

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. J. Dietl**

**Der Einfluss von HLA-G und HLA-E auf Large Granular Lymphocytes**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christine Probe  
aus Würzburg**

**Würzburg, März 2004**

**Referentin: Frau Priv. Doz. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer**

**Koreferentin: Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs**

**Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2004**

**Die Promovendin ist Ärztin**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Schwangerschaft als immunologisches Paradox	1
1.2 Die fetale Seite	2
1.2.1 Entwicklung der Blastozyste	2
1.2.2 Implantation	3
1.2.3 Plazenta-Entwicklung	6
1.2.4 Die reife Plazenta	9
1.3 Die maternale Seite: die Zellen der feto-maternalen Grenzzone	10
1.4 HLA-System	13
1.5 HLA-G	15
1.6 Interaktion zwischen LGL's und Trophoblastzellen	16
1.7 Zytokine	17
1.8 Unterschied zwischen Th1- und Th2-Zytokinen	17
1.9 Die untersuchten Zytokine	19
1.9.1 Interleukin 5 (IL-5)	19
1.9.2 Interleukin 10 (IL-10)	19
1.9.3 Interleukin 13 (IL-13)	19
1.9.4 Interleukin 15 (IL-15)	19
1.9.5 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)	20
1.9.6 Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	20
1.9.7 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	21
1.10 Modellsystem	23
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Deziduagewebeproben	25
2.2 Extraktion von Zellen aus Dezidua	25
2.3 Zellisolation von LGL und WASH	28
2.4 Kokulturrexperimente	29
2.5 ELISA (am Beispiel von TNF- $\alpha$ )	33

2.5.1	Vorbereitung	33
2.5.2	Beschichten der Platte	34
2.5.3	Blocken der Platte	34
2.5.4	Vorbereitung der Standards und der Proben	34
2.5.5	Inkubation der Standards und Proben	35
2.5.6	Inkubation des Detektionsantikörpers/HRP-Enzym	35
2.5.7	Inkubation der Substratlösung und Abstoppen der Reaktion	35
2.5.8	Ablezen der Platte	36
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Large Granular Lymphocytes (LGL)	37
3.1.1	Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	37
3.1.2	Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	39
3.1.3	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)	41
3.1.4	Interleukin 10 (IL-10)	43
3.1.5	Interleukin 13 (IL-13)	45
3.1.6	Interleukin 15 (IL-15)	47
3.1.7	Interleukin 5 (IL-5)	49
3.2	WASH	50
3.2.1	Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	50
3.2.2	Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	52
3.2.3	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)	53
3.2.4	Interleukin 10 (IL-10)	55
3.2.5	Interleukin 13 (IL-13)	57
3.2.6	Interleukin 15 (IL-15)	59
3.2.7	Interleukin 5 (IL-5)	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Feststellung zu den einzelnen Zytokinen	65
4.1.1	Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	65
4.1.2	Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	66
4.1.3	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)	67

4.1.4 Interleukin 10 (IL-10)	69
4.1.5 Interleukin 13 (IL-13)	70
4.1.6 Interleukin 15 (IL-15)	70
4.2 Ausblick	71
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>6. Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>74</b>
<b>7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>77</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	

## 1. Einleitung

### 1.1 Schwangerschaft als immunologisches Paradox

Bei der Ausbildung einer regelhaften Schwangerschaft kommt es im Rahmen der Plazentation zu einer ausgedehnten Infiltration der maternalen Uterusschleimhaut (dezidualisiertes Endometrium = Dezidua) und des angrenzenden Myometriums durch Cytotrophoblastzellen (CTB) embryonaler Herkunft. Dieser Vorgang weist Parallelen zu dem invasiven Verhalten maligner Tumoren auf. Allerdings unterliegt die Infiltration maternalen Gewebes durch CTB im Normalfall räumlichen und zeitlichen Begrenzungen. Die CTB sind durch die potentielle Expression von paternalen Antigenen für den mütterlichen Organismus als fremd (allogen) zu werten. In der Dezidua treffen die CTB jetzt unmittelbar auf Zellpopulationen maternaler Herkunft<sup>1</sup>. Betrachtet man den Fetus aufgrund seiner väterlichen Anteile als ein „Allotransplantat“ im Uterus, ergibt sich die zentrale Fragestellung der Schwangerschaftsimmunologie: warum in den meisten Fällen einer Schwangerschaft keine Abstoßungsreaktion von Seiten des mütterlichen Immunsystems stattfindet. Die Schwangerschaft scheint eine immunologische Ausnahmesituation darzustellen, in der spezielle Mechanismen zur Toleranzentwicklung führen.

Für eine allgemeine Toleranzentwicklung gegenüber allogenen Geweben kommen nach derzeitigem Wissensstand drei Möglichkeiten in Betracht:

Zum einen könnte die komplette Immunantwort der Mutter stark unterdrückt werden („generelle Immunsuppression“). Da die Folge hiervon jedoch eine erhöhte Anfälligkeit von Mutter und Feten gegenüber schweren Infektionen wäre, Schwangere aber im allgemeinen kein auffällig erhöhtes Infektionsrisiko haben<sup>2</sup>, erscheint dieser Mechanismus unwahrscheinlich.

Zum zweiten könnte das fremde Gewebe seine Antigene zurückhalten oder stark modifizieren um nicht vom „Wirts-“immunsystem erkannt zu werden. Dies würde im Fall

der Plazenta bedeuten, dass die fetalen Zellen keine MHC-Antigene exprimieren. Da die CTB aber MHC-Antigene exprimieren, allerdings nur HLA-C<sup>3</sup> und nicht HLA-A und HLA-B, müsste eine MHC-Erkennung stattfinden. Aus diesem Grund kann man also nicht von einer fehlenden Antigenerkennung sprechen und daher scheidet diese Hypothese aus. Zusätzlich wird diese Überlegung durch die Erkenntnis widerlegt, dass maternale immunkompetente Zellen mit Cytotrophoblastzellen embryonaler Herkunft interagieren. Dabei scheinen die maternalen Zellen auf die Major-Histocompatibility-Complex (MHC)-Klasse-I-Antigene der embryonalen Zellen zu reagieren.

Als dritte Möglichkeit käme in Betracht, dass seitens der Plazenta eine Schranke gebildet wird (Plazentaschranke), die fetale und mütterliche Zellen voneinander trennt. Hiergegen spricht allerdings die Beobachtung, dass fetale Zellen auch im Kreislaufsystem der Mutter nachgewiesen werden können und dass während der Implantation und in der frühen Schwangerschaft ein sehr enger Kontakt zwischen invasiven fetalen CTB und den mütterlichen Immunzellen der Dezidua zu beobachten ist <sup>4</sup>.

Nachdem alle drei Hypothesen der klassischen Immunologie zur Akzeptanz des Feten als „Allotransplantat“ ausscheiden, bleibt die Frage nach der Besonderheit der Immuntoleranz in der Schwangerschaft. Diese lässt sich sowohl auf der fetalen als auch auf der maternalen Seite vermuten.

## **1.2 Die fetale Seite:**

### **1.2.1 Entwicklung der Blastozyste**

Nach dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle (Imprägnation), teilt sich die befruchtete Eizelle mehrfach (Furchungen). Es entsteht ein Zellhaufen (Morula), der von einer Zona pelluzida umgeben ist. Die Ernährung des Keimes erfolgt durch Aufnahme von Flüssigkeit und Nährstoffen aus dem Tubensekret. Gleichzeitig mit dem Wachstum des Keimes ordnen und differenzieren sich die Furchungszellen.

Die außen unter der Zona pelluzida gelegenen Zellen werden zum Trophoblasten, die innen gelegenen Zellen entwickeln sich zum Embryoblasten. Vereinfacht kann man sagen, dass sich aus dem Trophoblasten hauptsächlich Plazenta und Eihäute entwickeln, während aus dem Embryoblasten im wesentlichen Fetus und Nabelschnur, aber auch das Amnion als innere der Eihäute hervorgehen. Die bisher beschriebenen Vorgänge finden alle noch im Bereich der Tuba uterina statt.

Sobald der Keim die Uterushöhle erreicht hat, löst sich die Zona pelluzida allmählich auf. Dadurch wird die Ausdehnung der Morula ermöglicht und es bildet sich eine flüssigkeitsgefüllte Höhle indem die erweiterten Interzellularräume des Keimes konfluieren. Aus der Morula ist eine Blastozyste geworden, die am 5. Tag nach der Befruchtung ca. 0,1x0,3x0,3mm groß ist und aus 107 bis 256 Zellen besteht.

### **1.2.2 Implantation**

Die Einnistung der Blastozyste in die Uterusschleimhaut (Implantation) erfolgt ungefähr am 6. Tag nach der Befruchtung. Das Endometrium befindet sich in diesem Zeitraum auf dem Höhepunkt der Sekretionsphase. In dieser Zeit scheint das Erkennungsvermögen des Endometriums für fremdes Gewebe herabgesetzt.

Implantationsort ist am häufigsten der obere Teil der Korpshinterwand. Abweichungen vom üblichen Implantationsort und von der üblichen Orientierung der Blastozyste können placentare Fehlbildungen verursachen wie z. B.:

- Placenta biloba (zweilappige Plazenta)
- Placenta anularis (ringförmige Plazenta)
- Placenta praevia (Plazenta liegt über dem inneren Muttermund)
- Placenta velamentosa (Ansatz der Nabelschnur an den Eihäuten anstatt der Plazenta).



Einnistungsorte der Blastozyste sind auch außerhalb der Uterushöhle möglich wie z. B. Tuba uterina (Eileiterschwangerschaft) und Peritoneum (Bauchhöhlenschwangerschaft). Ursache hierfür ist meist ein gestörter Eitransport durch die Tuben.

An der Stelle der Implantation nimmt die Blastozyste Kontakt mit dem dezidualisierten Endometrium auf. Dabei verschmelzen Trophoblastzellen unter Verlust ihrer Zellgrenzen und bilden einen zellreichen Synzytiotrophoblasten. Die verbleibenden nichtverschmelzenden Trophoblastzellen werden als Cytotrophoblast bezeichnet. Der Synzytiotrophoblast dringt in das Endometrium ein und beginnt, Endometrium und subendotheliales Stroma proteolytisch aufzulösen. Dabei werden mütterlich Spiralarterien eröffnet und durch Trophoblastzellen ersetzt. Der Keim vergrößert sich dabei ständig und verlagert sich in die Uterusschleimhaut.

Am 11. Tag nach der Befruchtung ist der Keim vollständig eingedrungen und die Implantation abgeschlossen. Der Epitheldefekt wird vorübergehend durch ein Verschlusskoagulum bedeckt und später durch Epithelproliferation verschlossen.

Eine zu geringe Invasion ist möglicherweise mitbeteiligt an Gestosen und Aborten. Wächst der Trophoblast dagegen zu tief ein, kann es zur Plazenta accreta bzw. percreta kommen.

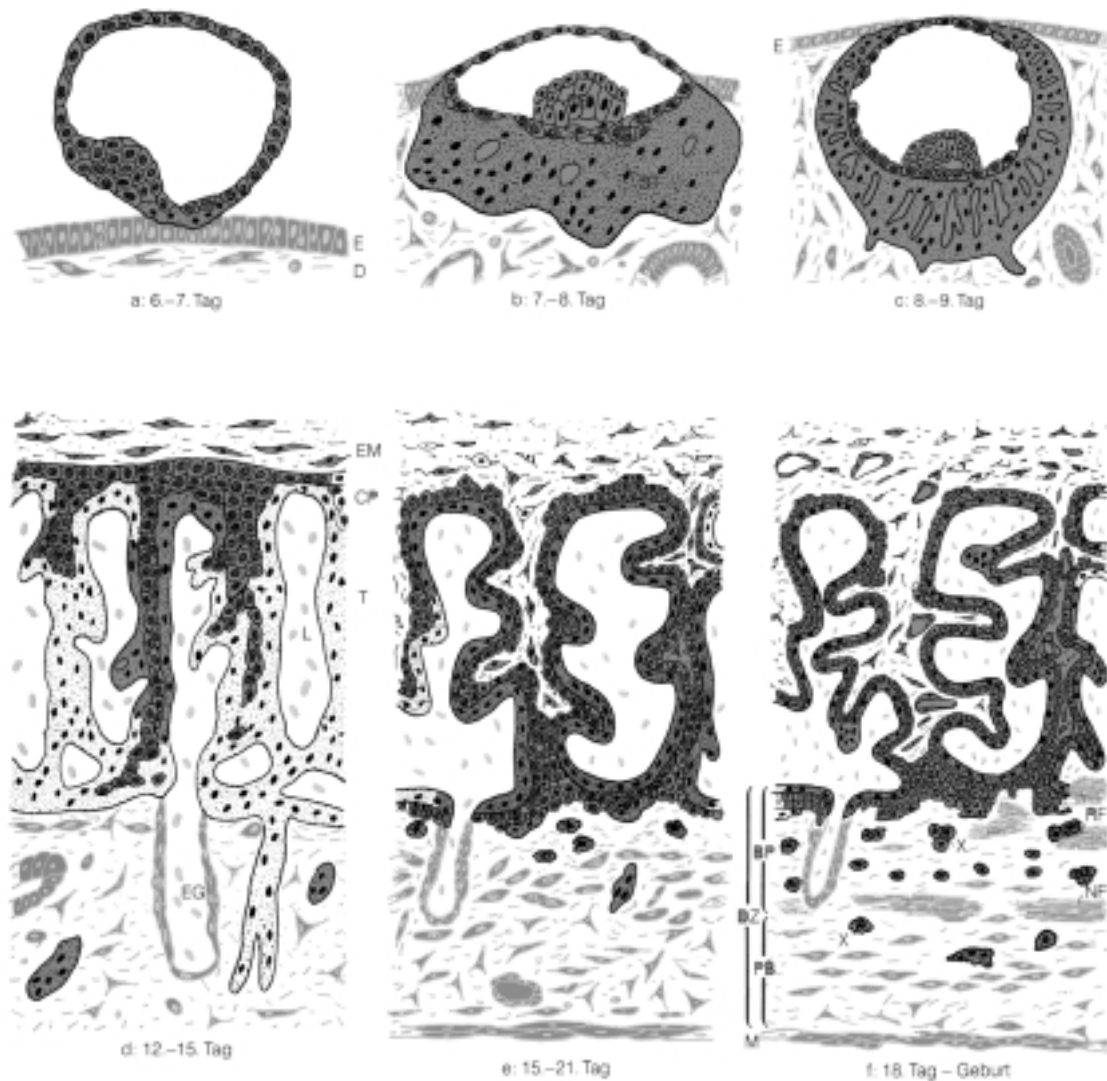


Abb. 1 bis 6: verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung.

Mütterliche Gewebe: hell, fetale Gewebe: dunkel.

(aus: **Benninghoff: Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, modifiziert nach Kaufmann und Scheffen, 15. Auflage, 2004 © Elsevier GmbH, Urban und Fischer, München**)

**E=Uterusepithel, D=Dezidua, EB=Embryoblast, ZT=Zytotrophoblast, ST=Synzytiotrophoblast, EM=extraembryonales Mesoderm, CP=Chorionplatte, T=Trabekel und Primärzotten, L=mütterliche Blutlakunen, EG=endometriale Gefäße, RF=Rohrsches Fibrinoid, NF=Nitabuchses Fibrinoid, BP=Basalplatte, PB=Plazentabett, DZ=Durchdringungszone, M=Myometrium, X=invasive Trophoblastzellen**

### 1.2.3 Plazenta-Entwicklung

Für den Bau und die Funktion der Plazenta sind vor allem das Endometrium, das zur Dezidua wird, und der Trophoblast wichtig. Im Endometrium beginnen die Stromazellen Fett und Glykogen einzulagern und sich dadurch stark zu vergrößern. Diese Stromazellen werden zu Deziduazellen, die sich während der gesamten Schwangerschaft nachweisen lassen. Durch Vermischung von Trophoblast und Dezidua im feto-maternalen Grenzbereich entsteht eine Durchdringungszone. Das Endometrium während der Schwangerschaft wird als Dezidua graviditatis bezeichnet. Die Dezidua gliedert sich in:

- Dezidua basalis (im Bereich des Implantationspol des Keimes)
- Dezidua capsularis (am anderen Pol des Keimes)
- Dezidua parietalis (kleidet den übrigen Teil des Uterus aus).

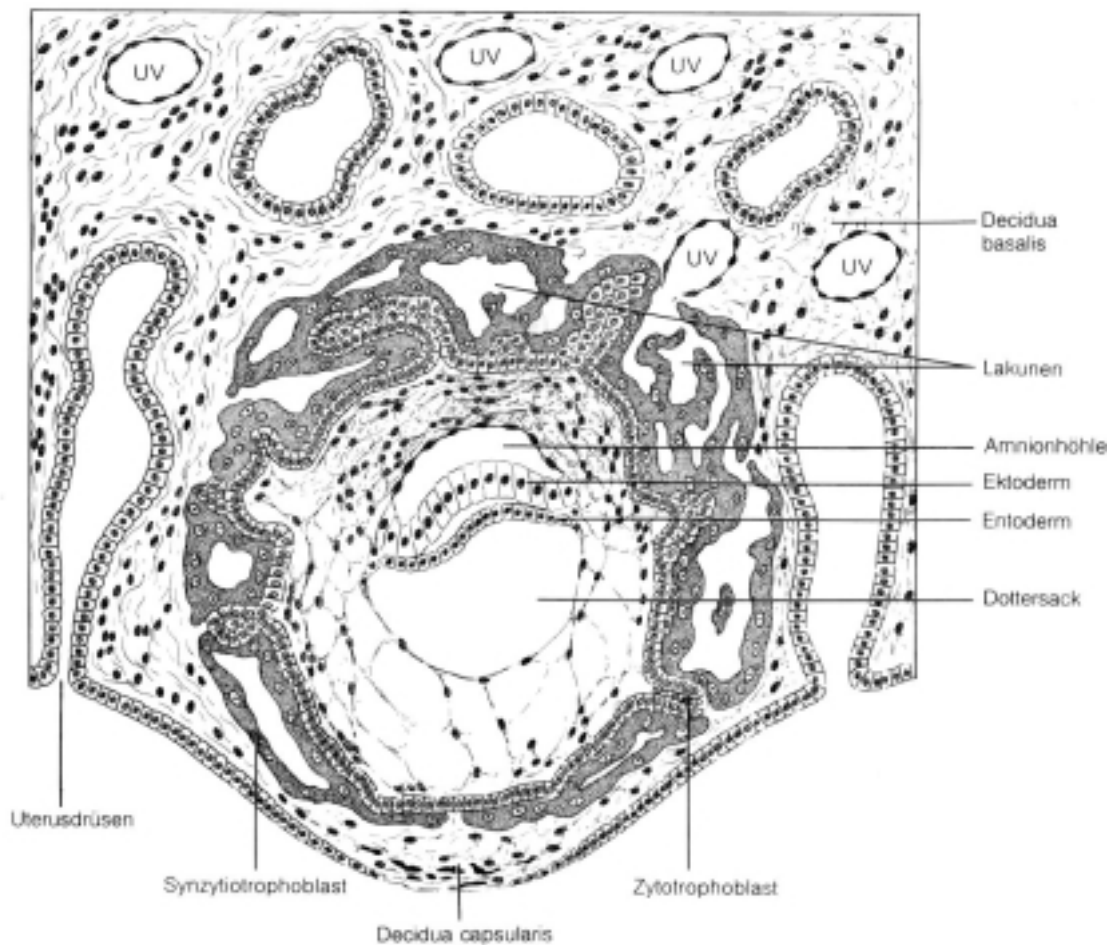


Abb. 7: Menschlicher Keim nach vollendeter Implantation, 12. Tag nach Befruchtung. Die Lakunen sind vom Synzytiotrophoblast umgeben.

(aus Schiebler, T.H. (1996) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. 4. Auflage, 2004 © Springer-Verlag.)

Der ehemalige Implantationspol bildet später die Plazenta. An diesem Implantationspol ist der Trophoblast deutlich dicker als an später implantierten Abschnitten. Diese Abschnitte werden im Laufe der Entwicklung zur sog. Eihaut zurückgebildet. Durch Umwandlung der Trophoblastzellen im Bereich des Implantationspols entstehen folgende Veränderungen:

- Lakunen (Vorläufer des intervillösen Raumes)
- Chorionplatte
- Chorionzotten
- Basalplatte.

Die Lakunen sind bereits am 11. Tag nach der Befruchtung auf der gesamten Oberfläche des Keimes voll ausgebildet. Zwischen den Lakunen befinden sich sog. Trabekel aus Synzytiotrophoblast. Durch fortschreitendes Eindringen des Synzytiotrophoblasten werden mütterliche Gefäße eröffnet und durch Trophoblastzellen ersetzt. Dies führt zu Blutungen aus mütterlichen Gefäßen in die Lakunen. Von jetzt an wird der Keim durch mütterliches Blut ernährt (hämatotrophe Ernährung).

Die primäre Chorionplatte ist eine massive Schicht aus Synzytiotrophoblast und Cytotrophoblast. Sie entsteht zwischen Trabekelwerk und Cytotrophoblast. Ab dem 12. Tag nach der Befruchtung entwickelt sich in der primären Chorionplatte ein bindegewebiger Anteil und es entsteht die sekundäre Chorionplatte. Dies ist die endgültige Chorionplatte.

Die Chorionzotten sind Abkömmlinge der Chorionplatte und differenzieren sich aus dem Trabekelwerk. Es werden Primärzotten (13. bis 14. Tag nach der Befruchtung), Sekundärzotten (15. bis 21. Tag nach der Befruchtung) und Tertiärzotten (ab 19. Tag nach der Befruchtung) unterschieden. Die Tertiärzotten enthalten im Vergleich zu den Primär- und Sekundärzotten Gefäße. Das Tertiärzottenstadium besteht bis zum Ende der Schwangerschaft, allerdings reifen die Zotten bis zum Geburtstermin noch erheblich.

Ca. am 13. Tag nach der Befruchtung geht ein großer Teil des Synzytiotrophoblasten zugrunde und der Zytotrophoblast kommt in direkten Kontakt mit mütterlichem Gewebe. Dabei vermischen sich kindliches und mütterliches Gewebe. Etwa am 22. Tag nach der Befruchtung ist die Durchdringungszone stark verzahnt und es ist eine Basalplatte entstanden. Sie bildet den Boden des intervillösen Raumes.

### 1.2.4 Die reife Plazenta

Die reife Plazenta ist scheibenförmig, annähernd rund und misst ca. 20cm Durchmesser. Sie ist ca. 3cm dick und wiegt zwischen 350 und 750g. Die Plazenta gliedert sich in:

- Chorionplatte
- Zottenbäume (Kotyledonen, dazwischen intervillöse Räume)
- Basalplatte
- Sonderstrukturen: Inseln, Zellsäulen, Septa placentae

Die Chorionplatte wird an ihrer Oberfläche von einschichtigem Amnionepithel bedeckt. Subamnial folgen mehrere Bindegewebsschichten. An der Chorionplatte inseriert die Nabelschnur mit zwei Aa. umbilicales und einer V. umbilicalis. Die Gefäße verlaufen am Übergang zur Chorionplatte sternförmig auf der mütterlichen Seite der Plazenta und biegen in die an der Unterseite der Chorionplatte verankerten Zottenbäume um.

Die reife menschlich Plazenta besitzt ca. 200 Zottenbäume, von denen 50 bis 60 voll entfaltet sind. Die Zottenbäume und die Chorionplatte sind miteinander verbunden. Jeder Zottenbaum besteht aus Stammzotten (Trunci chorii, Rami chorii und Ramuli chorii) und Endverzweigungen (Intermediärzotten und Endzotten). Die Funktion der Zotten besteht aus Gas- und Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind. Aufgebaut sind die Zotten aus Synzytiotrophoblast, Cytotrophoblast, Bindegewebe und Gefäßen.

Aus der Durchmischungszone von invasiven Trophoblasten und persistierendem Endometrium (Dezidua) geht die Basalplatte hervor. Sie besteht zum größten Teil aus Fibrinoid mit einer Mischung aus Trophoblastzellen und endometrialem Gewebe. Spiralarterien und uteroplazentare Venen durchziehen die Basalplatte und münden in den intervillösen Raum.

Zu den Sonderstrukturen gehören Inseln, Zellsäulen und Septa placentae.

Inseln sind Trophoblastkomplexe, die mit dem Zottenbaum verbunden sind. Möglicherweise handelt es sich um nicht-weiterentwickelte Primärzotten.

Die Zellsäulen dienen der Verankerung der Haftzotten an der Basalplatte.

Die Septa placentae ragen von der Basalplatte in den intervillösen Raum. Sie sind Verwerfungen der Basalplatte und identisch wie diese aufgebaut.

Die Lösung der Plazenta erfolgt nach der Geburt im feto-maternalen Grenzbereich. Die Deziduazellen rücken dabei auseinander und die Anzahl der Kollagenfasern nimmt ab. Auf der Basalplatte der gelösten Plazenta sind stets auch Deziduazellen zu finden.

### **1.3 Die maternale Seite: die Zellen der feto-maternalen Grenzzone**

Charakteristisch für das dezidualisierte Endometrium ist sein hoher Gehalt an leukozytären Zellen. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im ersten Trimenon sog. CD56<sup>++</sup> Large Granular Lymphocytes (LGL) mit ca. 70% anteilmäßig die dominante leukozytäre Zellpopulation darstellen, gefolgt von ca. 20% CD14<sup>+</sup> Makrophagen und ca. 10% CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten<sup>5-7</sup>.

Der Anteil der LGL an der Gesamtpopulation immunkompetenter Zellen in der Dezidua ist zur Zeit des ausgeprägtesten invasiven Trophoblastenwachstums in der Frühschwangerschaft am höchsten und nimmt dann kontinuierlich bis zur Geburt hin ab<sup>7</sup>, während die Zahl der Makrophagen und T-Zellen konstant bleibt. Erweiterte Charakterisierungen haben zudem zeigen können, dass es sich bei den LGL offenbar um eine weitgehend uteruspezifische, immunkompetente Zellpopulation handelt<sup>6</sup>. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Zellen im Rahmen der ausgedehnten Infiltrationsvorgänge der CTB eine besondere Rolle spielen.

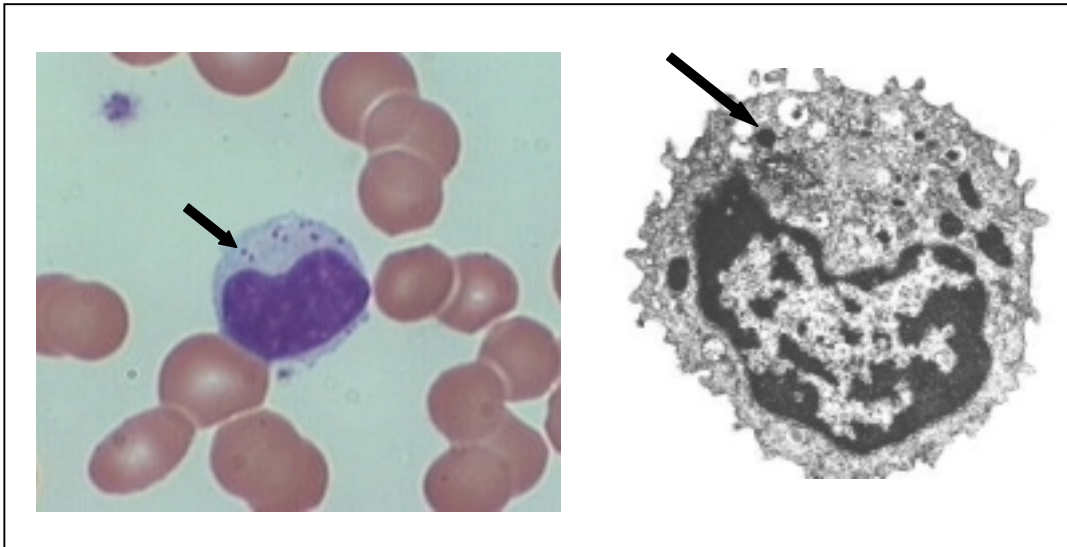


Abb. 8 und 9: Large Granular Lymphocytes (LGL) (aus white cell basics des pathologischen Instituts der Universität von Virginia, USA).

Der größte Teil der dezidualen LGL exprimiert  $CD2^+$ ,  $CD7^+$ ,  $CD56^{++}$ ,  $CD16^-$ ,  $CD3^-$ ,  $CD4^-$ ,  $CD8^-$  und weist somit eine phänotypische Ähnlichkeit mit Natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen auf<sup>5-8</sup>, obwohl die meisten NK-Zellen im peripheren Blut  $CD16^+$  sind und nur weniger als 2% den gleichen Phänotyp haben wie LGL<sup>9</sup>.

Für eine Beziehung der LGL zu den klassischen NK-Zellen sprechen auch die Beobachtungen, dass eine Subpopulation von NK-Zellen aus dem peripheren Blut nach Stimulation mit Interleukin 2 (IL-2) den Phänotyp von dezidualen LGL aufweist und zudem das Integrin alpha-1 (bzw. very late appearing antigen-1/VLA-1 oder CD 94a) exprimiert<sup>10</sup>. Unterstützung findet diese Annahme durch den Befund, dass eine Subpopulation der dezidualen LGL das Zelladhäsionsmolekül („intercellular cell adhesion molecule-1“ (ICAM-1 bzw. CD54)) präsentiert<sup>11</sup>. Auch dieses stellt ein Aktivierungsmerkmal dar<sup>11</sup>, welches sich auf  $CD56^{++}$  NK-Zellen des peripheren Blut praktisch nicht nachweisen lässt<sup>12</sup>.



Physiologische LGL zeigen im Gegensatz zu in vitro mit IL-2 stimulierten LGL keinerlei zytotoxische Aktivität<sup>13</sup>.

Die dezidualen Makrophagen exprimieren den Phänotyp von klassischen Gewebemakrophagen. Umfangreiche Studien haben zeigen können, dass ca. 20% der dezidualen Leukozyten CD14<sup>+</sup> Makrophagen darstellen<sup>5,6</sup>. Diese befinden sich besonders in der Dezidua basalis, wo sie in unmittelbarer Nähe zu einwandernden CTB stehen<sup>14</sup>. In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die dezidualen Makrophagen über alle drei Funktionen peripherer Makrophagen verfügen. Diese drei Funktionen sind Antigenpräsentation, Immunregulation und Zytokinproduktion<sup>15-17</sup>. Welche Funktion dabei allerdings durch die Anwesenheit der CTB hervorgerufen wird, ist bisher noch ungeklärt.

Reife T-Zellen finden sich im Rahmen der Plazentation in deutlich geringerer Anzahl in der Dezidua als LGL und Makrophagen<sup>18,5,6</sup>. Im Gegensatz zu den LGL verändert sich der Anteil der T-Zellen und Makrophagen im Verlauf der Schwangerschaft nicht<sup>7</sup>. Deziduale CD3<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren im Vergleich zu CD3<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut deutlich weniger T-Zell-Rezeptor (TCR) Moleküle auf ihrer Zelloberfläche<sup>18</sup>. Es gibt jedoch bisher auffallend wenige Arbeiten zur Funktion der T-Zellen in der fetomaternalen Grenzzone im Rahmen der Plazentation.

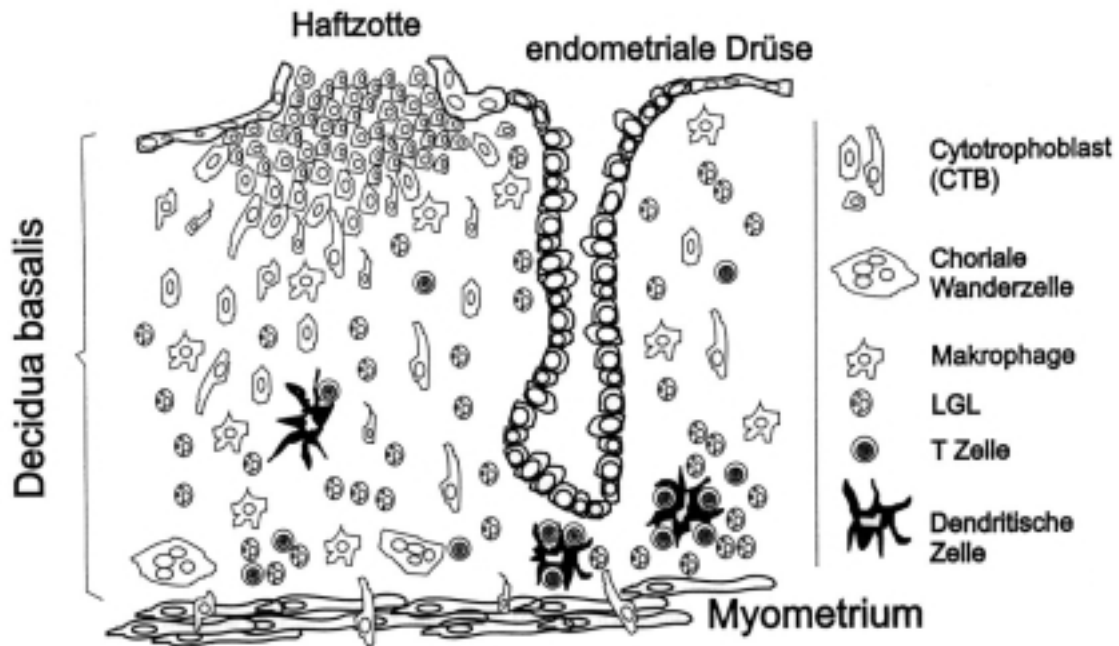


Abb. 10: Schematische Darstellung des Implantationsbereiches. Der Trophoblast (Haftzotte) geht in den invasiven Zytotrophoblast (CTB) über und dringt tief in das Endo- und Myometrium ein. Dabei bilden sich mehrkernige „choriale Wanderzellen“ aus. Es sind viele immunkompetente Zellen wie Makrophagen und LGL aber deutlich weniger T-Zellen und dendritische Zellen vorhanden.

(aus Dietl, J.A.. (2001) **Implantation aus molekularere Sicht**. *Gynäkologe*, **34**,485-493, modifiziert nach Kämmerer, U., Schoppet, M., Mc Lellan, A. D., Kapp, M., Huppertz, H.-I., Kämpgen, E. und Dietl, J.A. (2000) **Human Decidua contains potent Immunostimulatory CD83<sup>+</sup> dendritic cells**. *Am J Pathol* **157**, 159-169.)

#### 1.4 HLA-System

Menschliche fetale Trophoblastzellen exprimieren Moleküle aus der Gruppe der Major Histocompatibility Complex- (MHC-) Klasse-I-Antigene, neben dem klassischen Antigen HLA-C auch besonders die nicht-klassischen Antigene HLA-G, HLA-E und HLA-F<sup>19-21</sup>. Die auf somatischen Zellen häufigsten MHC Moleküle HLA-A und HLA-B fehlen auf den Trophoblastzellen. Alle MHC-Klasse-I-Moleküle haben zum einen die Funktion der Präsentation von fremden antigenen Peptiden für T-Lymphozyten. Eine

zweite Funktion ist die Inhibierung bzw. Aktivierung von NK-Zellen<sup>22</sup>. Dafür sind zwei verschiedene Rezeptorarten auf NK-Zellen bekannt: aktivierende und inhibierende Rezeptoren<sup>23</sup>. Stimulation der aktivierenden Rezeptoren führt zur Zerstörung der Zielzelle durch die NK-Zellen; Stimulation der inhibierenden Rezeptoren dagegen schützt die Zielzelle vor der Lyse.

Die nicht-klassische Gruppe der MHC-Klasse-I-Antigene setzt sich aus HLA-G, HLA-E und HLA-F zusammen. HLA-G ist monomorph und wurde bisher nur in Cytotrophoblasten und einigen Tumorgeweben beschrieben. HLA-E und HLA-F dagegen kommen in vielen fetalen und erwachsenen Geweben vor<sup>24</sup>.

HLA-G und HLA-E sind beide nicht-klassische MHC-Klasse-I-Moleküle mit begrenztem Polymorphismus. HLA-G wird hauptsächlich auf extravillösen Trophoblastzellen exprimiert, die in direktem Kontakt mit maternalen immunkompetenten Zellen, also zum größten Teil NK-ähnliche LGL, sind<sup>25</sup>.

Die Rolle, die HLA-G für die Immuntoleranz des Feten spielt, ist noch immer unklar. Es könnte sein, dass HLA-G wichtig für das Überleben des Fetus ist indem es ihn vor NK-Zell-vermittelter Lyse schützt und/oder die Zytokinproduktion von dezidualen Zellen beeinflusst<sup>26</sup>.

HLA-E kommt dagegen überall vor, es wurde auch auf fetalem Trophoblast entdeckt<sup>27</sup>. Die Funktion von HLA-E ist noch weniger untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Interaktion von HLA-E mit CD94/NKG2-Rezeptor auf NK-Zellen die Zytotoxizität von NK-Zelllinien vermindert<sup>28</sup>. Ob aber HLA-E oder HLA-G auf fetalen Trophoblastzellen die Zytokinproduktion verändert, ist nicht vollständig geklärt.

HLA-C ist ein klassisches MHC-Klasse-I-Molekül mit starkem Polymorphismus und wurde auch auf fetalen Trophoblastzellen entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass HLA-C mit einem killer-inhibitory receptor (KIR) reagieren kann und somit die Lyse der Zelle verhindert<sup>29</sup>.

## 1.5 HLA-G

HLA-G ist nur auf invasiven Trophoblasten, die in direktem Kontakt mit der Dezidua stehen, HLA-C dagegen findet sich auf allen Arten der Trophoblasten. Somit könnte HLA-G für die immunologische Toleranz des Fetus durch die Mutter verantwortlich sein<sup>30</sup>. Es sind im Moment fünf verschiedene HLA-G Untergruppen bekannt, von denen HLA-G1, -G2, -G3 und -G4 membrangebunden sind. HLA-G5 dagegen ist löslich. HLA-G1 kommt am häufigsten auf fetalem Trophoblast vor. Es wäre also möglich, dass HLA-G1, ein Signal darstellt, welches die Lyse fetaler Zellen durch NK-Zellen verhindert, und zwar sowohl von NK-Zellen aus mütterlichem uterinen Gewebe als auch aus peripherem Blut<sup>31,32</sup>.

Werden membrangebundene (m)-HLA-G-Proteine auf der Oberfläche von Zielzellen erkannt, verschiebt sich das Gleichgewicht der Th1- und Th2-Zytokine zugunsten der Th2-Zytokine<sup>33</sup>. Dabei macht es keinen Unterschied, ob diese Zielzellen aus dem peripheren Blut oder aus deziduaalem Gewebe stammen. In Plazentagewebe von Präeklampsie-Patientinnen konnte eine Abnahme der Expression von HLA-G-Protein festgestellt werden<sup>34,35</sup>; dies ist auch ein Grund, um eine physiologische Rolle von HLA-G in der Regulation der plazentaren Entwicklung anzunehmen.

HLA-G kommt auch als kleineres und stärker saures, lösliches Protein vor (soluble (s)-HLA-G)<sup>36</sup>. Auch dieses wird von Trophoblastzellen sezerniert<sup>37</sup> und kommt zusätzlich in Amnionflüssigkeit vor<sup>38</sup>. Beide, sowohl m-HLA-G als auch s-HLA-G können die Zytokinfreisetzung von peripheren Blutzellen beeinflussen, allerdings jeweils in die entgegengesetzte Richtung<sup>39</sup>. Es könnte daher sein, dass s-HLA-G für die Feinabstimmung („tuning“) beim Wachstum der Trophoblastzellen verantwortlich ist indem es die wachstumsfördernden Effekte von m-HLA-G antagonisiert.

## 1.6 Interaktion zwischen LGL's und Trophoblastzellen

Es sind verschiedene Rezeptoren auf dezidualen LGL bekannt, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren. Ein bekannter Rezeptor für HLA-G1 ist Immunglobulin-like-transcript 2 (ILT 2/LIR-1), der sowohl auf einem Teil der dezidualen NK-Zellen zu finden ist, als auch auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen<sup>40</sup>. Neben einer Reihe weiterer Funktionen übermittelt der Rezeptor im Zusammenspiel mit HLA-G1 ein negatives Signal, dass die Zerstörung durch NK-Zellen verhindert.

Ein anderer Rezeptor ist der Killer-Inhibitory Receptor p49 (KIRp49). Dieser wird von dezidua-assoziierten NK-Zellen exprimiert, nicht aber von NK-Zellen des peripheren Blutes. Er wurde als Rezeptor für HLA-G beschrieben<sup>41</sup>.

Deziduale LGL sind auch dafür bekannt, einen speziellen Rezeptorkomplex zu exprimieren, nämlich den CD94/NKG2 Rezeptorkomplex. Er ist ein bekannter Rezeptor für HLA-E<sup>42</sup> und bietet Schutz vor NK-Zell-vermittelter Lyse<sup>43</sup>. Im Hinblick auf die Inhibition der Killeraktivität von dezidualen LGL scheint aber die HLA-G Interaktion mit CD94/NKG2 der hauptsächliche Mechanismus zu sein<sup>44</sup>. Für diese Interaktion soll laut neuester Arbeiten eine Präsentation von HLA-G „leader-Peptiden“ durch das nicht-klassische MHC-Molekül HLA-E zu einer CD94/NKG2-Bindung führen<sup>28,45</sup>.

HLA-G-Moleküle können auch Zellen vor dem Angriff von NK-Zellen aus Dezidua oder dem peripheren Blut schützen. Möglicherweise ist die Interaktion von HLA-G mit dem NKAT 3-Rezeptor dafür verantwortlich<sup>46</sup>.

Weiterhin sind natürlich auch andere Rezeptoren, die mit HLA-G und HLA-E interagieren können, möglich.

## 1.7 Zytokine

Als Zytokine wird eine Gruppe von Proteinen verstanden, die von mononukleären Zellen sezerniert wird. Sie wirken als Botenstoffe in zellregulierenden Funktionen in zellulären Reaktionen. Je nach Produktionsort unterscheidet man Lymphokine, Monokine, Interleukine und Interferone. Zytokine sind in ihrer Wirkung pleiotrop, d.h. sie beeinflussen gleichzeitig mehrere Zellfraktionen und Zellfunktionen. Gemeinsame Charakteristika sind, dass Zytokine ein niedriges Molekulargewicht haben ( $<80\text{kD}$ ), dass sie an normalen Immunreaktionen wie chronisch-inflammatorischen Mechanismen teilnehmen, dass sie normalerweise nur vorübergehend und lokal produziert werden und in parakrinen autokrinen Mechanismen wirken. Gewöhnlich reichen Konzentrationen im pikomolaren Bereich, um physiologisch wie pathophysiologisch aktiv zu werden. Sie interagieren mit hochaffinen Zellmembranrezeptoren, wobei jedes Zytokin einen spezifischen Zellmembranrezeptor besitzt. Zytokine agieren und interagieren in Form eines Netzwerks („Cytokine Network“), wobei sie gegenseitig ihre Bildung induzieren können und zusätzlich synergistische wie additive oder auch antagonistische Interaktionen in ihrer Reaktion auf biologische und pathophysiologische Zellfunktionen ausüben.

Im Prinzip haben alle Zytokine eine wachstumsstimulierende Aktivität, einzelne können jedoch Zellwachstum inhibieren, wie Interferone und Tumor-Nekrose-Faktor sowie Interleukin-1 und TGF- $\beta$ . Derzeit sind 18 Interleukine bekannt, die kloniert wurden und damit in rekombinanter Form vorliegen.

## 1.8 Unterschied zwischen Th1-/Th2-Zytokinen

Die Kommunikation zwischen Mutter und sich-entwickelndem Fetus und damit die Kontrolle der feto-maternalen Grenzzone erfolgt neben direkten Zell-Zell-Kontakten durch viele verschiedene Stoffe wie Zytokine, Prostaglandine, Hormone und schwangerschaftsassozierte Proteine. Zytokine sind Botenstoffe, die von Makrophagen, T-Lymphozyten, NK-Zellen und vielen weiteren Zellen produziert werden. Sie sind wichtig für die Koordination der Immunantwort.

Man nimmt an, dass das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen wichtig ist für den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft<sup>47-49</sup>. Für die erfolgreiche Schwangerschaft wird postuliert, dass diese eher ein Th2-Phänomen ist<sup>12</sup>. Dieses Paradigma ist beim Mausmodell etabliert, beim Menschen jedoch zunehmend umstritten<sup>50,51</sup>.

Der Name Th-Zytokine leitet sich von den sog. T-Helferzellen ab, bei welchen diese Zytokingruppen erstmals beschrieben wurden. Es gibt zwei verschiedene Subgruppen von CD4 positiven T-Helferzellen: Th1 welche eher in inflammatorischen Prozessen aktiv sind und Th2, welche im Rahmen von Toleranzmechanismen und zellulärer Immunität aktiv werden. Sie unterscheiden sich durch das Muster der jeweils sezernierten Zytokine. T-Helferzellen, die Zytokine aus beiden Gruppen sezernieren, werden als Th0-Zellen bezeichnet. Daneben existiert noch das Th2-/Th3-Zytokin „Transforming Growth Factor  $\beta$  2“ (TGF $\beta$ 2)<sup>52-54</sup>. Zur inflammatorischen Th1-Zytokin-Familie gehört Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-2, IL-12 und Interferon (IFN)- $\gamma$ <sup>55,56</sup>. In Studien am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese Th1-Zytokine u. a. die plazentare Entwicklung hemmen.

TNF- $\alpha$  verhindert die fetale Trophoblastinvasion indem es die Zellmotilität des Trophoblasten hemmt<sup>57</sup>. IFN- $\gamma$  ist dafür bekannt, dass es MHC-Klasse-I- und II-Moleküle auf menschlichen Trophoblastzellen hoch reguliert<sup>58</sup>.

Dagegen haben die anti-inflammatorischen Th2-Zytokine wie IL-4, IL-6, IL-10 und IL-13<sup>55,56</sup> alle immunsuppressive Eigenschaften, von denen angenommen wird, dass sie zumindest zum Teil, ebenso wie TGF $\beta$ 2, für das Überleben des Fetus vorteilhaft sind<sup>59</sup>.

Sowohl uterine Lymphozyten als auch fetale Trophoblastzellen produzieren Granulocyte-Makrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)<sup>60</sup>. Bei schwangeren Mäusen mit hohem Abort-Risiko konnte die Gabe von GM-CSF die Rate an fetalen Todesfällen deutlich senken<sup>61</sup>. GM-CSF-Produktion scheint also auch förderlich auf die Schwangerschaft zu wirken.

## **1.9 Die untersuchten Zytokine**

### **1.9.1 Interleukin 5 (IL-5)**

IL-5 (Molekulargewicht 22kD, 153 Aminosäuren), auch als TRF („T cell replacing factor“) oder BCGF-II („B cell growth factor II“) bezeichnet, ist ein Produkt aktivierter T-Helferzellen. Zum einen wirkt es auf aktivierte B-Zellen und steigert die Antikörperproduktion von IgM, IgG und IgA. Hauptsächlich ist es aber ein Wachstums- und Aktivierungsfaktor für Eosinophile, der häufig z. B. bei parasitären Erkrankungen auftritt.

### **1.9.2 Interleukin 10 (IL-10)**

IL-10 (Molekulargewicht 18kD, 178 Aminosäuren) ist als „Cytokine synthesis inhibitory factor“, CSIF, bekannt und inhibiert die Bildung von IFN- $\gamma$ , die Antigenpräsentation sowie die IL-1-, IL-6- und TNF- $\alpha$ -Produktion von Makrophagen. Außerdem spielt IL-10 eine wichtige Rolle bei der IgE-Regulierung.

### **1.9.3 Interleukin 13 (IL-13)**

IL-13 (Molekulargewicht 13kD, 114 Aminosäuren) ist ein Produkt aktivierter T-Helferzellen, ähnlich wie auch IL-5. Es besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften indem es die Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und Monozyten hemmt. Außerdem ist IL-13 in allergische Reaktionen miteinbezogen. IL-13 kann auf menschlichen B-Zellen CD23-Expression verursachen und dadurch die Freisetzung von IgM, IgE und IgG4 anregen.

### **1.9.4 Interleukin 15 (IL-15)**

IL-15 (Molekulargewicht 14-15kD, 162 Aminosäuren) hat ähnliche Effekte wie IL-2, wirkt aber stark chemotaktisch auf Lymphozyten. Es aktiviert T-Zellen und B-Zellen und induziert lymphokine-activated killer (LAK) Aktivität in NK-Zellen. Eine weitere



wichtige Aufgabe ist die Hemmung der Zell-Apoptose, die durch verschiedenen Stimuli ausgelöst werden kann.

### **1.9.5 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)**

GM-CSF (Molekulargewicht 14kD, 128 Aminosäuren) ist ein natürlich vorkommender hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Reifung und Differenzierung von Neutrophilen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten stimuliert.

### **1.9.6 Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )**

Die genetische Information für den sog. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), der von aktivierten Makrophagen produziert wird, befindet sich auf Chromosom 6. Die Aminosäuresequenz des TNF weist eine etwa 30%ige Homologie mit der des Lymphotoxins auf. Da beide Peptide eine große funktionelle Ähnlichkeit haben, wird der Makrophagenfaktor als TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin als TNF- $\beta$  bezeichnet.

TNF- $\alpha$  kommt als dimeres Molekül vor, dessen Untereinheiten auch alleine funktionell aktiv sind. Wie TNF- $\alpha$  Zielzellen abtötet, ist noch unklar. Nicht alle Zellen sind TNF-empfindlich, und das Kriterium für TNF-Empfindlichkeit ist nicht bekannt. Rezeptoren für TNF- $\alpha$  sowie eine Hemmung der DNA und der Proteinsynthese nach TNF-Bindung sind nachgewiesen. TNF- $\alpha$  ist einer der Hauptmediatoren des Endotoxinschocks (septischer Schock) und ist als Cachectin für eine ausgeprägte Kachexie, wie sie bei Tumoren, schweren Infektionen, besonders bei Parasitosen auftreten, verantwortlich. Ähnlich wie Lymphotoxin fungiert TNF- $\alpha$  nicht nur als zytotoxischer Faktor, sondern stimuliert verschiedene Zellfunktionen wie Adhärenz neutrophiler Granulozyten, Degranulation und Produktion von Sauerstoffradikalen. Des Weiteren ist TNF- $\alpha$  bei der Unterhaltung von akuten und chronischen Entzündungsprozessen beteiligt.

### 1.9.7 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )

Typ-II-Interferon (IFN- $\gamma$ ) wird von aktivierten Lymphozyten freigesetzt (alle CD8-positiven Lymphozyten sowie CD4/Th1-Helferzellen bilden IFN- $\gamma$ ) und ist Bestandteil der makrophagenaktivierenden Faktoren (MAF). Diese MAF induzieren in Makrophagen Zytotoxizität und Freisetzung von Mediatoren wie IL-1 oder Sauerstoffradikale. MAF ist nicht - wie ursprünglich beschrieben - ein einzelnes Peptid, sondern stellt wahrscheinlich eine Gruppe von Peptiden dar. Dazu gehören  $\gamma$ -Interferon und die Kolonie-stimulierenden Faktoren GM-CSF und CSF-1.

Darüber hinaus moduliert IFN- $\gamma$  auch Eigenschaften anderer Zellen. Es inhibiert die Proliferation und induziert die Expression von Klasse-II-Antigenen. Besonders über die beiden letztgenannten Eigenschaften modifiziert IFN- $\gamma$  die Immunantwort.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Zytokine**

Zytokin	Molekulargewicht	Quelle	Ziel	Wirkung
IFN- $\gamma$	30kD (Dimer)	T-Zellen NK-Zellen	Lymphozyten Monozyten Gewebszellen	Immunregulation B-Zell- Differenzierung anti-virale Wirkung
TNF- $\alpha$	36kD (Dimer)	Makrophagen Lymphozyten	Fibroblasten Endothelien	Entzündung Kachexie
GM-CSF	14kD (128 AS)	Makrophagen T-Zellen	Myelomonozytische Reihe	Stimulierung von Wachstum und Differenzierung
IL-5	22kD (153 AS)	T-Zellen	B-Zellen Eosinophile	Differenzierung
IL-10	18kD (178 AS)	Th2-Zellen	Th1-Zellen	Hemmung
IL-13	13kD (114 AS)	T-Zellen	B-Zellen Makrophagen	Wachstum und Differenzierung von B-Zellen Produktionshemmung inflammatorischer Zytokine
IL-15	14-15kD (162 AS)	T-Zellen Plazenta Muskelzellen	T-Zellen	Proliferation

### 1.10 Modellsystem

In dieser Arbeit wurden als Modell für invasiven Trophoblasten zum einen Chorionkarzinomzelllinien, zum anderen die Leukämiezelllinie K562 verwendet. Alle sind nach wie vor trotz ihres unterschiedlichen Ursprungs ein allgemein gebräuchliches Modell für Interaktionen in der Schwangerschaft, da sie keine MHC-Klasse-I-Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren (K562) oder als Tumorzellen trophoblastären Ursprungs vorliegen (Chorionkarzinomzellen). Zu den verwendeten Chorionkarzinomzellen gehören JEG-3 (exprimiert HLA-C und HLA-G) und JAR (MHC-Klasse-I negativ, exprimiert HLA-E). Die Leukämiezelllinien bestehen zum einen aus nativen K562-Zellen, die entweder HLA-G oder HLA-E stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren.

**Tabelle 2: Herkunft der Zellen für die Kokulturrexperimente**

<b>JEG-3</b>	ATCC (American type culture collection, Rockville, MD)
<b>JAR</b>	ATCC (American type culture collection, Rockville, MD)
<b>K562</b>	Frau Prof. Dr. E.H. Weis, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
<b>K562(HLA-G)</b>	Frau Prof. Dr. E.H. Weis, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
<b>K562(HLA-E)</b>	Frau Prof. Dr. E.H. Weis, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dagegen exprimieren menschliche fetale Trophoblastzellen sowohl das klassische Antigen HLA-C als auch die nicht-klassischen Antigene HLA-G, HLA-E und HLA-F<sup>19-21</sup>.

Die Zelllinie JEG-3 besteht aus entarteten Trophoblastzellen, welche aus humanem Plazentagewebe angezüchtet wurden. JEG-3 produziert humanes Chorion-Gonadotropin (hCG), humanes Chorion-Somatotropin und Progesteron.

Die Zelllinie JAR besteht ebenfalls aus entarteten Trophoblastzellen. JAR produziert Oestrogen, Progesteron, humanes Chorion-Gonadotropin (hCG) und humanes Chorion-Somatotropin.

Die Leukämiezelllinie K562 hat ihren Ursprung in einer chronisch-myeloischen Leukämie und wurde aus humanem Knochenmark gewonnen. Morphologisch entstammen die Zellen einem Lymphoblasten.

Bei Verwendung dieser proliferierenden Tumorzelllinien ist anzunehmen, dass deren Eigenschaften einige Abweichungen vom normalen Verhalten des invasiven Cytotrophoblasten bedeuten. Dennoch wurde die Übereinstimmung der Oberflächenantigene für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen als ausreichend angesehen. Bei allen Versuchen konnte so gezielt der potentielle Einfluss von HLA-G und HLA-E auf die Immunantwort innerhalb der Dezidua untersucht werden.

Ziel der Arbeit war es, durch Verwendung der beschriebenen Modellsysteme einen Einfluss der nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-G und HLA-E auf die Zytokinsekretion humaner dezidualer LGL zu untersuchen. Hierzu wurde in Kokulturen sowohl der beiden Chorionkarzinomzelllinien als auch der untransfizierten und transfizierten Leukämiezelllinien mit isolierten dezidualen LGL sowie LGL-freien Deziduazellen die Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-15 untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Deziduagewebeproben**

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

Das deziduale Material (Dezidua basalis und parietalis) wurde durch Saugkürrettage von 16 schwangeren Frauen mit sonographisch gesicherter, intakter, intrauteriner Schwangerschaft (6. -10. Woche) nach vorausgegangener Beratung gemäß Paragraph 19 des Schwangerschaftskonfliktgesetzes gewonnen.

### **2.2 Extraktion von Zellen aus Dezidua**

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Klasse II, Personen- und Produktschutz) unter Verwendung sterilen Materials und steriler Lösungen durchgeführt.

**Tabelle 3: Benötigte Lösungen und Medien**

<b>Kollagenase-Mischung</b>	345mg Hyaluronidase Typ I-S (Sigma, H 3506) (=200U/ml, =0,7mg/ml) 500mg Kollagenase roh, Typ IV, CLS IV (Biochrom) (=1mg/ml) 100mg Deoxyribonuclease I, Typ IV (Sigma H 3506) (=0,2mg/ml) 500mg BSA, Fraktion V (Sigma, A 3350) (=1mg/ml) in 500ml PBS (mit) lösen, steril einfiltrieren, in Portionen bei $-20^{\circ}\text{C}$ einfrieren.
<b>Gradientenlösung</b>	Histopaque-1077, Fa. Sigma Best.-Nr. 1077-1
<b>PBS (mit <math>\text{Ca}^{2+}</math>, <math>\text{Mg}^{2+}</math>)</b>	Fa. Biochrom (Seromed): Best.-Nr.: L 1815 Inhaltsstoffe: NaCl 8000mg/l, KCl 200mg/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1150mg/l, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 200mg/l, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, $\text{CaCl}_2$ 100mg/l
<b>PBS</b>	Fa. Biochrom (Seromed): Best.-Nr.: L 1825 Inhaltsstoffe: NaCl 8000mg/l, KCl 200mg/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1150mg/l, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 200mg/l
<b>Zellkulturmedium</b>	RPMI 1640/10% FCS/Gentamycinsulfat 25mg/ml

Zuerst wurden die makroskopisch identifizierbaren Deziduastücke aus Saugabradat isoliert, in einer runden Glaspetrischale (Durchmesser ca. 12,5cm) mit PBS gespült und von großen Blutkoageln gereinigt.

Danach wurden die Deziduastücke ohne Flüssigkeit auf die Innenseite eines quadratischen Plastikpetrischalendeckels (ca. 12,5x12,5cm) gegeben und mit dem Wiegemesser in Fragmente von etwa 1mm<sup>3</sup> Größe geschnitten. Der Gewebebrei wurde in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und eingewogen. Je 1g Gewebebrei wurden 4ml Kollagenaselösung zugegeben und gut resuspendiert.

Für den enzymatischen Verdau der Gewebestücke wurde der Gewebebrei mit der Kollagenasemischung für 20min in einen Hybridisierungssofen unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Verdauansatz mit PBS auf 50ml aufgefüllt und unter folgenden Bedingungen abzentrifugiert: 250xg, RT, 10min.

Dann wurde das Pellet in 20ml PBS aufgenommen und portionsweise durch ein steriles Edelstahlsieb (Netzgrößen 50µm) in eine Schale passiert. Diese Zellsuspension wurde mit PBS auf 50ml aufgefüllt und abzentrifugiert: 250xg, RT, 10min.

Zwischenzeitlich wurde die Gradientenlösung vorbereitet. Dafür wurden Glaszentrifugenröhrchen mit je 5ml Histopaque gefüllt (ca. 1 Röhrchen je 5g Ausgangsgewebebrei).

Das pelletierte Zellgemisch wurde in PBS resuspendiert (je 5ml je 5g Ausgangsgewebebrei) und je 5ml Zelllösung wurden auf Histopaque überschichtet, dann abzentrifugiert: 400xg, 20°C, 30min, keine Bremse. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die weiße ringförmige Zellbande aus der Mitte des Gradienten wurde mit einer Pipette abgezogen, in ein 15ml Röhrchen gegeben und mit PBS auf 15ml aufgefüllt. Aus der Zellsuspension wurden 20µl Zellen zum Zählen entnommen die Zelllösung zur Sedimentierung der Zellen bei 250xg und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt: 20µl Zellen + 20µl Trypanblau und nach untenstehender Formel berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der gez. Zellen} \quad \times \quad \text{Verdünnung} \quad \times \quad \text{ml der Zelllösung} \quad \times \quad 10^4}{\text{Ausgezählte Großquadrate}}$$

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand komplett vom Zellpellet abgesaugt.



### 2.3 Zellisolation von LGL und WASH

Zur weiteren Isolation von CD56<sup>++</sup> Zellen (LGL) und von CD56<sup>++</sup> Zellen gereinigten Deziduazellen (WASH) wurden pro 10 Millionen Zellen 80µl Puffer (PBS- Polyglobulin) dazugegeben und resuspendiert. Anschließend wurde zu dem Zell-Puffer-Gemisch 20µl MACS CD56-Mikro-Beads (je 10 Millionen Zellen) zugegeben, gut gemischt (um die CD56<sup>++</sup> Zellen mit magnetbeladenen Anti-CD56 Antikörpern zu markieren) und für 15 Minuten in einen Kühlschrank gestellt.

Danach wurden zum Waschen der ungebundenen Beads 5ml MACS-Puffer auf das Micro-Beads/Antikörpergemisch gegeben und abzentrifugiert: 250 x g, RT, 10min. Die Überstände wurden abgenommen, die Magnetzellseparatorsäule (Typ LS, Milteny, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben aufgebaut und mit 600µl entgasstem MACS-Puffer vorgespült.

Anschließend wurde das Zellpellet in 600µl MACS-Puffer gelöst, auf die Magnetzellseparatorsäule gegeben und nach Einlauf in die Säule mit 600µl MACS-Puffer nachgespült. Hierbei wurden alle nicht mit Beads markierten Zellen aus der Säule gespült und in einem 1,5ml Röhrchen aufgefangen.

Dieses Zellgemisch wurde abzentrifugiert und mit WASH bezeichnet.

Dann wurden die in der Säule gebundenen CD56<sup>++</sup> Zellen 3mal mit je 600µl MACS-Puffer nachgespült. Diese Spüllösung wurde verworfen.

Nach diesem Spülvorgang wurde die Säule aus dem Magneten genommen, 1000µl MACS-Puffer mit einem Spritzstempel durch die Säule gedrückt und die aus der Säule eluierten Zellen in einem 1,5ml Microzentrifugationsröhrchen aufgefangen. Die so gewonnenen Zellen wurden abzentrifugiert und mit LGL bezeichnet.

Je nach Bedarf wurden die beiden Zellfraktionen entweder frisch weiterverarbeitet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Reanalyse nach Isolation mit einem FACScan Durchflusszytometriegerät (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ergab eine Reinheit der  $\text{CD56}^{++}$  Zellen von  $>95\%$ . Bei der von  $\text{CD56}^{++}$  gereinigten Zellfraktion (WASH) war in der FACS Analyse  $<2\%$   $\text{CD56}^{++}$  Zellen nachweisbar.

## 2.4 Kokulturrexperimente

Die Zelllinien JEG-3, JAR (American Type Culture Collection, Rockville, MD) und K562 wurden in RPMI 1640/10% FCS/Gentamycinsulfat 25mg/ml, die transfizierten Zelllinien K562(HLA-E) und K562(HLA-G) in oben genanntem Medium mit G418 kultiviert. Die genaueren Angaben zu Herkunft der Zellen siehe Tabelle 2. Für Kokulturrversuche wurden je nach Anzahl der dezidualen Zellen zwischen  $3 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well in 24 Well Kokulturplatten ausgesät. Zusätzlich wurden pro Deziduaprobe zwei Wells (für LGL und WASH) mit Medium pur als Kontrolle angelegt.

Diese Wellplatten wurden für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert um einen semi-konfluenten Zellrasen bzw. eine konstante Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wurden die Wellplatten mit UV-Licht bestrahlt um ein Weiterwachsen der Tumorzellen zu verhindern.

Danach wurden die vorgelegten Zellen mit der jeweils gleichen Anzahl von dezidualen Zellen überschichtet. Für jede Deziduaprobe wurden 12 Experimente durchgeführt, 6 Experimente für  $\text{CD56}^{++}$  Zellen (LGL) und 6 Experimente für von  $\text{CD56}^{-}$  Zellen (WASH). Die Zellgemische wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 1,5ml Medium für 24h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

Danach wurde der Zellüberstand abzentrifugiert und sowohl die Zellen als auch der Zellüberstand portionsweise bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Für genauere Angaben bzgl. Datum der Aufbereitung, Schwangerschaftswoche, Zellzahl gesamt und für LGL und WASH getrennt, sowie die Anzahl der überschichteten dezidualen Zellen wurden Tabellen angefertigt (siehe Tabellen 4 und 5). Desweiteren können der Tabelle entnommen werden, ob die Zellen tiefgefroren oder frisch verwendet wurden und wie die AK-Inkubation erfolgte (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 4: Die einzelnen Proben (1)**

<b>Nr.</b>	<b>Datum Verarbeitung</b>	<b>SSW</b>	<b>Gewicht</b>	<b>Zellzahl gesamt</b>	<b>Zellzahl LGL</b>	<b>Zellzahl WASH</b>
<b>1</b>	20.09.00	9	4,6g	6,0x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>	1,7x10 <sup>6</sup>
<b>2</b>	20.09.00	8	9,1g	15,7x10 <sup>6</sup>	4,8x10 <sup>6</sup>	7,2x10 <sup>6</sup>
<b>3</b>	26.09.00	7	12,0g	6,2x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
<b>4</b>	27.09.00	7	4,5g	8,0x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
<b>5</b>	28.09.00	7	12,1g	10,4x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>
<b>6</b>	29.09.00	8	9,7g	10,0x10 <sup>6</sup>	2,7x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>6</sup>
<b>7</b>	02.10.00	9	8,9g	10,0x10 <sup>6</sup>	9,7x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>
<b>8</b>	02.10.00	10	9,2g	15,4x10 <sup>6</sup>	14,0x10 <sup>6</sup>	7,7x10 <sup>6</sup>
<b>9</b>	04.10.00	6	4,2g	30,6x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	9,6x10 <sup>6</sup>
<b>10</b>	05.10.00	8	9,2g	11,0x10 <sup>6</sup>	4,3x10 <sup>6</sup>	6,1x10 <sup>6</sup>
<b>11</b>	05.10.00	9	5,4g	10,2x10 <sup>6</sup>	3,3x10 <sup>6</sup>	7,1x10 <sup>6</sup>
<b>12</b>	11.10.00	8	6,9g	2,7x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	5,0x10 <sup>6</sup>
<b>13</b>	11.10.00	8	7,0g	5,3x10 <sup>6</sup>	4,5x10 <sup>6</sup>	4,2x10 <sup>6</sup>
<b>14</b>	11.10.00	8	8,2g	37,6x10 <sup>6</sup>	10,1x10 <sup>6</sup>	17,6x10 <sup>6</sup>
<b>15</b>	13.10.00	8	5,2g	6,6x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>
<b>16</b>	13.10.00	9	4,6g	20,0x10 <sup>6</sup>	8,6x10 <sup>6</sup>	6,0x10 <sup>6</sup>

**Tabelle 5: Die einzelnen Proben (2)**

<b>Nr.</b>	<b>dazugeg. Zellen</b>	<b>tg/ frisch</b>	<b>AK-Inkubation</b>	<b>Säule</b>
<b>1</b>	$3 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>2</b>	$5 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>3</b>	$3 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>4</b>	$3 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>5</b>	$5 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>6</b>	$5 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>7</b>	$5 \times 10^5$	tg	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>8</b>	$5 \times 10^5$	tg	120µl PBS-Polyglob. + 30µl Anti-CD56-Mikrobeads	VS
<b>9</b>	$5 \times 10^5$	tg	240µl PBS-Polyglob. + 60µl Anti-CD56-Mikrobeads	VS
<b>10</b>	$5 \times 10^5$	frisch	120µl PBS-Polyglob. + 30µl Anti-CD56-Mikrobeads	VS
<b>11</b>	$5 \times 10^5$	frisch	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>12</b>	$5 \times 10^5$	frisch	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>13</b>	$5 \times 10^5$	frisch	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>14</b>	$5 \times 10^5$	frisch	320µl PBS-Polyglob. + 80µl Anti-CD56-Mikrobeads	VS
<b>15</b>	$3 \times 10^5$	frisch	80µl PBS-Polyglob. + 20µl Anti-CD56-Mikrobeads	MS
<b>16</b>	$5 \times 10^5$	frisch	160µl PBS-Polyglob. + 40µl Anti-CD56-Mikrobeads	VS

## 2.5 ELISA (am Beispiel von TNF- $\alpha$ )

### 2.5.1 Vorbereitung

Für den ELISA wurden am Tag 1 die benötigten Lösungen angesetzt.

**Tabelle 6: Lösungen für TNF- $\alpha$  ELISA**

<b>10x PBS-Stocklösung</b>	80,0g NaCl + 11,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2,0g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2,0g KCL in 500ml H <sub>2</sub> O, pH ad 7,0, Volumen auf 1l mit H <sub>2</sub> O
<b>PBS je Platte</b>	60ml Stocklösung + 540ml H <sub>2</sub> O
<b>Coating-Puffer</b>	0,2M Natriumphosphat-Lösung, pH 9,0 5,9g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 8,05g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 250ml H <sub>2</sub> O lösen, pH mit 1M NaOH auf 9,0 einstellen, Volumen auf 500ml mit H <sub>2</sub> O, bei 4°C 30 Tage haltbar
<b>Assay-Diluent</b>	PBS mit 10% FCS, pH 7,0 <b>je Platte:</b> 4ml FCS und 36 ml PBS*
<b>Wasch-Puffer</b>	PBS, 0,05% Tween-20 <b>je Platte:</b> 550ml PBS* und 275 $\mu$ l Tween-20
<b>Substratlösung</b>	zusammengesetzt aus: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (= Substrat Reagenz B, Cat. No. 2607KC) und Pufferlösung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (= Substrat Reagenz A, Cat. No. 2606KC)
<b>Stopplösung</b>	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (=1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )

### **2.5.2 Beschichten der Platte**

Um die Platte mit dem Bindeantikörper („capture“) zu beschichten („coaten“), wurden 10ml Coating-Puffer mit 40 $\mu$ l des Capture-Antikörpers (im Set) in einem 15ml Röhrchen gemischt. 100 $\mu$ l der Coating-Lösung werden in jedes Well pipettiert, die Platte wurde mit Klebefolie zugeklebt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank stehen gelassen.

### **2.5.3 Blocken der Platte**

Am nächsten Tag wurde die Coating-Lösung abgekippt und die Platte auf Papier trockengeklopft. Anschließend wurden 300 $\mu$ l Waschpuffer in jedes Well pipettiert, etwa 30sec. stehen gelassen, abgekippt und die Platte danach trockengeklopft. Dieser Waschschritt wurde dann noch zweimal wiederholt. In jedes Well der ELISA-Platte wurden zum Abblocken unspezifischer Bindungen 200 $\mu$ l des Assay-Puffers pipettiert, die Platte zugeklebt und 1h bei RT stehen gelassen.

### **2.5.4 Vorbereitung des Standards und der Proben**

Während des Blockens der Platte wurden die Proben zum Auftauen aus der Gefriertruhe geholt und die Verdünnungsreihe der Standards angesetzt. Dazu wurden sechs 1,5ml Röhrchen mit 100-50-25-22,5-6,3-3,1 beschriftet und mit jeweils 300 $\mu$ l Assay-Puffer gefüllt. Ein Röhrchen (10ml) wurde mit 200 beschriftet und mit 5,39ml Assay-Puffer gefüllt. In das aufgetaute rekombinante TNF- $\alpha$  wurden 500 $\mu$ l Assay-Puffer aus dem 200er Röhrchen pipettiert, gut gemischt und zurück in das 200er Röhrchen gegeben, in dem es ebenfalls gut gemischt wurde. Aus dem 200er Röhrchen wurden dann 300 $\mu$ l in das 100er Röhrchen gegeben, gut gemischt, dann aus dem 100er Röhrchen 300 $\mu$ l in das 50er Röhrchen gegeben, gut gemischt usw. bis zum Schluss aus dem 6,3er Röhrchen 300 $\mu$ l in das 3,1er Röhrchen gegeben wurden.

### **2.5.5 Inkubation der Standards und Proben**

Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Assay-Puffer abgekippt und die Platte dreimal bei 300µl gewaschen und nach jedem Waschschrift trockengeklopft. Anschließend wurden je 100µl der Standards und Proben als Doppelansatz in je 2 benachbarte Wells pipettiert, die Platte zugeklebt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

### **2.5.6 Inkubation des Detektionsantikörpers/HRP-Enzym**

Während der Inkubationszeit wurde ein Röhrchen mit 10ml Assay-Diluent vorgelegt, 20µl des biotinierten Detection-Antikörpers (im Set) dazu pipettiert und gut gemischt. Anschließend wurden zu dieser Lösung 20µl Horseradish-Peroxidase markiertes Streptavidin (Strept-HRP) (im Set) dazu pipettiert und ebenfalls gut gemischt.

Die Standards und die Proben wurden abgekippt und die Platte wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen, hier allerdings 5mal.

Nach diesen Waschvorgängen wurden jeweils 100µl der Detection-Antikörpers/Strept-HRP-Lösung in jedes Well pipettiert, die Platte zugeklebt und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

### **2.5.7 Inkubation der Substratlösung und Abstoppen der Reaktion**

Kurz vor Ende der Inkubation der ELISA-Platte wurde die Substratlösung angesetzt. Dabei wurden 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung und Pufferlösung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermischt. Dann wurde die Detection-Antikörper/Strept-HRP-Lösung abgekippt und 7mal mit Waschpuffer gewaschen und trockengeklopft. Anschließend wurde von der vorbereiteten Substratlösung je 100µl in jedes Well pipettiert, die Platte abgedeckt – nicht zugeklebt – und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen.



Nach exakt 30 Minuten wurde die Reaktion abgestoppt indem 50µl Stopplösung in jedes Well pipettiert wurden (Farbumschlag der Lösung von blau nach gelb).

### 2.5.8 Ablesen der Platte

Zur Auswertung wurde die Platte bei 450nm in den ELISA-Reader (Dynex) gegeben und das Ergebnis ermittelt.

Mit vergleichbaren Ansätzen und Protokollen wurden auch folgende Zytokine bestimmt: IL-10, IL-13, IL-5, IL-15, IFN- $\gamma$ , GM-CSF. Zur Herkunft der Zytokine siehe Tabelle 7. Abweichungen von dem bei TNF- $\alpha$  beschriebenen Protokoll ergaben sich teilweise in einem unterschiedlichem Ansatz der Standardreihen.

**Tabelle 7: Zytokine für ELISA**

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 555212</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 555142</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 555126</b>
<b>IL-5</b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 555202</b>
<b>IL-10</b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 555157</b>
<b>IL-13</b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 558983</b>
<b>IL-15</b>	<b>OptEIA von Becton Dickinson Company (BD) Bestellnummer 559268</b>

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuche für die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und GM-CSF sind in den **Abbildungen** 11 bis 22 dargestellt.

In den Überständen der Chorionkarzinomzelllinien JEG-3 und JAR sowie der Leukämiezelllinien K562, K562(HLA-G) und K562(HLA-E) jeweils mit Medium und auch Medium alleine konnte von den untersuchten Zytokinen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15) keines nachgewiesen werden.

#### 3.1 Large Granular Lymphocytes (LGL)

##### 3.1.1 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )

Aufgrund von Werten aller einzelnen Proben unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml wurden die Kokulturansätze 1 und 3 bis 9 aus der Wertung herausgenommen. Somit konnten 8 Kokulturansätze ausgewertet werden.

In Einzelkulturen von LGL konnte signifikant weniger IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden als in den Kokulturen.

##### LGL und JEG-3

In 3 von 8 Fällen konnte IFN- $\gamma$  bei Koinkubation von LGL und JEG-3 nicht nachgewiesen werden. Der Median der Konzentration in den Ansätzen mit IFN- $\gamma$  lag bei 6,2pg/ml.

##### LGL und JAR

In 2 von 8 Fällen konnte ein Wert über der Nachweisgrenze nicht nachgewiesen werden. Der Median der Konzentration in den Ansätzen mit nachweisbarem IFN- $\gamma$  lag bei

40,2pg/ml und es ließ sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung gegenüber LGL/JEG-3, LGL/K562(HLA-G) und LGL/K562(HLA-E) feststellen.

#### LGL und K562

In der Kokultur von LGL und K562 konnte in allen Fällen IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden, der Median der Konzentration lag bei 47,5pg/ml. Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung ergab sich nur der Kokultur von LGL und K562(HLA-G) gegenüber LGL und K562.

#### LGL und K562(HLA-G)

Ein Wert von 8 Werten lag unter der Nachweisgrenze, ein Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration von 16,5pg/ml konnte errechnet werden.

#### LGL und K562(HLA-E)

Auch hier lag ein Wert der IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Ansätzen unter 4 pg/ml, der Median betrug 26,7pg/ml. Gegenüber der Kokultur von LGL mit K562(HLA-G) ergab sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration in der Kokultur von LGL mit HLA-E.

#### LGL und Medium

Bei 5 Werten unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml konnte ein Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration von 3,4pg/ml und somit unter der Nachweisgrenze errechnet werden. Hierbei konnte signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden als in allen anderen Kokulturen.

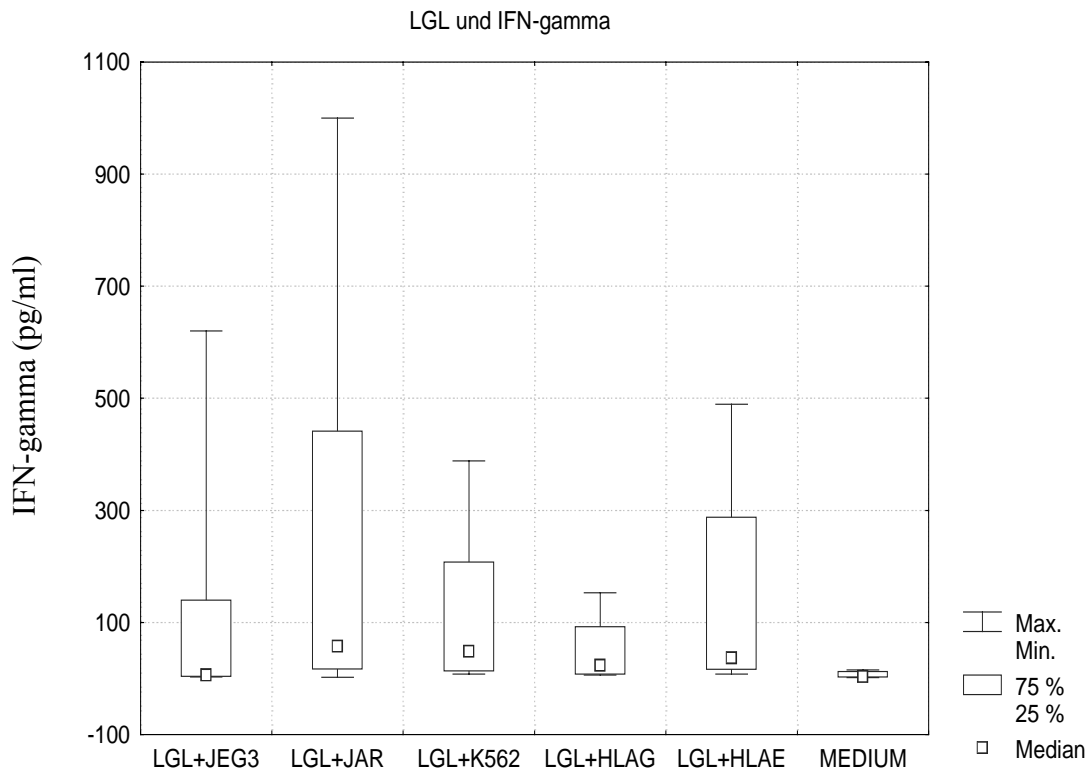


Abb. 11: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IFN- $\gamma$  bei Kokulturen von LGL mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.1.2 Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )

Aufgrund TNF- $\alpha$ -Konzentrationen unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml aller einzelnen Proben wurden die Kokulturansätze 3 bis 7 aus der Wertung genommen. Zur Auswertung kamen damit 11 Proben.

Im Vergleich zu den Kokulturen konnte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere TNF- $\alpha$ -Konzentration der Einzelkultur von LGL nachgewiesen werden.

### LGL und JEG-3

Der Median der Konzentration von TNF- $\alpha$  bei Koinkubation von LGL/JEG-3 lag bei 30,1pg/ml, es konnten alle 11 Deziduaprobe als über der Nachweisgrenze liegend verwendet werden.

### LGL und JAR

Auch hier lagen alle Ergebnisse der Kokulturanätze über der Nachweisgrenze ( Median 56,2pg/ml ). Kokulturen von LGL/JAR produzierten signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr TNF- $\alpha$  als Kokulturen von LGL mit JEG-3, K562, K562(HLA-G) und K562(HLA-E).

### LGL und K562

Ein Ergebnis der Kokultur von LGL/K562 lag nicht über der Nachweisgrenze, der Median der gemessenen TNF- $\alpha$  Konzentration betrug 45,9pg/ml. Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Produktion ergab sich im Vergleich zu LGL/K562.

### LGL und K562(HLA-G)

Auch hier lag ein Ergebnis unter 4pg/ml. Die Kokultur von LGL/K562(HLA-G) produzierte im Median die gemessene TNF- $\alpha$ -Konzentration 30,9pg/ml.

### LGL und K562(HLA-E)

TNF- $\alpha$  konnte in 9 von 10 Fällen mit einem Median von 38,6pg/ml nachgewiesen werden.

### LGL und Medium

Bei 2 Werten unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml wurde ein Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration von 27,7pg/ml errechnet. Es wurde zudem signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger TNF- $\alpha$  nachgewiesen als in allen anderen Kokulturen.

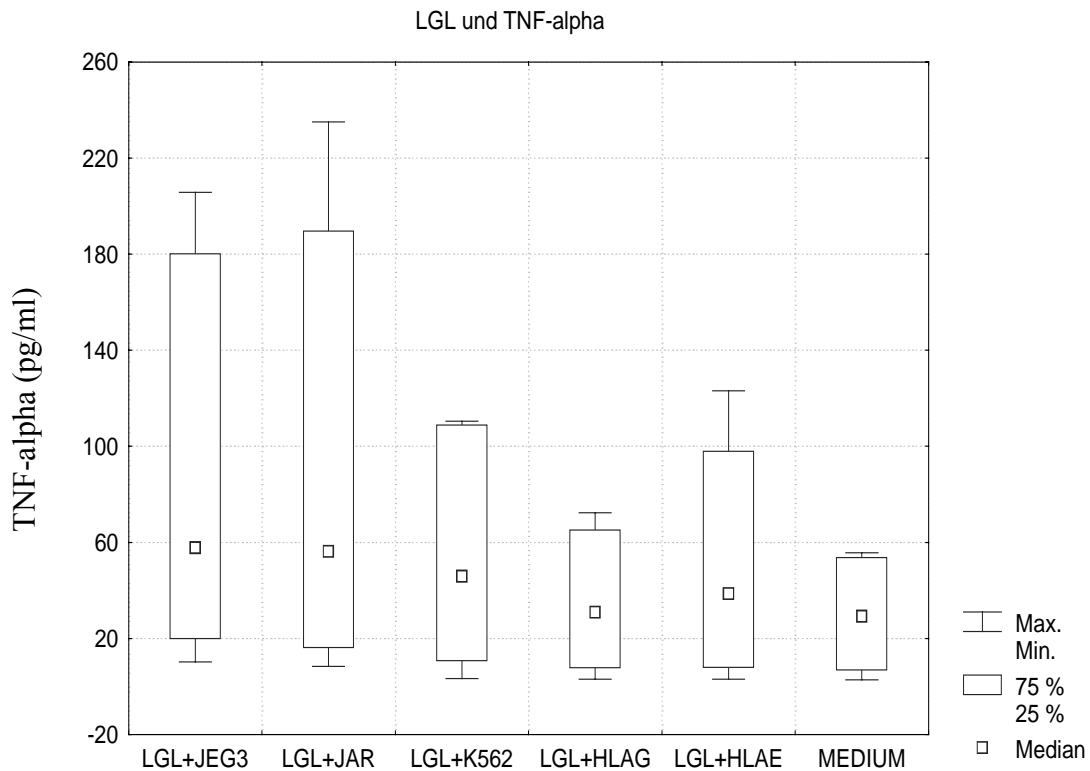


Abb. 12: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von TNF- $\alpha$  bei Kokulturen von LGL mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.1.3 Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)

Aufgrund von GM-CSF-Werten aller einzelnen Proben unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml wurden die Kokulturansätze 3 bis 7 aus der Wertung genommen. Somit kamen nur 11 Ansätze zur Auswertung.

Auch hier produzierte die Einzelkultur von LGL signifikant weniger GM-CSF als alle anderen Kokulturansätze.

#### LGL und JEG-3

Der Median der GM-CSF-Konzentration lag bei 62,3pg/ml, alle Ergebnisse konnten verwertet werden.

### LGL und JAR

Auch hier konnten alle Ergebnisse in die Wertung hineingenommen werden, der Median der GM-CSF-Konzentrationen wurde mit 112,5pg/ml berechnet. Außerdem konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der GM-CSF-Produktion in LGL/JAR zu LGL/JEG erkannt werden.

### LGL und K562

Alle Werte konnten verwendet werden und mit 127,4pg/ml lag der Median der GM-CSF-Konzentration relativ hoch. Bei Kokultur von LGL/K562 konnte eine signifikant erhöhte GM-CSF-Produktion gegenüber LGL/JEG und LGL/K562(HLA-G) erkannt werden.

### LGL und K562(HLA-G)

Bis auf ein Ergebnis lagen alle Ergebnisse über der Nachweisgrenze, der Median der GM-CSF-Konzentration betrug 79,6pg/ml.

### LGL und K652(HLA-E)

Hier wurde der Median der GM-CSF-Konzentration mit 87,6pg/ml berechnet, alle Ergebnisse konnten dabei verwendet werden. Signifikant erhöhte GM-CSF-Produktion konnte gegenüber LGL/JEG und LGL/K562(HLA-G) nachgewiesen werden.

### LGL und Medium

Bei 3 Werten unter der Nachweisgrenze (4pg/ml) ergab sich ein Median der GM-CSF-Konzentration von 21,3pg/ml. Damit wurde bei LGL mit Medium signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger GM-CSF nachgewiesen als bei allen anderen Kokulturen.

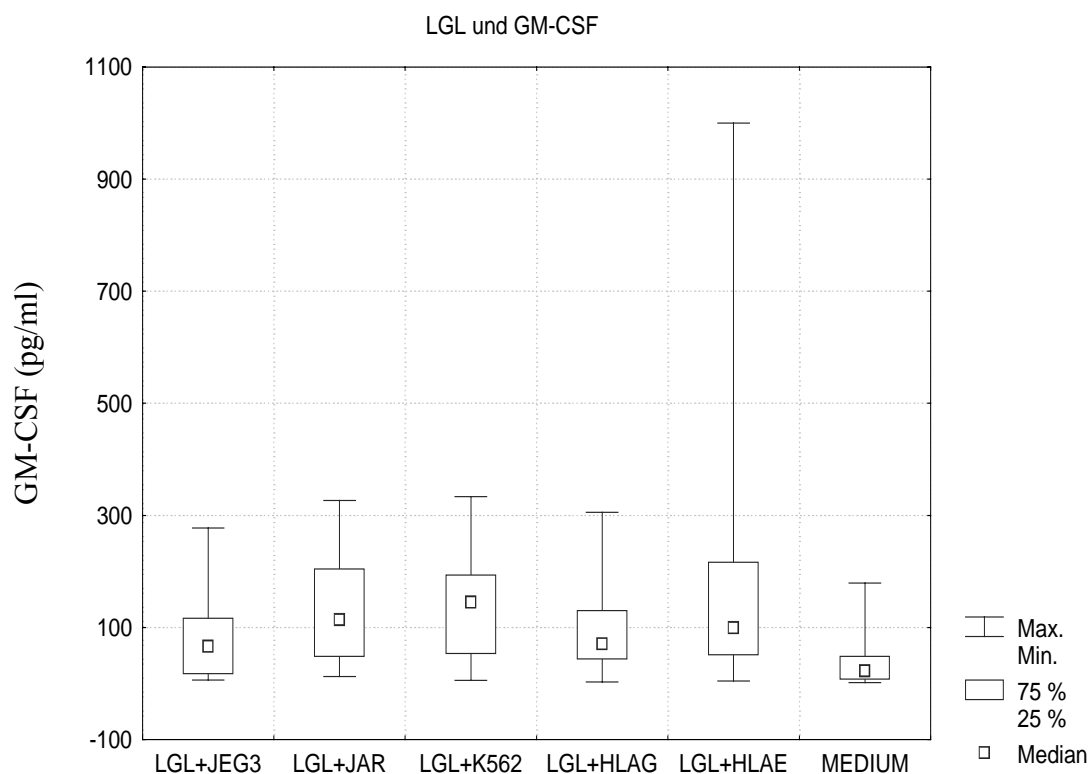


Abb. 13: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von GM-CSF bei Kokulturen von LGL mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.1.4 Interleukin 10 (IL-10)

Die Ansätze 1, 3 bis 7 kamen nicht mit in die Wertung aufgrund von Ergebnissen aller einzelnen Proben unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml. 10 Kokulturansätze wurden ausgewertet.

Auch hier produzierte die Einzelkultur von LGL signifikant weniger IL-10 als alle anderen Kokulturansätze.

#### LGL und JEG-3

Der Median der IL-10-Konzentration bei 8 Ergebnissen über der Nachweisgrenze von 4 pg/ml lag bei 17,9pg/ml. Es konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IL-10-Produktion gegenüber LGL/K562(HLA-G) und LGL/K562(HLA-E) erkannt werden.



### LGL und JAR

Hier konnten alle Ergebnisse verwertet werden, der Median der IL-10-Konzentration wurde mit 24,8pg/ml berechnet. LGL/JAR in Kokultur produzierte signifikant mehr IL-10 als die Kokulturen LGL/K562, LGL/K562(HLA-G) und LGL/K562(HLA-E).

### LGL und K562

Es lagen 9 Ergebnisse über der Nachweisgrenze bei einem Median der IL-10-Konzentration von 21,1pg/ml. Eine signifikant erhöhte IL-10-Produktion konnte gegen LGL /K562(HLA-G) und LGL/K562(HLA-E) nachgewiesen werden.

### LGL und K562(HLA-G)

Der Median der IL-10-Konzentration wurde hier mit 7,7pg/ml berechnet, es konnte allerdings nur 6 von 10 Ergebnissen als über der Nachweisgrenze liegend verwertet werden.

### LGL und K562(HLA-E)

Hier konnten 7 von 10 Ergebnissen verwendet werden. Der Median der IL-10-Konzentration betrug 8,4pg/ml.

### LGL und Medium

Bei 4 Werten unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml konnte ein Median der IL-10-Konzentration von 5,6pg/ml erreicht werden. Damit konnte signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger IL-10 errechnet werden als in allen anderen Kokulturen.

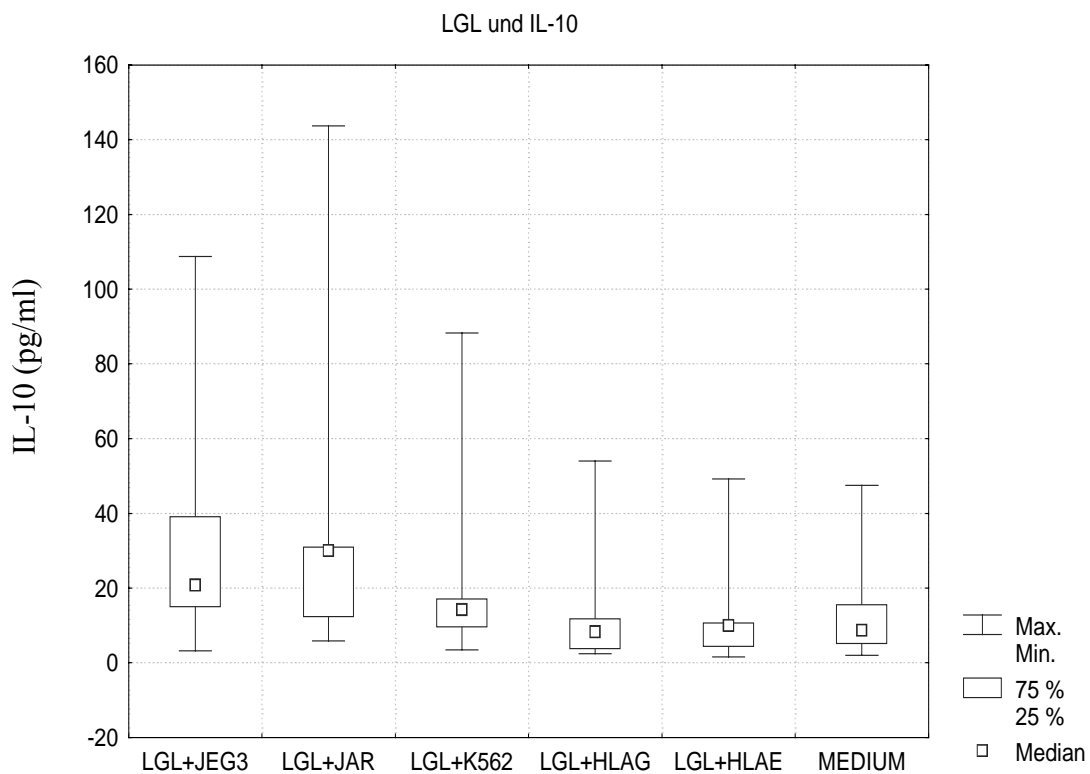


Abb. 14: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-10 bei Kokulturen von LGL mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.1.5 Interleukin 13 (IL-13)

Nur die Ansätze 10 bis 14 konnten als über der Nachweisgrenze liegend verwertet werden. Bei den anderen Proben lagen alle Einzelwerte unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml.

Hier produzierte die Einzelkultur von LGL signifikant weniger IL-13 als alle anderen Kokulturansätze.

#### 3.1.5.1 LGL und JEG-3

Bei 2 Ergebnissen über der Nachweisgrenze von 4pg/ml konnte ein Median der IL-13-Konzentration von 3,6pg/ml als unter der Nachweisgrenze errechnet werden.

#### 3.1.5.2 LGL und JAR

Hier wurde nur 1 Ergebnis aus der Wertung genommen bei einem Median der IL-13-Konzentration von 7,0pg/ml. Es ergab sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IL-13-Konzentration von LGL/JAR gegenüber LGL/JEG-3.

#### 3.1.5.3 LGL und K562

Hier konnten alle Ergebnisse in die Wertung hineingenommen werden, der Median der IL-13-Konzentrationen wurde mit 27,1pg/ml berechnet. Außerdem konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IL-13-Produktion von LGL/K562 zu LGL/K562(HLA-G) erkannt werden.

#### 3.1.5.4 LGL und K562(HLA-G)

Bei 3 verwertbaren Ergebnissen lag der Median der IL-13-Konzentration bei 4,2pg/ml. Es ergab sich eine signifikante Erhöhung der IL-13-Konzentration von LGL/K562(HLA-G) gegenüber LGL/K562(HLA-E).

#### 3.1.5.5 LGL und K562(HLA-E)

Bis auf ein Ergebnis lagen alle Ergebnisse über der Nachweisgrenze, der Median der IL-13-Konzentration betrug 5,7pg/ml.

#### 3.1.5.6 LGL und Medium

Hier lag nur ein Wert der IL-13-Konzentration über der Nachweisgrenze von 4pg/ml bei einem Median unter der Nachweisgrenze (2,0pg/ml). Es wurde signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger IL-13 nachgewiesen als in allen anderen Kokulturen.

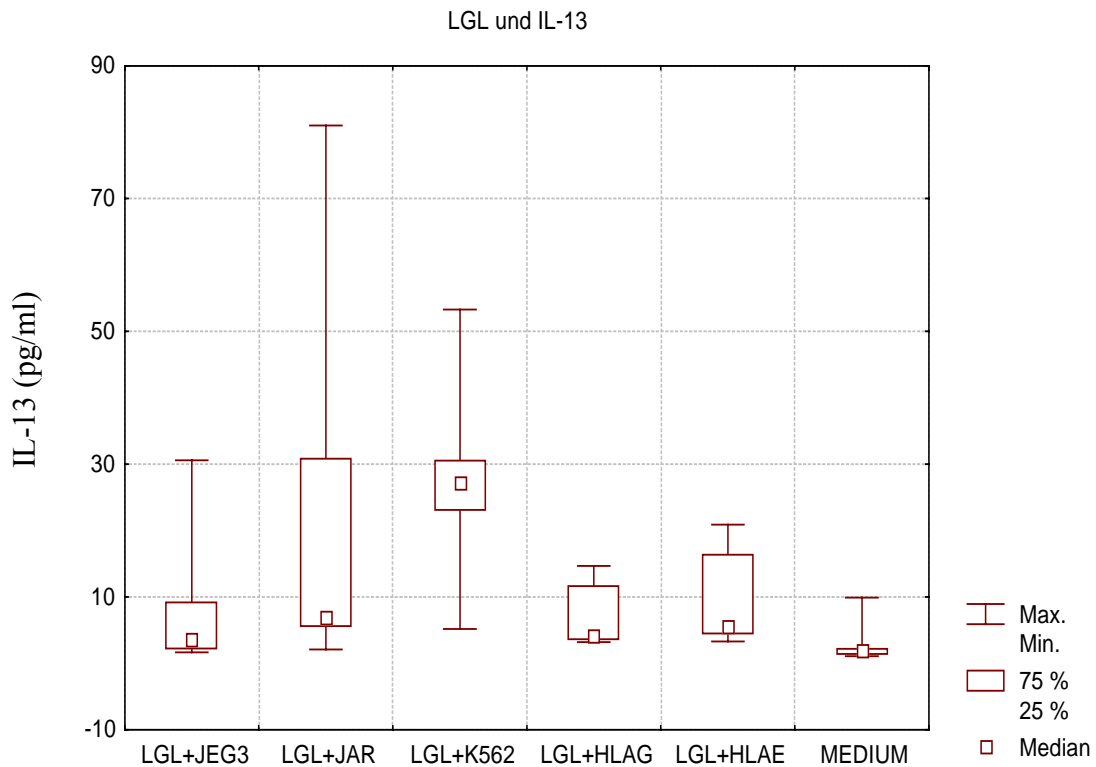


Abb. 13: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-13 bei Kokulturen von LGL mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.1.6 Interleukin 15 (IL-15)

Hier lagen bei allen Koinkubationen die Werte der IL-15-Konzentration über der Nachweisgrenze.

#### LGL und JEG-3

Der Median der IL-15-Konzentration lag bei 8,5pg/ml. Bei der Kokultur von LGL und JEG-3 konnte eine signifikant erhöhte IL-15-Produktion im Vergleich zu allen anderen Kokulturen erkannt werden.

#### LGL und JAR

Bei nur einem nicht-verwertbaren Ergebnis konnte ein Median der IL-15-Konzentration

von 4,9pg/ml errechnet werden. Es ergab sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IL-15-Konzentration von LGL/JAR gegenüber LGL/Medium.

#### LGL und K562

4 Ergebnisse der IL-15-Konzentration lagen unter der Nachweisgrenze mit einem Median der IL-15-Konzentration von 4,6pg/ml.

#### LGL und K562(HLA-G)

Der Median der IL-15-Konzentration lag bei 4,9pg/ml mit 10 Ergebnissen über der Nachweisgrenze von 4pg/ml.

#### LGL und K562(HLA-E)

Hier betrug der Median der IL-15-Konzentration 4,4pg/ml. Es waren 9 Ergebnisse über der Nachweisgrenze.

#### LGL und Medium

Bei nur 8 verwertbaren Ergebnissen konnte ein Median der IL-15-Konzentration von 4,2pg/ml errechnet werden.

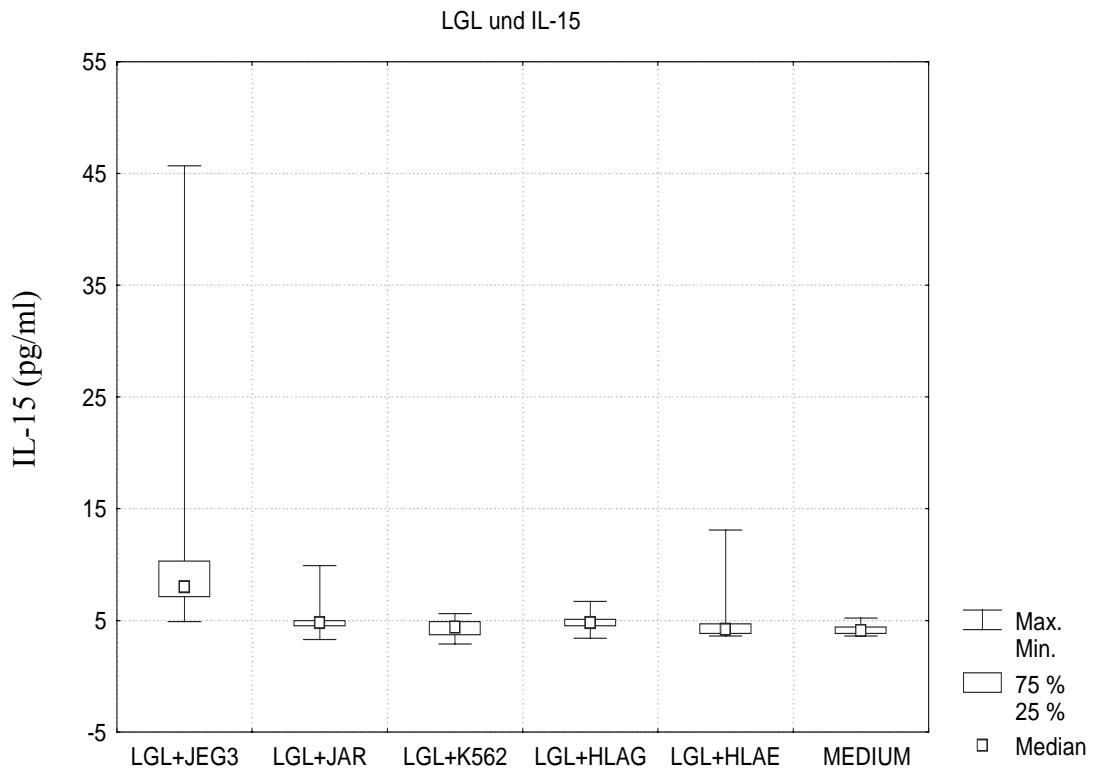


Abb. 16: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-15 bei Kokulturen von LGL mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.1.7 Interleukin-5 (IL-5)

Interleukin-5 konnte in 3 verschiedenen Proben nicht nachgewiesen werden, daher wurde auf weitere Versuche verzichtet und die restlichen Proben für Versuche mit Interleukin-15 verwendet.

## 3.2 WASH

### 3.2.1 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )

Aufgrund von IFN- $\gamma$ -Werten aller einzelnen Proben unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml wurden die Deziduaprobe 1,3,4 und 7 aus der Wertung genommen. Somit wurden 12 Proben ausgewertet.

Bei den Einzelkultur von WASH lag der Wert der IFN- $\gamma$ -Konzentration jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als bei den anderen Koinkubationen.

#### WASH und JEG-3

Bei 2 von 12 Fällen konnte IFN- $\gamma$  nicht nachgewiesen werden. Der Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration lag bei den anderen 10 Fällen bei 15,5pg/ml. Es ergab sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration von WASH/JEG-3 gegenüber der Kokultur von WASH und K562 (HLA-E).

#### WASH und JAR

In allen Fällen konnte eine IFN- $\gamma$ -Konzentration über 4pg/ml nachgewiesen werden mit einem Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration von 47,2pg/ml. Es ließ sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration von WASH/JAR gegenüber WASH/JEG-3, WASH/K562 (HLA-G) und WASH/K562 (HLA-E) feststellen.

#### WASH und K562

Kein Ergebnis der Kokultur von LGL und K562 war unter 4pg/ml. Es ergab sich eine Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration von 108,6pg/ml und es war eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration von WASH/K562 gegenüber WASH/JEG-3, WASH/K562 (HLA-G) und WASH/K562 (HLA-E) zu erkennen.

### WASH und K562 (HLA-G)

Auch hier lag ein Wert der IFN- $\gamma$ -Konzentration unter 4pg/ml, der Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration betrug 10,1pg/ml.

### WASH und K562 (HLA-E)

Ein Ergebnis der IFN- $\gamma$ -Konzentration lag unter der Nachweisgrenze mit einem Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration von 11,8pg/ml.

### LGL und Medium

Bei 4 Werten unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml wurde ein Median der IFN- $\gamma$ -Konzentration von 9,1pg/ml errechnet. Damit lag die IFN- $\gamma$ -Konzentration signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als bei allen anderen Kokulturen.

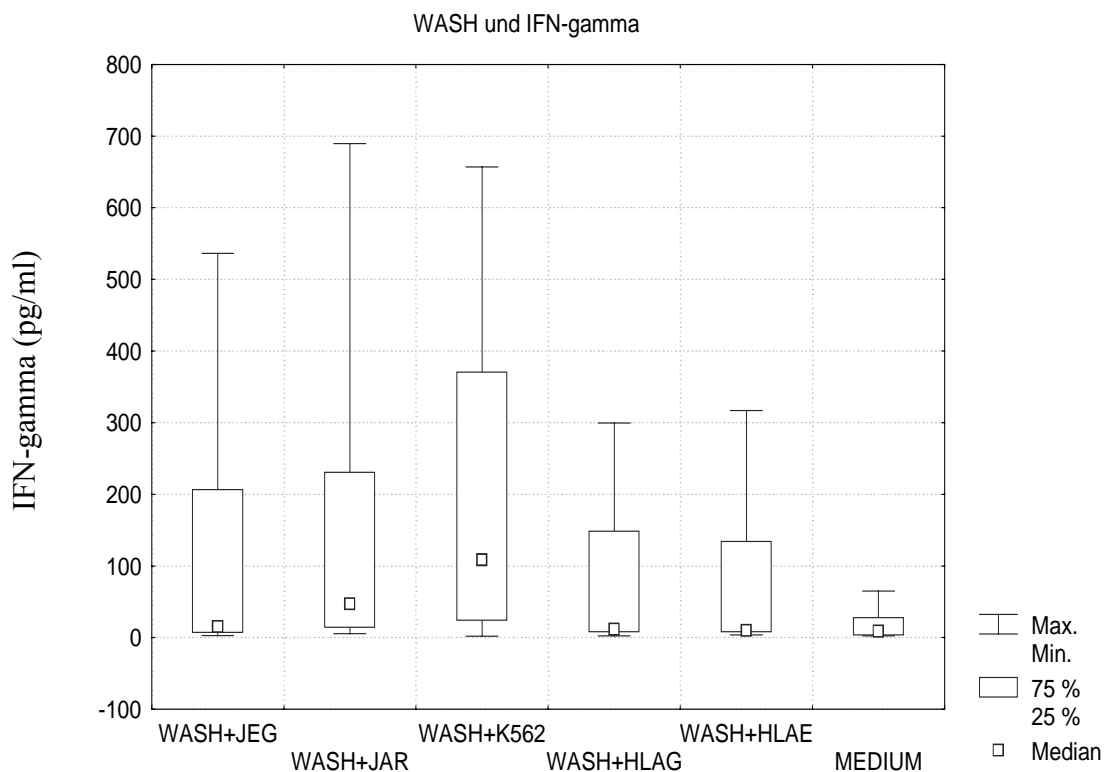


Abb. 17: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IFN- $\gamma$  bei Kokulturen von WASH mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.



### **3.2.2 Tumor-Nekrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )**

Hier lagen bei allen Koinkubationen die Werte der TNF- $\alpha$ -Konzentration über der Nachweisgrenze.

#### WASH und JEG-3

Der Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration betrug 520,6pg/ml. Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentration von WASH/JEG-3 ergab sich gegenüber WASH/K562, WASH/ K562 (HLA-G), WASH/K562 (HLA-E) und WASH/Medium.

#### WASH und JAR

Hier lag der Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration bei 389,0pg/ml und es konnte ebenfalls eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentration von WASH/JAR gegenüber WASH/K562 (HLA-G), WASH/K562 (HLA-E) und WASH/Medium nachgewiesen werden.

#### WASH und K562

Bei einem Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration von 329,6pg/ml wurde eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentration von WASH/K562 gegenüber WASH/K562 (HLA-G), WASH/K562 (HLA-E) und WASH/Medium nachgewiesen werden.

#### WASH und K562 (HLA-G)

Der Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration lag bei 271,6pg/ml. Bei der Kokultur von WASH und K562 (HLA-G) konnte eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion im Vergleich zu allen anderen Kokulturen erkannt werden.

#### WASH und K562 (HLA-G)

Hier betrug der Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration 261,5pg/ml.

### WASH und Medium

Der Median der TNF- $\alpha$ -Konzentration lag bei 288,8pg/ml.

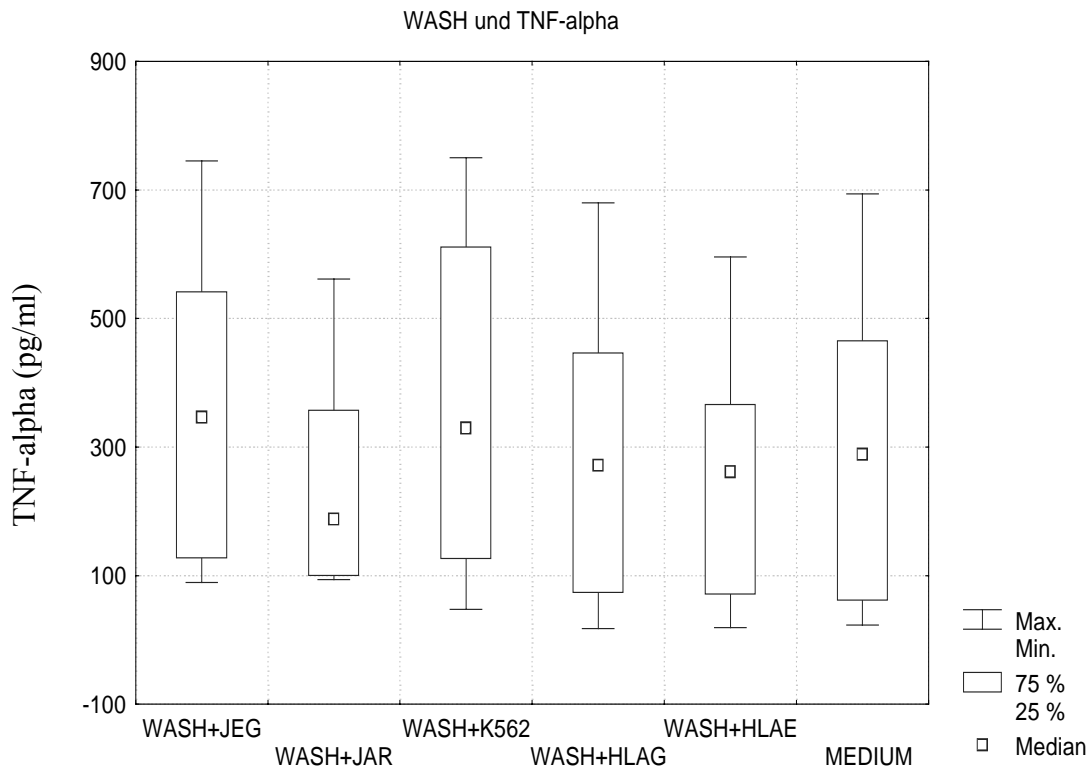


Abb. 18: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von TNF- $\alpha$  bei Kokulturen von WASH mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### **3.2.3 Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)**

Hier lagen bei allen Koinkubationen die Werte der GM-CSF-Produktion über der Nachweisgrenze.

#### WASH und JEG-3

Bei einem Median der GM-CSF-Konzentration von 156,8pg/ml produzierte die Koinkubation von WASH mit JEG-3 signifikant mehr GM-CSF als WASH mit K562 (HLA-E) und WASH mit Medium.

WASH und JAR

Der Median der GM-CSF-Konzentration betrug 134,0pg/ml.

WASH und K562

Hier konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der GM-CSF-Konzentration gegenüber allen anderen Kokulturen nachgewiesen werden. Der Median der GM-CSF-Konzentration betrug 187,4pg/ml.

WASH und K562 (HLA-G)

Bei einem Median der GM-CSF-Konzentration von 156,1pg/ml produzierte die Koinkubation von WASH mit K562 (HLA-G) signifikant mehr GM-CSF als WASH mit K562 (HLA-E).

WASH und K562 (HLA-E)

Ein Median der GM-CSF-Konzentration von 121,4pg/ml konnte errechnet werden.

WASH und Medium

Der Median der GM-CSF-Konzentration lag bei 152,7pg/ml.

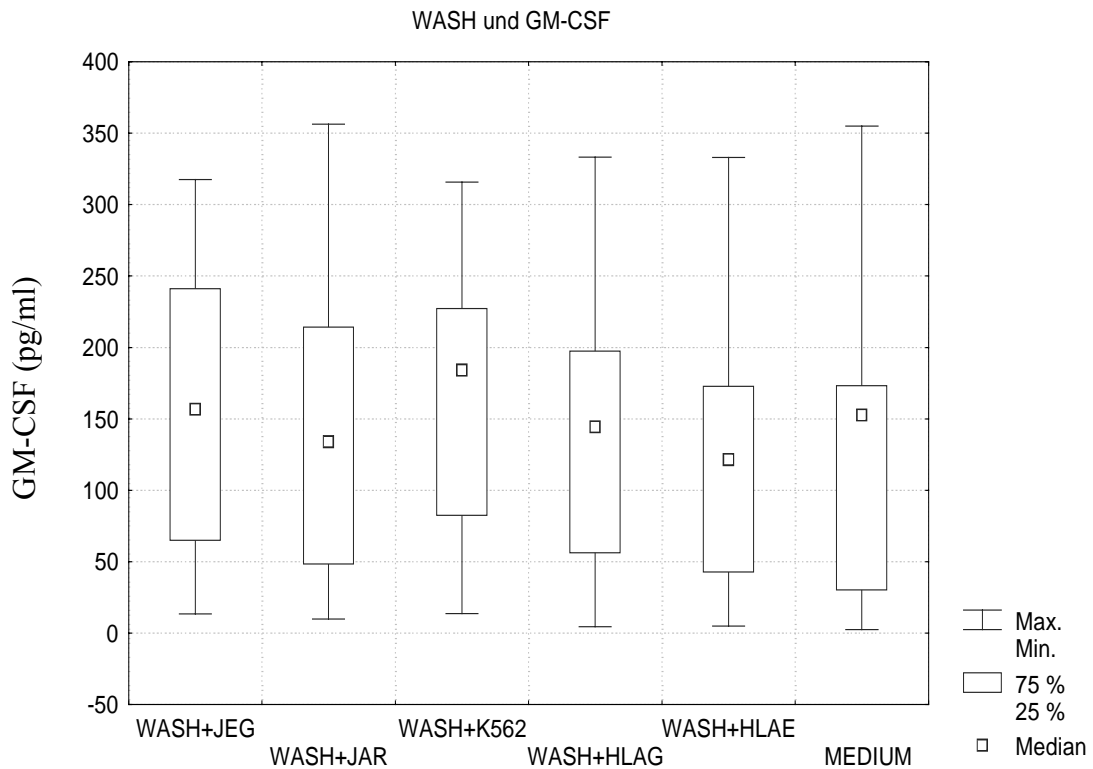


Abb. 19: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von GM-CSF bei Kokulturen von WASH mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.2.4 Interleukin 10 (IL-10)

Hier lagen bei allen Koinkubationen die IL-10-Werte über der Nachweisgrenze von 4pg/ml.

#### WASH und JEG-3

Bei einem Median der IL-10-Konzentration von 408,3pg/ml war in der Koinkubation von WASH mit JEG-3 signifikant mehr IL-10 nachzuweisen als in WASH mit Medium.

WASH und JAR

Der Median der IL-10-Konzentration lag bei 452,6pg/ml. Es ließ sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IL-10-Konzentration von WASH mit JAR gegenüber WASH mit K562 (HLA-G), mit K562 (HLA-E) und mit Medium feststellen.

WASH und K562

Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der IL-10-Konzentration von WASH/K562 ergab sich gegenüber den Kokulturen von WASH mit K562 (HLA-G), mit K562 (HLA-E) und mit Medium bei einem Median der IL-10-Konzentration von 446,9pg/ml.

WASH und K562 (HLA-G)

Der Median der IL-10-Konzentration lag bei 401,3pg/ml.

WASH und K562 (HLA-E)

Der Median der IL-10-Konzentration betrug 352,9pg/ml.

WASH und Medium

Ein Median der IL-10-Konzentration von 342,8pg/ml konnte errechnet werden.

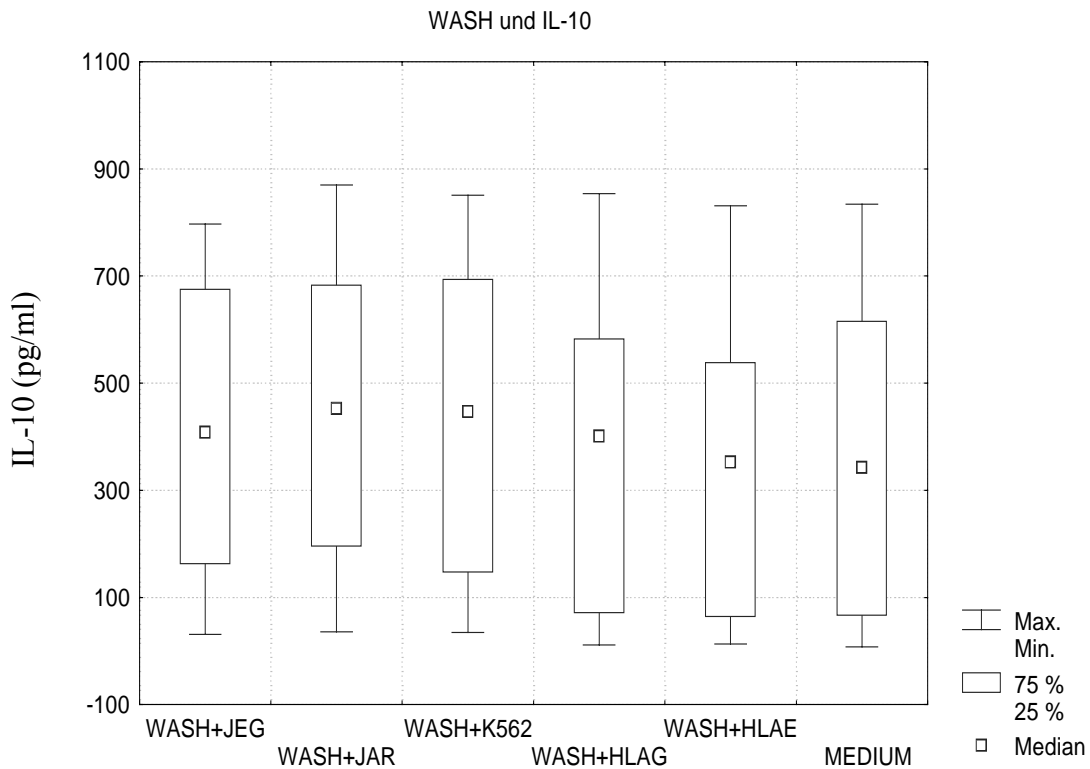


Abb. 20: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-10 bei Kokulturen von WASH mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.2.5 Interleukin 13 (IL-13)

Aufgrund von IL-13-Werten aller einzelnen Proben unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml wurden die Kokulturansätze 1 bis 4, 6, 7, 9 und 13 aus der Wertung genommen. Somit kamen nur 7 Ansätze zur Auswertung.

#### WASH und JEG-3

Der Median der IL-13-Konzentration betrug 2,8pg/ml und lag damit unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml.

#### WASH und JAR

Der Median der IL-13-Konzentration lag bei 4,3pg/ml bei 4 auswertbaren Ergebnissen.

#### WASH und K562

Bei einem Median der IL-13-Konzentration von 8,0pg/ml produzierte die Koinkubation von WASH mit K562 signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr IL-13 als WASH mit JEG-3, WASH mit JAR und WASH mit Medium.

#### WASH und K562(HLA-G)

Der Median der IL-13-Konzentration wurde hier mit 7,6pg/ml berechnet, es konnte allerdings nur 6 von 7 Ergebnissen als über der Nachweisgrenze liegend verwertet werden. Dabei zeigte die Koinkubation von WASH/K562(HLA-G) signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr IL-13 als WASH/JEG-3 und WASH/JAR.

#### WASH und K562(HLA-E)

Bei nur einem nicht-verwertbarem Ergebnis konnte ein Median der IL-13-Konzentration von 6,6pg/ml errechnet werden. Bei der Kokultur von WASH und K562(HLA-E) konnte eine signifikant erhöhte IL-13-Produktion im Vergleich zu WASH/JEG-3, WASH/JAR und WASH/Medium erkannt werden.

#### WASH und Medium

Ein Median der IL-13-Konzentration von 3,2g/ml konnte als unter der Nachweisgrenze von 4pg/ml errechnet werden. Es lagen 3 Ergebnisse über der Nachweisgrenze.

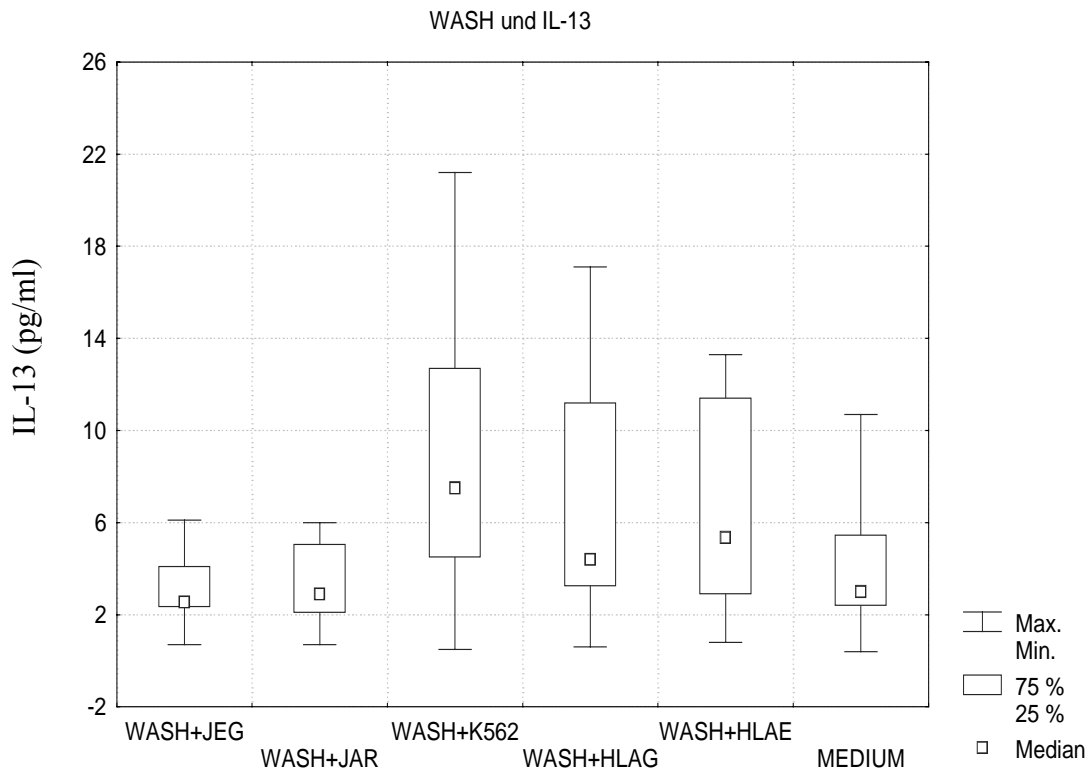


Abb. 21: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-13 bei Kokulturen von WASH mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.2.6 Interleukin 15 (IL-15)

Hier lagen bei allen Koinkubationen die IL-15-Werte über der Nachweisgrenze von 4pg/ml.

#### WASH und JEG-3

Der Median der IL-15-Konzentration lag bei 8,3pg/ml. Bei der Kokultur von WASH und JEG-3 konnte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte IL-15-Produktion im Vergleich zu allen anderen Kokulturen erkannt werden.



WASH und JAR

Bei einem Median der IL-15-Konzentration von 5,7pg/ml konnte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte IL-15-Produktion im Vergleich zu allen anderen Kokulturen gefunden werden.

WASH und K562

Der Median der IL-15-Konzentration lag bei 4,9pg/ml bei 10 auswertbaren Ergebnissen.

WASH und K562(HLA-G)

Bis auf ein Ergebnis lagen alle Ergebnisse über der Nachweisgrenze, der Median der IL-15-Konzentration betrug 5,3pg/ml. Eine signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte IL-15-Konzentration von WASH/K562(HLA-G) konnte gegenüber WASH/K562 nachgewiesen werden.

WASH und K562(HLA-E)

Bei einem Median der IL-15-Konzentration von 5,4pg/ml konnte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte IL-15-Konzentration von WASH/K562(HLA-E) gegenüber WASH/K562 nachgewiesen werden.

WASH und Medium

Der Median der IL-15-Konzentration lag bei 5,0pg/ml.

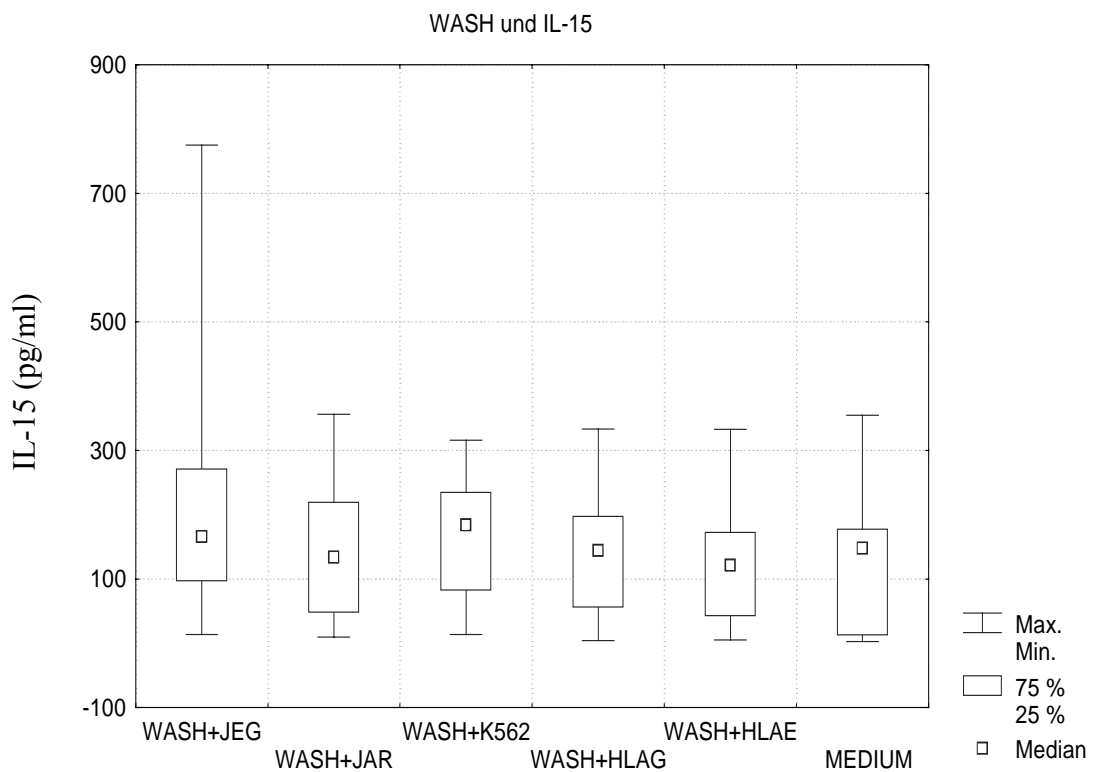


Abb. 22: Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-15 bei Kokulturen von WASH mit JEG-3, JAR, K562, K562 (HLA-G), K562 (HLA-E) und Medium.

### 3.2.7 Interleukin 5 (IL-5)

Interleukin-5 konnte in 3 verschiedenen Proben nicht nachgewiesen werden, daher wurde auf weitere Versuche verzichtet und die restlichen Proben für Versuche mit Interleukin-15 verwendet.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Produktion verschiedener Zytokine durch Large Granular Lymphocytes (LGL) im Rahmen von Kokulturen mit den Zelllinien JEG-3, JAR, K562, K562 (transfiziert mit HLA-G) und K562 (transfiziert mit HLA-E) moduliert werden konnte. Einige Ergebnisse waren dabei ziemlich unerwartet.

Es ist noch immer nicht ganz klar, welche Rolle deziduale LGL in der Immunregulation der Schwangerschaft spielen. Einerseits könnte es sein, dass deziduale LGL als „Natürliche Killerzellen“ (NK) wirken. Dabei könnte der infiltrierende Trophoblast eine Art Zielzelle darstellen, der vermutlich durch die Expression von HLA-G vor der NK-Zell-vermittelten Lyse geschützt ist. Darüber wurden bisher widersprüchliche Ergebnisse publiziert.

So konnten Rouas-Freiss et al. 1997 zeigen, dass K562-Zellen, welche normalerweise von NK-Zellen lysiert werden, sowohl vor Lyse durch deziduale LGL als auch vor Lyse durch NK-Zellen geschützt sind, wenn sie HLA-G exprimieren<sup>62</sup>. Zum anderen konnten Rieger et al. 2002 nachweisen, dass K562-Zellen durch HLA-G-Expression nicht vor der NK-Zell-vermittelten Lyse geschützt sind<sup>63</sup>. Allerdings wurden nur die HLA-G-transfizierten K562-Zellen zerstört, die HLA-E-transfizierten K562-Zellen dagegen wurden vor NK-Zell-vermittelter Lyse verschont. Zudem exprimiert die NK-Zelllinie CD94/NKG2A, den einzigen bekannten Rezeptor für HLA-E<sup>64</sup>, und ILT-2, einen inhibierend wirkenden Rezeptor für HLA-G<sup>65</sup>. Die Expression von HLA-E auf der Zelloberfläche genügt, um ein negatives Signal durch Interaktion mit dem CD94/NKG2A-Rezeptor zu senden<sup>66</sup>, während die HLA-G-Expression in Interaktion mit ILT-2 dieses Signal nicht sendet<sup>65</sup>. Diese Ergebnisse weisen auf verschiedenartige Regulationsmechanismen von Faktoren hin, die in eine Zellzerstörung mittels inhibierender MHC-Klasse-I Rezeptoren involviert sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Choriokarzinomzelllinie JAR (MHC-Klasse-I negativ) ebenso gegen die Lyse durch NK-

Zellen aus dem peripheren Blut geschützt war wie die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 (HLA-G und HLA-C positiv)<sup>63</sup>. Wenn dagegen die NK-Zellen aus dem peripheren Blut mit Interleukin-2 (IL-2) stimuliert wurden, konnten sie beide Zelllinien lysieren<sup>67</sup>. Diese Tatsachen werfen die Frage auf, ob die biologische Funktion von HLA-G nicht größer ist als nur der Schutz von Trophoblastzellen gegen NK-Zell-vermittelte Lyse.

Andererseits haben deziduale LGL nicht nur eine zytotoxische Funktion, sondern produzieren auch verschiedene Zytokine. Möglicherweise schaffen die LGL durch ihre Zytokinproduktion ein Milieu, welches einen Schutz für den fetalen Trophoblast bietet. Man nimmt an, dass die Balance von Th1- und Th2-Zytokinen wichtig ist für den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft<sup>68-70</sup>. Während der Schwangerschaft soll eine Th2-Polarisation stattfinden<sup>71</sup>. Es könnte daher sein, dass HLA-G auf fetalem Trophoblast die Zytokinfreisetzung von dezidualen LGL moduliert. Dazu konnte gezeigt werden, dass HLA-G-Expression auf 721.221-Lymphozyten die Zytokinfreisetzung von dezidualen und peripheren Blutzellen in Richtung Th2 polarisierte<sup>72</sup>. Während der Schwangerschaft wurden weniger Th1-Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-2 (IL-2) produziert, dagegen aber mehr Th2-Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4)<sup>72</sup>. In einer normalen Schwangerschaft konnte auch eine gesteigerte Produktion von Interleukin-10 (IL-10) und eine verminderte Produktion von Interleukin-12 (IL-12) erkannt werden<sup>73</sup>. Zusätzlich konnte herausgefunden werden, dass eine Dominanz von Th1-Zytokinen und eine Herunterregulation von Th2-Zytokinen während der Schwangerschaft zum Beispiel zu unerklärlichen wiederholten Aborten<sup>74-77</sup> und zu Präeklampsie<sup>78</sup> führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Herabregulation der gemessenen Zytokine nachgewiesen werden, die möglicherweise durch HLA-G-Expression auf K562 verursacht wurde. Dabei wurden sowohl die Th1-Zytokine „Tumor Nekrose Faktor-alpha“ (TNF- $\alpha$ ) und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) als auch die Th2-Zytokine wie „Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor“ (GM-CSF), Interleukin-10 (IL-10), IL-13 und IL-15 unterdrückt wenn LGL mit HLA-G transfizierten K562 Zellen kultiviert wurden. Mit den untransfizierten K562 Zellen konnte für keines der getesteten Zytokine eine Herabregulation nachgewiesen werden. Im Gegenteil, die Kokulturen von LGL mit

untransfizierten K562-Zellen führten sogar zu einem dramatischen Anstieg der Zytokinproduktion im Vergleich zu Kontroll-LGL.

Über die Rolle von HLA-E an der feto-maternalen Grenzzone ist noch weniger bekannt als über die von HLA-G. Hier kam man zu der Annahme, dass HLA-E dafür verantwortlich sein könnte, dass das Immunsystem eine normale Produktion von HLA-Klasse-I-Molekülen zeigt. Dieser Vorgang wird während viraler Infektionen und in einigen Tumoren gehemmt<sup>79</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die HLA-E-Expression auf 721.221-Zellen inhibierend auf die zytotoxische Aktivität von dezidualen NK-Zellen wirkte<sup>80</sup>, aber derzeit gibt es keine weiteren Information über den Einfluss von HLA-E auf die Zytokinproduktion von anderen immunkompetenten Zellen. So wie HLA-G- reduzierte auch HLA-E-Expression auf K562-Zellen die Zytokinproduktion in unseren Modell-Versuchen, aber, mit Ausnahme von IL-10, ohne statistische Signifikanz. Dabei konnte aber nur eine geringe Anzahl an Kulturüberständen mit messbaren Konzentrationen von IL-13 ausgewertet werden.

Das unterschiedliche Ausmaß der Reduktion der Zytokinausschüttung von HLA-G und HLA-E kann möglicherweise auch durch unterschiedliche Rezeptoren auf LGL erklärt werden. Ein bekannter Rezeptor für HLA-G1 ist dabei ILT2/LIR-1, der ein negatives Signal vermittelt, das die Zerstörung durch NK-Zellen verhindert<sup>81</sup>. Ein weiterer Rezeptor für HLA-G ist KIRp49<sup>82</sup>. HLA-E reagiert mit dem Rezeptorkomplex CD 94/NKG2<sup>83</sup> und bietet Schutz vor NK-Zell-vermittelter Lyse<sup>84</sup>.

Die Chorionkarzinomzellen zeigten andere Ergebnisse. Die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 (HLA-G und HLA-C positiv) zeigte eine Unterdrückung der TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ -, GM-CSF- und IL-13-Produktion aber eine Erhöhung der IL-10- und IL-15-Produktion gegenüber JAR (MHC-Klasse-I negativ). Dieses Ergebnis könnte daran liegen, dass die beiden Chorionkarzinomzelllinien JEG-3 und JAR möglicherweise selbst zur Zytokinproduktion beitragen oder durch andere Mechanismen eine Veränderung der Resultate bewirken und daher nicht das ideale Modell für invasive Trophoblastzellen darstellen.

## 4.1 Feststellung zu den einzelnen Zytokinen

### 4.1.1 Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )

IFN- $\gamma$  ist ein Th1-Zytokin, das die zelluläre Immunität von NK-Zellen steigert. Zusätzlich hat es noch eine anti-virale Wirkung.

Saito et al.<sup>85</sup> hatten 1993 in Kulturen von LGL m-RNA nachgewiesen, die für IFN- $\gamma$  kodiert. Damit wären LGL also in der Lage, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Wie allerdings die IFN- $\gamma$ -Freisetzung reguliert wird, also möglicherweise durch das Zusammenspiel von LGL und Zellen, die HLA-G und HLA-E exprimieren, war zu diesem Zeitpunkt noch kein Thema seiner Untersuchungen.

Kanai et al.<sup>64</sup> hatten 2001 zeigen können, dass deziduale Leukozyten die Freisetzung von IFN- $\gamma$  herabsetzen, wenn sie mit Zellen kokultiviert werden, die HLA-G exprimieren. Unter den dezidualen Leukozyten befanden sich dabei ein kleiner Teil T-Lymphozyten, Makrophagen und zum größten Teil CD56<sup>++</sup>-Lymphozyten, die LGL. Kanai et al. hatten dabei allerdings nicht unterschieden, ob T-Lymphozyten, Makrophagen oder LGL die Freisetzung von IFN- $\gamma$  herabsetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden LGL durch einen Magnetzellseparator von den anderen dezidualen Leukozyten getrennt. Die übrig gebliebenen Zellen wurden als WASH bezeichnet. In Kokulturen von LGL und WASH mit jeweils K562, K562(HLA-E) und K562(HLA-G) wurde die IFN- $\gamma$ -Freisetzung durch ELISA gemessen werden. Dabei stellte sich heraus, dass in Kokulturen von LGL mit K562(HLA-G) signifikant weniger IFN- $\gamma$  freigesetzt wurde als in Kokulturen von LGL mit K562 und LGL mit K562(HLA-E). Bei den Kokulturen von WASH mit K562, K562(HLA-G) und K562(HLA-E) konnte dagegen kein signifikanter Unterschied in der IFN- $\gamma$ -Freisetzung gemessen werden. HLA-G konnte damit also die IFN- $\gamma$ -Freisetzung von LGL, nicht aber die von WASH herunterregulieren. Die Freisetzung eines Th1-Zytokines wie IFN- $\gamma$ , welches als nicht schwangerschaftsförderlich angesehen wird, wird unterdrückt. Damit könnte es zu einer Herabregulation der Aktivität von LGL kommen und der Fetus wäre vor Angriffen

durch diese Zellen geschützt.

Dazu konnten Saito et al. dann im Jahre 1999<sup>78</sup> eine erhöhte Freisetzung von Th1-Zytokinen wie IFN- $\gamma$  aber auch IL-2 und TNF- $\alpha$  und eine erniedrigte Freisetzung von Th2-Zytokinen wie IL-4 bei Frauen mit einer Präeklampsie in der Schwangerschaft nachweisen. Eine Präeklampsie ist eine sehr ernste Erkrankung während der Schwangerschaft mit Hypertonie, Proteinurie und Ödemen, die im schlimmsten Fall zum Tod von Mutter und Fetus führen kann. Wenn eine Mutter schon einmal eine Präeklampsie während der Schwangerschaft erlitten hat, ist die Wahrscheinlichkeit für das nochmalige Auftreten einer Präeklampsie bei einer erneuten Schwangerschaft erhöht. Das könnte damit in Zusammenhang stehen, dass eine Regulationsstörung in der Immunantwort der Mutter eine regelhafte Implantation verhindert. Dies könnte bedeuten, dass eine gestörte Interaktion zwischen der Mutter und dem sich entwickelndem Trophoblast in der Frühschwangerschaft die IFN- $\gamma$ -Konzentration ansteigen lässt, dadurch der Trophoblast nicht tief genug in die Dezidua einwachsen kann und es dann im Verlauf der Schwangerschaft zu einer Präeklampsie kommt.

#### **4.1.2 Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  gehört zur Gruppe der inflammatorischen Th1-Zytokine. Es hemmt unter anderem die Zellmotilität des Trophoblasten und verhindert damit die fetale Trophoblastinvasion.

Außerdem unterdrückt TNF- $\alpha$  das Wachstum des Trophoblasten indem es seine Penetration in die Dezidua verhindert<sup>86</sup>. Auch die Induktion des apoptotischen Zelltodes von villösen Trophoblastzellen kann durch TNF- $\alpha$  erfolgen<sup>87</sup>.

Damit wäre also eine hohe TNF- $\alpha$ -Konzentration wohl eher schädlich für den Verlauf einer Schwangerschaft. In den vorliegenden Versuchen konnten wir nachweisen, dass HLA-G auf K562 in Kokultur mit LGL die TNF- $\alpha$ -Produktion im Vergleich zu Kokulturen von K562 mit LGL unterdrückte. Auch JEG-3 mit LGL zeigte denselben Effekt im Vergleich zu JAR. Im Einklang damit befindet sich auch die Publikation von Maejima

et al. im Jahre 1997<sup>88</sup>. Darin wurde festgestellt, dass ein direkter Kontakt von HLA-G-exprimierenden Trophoblastzellen mit mütterlichen Lymphozyten die Zytokinfreisetzung dieser Zellen beeinflusst. Insbesondere wird die TNF- $\alpha$ -Freisetzung herunterreguliert, was zu einer erfolgreichen Schwangerschaft führen kann.

Saito et al.<sup>78</sup> konnten dazu 1999 noch zeigen, dass eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Freisetzung (wie auch IFN- $\gamma$ -Freisetzung) von stimulierten und unstimulierten kultivierten Leukozyten des peripheren Blutes mit dem Ausbruch einer Präeklampsie in der Schwangerschaft zusammenhängt. Zusätzlich konnte er nachweisen, dass die Höhe des Blutdruckes mit der Höhe der Konzentration an Th1-Zytokinen wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  positiv korreliert<sup>78</sup>.

Auch das unterstützt unsere Ergebnisse, die eine Unterdrückung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch HLA-G-Exprimierung zeigen. Diese Unterdrückung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung könnte wichtig für den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft sein.

#### **4.1.3 Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)**

GM-CSF ist ein klassisches hämatopoetisches Zytokin, von dem man annimmt, dass es das Wachstum und die Entwicklung der Plazenta fördert.

Jokhi et al.<sup>89</sup> konnten 1994 dazu nachweisen, dass JEG-3 und JAR alleine kein GM-CSF produzieren, was auch in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte. Sowohl fetale Trophoblastzellen als auch LGL sind seit Jokhi et al. als GM-CSF-Produzenten bekannt. Dazu konnte festgestellt werden, dass LGL die Hauptproduzenten von GM-CSF sind und auch deutlich mehr GM-CSF produzieren als Leukozyten, die aus dem peripheren Blut isoliert wurden. Dabei wurde allerdings nicht darauf eingegangen, ob die Kokultivierung von LGL mit Zellen, die HLA-G oder HLA-E exprimieren, die GM-CSF-Freisetzung irgendwie beeinflusst.



In unseren Untersuchungen haben wir feststellen können, dass HLA-G die GM-CSF-Produktion unterdrücken kann. Dabei wiesen sowohl Kokulturen von JEG-3 mit LGL im Vergleich zu Kokulturen von JAR mit LGL als auch Kokulturen von K562(HLA-G) mit LGL im Vergleich zu Kokulturen von K562 mit LGL und K562(HLA-E) mit LGL eine erniedrigte GM-CSF-Rate auf.

Über die Rolle von GM-CSF in der Schwangerschaft wurden schon viele Untersuchungen angestellt. Gab man Mäusen mit einem hohen Abort-Risiko GM-CSF, konnte die Rate an fetalen Todesfällen deutlich gesenkt werden<sup>90</sup>. In vitro konnte GM-CSF die Apoptose und den programmierten Zelltod von reifen myeloiden Zellen verhindern<sup>91-93</sup>. Es wäre also möglich, dass GM-CSF einen ähnlichen Effekt auf menschliche Trophoblastzellen hat. Zudem konnte ein gewisser Einfluss von GM-CSF auf die Invasion und die Metastasierung von frisch isolierten Tumorzellen und Tumorzelllinien nachgewiesen werden<sup>94,95</sup>. Da fetale Trophoblastzellen ähnlich dem Tumorwachstum in die maternale Dezidua einwachsen, könnte GM-CSF auch dem Trophoblasten das Eindringen in fremdes Gewebe erleichtern.

Bisher wurde also in mehreren Publikationen nachgewiesen, dass GM-CSF wohl eher förderlich für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist. Daher ist es für uns nur schlecht zu erklären, warum bei unseren Experimenten die HLA-G-Expression sowohl auf JEG-3 als auch auf K562 zu erniedrigten GM-CSF-Konzentrationen führte. Ein möglicher Erklärungsversuch dafür wäre, dass normalerweise auch der fetale Trophoblast zur GM-CSF-Produktion beitragen kann. Da aber unsere Experimente nicht mit fetalem Trophoblasten sondern mit Chorionkarzinom- und transfizierten Leukämiezelllinien durchgeführt wurden, wäre es möglich, dass diese Zelllinien nicht in dem Ausmaß zur GM-CSF-Produktion beitragen wie fetale Trophoblastzellen, aus Gründen, die wir im Moment nicht nachvollziehen können.

Es wäre aber auch möglich, dass GM-CSF zwar schwangerschaftsförderlich ist, aber eine geringere Menge an GM-CSF ausreicht, um eine Schwangerschaft erfolgreich werden zu lassen. Denn es besteht auch die Möglichkeit, dass ein zuviel an GM-CSF sich wiederum schädlich auf das Gleichgewicht der Zytokine auswirken könnte.

Zum anderen könnte es natürlich auch sein, dass sich die Leukämiezelllinie K562, die entweder mit HLA-G oder mit HLA-E transfiziert ist, unterschiedlich verhält als der Trophoblast, der gleichzeitig HLA-C, HLA-G und HLA-E exprimiert.

#### **4.1.4 Interleukin 10 (IL-10)**

IL-10 ist ein Zytokin, welches die Bildung von IFN- $\gamma$  inhibiert und auch die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  hemmt. Es hat wahrscheinlich anti-inflammatorische Eigenschaften und könnte damit für das Überleben des Fetus im Mutterleib vorteilhaft sein<sup>96</sup>.

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass sowohl HLA-G- als auch HLA-E-Expression auf K562 in Kokulturen mit LGL signifikant weniger IL-10 produzierten als K562 in Kokultur mit LGL.

Dazu beobachteten Kanai et al.<sup>97</sup>, dass membrangebundenes HLA-G die IL-10-Freisetzung von Leukozyten des peripheren Blutes nicht beeinflusste, lösliches HLA-G dagegen die IL-10-Freisetzung erhöhte. Dies ist mit unseren Ergebnissen scheinbar nicht in Einklang zu bringen. Allerdings hatten Kanai et al. nur Leukozyten aus dem peripheren Blut verwendet, wir dagegen LGL aus der mütterlichen Dezidua. Es könnte daher sein, dass mit den jeweils anderen Zellen in den Versuchen die Übereinstimmung gegeben wäre.

Warum IL-10 aber herunterreguliert wird, und zwar sowohl durch HLA-G- als auch durch HLA-E-Expression, wurde uns nicht ganz klar. Eigentlich werden IL-10 anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Es könnte allerdings sein, dass IL-10 zusätzlich andere Eigenschaften hat, die einer Schwangerschaft schädlich wären. Die wahrscheinlicher Möglichkeit ist aber, dass der Trophoblast einfach unspezifisch die Freisetzung aller Zytokine, also auch von IL-10 drosselt, aus Gründen, die wir zum derzeitigen Stand der Wissenschaft noch nicht erklären können. Dies würde zu den anderen Ergebnissen passen, die eine Herunterregulation der Th1-Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und der Th2-Zytokine IL-10, IL-13 und GM-CSF zeigen.

#### **4.1.5 Interleukin 13 (IL-13)**

IL-13 ist ein Th2-Zytokin, welches unter anderem die Produktion inflammatorischer Zytokine hemmt. Mit dieser Eigenschaft wäre dieses Zytokin also eher schwangerschaftsförderlich. Dazu mussten wir aber in der vorliegenden Arbeit feststellen, dass HLA-G-Exprimierung die IL-13-Freisetzung von LGL drosselte. Unbeeinflusst durch HLA-G blieb dagegen die IL-13-Freisetzung von WASH. Dieses Ergebnis kam überraschend, da man bisher davon ausging, dass IL-13 als schwangerschaftsförderliches Th2-Zytokin hochreguliert wird. Die Herunterregulation von IL-13 lässt nun zum einen die Vermutung zu, dass eine erhöhte IL-13-Freisetzung nicht zwingend für eine erfolgreiche Schwangerschaft erforderlich ist, zum anderen wäre es auch möglich, dass IL-13 nicht so schwangerschaftsförderlich ist wie bisher angenommen. Zum dritten wäre auch die Möglichkeit gegeben, dass Trophoblasten ganz unspezifisch die Zytokinfreisetzung der LGL drosseln und damit die komplette Immunantwort der Mutter herunterregulieren. Leider gibt es bisher keine Studien, die sich mit der IL-13-Freisetzung von mit HLA-G stimulierten LGL befassen. Damit ist ein Vergleich mit anderen Untersuchungen nicht gegeben.

#### **4.1.6 Interleukin 15 (IL-15)**

IL-15 ist ein Zytokin der Th2-Familie, das die Apoptose von Zellen verhindern kann. Da aber in unseren Experimenten nur wenige Ergebnisse oberhalb der Nachweisgrenze waren, kann dieser Versuch nur begrenzt ausgewertet werden. Erkennen konnte man, dass die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3, die HLA-G exprimiert, signifikant mehr IL-15 produziert als alle anderen Kokulturen.

Kokulturen von LGL mit K562 (HLA-G) scheinen im Diagramm eine leicht höhere IL-15-Produktion zu zeigen als LGL mit K562, allerdings ohne statistische Signifikanz. Somit könnte man eine Hochregulation von IL-15 durch HLA-G-Expression annehmen, was wir aber aufgrund der zu geringen auswertbaren Ergebnisse um Fehler zu vermeiden nicht machen werden.

## 4.2 Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass HLA-G- und teilweise auch HLA-E-Expression auf kokultivierten K562-Zellen die Zytokinfreisetzung von isolierten dezidualen CD 56<sup>++</sup> LGL unterdrückt, was zusammen mit ihrer NK-inhibierenden Funktion einen generellen immunsuppressiven Effekt ausmacht. Der genaue Interaktionsmechanismus zwischen MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Trophoblastzellen mit dezidualen NK-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Expression von HLA-G auf verschiedenen Zelllinien, wie z. B. auf JEG-3 und K562, haben ähnliche Effekte auf kokultivierte deziduale LGL. Weitere Forschung ist notwendig, um herauszufinden, welcher Rezeptor die Zytokinfreisetzung von dezidualen LGL reguliert.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Implantation des Embryos in den Uterus interagieren fetale Trophoblastzellen mit maternalem Endometrium. Dabei kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, die von großer Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort sind und von allen immunkompetenten Zellen sezerniert werden. Wird diese Interaktion gestört, kann es zu Aborten, Präeklampsie und Plazenta accreta kommen.

Der in das maternale Endometrium einwachsende Fetus findet während einer normal verlaufenden Schwangerschaft eine Umgebung vor, die sein Eindringen erleichtert. Wahrscheinlich wird im Uterus durch die Dezidua und die Expression der nichtklassischen HLA-G- und HLA-E-Moleküle ein Milieu geschaffen, das dem fetalen Trophoblasten ein Einwachsen ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen die Chorionkarzinomzelllinien JEG-3 (exprimiert HLA-C und HLA-G) und JAR (MHC-Klasse I negativ, exprimiert HLA-E), zum anderen die Leukämiezelllinien K562 (untransfiziert), K562 (mit HLA-G transfiziert) und K562 (mit HLA-E transfiziert) als Modell für den fetalen Trophoblasten verwendet. In Kokulturen dieser Zelllinien mit dezidualen Large Granular Lymphocytes (LGL, CD 56<sup>++</sup>) sowie LGL freier Dezidua (WASH) wurde die Expression der Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-15 gemessen.

Dabei zeigte die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 (HLA-C und HLA-G positiv) eine Unterdrückung der TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ -, GM-CSF- und IL-13-Produktion, aber eine Erhöhung der IL-10- und IL-15-Produktion gegenüber JAR (MHC-Klasse-I negativ, HLA-E positiv). Möglicherweise tragen aber die Chorionkarzinomzelllinien selbst zur Zytokinproduktion bei oder bewirken durch andere, noch nicht bekannte Mechanismen, eine Veränderung der Resultate.

Im Vergleich mit Kokulturen von LGL mit der untransfizierten Leukämiezelllinie K562 produzierten Kokulturen mit Leukämiezellen, die HLA-G exprimieren, signifikant weniger Zytokine (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-10, IL-13 und IL-15). Wurden dagegen LGL mit K562-Zellen kokultiviert, die mit HLA-E transfiziert waren, konnte keine signifikante Reduktion der Zytokinproduktion gemessen wird.

In diesen Untersuchungen präsentierten also mit HLA-G transfizierte Zellen und in geringerem Maße auch mit HLA-E transfizierte Zellen eine Zytokinfreisetzung, die nicht mit der bisherigen Überzeugung übereinstimmen, nach der es für eine erfolgreiche Schwangerschaft notwendig ist, dass Th1-Zytokine herabreguliert und Th2-Zytokine heraufreguliert werden. In dieser Arbeit konnte eine generelle Herabregulation aller Zytokine durch die Präsentation von HLA-G auf K562-Zellen erkannt werden.

## 6. Verzeichnis der Abkürzungen

A	Arterie
Aa	Arterien
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
B-Lymphozyten	Bone Marrow (Knochenmark) geprägte Lymphozyten
B-Zellen	Kurzform für B-Lymphozyten
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca./Ca.	circa/Circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CTB	Cytotrophoblast
dazu geg.	dazu gegeben
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbend-Assay
et al.	et altera (und andere)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fetal-Calf-Serum (fötales Kälberserum)
g	je nach Zusammenhang Gramm oder Erdanziehungskraft g
gez.	gezählt
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin

HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin(e)
ILT	Immunglobulin-Like-Transcript
kD	kilo Dalton
KIR	Killer-Inhibitory-Receptor
LAK	Lymphokine-Activated Killer
LGL	Large Granular Lymphocyte(s)
m	membrangebunden
MACS	Magnetic-Cell-Sorting
MAF	Makrophagenaktivierender Faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
pg	Pikogramm
Polyglob.	Polyglobulin
RPMI	Rosewell Park Memorial-Institut
RT	Raumtemperatur
s	soluble (löslich)



sec.	Sekunde
sog.	sogenannte
SSW	Schwangerschaftswoche
TCR	T-Cell-Receptor
tg	tiefgefroren
TGF	Transforming-Growth-Factor
Th-Zellen	Thymus-abhängige Helferzellen
T-Lymphozyten	Thymus-abhängige Lymphozyten
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Necrosis-Factor
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Vene
Vv	Venen
WASH	Zellgemisch ohne CD 56 <sup>++</sup> -Zellen
Well	Vertiefung
z. B.	zum Beispiel

<b>7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>		<b>Seite</b>
Abbildung 1	verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung (6.-7. Tag)	5
Abbildung 2	verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung (7.-8. Tag)	5
Abbildung 3	verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung (8.-9. Tag)	5
Abbildung 4	verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung (12.-15.Tag)	5
Abbildung 5	verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung 15.-21. Tag	5
Abbildung 6	verschiedene Stadien der Implantation und Plazenta-Entwicklung 18. Tag – Geburt	5
Abbildung 7	Menschlicher Keim nach vollendeter Implantation	7
Abbildung 8	Large Granular Lymphocytes (LGL)	11
Abbildung 9	Large Granular Lymphocytes (LGL)	11
Abbildung 10	Schematische Darstellung des Implantationsbereichs	13
Abbildung 11	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IFN- $\gamma$ in Bezug auf LGL	39
Abbildung 12	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von TNF- $\alpha$ in Bezug auf LGL	41
Abbildung 13	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von GM-CSF in Bezug auf LGL	43
Abbildung 14	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-10 in Bezug auf LGL	45
Abbildung 15	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-13 in Bezug auf LGL	47
Abbildung 16	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-15 in Bezug auf LGL	49

Abbildung 17	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IFN- $\gamma$ in Bezug auf WASH	51
Abbildung 18	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von TNF- $\alpha$ in Bezug auf WASH	53
Abbildung 19	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von GM-CSF in Bezug auf WASH	55
Abbildung 20	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-10 in Bezug auf WASH	57
Abbildung 21	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-13 in Bezug auf WASH	59
Abbildung 22	Box-Whisker-Plot für Konzentrationen von IL-15 in Bezug auf WASH	61
Tabelle 1	Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Zytokine	22
Tabelle 2	Herkunft der Zellen für die Kokultorexperimente	23
Tabelle 3	Benötigte Lösungen und Medien	26
Tabelle 4	Die einzelnen Proben (1)	31
Tabelle 5	Die einzelnen Proben (2)	32
Tabelle 6	Lösungen für TNF- $\alpha$ ELISA	33
Tabelle 7	Zytokine für ELISA	36

## 8. Literaturverzeichnis

1. Marzusch, K. and Steck, T. (1998) **Immunologische Vorgänge im Rahmen der Dezidualisation und beginnenden Plazentation.** *Gynäkologe*, **31**, 1-7.
2. Larsen, B. (1983) **Host defence mechanisms in obstetrics and gynaecology.** *Clin Obstet Gynaecol*, **10 (1)**, 37-64.
3. King, A., Burrows, T.D., Hiby, S.E., Bowen, J.M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P.B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A. Uchanska-Ziegler, B. and Loke, Y.W. (2000b) **Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast.** *Placenta*, **21**, 376-387.
4. Cross, J.C., Werb, Z. and Fisher, S.J. (1994) **Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle.** *Science*, **266**, 1508-1518.
5. Dietl, J.A., Ruck, P., Horny, H.P., Handgretinger, R., Marzusch, K., Ruck, M., Kaiserling, E., Griesser, H. and Kabelitz, D. (1992) **The decidua of early human pregnancy: Immunohistochemistry and function of immunocompetent cells.** *Gynecol Obstet Invest*, **33**, 197-204.
6. Starkey, P.M., Sargent, I.L. and Redman, C.W. (1988) **Cell Population in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry.** *Immunology*, **65**, 129-134.
7. Starkey, P.M. (1993) **The decidua and placentation.** In Redman, C.W.G., Sargent, I. and Starkey, P.M. (Hrsg.) *The human placenta*. Blackwell, London, Edinburgh, Boston, pp 362-413.

8. Bulmer, J.N., Morrison, L., Longfellow, M., Ritson, A. and Pace, D. (1991) **Granulated lymphocytes in human endometrium: immunohistochemical studies.** *Hum Reprod*, **6**, 791-798.
9. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. and Phillips, J.H. (1986) **The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes.** *J Immunol*, **136**, 4480-4486.
10. Dietl, J.A., Ruck, P., Marzusch, K., Horny, H-P., Kaiserling, E. and Handgretinger, R. (1992) **Uterine granular lymphocytes are activated natural killer cells.** *Immunol Today*, **13**, 236.
11. Triozzi, P.L., Eicher, P.M. and Rinehart, J.J. (1992) **Modulation of adhesion molecules on large granular lymphocytes by interleukin-2 in vivo and in vitro.** *Cell Immunol*, **140**, 295-303.
12. Marzusch, K., Ruck, P., Geiselhart, A. Handgretinger, R., Dietl, J.A. Kaiserling, E., Horny, H.-P., Vince, G. and Redman, C.W. (1993) **Distribution of cell adhesion molecules on CD56<sup>++</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup> large granular lymphocytes and endothelial cells in first trimester human decidua.** *Human Reprod*, **8**, 1203-1208.
13. King, A. and Loke, Y.W. (1990) **Human trophoblast and JEG chorioncarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2 stimulated decidual cells.** *Cell Immunol*, **129**, 435-448.
14. Bulmer, J.N., Smith, J., Morrison, L. and Wells, M. (1988) **Maternal and cellular relationship in the human placental basal plate.** *Placenta*, **9**, 237-246.

15. Jokhi, P.P., King, A. and Loke, Y.W. (1997) **Cytokine production and cytokine expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface.** *Cytokine*, **9**, 126-137.
16. Mizuno, M., Aoki, K. and Kimbara, T. (1994) **Functions of macrophages in human decidua tissue in early pregnancy.** *Am J Reprod Immunol*, **31**, 180-188.
17. Olivares, E.G., Montes, M.J., Oliver, C., Galindo, J.A. and Ruiz, C. (1997) **Cultured human decidua stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogenic T-cells.** *Biol Reprod*, **57**, 609-615.
18. Chernyshov, V.P., Slukvin, I.I. and Bondarenko, G.I. (1993) **Phenotypic characterisation of CD7<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes from first trimester human decidua using two-colour flow cytometry.** *Am J Reprod Immunol*, **29**, 5-16.
19. Gobin, S.J., Wilson, L., Keijsers, V. and Van den Elsen, P.J. (1997) **Antigen processing and presentation by human trophoblast-derived cell lines.** *J Immunol*, **158**, 3587-3592.
20. King, A., Boocock, C., Sharkey, A.M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi A.G. and Loke, Y.W. (1996) **Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by first trimester trophoblast.** *J Immunol*, **156**, 2068-2076.
21. Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. and Geraghty, D.E. (1998) **HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.** *Proc Natl Acad Sc USA*, **95**, 5199-5204.

22. Munz, C., Holmes, N., King, A., Loke, Y.W., Colonna, M., Schild, H. and Rammensee, H.G. (1997) **Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells.** *J Exp Med*, **185(3)**, 385-391.
23. Yokoyama, W.M. and Seaman, W.E. (1993) **The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: The NK gene complex,** *Annu Rev Immunol*, **11**, 613-635.
24. Carosella, E.D., Kirszenbaum, M. and Dausset, J. (1995) **HLA-G: a non classical antigen of major histocompatibility complex.** *C R Acad Sci (Ser.III)* **318**, 827-830.
25. McMaster, M.T., Librach, C.L., Zhou, Y., Lim, K.H., Janatpour, M.J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C. and Fisher, S.J. (1995) **Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts.** *J Immunol*, **154**, 3771-3778.
26. Loke, Y.W. and King, A. (2000) **Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokinproduction?** *Biochem Soc Trans*, **28**, 196-198.
27. King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W. and Braud, V.M. (2000a) **HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells.** *Eur J Immunol*, **30**, 1623-1631.
28. Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E. and Brooks, A.G. (1998) **Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis.** *J Exp Med*, **187**, 813-818.

29. King, A., Hiby, S.E., Gardner, L., Joseph, S., Bowen, J.M., Verma, S., Burrows, T.D. and Loke, Y.W. (2000) **Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – a review.** *Placenta* **21 Suppl A**, S81-85.
30. Carosella, E.D., Dausset, J. and Kirszenbaum, M. (1996) **HLA-G revisited.** *Immunol Today*, **17**, 407-409.
31. Ishitani, A. and Geraghty, D.E. (1992) **Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 3947-3951.
32. Kirszenbaum, M., Moreau, P., Gluckman, E., Dausset, J. and Carosella, E. (1994) **An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcripts in adult lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 4209-4213.
33. Kanai, T., Fujii, T., Unno, N., Yamashita, T., Hyodo, H., Miki, A., Hamai, Y., Kozuma, S. and Taketani, Y. (2001b) **Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood.** *Am J Reprod Immunol*, **45**, 94-99.
34. Hara, N., Fujii, T., Yamashita, T., Kozuma, S., Okai, T. and Taketani, Y. (1996) **Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistochemical demonstration with anti-HLA-G specific antibody “87G” and anti-cytokeratin antibody “CAM5.2”.** *Am J Reprod Immunol*, **36**, 349-358.



35. Goldman-Wohl, D.S., Ariel, I., Greenfield, C., Hochner-Celnikier, D., Cross, J., Fisher, S. and Yagel, S. (2000) **Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia.** *Mol Hum Reprod*, **6**, 88-95.
36. Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J. and DeMars, R. (1999) **A class I antigen, HLA-G expressed in human trophoblasts.** *Science*, **248**, 220-223.
37. Fujii, T., Ishitani, A. and Geraghty, D.E. (1994) **A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4.** *J Immunol*, **153**, 5516-5524.
38. Hamai, Y., Fujii, T., Miki, A., Geraghty, D.E., Harada, I., Takai, Y., Tsutsumi, O. and Taketani, Y. (1999) **Quantitative assessment of human leukocyte antigen-G in amniotic fluid by a double-determinant enzyme-linked immunosorbent assay using anti-human leukocyte antigen-G-specific antibody "87G".** *Am J Reprod Immunol*, **41**, 293-295.
39. Kanai, T., Fujii, T., Kozuma, S., Yamashita, T., Miki, A., Kikuchi, A. and Taketani, Y. (2001) **Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture.** *Mol Hum Reprod*, **7**, 195-200.
40. Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. and Lopez-Botet, M. (1997) **A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.** *J Exp Med*, **186**, 1809-1818.

41. Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Pende, D., Ponte, M., Mikaelsson, M.S., Moretta, L. and Biassoni, R. (1998) **p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily.** *Eur J Immunol*, **28**, 1980-1990.
42. King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W. and Braud, V.M. (2000a) **HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells.** *Eur J Immunol*, **30**, 1623-1631.
43. Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. and Geraghty, D.E. (1998) **HLA-G is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.** *Proc Natl Acad Sc USA*, **95**, 5199-5204.
44. Söderström, K., Corliss, B., Lanier, L.L. and Phillips, J.H. (1997) **CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK-cells.** *J Immunol*, **159**, 1072-1075.
45. Braud, V.M., Allan, D.S.J., O'Callaghan, C.A., Söderström, A., D'Andrea, A., Ogg, G.S. Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L. and McMichael, A. J. (1998) **HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.** *Nature*, **391**, 795-799.
46. Carosella, E.D., Kirszenbaum, M. and Dausset, J. (1995) **HLA-G: a non classical antigen of major histocompatibility complex.** *C R Acad Sci (Ser.III)*, **318**, 827-830.
47. Wegman, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993) **Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?** *Immunol Today*, **14**, 353-356.

48. Szereday, L., Varga, P. and Szekeres-Bartho, J. (1997) **Cytokine production by lymphocytes in pregnancy.** *Am J Reprod Immunol*, **38**, 418-422.
49. Raghupathy R. (1997): **Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.** *Immunol Today*, **18**, 478-482.
50. Vince, G.S. and Johnson P.M. (1996) **Is there a Th2 bias in pregnancy?** *J Reprod Immunol*, **32**, 101-104.
51. Kelso, A. (1995) **Th1 and Th2 subsets: Paradigms lost?** *Immunol Today*, **16**, 374-379.
52. Letterio, J.J. and Roberts, A.B. (1998) **Regulation of immune responses by TGF-beta.** *Ann Rev Immunol*, **16**, 137-161.
53. Clark, D.A. and Coker, R. (1998) **Transforming growth factor-beta (TGF-beta).** *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 293-298.
54. Fargeas, C., Wu, C.Y., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T. and Delespesse, G. (1992) **Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes.** *Eur J Immunol*, **22**, 2173-2176.
55. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. (1986) **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activity and secreted proteins.** *J Immunol*, **136**, 2348-2357.

56. Del Prete, G.F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M. and Romagnani, S. (1991) **Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expanded in vitro human T cells with stable opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production.** *J Clin Invest*, **88**, 346-350.
57. Todt, J.C., Yang, Y., Lei, J., Lauria, M.R., Sorokin, Y., Cotton, D.B. and Yelian, F.D. (1996) **Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on human trophoblast cell adhesion and motility.** *Am J Reprod Immunol*, **36**, 65-71.
58. Grabowska, A., Chumbley, G., Carter, N. and Loke, Y.W. (1990) **Interferon- $\gamma$  enhances m-RNA and surface expression of class I antigen on human extravillous trophoblast.** *Placenta*, **11**, 301-308.
59. Wegman, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993) **Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?** *Immunol Today*, **14**, 353-356.
60. Jokhi, P.P., King, A. and Loke, Y.W. (1994) **Production of granulocyte-makrophage-colony-stimulating-factor by human trophoblast cells and by human large granular lymphocytes.** *Hum Reprod*, **9**, 1660-1669.
61. Clark, D.A., Chaouat, G., Mogil, R. and Wegmann T.G. (1994) **Prevention of spontaneous abortion in DBA/2 mated mice by GM-CSF involves CD8<sup>+</sup> T cell-dependent suppression of natural effector cell cytotoxicity against trophoblast target cells.** *Cell Immunol*, **154**, 143-152.

62. Rouas-Freiss, N., Goncalves, R.M., Menier, C., Dausset, J. and Carosella, E.D. (1997) **Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 11520-11525.
63. Rieger, L., Hofmeister, V., Probe, C., Dietl, J.A., Weiss, E.H., Steck, T. und Kämmerer, U. (2002) **Th1- and Th2-like cytokin production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E,** *Mol Hum Reprod*, **8(3)**, 255-61.
64. King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W. and Braud, V.M. (2000a) **HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells.** *Eur J Immunol*, **30**, 1623-1631.
65. Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. and Lopez-Botet, M. (1997) **A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.** *J Exp Med*, **186**, 1809-1818.
66. Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. and Geraghty, D.E. (1998) **HLA-G is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.** *Proc Natl Acad Sc USA*, **95**, 5199-5204.
67. Avril, T., Jarousseau, A.C., Watier, H., Boucraut, J., Le Bouteiller, P., Bardos, P. and Thibault, G. (1999) **Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism.** *J Immunol*, **162**, 5902-5909.

68. Wegman, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993) **Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?** *Immunol Today*, **14**, 353-356.
69. Szereday, L., Varga, P. and Szekeres-Bartho, J. (1997) **Cytokine production by lymphocytes in pregnancy.** *Am J Reprod Immunol*, **38**, 418-422.
70. Raghupathy R. (1997) **Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.** *Immunol Today*, **18**, 478-482.
71. Marzusch, K., Ruck, P., Geiselhart, A, Handgretinger, R., Dietl, J.A., Kaiserling, E., Vince, G. and Redman, C.W. (1993) **Distribution of cell adhesion molecules on CD56<sup>++</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup> large granular lymphocytes and endothelial cells in first trimester human decidua.** *Human Reprod*, **8**, 1203-1208.
72. Kanai, T., Fujii, T., Unno, N., Yamashita, T., Hyodo, H., Miki, A., Hamai, Y., Kozuma, S. and Taketani, Y. (2001b) **Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood.** *Am J Reprod Immunol*, **45**, 94-99.
73. Szereday, L., Späth, P. and Szekeres-Bartho, J. (1999) **Natural Killer Cell Activity and Cytokine Production after In Vitro Immunglobulin Treatment of Lymphocytes Derived from Pregnant Women with or without Risk for Spontaneous Abortion.** *Am J Reprod Immunol*, **42(5)**, 282-287.
74. Polgar, K. and Hill, J.A. (2002) **Identification of the white blood cell populations responsible Th1 immunity to trophoblast and the timing of timing of the response in women with recurrent pregnancy loss.** *Gynecol Obstet Invest*, **53(1)**, 59-64.

75. Rezaei, A. and Dabbagh, A. (2002) **T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion.** *Med Sci Monit*, **8(8)**, CR607-610.
76. Makhseed, M., Raghupathy, R., Azizieh, F., Al-Azemi, M.M., Hassan, N.A. and Bandar, A. (1999) **Mitogen-induced cytokine response of maternal peripheral blood lymphocytes indicate a differential Th-type bias in normal pregnancy and pregnancy failure.** *Am J Reprod Immunol*, **42(5)**, 273-281.
77. Laird, S.M., Tuckerman, E.M., Cork, B.A., Linjawi, S., Blakemore, A.I. and Li, T. (2003) **A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage.** *Hum Reprod Update*, **9(2)**, 163-174.
78. Saito, S., Umekage, H., Sakamoto, Y., Sakai, M., Tanebe, K., Sasaki, Y. and Morikawa, H. (1999) **Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia.** *Am J Reprod Immunol*, **41**, 297-306.
79. Lopez-Botet, M. and Bellon, T. (1999) **Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I.** *Curr Opin Immunol*, **11**, 301-307.
80. King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W. and Braud, V.M. (2000a) **HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells.** *Eur J Immunol*, **30**, 1623-1631.
81. Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. and Lopez-Botet, M. (1997) **A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.** *J Exp Med*, **186**, 1809-1818.

82. Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Pende, D., Ponte, M., Mikaelsson, M.S., Moretta, L. and Biassoni, R. (1998) **p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily.** *Eur J Immunol*, **28**, 1980-1990.
83. King, A., Allan, D.S., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W. and Braud, V.M. (2000a) **HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells.** *Eur J Immunol*, **30**, 1623-1631.
84. Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. and Geraghty, D.E. (1998) **HLA-G is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A.** *Proc Natl Acad Sc USA*, **95**, 5199-5204.
85. Saito, S., Nishikawa, K., Morii, T., Enomoto, M., Narita, N., Motoyoshi, K. and Ichijo, M. (1993) **Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancydecidua.** *Int Immunol*, **5**, 559-563.
86. Todt, J.C., Yang, Y., Lei, J., Lauria, M.R., Sorokin, Y., Cotton, D.B. and Yelian, F.D. (1996) **Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility.** *Am J Reprod Immunol*, **36**, 65-71.
87. Yui, J., Garcia-Lloret, M., Weggmann, T.G. and Guilbert, L.J. (1994) **Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts.** *Placenta*, **15**, 819-835.
88. Maijima, M., Fujii, T., Kozuma, S., Okai, T., Shibata, Y. and Taketani, Y. (1997) **Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines.** *Am J Reprod Immunol*, **38**, 79-82.



89. Jokhi, P.P., King, A. and Loke, Y.W. (1994) **Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes.** *Hum Reprod*, **9**, 1660-1669.
90. Clark, D.A., Chaouat, G., Mogil, R. and Wegmann T.G. (1994) **Prevention of spontaneous abortion in DBA/2 mated mice by GM-CSF involves CD8+ T cell-dependent suppression of natural effector cell cytotoxicity against trophoblast target cells.** *Cell Immunol*, **154**, 143-152.
91. Owen, W.F. Jr., Rothenberg, M.E., Silberstein, D.S., Gasson, J.C., Stevens, R., Austen, K.F. and Soberman, R.J. (1987) **Regulation of human eosinophil viability, density and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts.** *J Exp Med*, **166(1)**, 129-141.
92. Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. and Mantovani, A. (1992) **Modulation of granulocyte survival and programmed cell death.** *Blood*, **80(8)**, 2012-2020.
93. Brach, M. A., deVos, S., Gruss, H.-J. and Herrmann, F. (1992) **Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death.** *Blood*, **80**, 2920-2924.
94. Young, M.R., Halpin, J., Hussain, R., Lozano, Y., Djordjevic, A., Devata, S., Matthews, J.P. and Wright, M.A. (1993) **Inhibition of tumor production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 reduces tumor motility and metastasis.** *Invasion Metastasis*, **13(4)**, 169-177.

95. Kohn, E.C., Hollister, G.H. DiPersio, J.D. Wahl, S., Liotta, L.A. and Schiffmann, E. (1993) **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces human melanoma-cell migration.** *Int J Cancer*, **53(6)**, 968-972.
96. Wegman, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993) **Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?** *Immunol Today*, **14**, 353-356.
97. Kanai, T., Fujii, T., Kozuma, S., Yamashita, T., Miki, A., Kikuchi, A. and Taketani, Y. (2001) **Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture.** *Mol Hum Reprod*, **7**, 195-200.

Literatur für die Kapitel **Entwicklung der Blastozyste, Implantation, Plazenta-Entwicklung und die reife Plazenta:**

1. Schiebler, T.H. (1996) **Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.** *Springer Verlag* (4. Auflage).
2. Drenckhahn, D. und Zenker, W. (1993) **Benninghoff: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen.** *Urban und Schwarzenberg* (15. Auflage).

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ulrike Kämmerer, die mir bei der Durchführung der Versuche, bei Fragen und Problemen jederzeit hilfreich zur Seite stand. Ich danke ihr für die sehr gute Betreuung, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die kompetente Beratung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Johannes Dietl, Direktor der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik in Würzburg, für die Aufgabenstellung und die Möglichkeit, an seiner Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Steck für die Vermittlung des Themas dieser Arbeit.

Frau Michaela Kapp hat mich im Labor und in das praktische Arbeiten eingeführt. Auch für die gute Zusammenarbeit in freundlicher Atmosphäre und ihre große Teamfähigkeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Für die Einweisung in das Computerprogramm STATISTICA danke ich Herrn Dr. Lorenz Rieger. Für die Hilfe bei der computertechnischen Umsetzung meiner Arbeit danke ich meiner Cousine Frau Christiane Fischer.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Weiss vom Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mir die Zelllinien für meine Experimente zur Verfügung gestellt hat.

Für die stets freundlichen Email-Kontakte, die damit verbundene Mühe und die kostenlose Druckgenehmigung verschiedener Abbildungen in meiner Dissertation danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Theodor Heinrich Schiebler, Frau Rosita Sturm vom Springer-Verlag und Frau Ina Schibel von der Elsevier GmbH Urban und Fischer Verlag.

Ohne die große Unterstützung meiner Eltern hätte ich mein Studium der Humanmedizin nicht erfolgreich beenden können, dafür danke ich ihnen sehr. Auch Frau Dr. Waltraud Sauer hat stets ein offenes Ohr für mich, vielen Dank.

## Lebenslauf

FLORIAN-GEYER-STRASSE 103 • 97076 WÜRZBURG  
TELEFON 0931/274521 • E-MAIL CHRISTINE.PROBE@GMX.NET

# CHRISTINE PROBE

## PERSÖNLICHE INFORMATION

---

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 28 Jahre
- Geburtstag: 14.12.1975
- Geburtsort: Würzburg

## SCHULBILDUNG

---

- |             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| 1982 – 1986 | Max-Dauthendey-Grundschule Würzburg |
| 1986 – 1995 | Wirsberg-Gymnasium Würzburg         |

## AUSBILDUNG

---

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 07 – 08/1995      | Pflegepraktikum  |
| 09 – 11/1995      | Kurs zur Schwesternhelferin                                |
| 12/1995 – 04/1996 | Kindermädchen  |
| 05 – 10/1996      | Hebammenschule an der Universitätsfrauenklinik<br>Würzburg |

## STUDIUM

---

- |         |  |
|---------|--|
| 11/1996 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der<br>Julius-Maximilians-Universität Würzburg |
| 03/1999 | Physikum   |
| 03/2000 | 1. Teil des Staatsexamens  |
| 03/2002 | 2. Teil des Staatsexamens  |
| 11/2003 | 3. Teil des Staatsexamens  |

*Christine Probe*

Würzburg, den 31.03.2004