68. 2566-2572 (2000)
- 35 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282. 2085-2088 (1998)
- 36 Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 164. 5998-6004 (2000)
- 37 Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS: Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90. 2744-2748 (1993)
- 38 Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA: Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 104. 271-280 (1999)
- 39 Helfgott DC, May LT, Stoeber Z, Tamm I, Sehgal PB: Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med.* 166. 1300-1309 (1987)

- 40 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie. 5 edn. pp. 70-75. Spektrum Akademischer Verlag. Berlin 2002
- 41 Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD: Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ*. 319. 220-223 (1999)
- 42 Nelson DB, Bellamy S, Nachamkin I, Ness RB, Macones GA, Allen-Taylor L: First trimester bacterial vaginosis, individual microorganism levels, and risk of second trimester pregnancy loss among urban women. *Fertil Steril*. 88. 1396-1403 (2007)
- 43 Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S: Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG*. 116. 1315-1324 (2009)
- 44 Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG: Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *J Reprod Fertil*. 90. 395-402 (1990)
- 45 Zhao L, Chen YH, Wang H, Ji YL, Ning H, Wang SF, Zhang C, Lu JW, Duan ZH, Xu DX: Reactive oxygen species contribute to lipopolysaccharide-induced teratogenesis in mice. *Toxicol Sci*. 103. 149-157 (2008)
- 46 Leazer TM, Barbee B, Ebron-McCoy M, Henry-Sam GA, Rogers JM: Role of the maternal acute phase response and tumor necrosis factor alpha in the developmental toxicity of lipopolysaccharide in the CD-1 mouse. *Reprod Toxicol*. 16. 173-179 (2002)
- 47 Beijar EC, Mallard C, Powell TL: Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta*. 27. 322-326 (2006)
- 48 Wang H, Hirsch E: Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *Biol Reprod*. 69. 1957-1963 (2003)
- 49 Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor G: A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol*. 175. 8096-8104 (2005)
- 50 Silver RM, Lohner WS, Daynes RA, Mitchell MD, Branch DW: Lipopolysaccharide-induced fetal death: the role of tumor-necrosis factor alpha. *Biol Reprod*. 50. 1108-1112 (1994)
- 51 Vizi ES, Szelenyi J, Selmechy ZS, Papp Z, Nemeth ZH, Hasko G: Enhanced tumor necrosis factor-alpha-specific and decreased interleukin-10-specific immune responses to LPS during the third trimester of pregnancy in mice. *J Endocrinol*. 171. 355-361 (2001)
- 52 Balkundi DR, Ziegler JA, Watchko JF, Craven C, Trucco M: Regulation of FasL/Fas in human trophoblasts: possible implications for chorioamnionitis. *Biol Reprod*. 69. 718-724 (2003)

- 53 Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 61. 748-755 (1968)
- 54 Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM: Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb*. 11. 1700-1711 (1991)
- 55 Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G: Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*. 100. 879-887 (2002)
- 56 Beri R, Chandra R: Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab Rev*. 25. 49-152 (1993)
- 57 Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37. 517-554 (1997)
- 58 McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem*. 247. 725-732 (1997)
- 59 Oshiro S, Takeuchi H, Matsumoto M, Kurata S: Transcriptional activation of heme oxygenase-1 gene in mouse spleen, liver and kidney cells after treatment with lipopolysaccharide or hemoglobin. *Cell Biol Int*. 23. 465-474 (1999)
- 60 Keyse SM, Tyrrell RM: Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 262. 14821-14825 (1987)
- 61 Panchenko MV, Farber HW, Korn JH: Induction of heme oxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278. C92-C101 (2000)
- 62 Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS: Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 274. H883-891 (1998)
- 63 Otterbein LE, Choi AM: Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279. L1029-1037 (2000)
- 64 Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP: Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*. 192. 1015-1026 (2000)
- 65 Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM: Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 6. 422-428 (2000)

- 66 Brune B ,Ullrich V: Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 32. 497-504 (1987)
- 67 Morita T ,Kourembanas S: Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest.* 96. 2676-2682 (1995)
- 68 Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K ,Bach FH: Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 24. 449-455 (2003)
- 69 Stocker R ,Ames BN: Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84. 8130-8134 (1987)
- 70 Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN ,Robson SC: Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J.* 14. 208-219 (2000)
- 71 Bilban M, Haslinger P, Prast J, Klinglmuller F, Woelfel T, Haider S, Sachs A, Otterbein LE, Desoye G, Hiden U, Wagner O ,Knofler M: Identification of novel trophoblast invasion-related genes: heme oxygenase-1 controls motility via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Endocrinology.* 150. 1000-1013 (2009)
- 72 Denschlag D, Marculescu R, Unfried G, Hefler AL, Exner M, Hashemi A, Riener E-K, Keck C, Tempfer CB ,Wagner O: The size of a microsatellite polymorphism of the haem oxygenase 1 gene is associates with idiopathic recurrent miscarriage. *Molecular Human Reproduction.* 10. 211-214 (2004)
- 73 Zenclussen AC, Sollwedel A, Bertoja AZ, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C ,Volk HD: Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *Int Immunopharmacol.* 5. 41-51 (2005)
- 74 Sollwedel A, Bertoja AZ, Zenclussen ML, Gerlof K, Lisewski U, Wafula P, Sawitzki B, Woiciechowsky C, Volk HD ,Zenclussen AC: Protection from abortion by heme oxygenase-1 up-regulation is associated with increased levels of Bag-1 and neuropilin-1 at the fetal-maternal interface. *J Immunol.* 175. 4875-4885 (2005)
- 75 Zenclussen ML, Anegon I, Bertoja AZ, Chauveau C, Vogt K, Gerlof K, Sollwedel A, Volk HD, Ritter T ,Zenclussen AC: Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol.* 69. 35-52 (2006)
- 76 Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA ,Reed JC: Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell.* 80. 279-284 (1995)
- 77 Townsend PA, Cutress RI, Carroll CJ, Lawrence KM, Scarabelli TM, Packham G, Stephanou A ,Latchman DS: BAG-1 proteins protect cardiac myocytes from simulated ischemia/reperfusion-induced apoptosis via an alternate mechanism of cell survival independent of the proteasome. *J Biol Chem.* 279. 20723-20728 (2004)

- 78 Coito AJ, Buelow R, Shen XD, Amersi F, Moore C, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW: Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 74. 96-102 (2002)
- 79 Zenclussen ML, Casalis PA, El-Mousleh T, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC: Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J Pathol*. 225. 293-304 (2011)
- 80 El-Mousleh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, Jensen F, Zenclussen AC: Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy complications. *Med Gas Res*. 2. 4 (2012)
- 81 Coito AJ, Shaw GD, Li J, Ke B, Ma J, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW: Selectin-mediated interactions regulate cytokine networks and macrophage heme oxygenase-1 induction in cardiac allograft recipients. *Lab Invest*. 82. 61-70 (2002)
- 82 DeBruyne LA, Magee JC, Buelow R, Bromberg JS: Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. *Transplantation*. 69. 120-128 (2000)
- 83 Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Bachmann U, Reutzel-Selke A, Jonas S, Pratschke J, Bechstein WO, Reinke P, Buelow R, Neuhaus P, Volk H: Induction of heme-oxygenase-1 prevents ischemia/reperfusion injury and improves long-term graft outcome in rat renal allografts. *Transplant Proc*. 33. 1286-1287 (2001)
- 84 Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber JH, Fabisiak J, Alber SM, Watkins SC, Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Ning W, Oury TD, Lee PJ, McCurry KR, Choi AM: Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol*. 163. 231-242 (2003)
- 85 Poss KD, Tonegawa S: Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94. 10919-10924 (1997)
- 86 Wiesel P, Patel AP, DiFonzo N, Marria PB, Sim CU, Pellacani A, Maemura K, LeBlanc BW, Marino K, Doerschuk CM, Yet SF, Lee ME, Perrella MA: Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*. 102. 3015-3022 (2000)
- 87 Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A: Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol*. 165. 1045-1053 (2004)
- 88 Tracz MJ, Juncos JP, Grande JP, Croatt AJ, Ackerman AW, Rajagopalan G, Knutson KL, Badley AD, Griffin MD, Alam J, Nath KA: Renal hemodynamic, inflammatory, and apoptotic responses to lipopolysaccharide in HO-1^{-/-} mice. *Am J Pathol*. 170. 1820-1830 (2007)

- 89 Roach JP, Moore EE, Partrick DA, Damle SS, Silliman CC, McIntyre RC, Jr, Banerjee A: Heme oxygenase-1 induction in macrophages by a hemoglobin-based oxygen carrier reduces endotoxin-stimulated cytokine secretion. *Shock*. 31. 251-257 (2009)
- 90 Sun B, Zou X, Chen Y, Zhang P, Shi G: Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC. *Int J Biol Sci*. 4. 270-278 (2008)
- 91 Song Y, Shi Y, Ao LH, Harken AH, Meng XZ: TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: role of TNF-alpha and IL-1beta. *World J Gastroenterol*. 9. 1799-1803 (2003)
- 92 Wang XM, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM: The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *J Immunol*. 182. 3809-3818 (2009)
- 93 Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S, Lee ME: Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest*. 103. R23-29 (1999)
- 94 Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G: Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta*. 21. 733-741 (2000)
- 95 Friebe A, Arck P: Causes for spontaneous abortion: what the bugs 'gut' to do with it? *Int J Biochem Cell Biol*. 40. 2348-2352 (2008)
- 96 Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK: Comprehending the role of LPS in Gram-negative bacterial vaginosis: ogling into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet*. 270. 133-146 (2004)
- 97 Rushworth SA, Chen XL, Mackman N, Osborne RM, O'Connell MA: Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *J Immunol*. 175. 4408-4415 (2005)
- 98 Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC: Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *Am J Reprod Immunol*. 50. 66-76 (2003)
- 99 Shaarawy M, Nagui AR: Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 76. 205-211 (1997)
- 100 Daher S, de Arruda G, Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, Mattar R: Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 62. 151-157 (2004)

- 101 Robertson SA, Skinner RJ ,Care AS: Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice. *J Immunol.* 177. 4888-4896 (2006)
- 102 Chung SW, Liu X, Macias AA, Baron RM ,Perrella MA: Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest.* 118. 239-247 (2008)
- 103 Doong H, Vrailas A ,Kohn EC: What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett.* 188. 25-32 (2002)
- 104 Ollinger R ,Pratschke J: Role of heme oxygenase-1 in transplantation. *Transpl Int.* 23. 1071-1081 (2010)
- 105 Ke B, Shen XD, Buelow R, Melinek J, Amersi F, Gao F, Ritter T, Volk HD, Busuttill RW ,Kupiec-Weglinski JW: Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/FasL-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Transplant Proc.* 34. 1465-1466 (2002)
- 106 Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, Bussolati B ,St John J: Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Mol Med.* 6. 391-409 (2000)
- 107 Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R ,Mor G: Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol.* 173. 4286-4296 (2004)
- 108 Ma Y, Mor G, Abrahams VM, Buhimschi IA, Buhimschi CS ,Guller S: Alterations in syncytiotrophoblast cytokine expression following treatment with lipopolysaccharide. *Am J Reprod Immunol.* 55. 12-18 (2006)
- 109 Chauveau C, Remy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, Tesson L, Brion R, Beriou G, Gregoire M, Josien R, Cuturi MC ,Anegon I: Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood.* 106. 1694-1702 (2005)
- 110 Nakahira K, Kim HP, Geng XH, Nakao A, Wang X, Murase N, Drain PF, Sasidhar M, Nabel EG, Takahashi T, Lukacs NW, Ryter SW, Morita K ,Choi AM: Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J Exp Med.* 203. 2377-2389 (2006)
- 111 Remy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, Motterlini R, Foresti R, Painchaut M, Pogu S, Gregoire M, Bach JM, Anegon I ,Chauveau C: Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol.* 182. 1877-1884 (2009)
- 112 Ljunger E, Cnattingius S, Lundin C ,Anneren G: Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 84. 1103-1107 (2005)

- 113 Calleja-Agius J, Jauniaux E, Muttukrishna S: Inflammatory cytokines in maternal circulation and placenta of chromosomally abnormal first trimester miscarriages. *Clin Dev Immunol*. 2012. 175041 (2012)
- 114 Otun HA, Lash GE, Innes BA, Bulmer JN, Naruse K, Hannon T, Searle RF, Robson SC: Effect of tumour necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma on first trimester extravillous trophoblast invasion. *J Reprod Immunol*. 88. 1-11 (2011)
- 115 Radhakrishnan N, Yadav SP, Sachdeva A, Pruthi PK, Sawhney S, Piplani T, Wada T, Yachie A: Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 33. 74-78 (2011)
- 116 Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT: Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol*. 172. 4744-4751 (2004)
- 117 Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK: Gram-negative bacterial LPS induced poor uterine receptivity and implantation failure in mouse: alterations in IL-1beta expression in the preimplantation embryo and uterine horns. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 13. 125-133 (2005)
- 118 Wang R, Chen X, Han M: [Relationship between human parvovirus B19 infection and spontaneous abortion]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 32. 541-543 (1997)
- 119 Friebe A, Douglas AJ, Solano E, Blois SM, Hagen E, Klapp BF, Clark DA, Arck PC: Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress-triggered fetal loss in murine pregnancy. *J Mol Med (Berl)*. 89. 689-699 (2011)
- 120 Luppi P, Haluszczak C, Betters D, Richard CA, Trucco M, DeLoia JA: Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J Leukoc Biol*. 72. 874-884 (2002)
- 121 Luppi P, Haluszczak C, Trucco M, DeLoia JA: Normal pregnancy is associated with peripheral leukocyte activation. *Am J Reprod Immunol*. 47. 72-81 (2002)
- 122 Robertson SA, Care AS, Skinner RJ: Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biol Reprod*. 76. 738-748 (2007)
- 123 Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC: A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med*. 13. 1450-1457 (2007)
- 124 Ogando DG, Paz D, Cella M, Franchi AM: The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction*. 125. 95-110 (2003)
- 125 Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D, Meiss R, McCann SM, Rettori V, Franchi AM: Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on

- lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104. 7534-7539 (2007)
- 126 Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, Wang JP ,Wei W: Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicol Sci.* 88. 525-533 (2005)
- 127 Ejima K, Koji T, Tsuruta D, Nanri H, Kashimura M ,Ikeda M: Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysaccharides: possible involvement of Fas/Fas ligand system. *Biol Reprod.* 62. 178-185 (2000)
- 128 Poss KD ,Tonegawa S: Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94. 10925-10930 (1997)
- 129 Zhao H, Wong RJ, Kalish FS, Nayak NR ,Stevenson DK: Effect of heme oxygenase-1 deficiency on placental development. *Placenta.* 30. 861-868 (2009)
- 130 Carpentier PA, Dingman AL ,Palmer TD: Placental TNF-alpha signaling in illness-induced complications of pregnancy. *Am J Pathol.* 178. 2802-2810 (2011)

8 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Ana Zenclussen, die mir die Möglichkeit gegeben hat, an Ihrem Institut zu arbeiten. Sie war immer für mich ansprechbar und stand mir bei Problemen zur Seite. In zwischenzeitlichen Phasen der Frustration verstand Sie es, mir neuen Mut zu geben. Meine Motivation und Durchhaltevermögen ist auch Ihrem beständigen positiven Zuspruch zu verdanken.

Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe der experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe. Vor allem Anne Leber, Nadja Linzke, Alexandra Goldschmidt, Katja Woidacki, Stefanie Langwisch, Markus Scharm und Federico Jensen verdanke ich meine wissenschaftlichen Fertigkeiten und Fähigkeiten. Sie und alle weiteren Arbeitskollegen haben mich immer unterstützt und ich verbrachte mit Ihnen eine sehr schöne Zeit.

Anne Leber möchte ich zusätzlich hervorheben. Sie war meine erste Ansprechpartnerin und hat nicht nur diese Arbeit korrigiert und mit Ihren Vorschlägen und Anmerkungen bereichert, sondern hat mir auch zu vielen anderen Gelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Danken möchte ich auch Sara Fill Malfertheiner für Ihre Betreuung und Unterstützung. Von Ihr stammt die Intention zu dieser Dissertation.

Meine Schwester Katharina und meine Mama Inge Kahlo haben sich die Zeit genommen, um diese Arbeit zu lesen und mir mit ihren Kommentaren und Hinweisen eine große Hilfe geleistet. Ihnen, meinem Bruder Tobias und meinem Vater Bernhard Kahlo gilt mein größter Dank für ihre bedingungslose Unterstützung und den ständigen Rückhalt. Sie haben so nicht nur zu der Bewältigung dieser Dissertation beigetragen, sondern meinen ganzen Lebensweg bis zum heutigen Tag positiv geprägt und seine erfolgreiche Gestaltung ermöglicht.

Zum Abschluss möchte ich meinen Studienfreunden Stefanie Jürgens, Jennifer Mosebach, Stephanie Pabert und Tilmann Dreßel danken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich und als Leidensgenossen verstanden sie es, mich aufzubauen und positiv abzulenken.

9 Lebenslauf

Name	Kahlo
Vorname	Kristina
Geburtsdatum	31.03.1986
Geburtsort	Halle / Saale
Familienstand	ledig
Adresse	Landsberger Str.60 06112 Halle / Saale
	E-Mail: kristina.kahlo@gmx.de
Derzeitige Beschäftigung	Assistenzärztin der Allgemein- und Viszeral- chirurgie im Diakoniekrankenhaus Halle / Saale

Schulbildung:

1992 - 2005 Grundschule und Gymnasium in Wittstock
Abschluss: Abitur, Note 1,2

Hochschulausbildung:

2005 - 2011 Studium der Humanmedizin
an der Otto von Guericke Universität Magdeburg
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note 1,66

Famulaturen Internistische Facharztpraxis, Dipl.med W.Stiller, Wittstock

Facharztpraxis für Orthopädie, Unfallchirurgie und Handchirurgie,
Dr. R. Greese, Wittstock

Klinik für Augenheilkunde, Prof. Dr. W. Behrens-Baumann,
Universitätsklinik Magdeburg

Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Prof. Dr. S.-C. Costa,
Universitätsklinikum Magdeburg

Praktisches Jahr Innere Medizin, Prof. Dr. P. Malfertheiner, Universitätsklinikum
Magdeburg

Chirurgie, Prof. Dr. R. Rimdeika, Universitätsklinik Kaunas, Litauen

Urologie, Prof. Dr. M. Schostak, Universitätsklinikum Magdeburg

Studienbegleitende Tätigkeiten

- 2008 - 2009 Betreuung der Erstsemester im Präparierkurs als Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie
- 2008 - 2009 Erfolgreiche Teilnahme an der fakultativen Lehrveranstaltung zum Thema „Experimentelle Ansätze in der Gynäkologie“
- 2009 - 2010 erfolgreiche Teilnahme am Kurs zur Einführung in tierexperimentelle Methoden für Doktoranden, wissenschaftliches und nicht wissenschaftliches Personal der Hochschule
- 2011 Betreuung von Studenten des 4. Semesters im Kurs „Einführung in die Klinische Medizin“

Promotion

- seit Mai 2009 Thema „Der Einfluss der Hämoxxygenase-1 auf die LPS induzierte Immunantwort in der Schwangerschaft“
Betreuung durch Prof. Dr. A. C. Zenclussen, Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinik Magdeburg

Stipendien

- Dezember 2010 Reisestipendium des Leonardo Programmes im Rahmen eines 4 monatigen Litauenaufenthalts während des PJs
- November 2012 Promotionsstipendium im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe an der Medizinischen Fakultät Magdeburg

Veröffentlichungen

- Kongresse Teilnahme an der “Reproductive Biology and Immunology Autumn School” Oktober 2011
Poster: “HO-1 regulation in placenta during premature birth”
- Publikation HO-1 As Modulator of the Innate Immune Response in Pregnancy.
Kahlo K, Fill Malfertheiner S, Ignatov T, Jensen F, Costa SD, Schumacher A, Zenclussen AC. Am J Reprod Immunol. 2013 Mar 22. doi: 10.1111/aji.12115.

10 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

"Der Einfluss der Hämoxygenase-1 auf die LPS induzierte Immunantwort in der Schwangerschaft"

im Institut der Experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. Ana Claudia Zenclussen

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Halle/ Saale, den

Unterschrift

11 Anhang

11.1 Material

Allgemeine Laborausstattung

Digitalkamera Canon IXUS 80 IS	Bauer Electronics, Magdeburg, Deutschland
Einmal-Dentalkanülen (27G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Eisbad	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Glasmaterialien	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Kapillarpipetten	Servoprax [®] , Wesel, Deutschland
Kühlschrank Liebherr FKEX 3600	Rexel Deutschland, Hannover, Deutschland
Kühlschrank Liebherr KTP 1810-20	Unielektro, Magdeburg, Deutschland
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Magnetrührer RH basic 2 IKAM	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Mikrotestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Minishaker MS 3 basic	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Mini Spin	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
pH-Meter	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Parafilm M	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen (Typ A-C)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage LA 620	Sartorius, Berlin, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reinigungs- und Desinfektionsautomat	Omnilab-Laborzentrum, Bremen, Deutschland
Skalpell	Feather [®] , Osaka, Japan
Trockenschrank	Novodirect Labortechnik, Kehl, Deutschland

Ultra-Tiefkühlschrank MDF-U53V	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

Computerprogramme

Gene Snap für WB	VWR, Darmstadt, Deutschland
Gen 5 TM Data Analysis Software	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
FCAP Array v1.0.1	Soft Flow, Mineapolis, USA
iQ5 Software	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Microsoft Excel 2003, 2007	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2003, 2007	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2003, 2007	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland

Geräte und Materialien für Zellkultur

CO ₂ -Inkubator HERACELL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
CO ₂ -Inkubator NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
CryoSystem 4000	German Cryo Jutta Ohst, Jüchen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axio Observer A1	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Probenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Puradisc Syringe Filter (0,2 µm)	Whatman, Dassel, Deutschland
Schüttelwasserbad SWB 25	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank NU-437-400E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Sterile Einwegspritzen (30 ml)	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ³)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturflaschen (Collagen IV, 25 cm ³)	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 12-, 96- Loch)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsiebe (100 µm)	BD Falcon, Erembodegem, Belgien

Geräte und Materialien für molekularbiologische Methoden

Filterspitzen RNase-/ DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greinder Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
iQ5 Real-time PCR System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Microseal® `B` Film	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Rotilab-PCR Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Safe Lock Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Thermocycler	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Thermo-Fast 96, non skirted PCR plates	ABgene, Epsom, England
Ultraschall-Homogenisator, SONOPLUS	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultra Turrax T25 Homogenisator	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Geräte und Materialien für Western Blot

Chemilumineszenzgerät, GENE-GNOME®	VWR, Darmstadt, Deutschland; GeneGnome, Syngene, England
Elektrophorese Kammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Fasermatten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Glasplatten mit Spacer, 1,5 mm Dicke	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Immobilon PVDF Membran, 0,45 µm	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Kapillarspitzen (10 µl - 100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kompressionskassetten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Plastikpinzetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Powersupply	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Tank Elektro-Blotter, Perfect Blue, Web S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Whatmanpapier/Filterpapier	Millipore GmbH, Schwalbach / Ts., Deutschland

Geräte und Materialien für Durchflusszytometrie

Axio Vision Rel. 4.6.	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
BD FACS Calibur TM 4CA	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS (Rinse, Clean)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Omnifix [®] - 1 ml Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Polystyren-Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Falcon, Erembodegem, Belgien

Chemikalien und Lösungen

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad injectabile (steriles Wasser)	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Aquatex Mounting Media	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Di-Methyl-Sulfoxid (DSMO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Fluka Biochemika, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut, 96 %, 75 %	Otto Fischer, München, Deutschland
Fluorescein	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin (nach Meyer)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium (LSM)	MP Biochemicals, Illkirch, Frankreich
Magermilchpulver	Fluka Biochemika, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
M-MLV RT 5 x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natrium-Matavanadate	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
n-Dodecyl β D-Maltosid (LM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P40 (NP 40)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Rotiphorese [®] NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Air Liquide Deutschland GmbH, Leipzig, Deutschland
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (39 %) (H_2O_2)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Medien und Pufferlösungen

Medien

HBSS 10 x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medium 199 Earles und Hepes	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 + L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Kulturmedium für Primäre Trophoblasten (M199)

Medium 199 versetzt mit 10 % fötales Kälberserum
50 mg/ml Normocin

Kulturmedium für Primäre Lymphozyten

RPMI 1640 + L-Glutamin versetzt mit 10 % fötales Kälberserum
100 ng/ml Penicillin/Streptomycin

Verdauulösung für Trophoblastenisolierung

Verdauulösung 1 mM MgSO₄
0,125 % Trypsin
10 U/ml DNase I
in 95 ml PBS

Lysispuffer für Proteinisolierung

Lysispuffer 0,1 ml 10 % NP 40
0,1 ml 0,1 µg/ml LM
0,02 ml 500 mM Natriumfluorid
0,01 ml 10 mM Natrium Matabanadate
0,01 ml 100 mM PMSF
0,5 ml 1 M Trizma Base pH 7,5
0,02 ml 0,5 M EDTA
0,033 ml 5 M NaCl
0,657 ml dest. Wasser

Lösungen für Polyacrylamidgele und Western Blot

Blockierlösung 5 % Magermilchpulver in 1 x TBS

Elektrochemilumineszenz-Lösung (ECL) Lösung 1
4,6 ml dest. Wasser
0,33 ml 1,5 M Trizma Hydrochlorid pH 8,8
0,022 ml Cumarsäure (0,073 g in 5 ml DMSO)
0,05 ml Luminol (11,2 mg/ml)

Lösung 2
4,6 ml dest. Wasser
0,33 ml 1,5 M Trizma Hydrochlorid pH 8,8
0,01 ml H₂O₂

Elektrophoresepuffer 10 x 0,25 mM Trizma Base
1,92 M Glyzin
1 % SDS

Ladepuffer 5 x 15 % β-Mercaptoethanol
6 % SDS
60 % Glycerol

	0,006 % Bromphenolblau 0,18 M Trizma Hydrochlorid pH 6,8
Sammelgel 10 % für 2 Gele	6,8 ml dest. Wasser 12,1 ml Acrylamid 1,26 ml 1,5 M Trizma Hydrochlorid pH 6,8 0,1 ml 10 % APS 0,1 ml 10 % SDS 0,020 ml TEMED
TBS (10 x), pH 7,6	74 mM Trizma Base 43 M Trizma Hydrochlorid 150 M NaCl mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen
Transferpuffer 10 x	25 mM Trizma Base 192 mM Glyzin
Transferpuffer gebrauchsfertig	25 % Methanol in 1 x Transferpuffer
Trenngel 10 % für 2 Gele	11,8 ml dest. Wasser 1,66 ml Acrylamid 7,5 ml 1,5 M Trizma Hydrochlorid pH 8,8 0,3 ml 10 % APS 0,3 ml 10 % SDS 0,024 ml TEMED
Waschpuffer	1 x TBS mit 0,5 % Tween®20

HBSS-Lösung für Lymphozytenisolierung

HBSS 1 x	0,35 g NaHCO ₃ in 1000 ml dest. Wasser pH 7,2 100 ml durch 100 ml HBSS 10 x ersetzen
----------	--

Pufferlösung für Durchflusszytometrie

FACS-Puffer	1 % BSA 0,1 % NaN ₃ in PBS
Lysis-Puffer	1,5 M NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 100 mM EDTA in destilliertem Wasser

Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und andere biologisch aktive Substanzen

Bovine serum albumine (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

DNase (für reverse Transkription)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
DNase I (für Verdau)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Fötale Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Lipopolysaccharid L2630 (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
Normocin-Lösung	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Oligo-Desoxy-Thymidin-Nukleotide (odTs)	Promega, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pferdeserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
SYBR [®] Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TaqMan-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Trypsin (für Trophoblastenisolierung)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper

Immunhistochemie und Western Blot

Bag-1 polyklonaler Kaninchen anti-Mensch Antikörper, C-16, sc 939	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Biotinylierter Protein Marker; inkl. Meerrettichperoxidase-konjugiertem Antikörper	Cell signaling technology, Boston, USA
Cytokeratin-7 AE1/AE3 monoklonaler Maus anti-Mensch Antikörper, Klon OV-TL 12/30	Dako, Glostrup, Dänemark
GAPDH polyklonaler Hase anti-Mensch Antikörper, FL335, sc257778	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HO-1 (Hsp32) polyklonaler Hase anti-Mensch Antikörper; SPA894	Biotrend, Köln, Deutschland
Immuno Pure [®] Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L), Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific, Rockford, USA
Immuno Pure [®] Ziege anti-Maus IgG(H+L), Peroxidase-konjugiert	Thermo Scientific, Rockford, USA
Monoklonaler β -Aktin Maus anti-Mensch Antikörper Klon AC-15	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Polyklonaler Ziege anti-Maus Antikörper, Dako, Glostrup, Dänemark
biotinyliert

Durchflusszytometrie

Allophycocyanin Hamster anti-Maus BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD11c (Clone: HL3)
Fluorescein Isothiocyanate Ratte anti-Maus BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD4 (Clone: RM4-4)
Phycoerythrin Ratte anti-Maus I-A/I-E BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
(Clone: M5/114.15.2)
PE-Cy7 Ratte anti-Maus CD8a (Clone: BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
53-67)

Primer und Sonden

	Primer (5'-3')	Sonde (5'-3')
β-Aktin (Maus)	Fw: GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTT Rev: GTTGTCGACGACCAGCGC	CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT GGAATCCT
Bag-1 (Maus)	FW: GCTAACCACCTGCAAGAATTGAAT Rev: GTTTGCAGAGAGCCTCCGC	TTCTGACATCCAGCAGGGTTTT CTGGC
HO-1 (Maus)	Fw: CAGAAGAGGCTAAGACCGCCTT Rev: TCTGGTCTTTGTGTTCTCTGTCA	TGCTCAACATTGAGCTGTTT GAGGAGCTG
IL-4 (Maus)	Fw: CTCATGGAGCTGCAGAGACTCTTT Rev: GTCATGTGGACTTGGACTCATTCA	ATGCCTGGATTCATCGATAA GCTGCACCT
IL-6 (Maus)	Fw: TCCAGAAACCGCTATGAAGTTCC Rev: GTCACCAGCATCAGTCCCAAG	
IL-10 (Maus)	Fw: GAAGACCCTCAGGATGCGG Rev: CCTGCTCCACTGCCTTGCT	CGCTGTCATCGATTTCTCCCC TGTGA
TNF-α (Maus)	Fw: TCGAGTGACAAGCCCGTAGC Rev: CTCAGCCACTCCAGCTGCTC	CGTCGTAGCAAACCACCAAG CGGA

Kits

Biorad Proteinassay Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, Cyto- BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
metric Bead Array (CBA)
Vectastain ABC Kit Vector Laboratories, Burlingame, USA

Primäre Zellen

Primäre Lymphozyten Isolation aus Mausorganen (Milz, inguina-
le/iliakale Lymphknoten, Dezidua)
Primäre Trophoblasten Isolation aus Plazentagewebe des 1. Trimesters
(Schwangerschaftsabbruch, Fehlgeburt)

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente mit menschlichem Probenmaterial wurden durch die Ethikkommission der Otto von Guericke Universität (OVGU) in Magdeburg, Studie 28/08, genehmigt. Die Plazenten wurden von der Landesfrauenklinik in Magdeburg zur Verfügung gestellt. Das Material erhielten wir nach eingehender Aufklärung der Patientinnen und deren schriftlichen Einverständniserklärung.

Tierstämme und Tierhaltung

BALB/c	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
<i>Hmox1</i> ^{+/+} , <i>Hmox1</i> ^{+/-} , <i>Hmox1</i> ^{-/-} (BALB/c Hintergrund)	Aus eigener Kolonie, ursprünglich generiert von Dr. Yet (Harvard Medical School, Boston, USA), nach Transferabkommen (MTA-Material Transfer Agreement) freundlicherweise bereit gestellt von Prof. Miguel Soares (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal)
C57BL/6	Wildtypmäuse aus eigener Kolonie oder Charles River, Sulzfeld, Deutschland

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Tierexperimente wurden durch die Tier-schutzbehörden in Halle (LVwA, Referat Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten) unter dem Aktenzeichen: 42502-2-868 Universität Magdeburg genehmigt. Die Tiere waren im Zentralem Tierlabor der Medizinischen Fakultät und in der Tierhaltung der experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe in Magdeburg artgerecht untergebracht. Sie wurden einem wechselnden 12-stündigen Licht-/Dunkelheitsrhythmus ausgesetzt. Die Tierkäfige wurden einmal wöchentlich gereinigt. Wasser und Futter standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

11.2 Methoden

11.2.1 Trophoblastenisolierung aus Plazentagewebe und Kultur

Das placentare Gewebe wurde in PBS (Phosphate buffered saline; PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) gewaschen und mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde es 30 min in der Verdauung bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Gewebesuspension wurde durch ein 100 µl Zellsieb gefiltert um größere Bindegewebsreste zu entfernen. Es folgte die Zentrifugation der Suspension bei 1500 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Das entstandene Zellpellet wurde in 4 ml Kulturmedium M199 gelöst und die Zellsuspension vorsichtig in einem 15 ml Probenröhrchen auf 4 ml LSM geschichtet. Die Lösung wurde durch

Dichtegradientenzentrifugation bei RT bei 1000 rpm für 15 min ohne Bremsenwirkung aufgetrennt und die Trophoblastzellen in der transparenten Interphase angereichert. Die Zellen wurden in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und zum Waschen mit PBS auf 15 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 10 min bei RT wurde das entstandene Zellpellet in 10 ml M199 gelöst und jeweils 5 ml der Lösung in zwei Kollagen beschichtete Zellkulturflaschen (25 cm³) überführt. Die primären Trophoblastzellen wurden direkt nach der Isolation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt kultiviert. Das von den Zellen verbrauchte Medium wurde drei Mal wöchentlich durch frisches ersetzt. Nach Erreichen einer Zelldichte von 90 bis 100 % wurden die Zellen auf neue Kulturflaschen (75 cm³) verteilt. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit 10 ml bzw. 5 ml (75 bzw. 25 cm³ Kulturflasche) PBS gewaschen, um Mediumrückstände vollständig zu entfernen. Danach wurden die adhärennten Trophoblastzellen mit 10 ml bzw. 5 ml Trypsin/EDTA Lösung für 3 min inkubiert. Trypsin ist ein Enzym das extrazelluläre Proteine spaltet und so adhärennte Zellen vom Flaschenboden löst. Die Reaktion wurde mit 10 ml bzw. 5 ml M199 abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml bzw. 15 ml Probenröhrchen überführt und bei 1500 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml M199 gelöst und die Zellsuspension eins zu eins auf zwei neue Zellkulturflaschen (75 cm³) aufgeteilt. Die Kulturflaschen wurden mit weiteren 14 ml M199 aufgefüllt. Die Anzahl der Verteilungen der Zellen auf eine neue Flasche wurde in Passagen beschrieben, diese spiegelten somit das Alter der Zellen wieder.

11.2.2 Zytokeratinfärbung primärer Trophoblastzellen

Für die Färbung der Trophoblasten gegen Zytokeratin wurde das Medium aus den 25 cm³ Zellkulturflaschen abgenommen, in der die adhärennten Zellen bis zur vollständigen Konfluenz gewachsen waren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 5 ml eines kalten 1 zu 1 Aceton-Methanol Gemisches für 20 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen in jeweils 5 ml PBS erfolgte die Behandlung mit 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen durch die Inkubation der Zellen mit 1,5 % Pferdeserum in PBS für 20 min bei RT konnte der primäre Antikörper gegen Zytokeratin aus Maus (1 zu 100 Verdünnung in 5 % BSA in TBS) für 30 min auf die Zellen gegeben werden. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper (1 zu 300 Verdünnung in 5 % BSA in TBS) inkubiert. Dieser aus Ziege gegen Maus gerichtete Antikörper war biotinyliert und interagierte spezifisch mit dem primären Antikörper. Es folgten zwei Waschschr

te mit 5 ml PBS und anschließend die Inkubation mit dem ABC Reagenz. Dieses enthielt eine Peroxidase, die über Avidin an das Biotin des sekundären Antikörpers gebunden wurde. Die Zellen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und das AEC-Substrat für 7 min zugeführt. Dieses wird durch die Peroxidase umgesetzt, wodurch es zu einem rotbraunen Farbumschlag am Lokus des gesuchten Antigens kommt. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Gegenfärbung der Zellen mit Hämatoxylin.

11.2.3 Proteinisolation aus Zellen

Die bei -80 °C gelagerten primären Trophoblastzellen wurden auf Eis aufgetaut. Der Lysisbuffer dient der Aufspaltung der Zellmembranen und Freisetzung intrazellulärer Zellproteine. Das aufgetaute Zellpellet wurde mit 30 µl Lysispuffer resuspendiert und die Lösung 40 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend bei 12000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit den freien Proteinen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlösung wurde bis zur Quantifizierung 24 h bei -80 °C gelagert.

11.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch mittels des BioRad Protein Assays ermittelt. Hierfür wurden die Zellsuspensionen auf Eis aufgetaut und nach gründlicher Mischung 1 zu 10 mit dest. Wasser verdünnt. Eine aufsteigende Konzentrationsreihe der BSA-Lösung mit 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 mg/ml in dest. Wasser wurde als Standardreihe hergestellt. 10 µl der verdünnten Proteinlösung und BSA-Standardreihe wurden jeweils als Doppelbestimmung in die Kammern einer 96-Lochplatte pipettiert. Die in dest. Wasser 1 zu 5 verdünnte BioRad Lösung wurde durch eine 0,2 µm Zelluloseacetat Filtereinheit filtriert und 200 µl der Lösung auf die Proben gegeben. Anschließend wurde die Optische Dichte der Farbreaktion mit einem Mikrotiterplattenleser bei 562 nm gemessen. Aus den Werten der optischen Dichte der BSA-Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die Konzentration der Proteine nach folgender Gleichung bestimmt werden konnte.

$$\text{Proteinkonzentration der Probe [mg/ml]} = \frac{\text{optische Dichte der Probe (bei 562 nm)}}{\text{Anstieg der Eichgerade}}$$

11.2.4 Proteinauftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Gelelektrophorese)

Isolierte Proteine wurden mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die bei -80 °C gelagerten Zellsuspensionen wurden auf Eis aufgetaut. In Doppelbestimmungen wurden jeweils 10 µg Proteinlösung für HO-1 bzw. 30 µg Proteinlösung für Bag-1 mit fünf Anteilen Ladepuffer und dest. Wasser auf ein Endvolumen von 25 µl gebracht. Das Gemisch wurde für 5 min auf 99 °C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Proteinlösungen und 8 µl eines biotinylierten Markers zum Vergleich des Molekulargewichts wurden in die Taschen eines Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das 1 mm dicke Gel setzte sich aus einem oberen 5 % Sammelgel und einem unteren 10 % Trenngel zusammen. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 100 V, max. 50 mA und RT für ca. 4 h. Die Gele wurden anschließend mittels Western Blot weiterverarbeitet

11.2.5 Western Blot

Das Protein tragende Gel wurde luftblasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Diese wurde zuvor 30 sek lang mit Methanol und anschließend 2 min mit dest. Wasser behandelt. Ober und Unterhalb von Gel und Membran wurden des Weiteren jeweils 3 Lagen Filterpapier und ein Schwamm gelegt. Die durch Transferpuffer die ganze Zeit über befeuchteten Lagen wurden abschließend in eine Kompressionskassette gepresst. In einer mit Transferpuffer aufgefüllten Blotkammer erfolgte nun, mit entsprechender Laufrichtung von positiven zum negativen Pol, die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran bei 100 V und max. 350 mA für 2 h auf Eis für HO-1 bzw. über Nacht bei 30 V und max. 100 mA bei 4 °C für Bag-1.

11.2.5.1.1 Immundetektion von HO-1

Die gebloteten Membranen wurden über Nacht in einer 5 % Milchlösung bei 4 °C geschwenkt, um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren und eine spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen. Nach dreimaligen Waschen der Membran für 5 min in einem 0,05 % Tween® haltigem Waschpuffer wurde die Membran mit dem Primäantikörper gegen menschliche HO-1 (1 zu 500 in 5 % Milch-TBS-Lösung) und gegen menschliches GAPDH (1 zu 2000 in 5 % Milch-TBS-Lösung) als Haushaltsgen für 2 h bei RT unter schwenken inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem sekundärem biotinyliertem Antikörper aus Ziege gegen Hase (1 zu 1000 in 5 % Milch-TBS-Lösung) unter schwenken bei RT für 1 h. Durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für 5 min wurden

ungebundene Antikörper entfernt und die Membran anschließend für 30 min unter Schwenken mit der ABC-Lösung inkubiert. Diese enthielt die Peroxidase, die über Avidin an den biotinylierten sekundären Antikörper gebunden wurde. Die Membran wurde für zweimal 5 min in reinem TBS gewaschen und in dieser Zeit die Elektrochemilumineszenz-Lösung (ECL) angesetzt. Diese enthält Luminol als Substrat für die Peroxidase und bedingt das Signal in der enzymatischen Reaktion. Die Lösung ist sehr lichtempfindlich und wird auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit durch 1 zu 1 Vermischung aus den zwei Grundlösungen erst kurz vor dem Gebrauch angefertigt. Es wurden 2 ml der ECL auf die Nitrozellulosemembran gegeben und mit Hilfe der Chemolumineszenzapparatur 15 min lang alle 60 sek Aufnahmen der Membran und der sich entwickelnden fluoreszierenden Banden angefertigt.

11.2.5.1.2 Immundetektion von Bag-1

Die über Nacht gebloteten Membranen wurden für 2 h bei RT in 5 % Milch in TBS geblockt. Nach dem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper aus Kaninchen gegen menschliches Bag-1 (1 zu 250 in 5 % BSA in TBS mit 0,5 % Tween) über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen wurde der sekundäre mit Peroxidase gekoppelte Antikörper gegen Kaninchen (1 zu 1000 in 5 % Milch-TBS) für 2 h bei RT auf die Membran gegeben. Es erfolgte das Waschen der Membran und die anschließende Inkubation mit der ECL und Entwicklung der Membran in dem Chemilumineszenzapparat. Als Proteinprodukt des Haushaltsgenes wurde β -Aktin verwendet, welches unabhängig von Bag-1 visualisiert wurde. Die Membran musste hierfür mit dem Stripping-Puffer für 6 min inkubiert werden. Dieser Puffer löst die spezifischen Bindungen des primären Antikörpers am Zielprotein und ermöglicht die Wiederverwendung der Membran. Nach dreimaligem Waschen der gestrippten Membran in TBS für 5 min konnte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen β -Aktin aus Maus (1 zu 10000 in 5 % Milch-TBS) für 1 h bei RT erfolgen. Die Membran wurde anschließend gewaschen und mit dem sekundären Ziege gegen Maus Antikörper (1 zu 1000 in 5 % Milch-TBS) für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Entwicklung und Auswertung erfolgte wie zuvor für HO-1 und Bag-1 beschrieben.

11.2.6 Lymphozytenisolierung aus Milz und Lymphknoten

Die in 1 ml RPMI-Medium auf Eis gelagerten Mausorgane wurden zusammen mit weiteren 4 ml RPMI mittels eines Spritzenstempels durch ein 100 μ m Zellsieb gerieben. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in einer 6-Lochplatte aufgefangen und in ein 50 ml Probenröhr-

chen überführt. Die Suspension wurde anschließend mit Lysispuffer auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min bei 4 °C konnten lysierte Erythrozyten im Überstand vom Zellpellet getrennt werden. Das vorwiegend Lymphozyten enthaltende Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-Kulturmedium resuspendiert und die Lösung erneut bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Lymphozyten bis zur weiteren Verarbeitung in 1 ml RPMI in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert.

11.2.7 Lymphozytenisolierung aus der Dezidua

Das zerkleinerte Deziduagewebe wurde mit HBSS/DDT (0,014 g/l DDT) auf 50 ml aufgefüllt und bei 20°C im Wasserbad für 20 min geschwenkt. Zusätzlich wurde das Probenröhrchen nach 10 min kurz geschüttelt. Die Behandlung mit DDT bewirkt die Auflockerung des Gewebes und somit die Freisetzung von Lymphozyten. Der Überstand der Lösung wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette durch ein 100 µm Zellnetz in ein weiteres 50 ml Probenröhrchen gefiltert und bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das durch Absaugen des Überstandes gewonnene Zellpellet wurde auf Eis gelagert. Die übrigen Gewebereste im ersten Probengefäß wurden erneut mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und wieder ins Wasserbad verbracht. Die Prozedur wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Das so nach dem dritten Zentrifugationsschritt erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml RPMI gelöst und in einem 15 ml Probengefäß auf 3 ml Ficolite M® geschichtet. Durch Dichtegradientenzentrifugation bei 2400 rpm bei 4°C für 20 min ohne Bremseinwirkung konnten die Lymphozyten von anderen Zellen der Suspension getrennt und in der Interphase angereichert werden. Die Lymphozytensuspension wurde mittels einer Pasteurpipette in ein weiteres 15 ml Probengefäß überführt und mit 8 ml RPMI gewaschen. Das nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm bei 4 °C und Verwerfen des Überstandes erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml RPMI-Kulturmedium gelöst und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis belassen.

11.2.8 Extrazelluläre Färbung von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Dezidua

Die pro Organ isolierten Lymphozyten wurden auf jeweils zwei Rundbodenröhrchen verteilt. Nach dem Waschen in 1 ml FACS-Puffer und zentrifugieren bei 1200 rpm bei 4 °C für 10 min wurde der Überstand abgesaugt und es erfolgte die Färbung. Die spezifischen mit unterschiedlichen Fluorochromen markierten Antikörper (Tabelle 5) wurden 1 zu 100 in FACS-Puffer verdünnt und jeweils 100 µl der Lösung bzw. für die negativ Kontrolle 100 µl FACS-Puffer

auf die Zellsuspension gegeben. Zur optimalen Bindung der Antikörper folgte ein Inkubationsschritt von 30 min bei 4 °C in Dunkelheit. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer, Zentrifugation bei 1200 rpm bei 4 °C für 10 min und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer aufgefüllt. Es folgte die Messung am Durchflusszytometer, wobei eine gefärbte Probe immer gegen die entsprechende ungefärbte Probe als Kontrolle gemessen wurde.

Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome mit Extinktions- (Ex) und Emmissionsmaxima (Em), sowie den konjugierten Antikörpern.

(Quelle: http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_Fluorochrome_Specs.pdf)

Farbstoff	Ex max (nm)	Em max (nm)	konjugierter Antikörper (gegen Maus)
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	494	519	Anti-CD4
Phycoerythrin (PE)	496, 564	578	Anti-I-A/I-E (MHC II)
Phytoerytrincyanin(PE-Cy TM 7)	496, 564	785	Anti-CD8
Allophycocyanin (APC)	650	660	Anti-CD11c

11.2.9 Zytokinbestimmung in Zellkulturüberständen

Um die Konzentration der Zytokine bestimmen zu können, wurde eine Standardreihe als Referenz verwendet. Hierfür wurde das Standardkonzentrat in einem 15 ml Reaktionsgefäß in 2 ml Verdünnungslösung aufgelöst. Die Lösung wurde 15 min bei RT inkubiert und dann 1 zu 1 in 300 µl Verdünnungslösung zu folgenden Konzentrationen verdünnt: 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 80, 40, 20 und 10 pg/ml. Als Negativkontrolle wurde die reine Verdünnungslösung verwendet. Die einzelnen Lösungen der *capture beads* wurden jeweils 10 µl pro Probe in einem 15 ml Reaktionsgefäß gemischt. Die Proben wurden währenddessen auf Eis aufgetaut. Zur Messung wurden jeweils 50 µl der *capture beads*, 50 µl der Probe bzw. des Standards und 50 µl der PE-Detektionslösung in ein Rundröhrchen pipettiert. Die Detektionslösung enthielt die PE gebundenen Antikörper, die spezifisch an das bereits am *capture bead* gebundene Antigen gebunden haben. Der Ansatz wurde 3 h in Dunkelheit bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, bei dem 1 ml Waschpuffer auf Proben und Standard pipettiert wurde. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm, 4 °C für 5 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und auf die verbleibende Probe 300 µl Waschpuffer gegeben. Die Proben wurden nach kurzem vortexen am Durchflusszytometer FACS-Calibur gemessen.

11.2.10 RNA Isolation aus Gewebe

Aus der Milz und der Plazenta der Mäuse wurde RNA isoliert. Zu den schockgefrorenen Organen wurde 600 µl kaltes Trizol® in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und das Gewebe mit dem Homogenisator zerkleinert. Diesem Gemisch wurden 200 µl Chloroform zugeführt und die Reaktionsgefäße für eine gute Durchmischung einige Male invertiert. Es folgte die Zentrifugation bei 12200 rpm bei 4 °C für 15 min. Durch das Chloroform bilden sich 3 Phasen aus, die untere Phase enthält DNA und Protein, darauf folgt eine Interphase und in der oberen klaren Schicht die RNA. Diese wurde vorsichtig abgenommen, in ein 1,5 ml RNase freies Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge Isopropanol zur Fällung der RNA aufgefüllt. Die RNA wurde über Nacht bei -80 °C eingefroren, um ihre vollständige Präzipitation zu erreichen. Am folgenden Tag wurden die noch gefrorenen Proben direkt bei 12200 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte das zweimalige Waschen des RNA Pellets mit kaltem, 80 % Ethanol und anschließendem Zentrifugationsschritt bei 9500 rpm bei 4 °C für 5 min. Die Pellets wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend in 11 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

11.2.10.1 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Hierfür wurde eine 1 zu 200 Verdünnung der RNA in RNase freiem Wasser angefertigt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (RNA- und DNA-Absorptionsmaximum) und 280 nm (Proteinanteil) bestimmt. Der Quotient der beiden Werte spiegelt die Reinheit der RNA wieder und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ausgehend von der Annahme, dass eine Extinktion von 1 bei 260 nm 40 µg/ml RNA entsprechen, wurde die Konzentration der RNA bestimmt.

11.2.11 cDNA Synthese aus mRNA mittels reverser Transkription

Aus der aus Mausorganen gewonnenen RNA wurde cDNA synthetisiert. Die RNA Proben wurden auf Eis aufgetaut und 2 µg RNA in ein 200 µl RNase freies Reaktionsgefäß überführt und mit RNase freiem Wasser auf 18 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 2 µl Primern, kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte die Inkubation der Lösung bei 75°C für 10 min im Thermocycler. Die Anlagerung des Primers an das poly-A-Ende der mRNA wurde so ermöglicht. Die Proben wurden 10 min auf Eis gelagert und anschließend jeweils mit einem Mix aus 8 µl Reverse-Transkriptase Puffer, 4 µl RNase freiem Wasser, 4 µl 2,5 mM dNTPs (Phosphor-

Desoxyribonukleotide), 2 µl DNase und 0,5 µl RNase Inhibitor pro Ansatz versehen. In den folgenden Inkubationsschritten bei 37 °C für 30 min und 75 °C für 5 min erfolgten der Abbau der eventuell vorhandenen DNA mittels der DNase und deren Denaturierung. Die Proben wurden nun für 10 min auf Eis gekühlt und es wurden jeweils 1 µl reverse Transkriptase und 1 µl RNase Inhibitor zugegeben. Die reverse Transkription fand anschließend bei 42 °C für 60 min statt. Die abschließende Erwärmung der Proben auf 94 °C für 5 min hatte die Denaturierung und Inaktivierung aller vorhandenen Enzyme in den Ansätzen zum Ziel. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

11.2.12 Real-Time PCR mit TaqMan

Mit Hilfe der TaqMan Methode wurden über den cDNA Syntheseschritt die Mengen der mRNA von HO-1, IL-4, IL-10, TNF- α und Bag-1 in der Mausplazenta und der Milz quantifiziert. Hierzu wurden zu 1 µl der zu untersuchenden cDNA jeweils 6,25 µl des TaqMan Reagenz, 3 µl des entsprechenden Primer Mix, 0,5 µl der Sonde und 2,25 µl Wasser gegeben. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz aller Reagenzien mit Wasser an Stelle von cDNA. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung und in jeder Probe wurde zusätzlich zur Ziel-DNA β -Aktin als Referenz-DNA bestimmt.

11.2.13 Real-Time PCR mit SYBR®-Green

Mit dem Prinzip nach SYBR®-Green wurde die Expression von IL-6 in der Mausplazenta bestimmt. Hierfür wurden zu 1 µl der zu untersuchenden cDNA, 6,25 µl SYBR®-Green Mastermix, 3 µl Primermix, 0,5 µl Fluoreszin und 3,25 µl Wasser gegeben. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz aller Reagenzien mit 1 µl Wasser an Stelle der cDNA. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung gemessen und zusätzlich β -Aktin als Referenz DNA bestimmt.

11.2.14 Auswertung der Real-Time PCR

Für die Auswertung der Real-Time PCR wird der C_T -Wert (*Threshold-Cycle*) herangezogen. Zusätzlich zur Ziel-DNA wurde eine Referenz-DNA mitbestimmt, in diesem Fall β -Aktin. Es handelt sich dabei um ein konstitutiv exprimiertes Genprodukt, das in jeder Probe in ähnlicher Konzentration vorliegen sollte und auch als Haushaltsgen (*housekeeping gen*) bezeichnet wird. Mit Hilfe der beiden C_T -Werte kann die relative Menge der Ziel-DNA zur DNA des Haushaltsgenes bestimmt werden. Folgende Berechnung wird dazu herangezogen.

$$\Delta CT = \frac{(C_{T1}-C_{T2})_{Ziel-Gen}}{2} - \frac{(C_{T1}-C_{T2})_{Haushaltsgen}}{2}$$

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

11.3 Zytokinkonzentrationen in Überständen primärer Trophoblasten nach LPS Stimulation

Tabelle 6: Trophoblasten von Abbrüchen und Aborten produzieren die gleichen Mengen IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ . Humane Erst-Trimester Trophoblasten in Kultur wurden für unterschiedliche Zeitdauern (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h) mit LPS Stimuliert. Die Überstände wurden konzentriert und mittels des BD Cytometric Beat Array® auf den Gehalt von Zytokinen untersucht. Dargestellt sind die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ in den Überständen von Trophoblastzellen aus Gewebe von Abbrüchen und spontanen Aborten. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Gruppen oder zwischen Kontrolle und LPS Behandlung. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung ($M \pm SD$) und zugehöriger Gruppengröße (n) abgebildet. Der Vergleich der Gruppen gegen Behandlung und Zeit wurde mit dem Two-Way ANOVA Test durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

IL-2	Abbruch				Abort			
	Zeit (h)	Kontrolle (M \pm SD)	n	LPS (M \pm SD)	n	Kontrolle (M \pm SD)	n	LPS (M \pm SD)
0	1,57 \pm 1,90	6	1,62 \pm 1,66	7	1,11 \pm 1,09	5	0,96 \pm 0,76	6
2	1,66 \pm 1,76	6	1,80 \pm 1,82	6	0,93 \pm 0,97	7	1,22 \pm 0,96	7
4	1,61 \pm 1,94	6	1,00 \pm 0,56	5	0,67 \pm 1,09	6	1,01 \pm 1,06	7
8	1,64 \pm 1,95	6	1,76 \pm 2,06	5	0,79 \pm 1,08	7	1,02 \pm 1,10	7
12	1,73 \pm 1,55	7	1,43 \pm 1,54	7	0,98 \pm 1,17	6	1,28 \pm 1,12	7
24	1,54 \pm 1,76	6	1,62 \pm 1,87	6	1,24 \pm 1,05	7	0,67 \pm 1,49	6
48	1,61 \pm 1,67	6	2,04 \pm 1,89	5	1,35 \pm 1,07	7	1,06 \pm 1,33	5

IL-4	Abbruch				Abort			
	Zeit (h)	Kontrolle (M \pm SD)	n	LPS (M \pm SD)	n	Kontrolle (M \pm SD)	n	LPS (M \pm SD)
0	4,19 \pm 5,89	7	3,83 \pm 6,14	7	1,71 \pm 1,53	6	1,47 \pm 1,37	6
2	4,63 \pm 5,92	6	4,05 \pm 5,29	7	1,90 \pm 1,36	7	1,93 \pm 1,36	7
4	3,92 \pm 5,77	7	1,58 \pm 1,65	5	1,94 \pm 1,62	7	1,78 \pm 1,76	7
8	3,56 \pm 5,30	7	4,67 \pm 5,89	6	1,83 \pm 1,49	7	2,46 \pm 1,28	7
12	3,99 \pm 5,61	7	4,09 \pm 5,38	7	2,41 \pm 1,56	7	2,02 \pm 1,85	7
24	4,09 \pm 5,45	7	4,45 \pm 5,54	7	1,94 \pm 1,44	7	2,35 \pm 1,30	7
48	4,44 \pm 6,05	6	4,75 \pm 5,83	6	2,64 \pm 1,08	7	2,15 \pm 1,79	7

Fortsetzung Tabelle 6

IL-10	Abbruch				Abort			
	Kontrolle (M ±SD)	n	LPS (M ±SD)	n	Kontrolle (M ±SD)	n	LPS (M ±SD)	n
0	6,02 ±8,26	6	5,12 ±7,90	7	1,53 ±1,80	6	2,10 ±1,02	6
2	6,05 ±8,22	6	5,77 ±7,49	7	1,97 ±1,57	7	2,10 ±1,67	7
4	4,76 ±6,84	7	5,01 ±6,70	7	2,19 ±1,39	7	2,24 ±1,43	7
8	5,17 ±7,29	7	5,52 ±7,17	7	2,75 ±2,52	7	2,66 ±2,39	7
12	5,50 ±7,28	7	5,37 ±7,30	7	5,15 ±6,94	7	3,09 ±1,87	7
24	5,94 ±7,22	7	6,18 ±7,25	7	5,87 ±9,79	7	6,00 ±6,55	7
48	5,42 ±7,67	7	10,41 ±11,43	6	5,07 ±5,32	7	8,19 ±11,29	7

IFN- γ	Abbruch				Abort			
	Kontrolle (M ±SD)	n	LPS (M ±SD)	n	Kontrolle (M ±SD)	n	LPS (M ±SD)	n
0	2,94 ±1,54	7	2,91 ±2,12	6	1,75 ±1,81	6	1,62 ±0,82	6
2	2,48 ±2,05	6	2,88 ±1,66	6	2,58 ±1,85	7	2,22 ±1,36	7
4	2,47 ±1,78	6	2,62 ±1,32	7	2,62 ±1,24	7	2,57 ±1,52	7
8	2,52 ±1,32	7	2,74 ±1,35	7	2,43 ±1,71	7	2,35 ±1,63	7
12	3,01 ±1,85	7	2,97 ±1,69	7	2,86 ±1,50	6	2,54 ±1,38	7
24	3,21 ±1,47	6	3,03 ±1,34	7	2,43 ±1,76	7	2,83 ±1,51	7
48	2,62 ±1,93	7	3,02 ±1,44	6	2,98 ±1,36	7	2,06 ±1,82	7

11.4 Bag-1 Expression in Plazenten von *Hmox1*^{-/-} Mäusen

Tabelle 7: Bag-1 Expression in der Plazenta von trächtigen *Hmox1*^{-/-} Mäusen. Plazenten von *Hmox1*^{-/-} Weibchen wurden am 9. Schwangerschaftstag mittels Real-Time PCR auf ihre relative Expression von Bag-1 untersucht. Die Tiere erhielten am 7. Schwangerschaftstag eine 0,1 μ g LPS oder PBS i.p. Injektion. Für jedes Tier sind die Rohdaten dargestellt. Eine statistische Auswertung war auf Grund der zu geringen Gruppenstärke nicht möglich.

	i.p. Injektion	Bag-1 relative Expression ($2^{-\Delta CT}$) in der Plazenta		
<i>Hmox1</i> ^{-/-}	PBS	0,4	0,86	0,36
	LPS	0,62		