

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

**Immunhistologische Analyse Chemokinrezeptor positiver Zellen
in der humanen decidua basalis der Frühschwangerschaft**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. dent. Thomas Bittner
aus Würzburg

Würzburg, März 2007

Referent : Priv.-Doz. Dr. rer. biol. hum. U. Kämmerer

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Becker

Dekan : Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2007

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	BILDUNG DER PLAZENTA / IMPLANTATION	1
1.2	DEZIDUA UND IMMUNKOMPETENTE ZELLEN IN DER FRÜHSCHWANGERSCHAFT 2	
1.3	LEUKOZYTENTRAFFICKING	3
1.4	CHEMOKINE	4
1.5	CHEMOKINREZEPTOREN	6
1.6	CHEMOKINREZEPTOREN IN DER DEZIDUA	8
1.7	CHEMOKINEXPRESSION IN DER DEZIDUA	8
1.8	FRAGESTELLUNG	9
2	MATERIAL UND METHODE	10
2.1	VERWENDETE MATERIALIEN	10
2.2	GEWEBE UND LAGERUNG	10
2.3	AUFBEREITUNG DES GEWEBES	11
2.4	FÄRBEVORGANG	11
2.4.1	<i>Verwendete Antikörper</i>	11
2.4.2	<i>Die Immunperoxidasefärbung</i>	12
2.5	VERWENDETE MIKROSKOPE	13
2.6	VORGEHENSWEISE BEIM MIKROSKOPIEREN	13
3	ERGEBNISSE	14
3.1	GEGENÜBERSTELLUNG DES GLEICHEN GEWEBESABSCHNITTS	14
3.2	DIE ANTIKÖRPER IM EINZELNEN	17
3.2.1	<i>CXCR3</i>	17
3.2.2	<i>CCR6</i>	20
3.2.3	<i>CXCR2</i>	22
3.2.4	<i>CCR7</i>	23
3.2.5	<i>CXCR4</i>	23
3.2.6	<i>CCR9</i>	25
3.3	SYNOPSIS DER BEFUNDE	27

4	DISKUSSION.....	28
5	ZUSAMMENFASSUNG	39
6	LITERATURVERZEICHNIS	41

1 Einleitung

1.1 Bildung der Plazenta / Implantation

Die Entwicklung der Plazenta und der Dezidua im Rahmen einer Schwangerschaft beinhaltet viele ungewöhnliche Prozesse. Bald nach der Konzeption muss die Plazenta beginnen, als ein Hilffsystem für die Versorgung von Embryo/Fetus zu funktionieren. Dementsprechend entsteht in den ersten Wochen der Schwangerschaft durch viele synergetische Prozesse aus der strukturell einfachen Trophoblastenschicht der Blastozyste die Plazenta als ein hochspezialisiertes und strukturiertes reifes Organ.

Die Plazenta ist im Hinblick auf die Mutter semiallogen (50% der MHC-Anteile stammen vom Vater). Dennoch wird sie normalerweise vom mütterlichen Immunsystem toleriert, obwohl Lymphozyten, besonders natürliche Killerzellen, eine Hauptzellpopulation des Uterus darstellen (Bulmer, 1991). Diese Zellen finden sich vor allem in der Uterusschleimhaut, dem Endometrium, welches sich in der Schwangerschaft in die Dezidua umwandelt.

Im Rahmen der Plazentation wird die Dezidua in großem Umfang durch fetale Cytotrophoblasten (CTB) infiltriert, welche aus spezialisierten Zellsäulen, den Haftzotten der entstehenden Plazenta, auswachsen. Diese Cytotrophoblasten wandern durch die Dezidua bis in das innere Drittel des Myometrium, wo sie als sogenannte Plazenta-Riesenzellen die äußere Grenze der Infiltrationszone bilden. Im Rahmen ihrer Invasion gelangen die Cytotrophoblasten in engen Kontakt mit den Immunzellen der Dezidua, so dass eine Zellzellinteraktion zwischen diesen beiden Zellsystemen wahrscheinlich erscheint (Kämmerer, 2002).

Während des ersten Schwangerschaftstrimesters wandert eine Subpopulation der invasiven Cytotrophoblasten in uterine Arteriolen ein. Hier wandern sie das Gefäßlumen entlang und ersetzen schlussendlich das maternale Gefäß-Endothel im Bereich der Anheftungsstelle der Plazenta. So wandeln diese fetalen Zellen die uterinen Gefäße in ein System um, das es ermöglicht, eine beträchtliche Menge mütterlichen Blutes dem intervillösen Raum zuzuführen (Damsky, 1998).

Wie die Entwicklung anderer Organe beinhaltet die Entstehung der Plazenta neben Proliferation und Differenzierung eine gerichtete Migration von spezialisierten

Zellpopulationen, hier den Cytotrophoblasten. Wie in anderen Systemen, kann hierbei davon ausgegangen werden, dass dieser Prozess der gerichteten Trophoblastenwanderung durch Chemokine gesteuert wird.

1.2 Dezidua und immunkompetente Zellen in der Frühschwangerschaft

Charakteristisch für die Dezidua ist ihr hoher Gehalt an leukozytären Zellen.

So konnten immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass im ersten Schwangerschaftstrimenon 40-70% der Zellen in der Dezidua den Leukozytenmarker CD45 exprimieren. Hierbei ergaben quantitative Analysen mittels Durchflusszytometrie, dass sogenannte CD56 positive "large granular lymphocytes" (LGL) mit ca. 70% die dominante leukozytäre Zellpopulation darstellen, gefolgt von ca. 20% CD14 positiver Zellen (Makrophagen) und 10% CD3 positiver T-Zellen (Dietl, 1992).

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, während die Zahl der Makrophagen und T-Zellen konstant bleibt (Starkey, 1993).

LGL weisen eine phänotypische Ähnlichkeit mit natürlichen Killerzellen (NK) auf, obwohl die LGL für den klassischen NK-Marker CD16 negativ sind und keine cytotoxische Aktivität gegenüber invasiven CTB zeigen (King, 1990).

Erweiterte Charakterisierungen haben zudem zeigen können, dass es sich bei den LGL offenbar um eine weitgehend uteruspezifische immunkompetente Zellpopulation handelt (Starkey, 1988). Dies legt die Vermutung nahe, dass LGL bei der Regulation der ausgedehnten Infiltrationsvorgänge der CTB eine besondere Rolle spielen.

Der genaue Mechanismus der Rekrutierung dieser Zellen ist bisher unbekannt, aber analog zu anderen Systemen, spielen Chemokine wahrscheinlich eine bedeutende Rolle.

Bei den CD14 positive Zellen handelt es sich nach Kämmerer wohl um eine spezialisierte Population von unreifen dendritischen Zellen (DC), welche als Leitmarker das DC spezifische Molekül DC-Sign auf ihrer Oberfläche exprimieren. Hierfür spricht, dass das Repertoire dieser Zellen über das von peripheren Makrophagen weit hinausgeht: so können sie allogene Antigene präsentieren und über eine vielfältige Zytokinproduktion immunregulatorisch auf andere Zellen wirken.

Darüber hinaus können sie in vitro in klassische CD83 positive DC ausreifen, von denen jedoch nur wenige in situ in der Dezidua gefunden werden (Kämmerer, 2000).

Die T-Zellen lassen sich in T-Helferzellen (TH) und zytotoxische T-Zellen unterscheiden. Obwohl die Zahl der T-Zellen im Laufe der Schwangerschaft konstant bleibt (Starky, 1993), findet sich ein Wandel der einzelnen Zellpopulation. Beträgt z.B. das Verhältnis TH 1 zu TH 2 in der Sekretionsphase noch 37, so fällt dieses in der Frühschwangerschaft auf 1,3 ab:

Von Trophoblasten und endometrialen Drüsen produziertes TARC (Thymus and activation regulated Chemokine) soll besonders TH 2 Zellen anlocken (Tsuda, 2002).

Die von eben diesen Zellen sezernierte TH 2 Zytokine vermitteln einen vorteilhaften Einfluss auf das Plazentawachstum und dominieren bei normal verlaufender Schwangerschaft.

1.3 Leukozytentracking

Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Leukozytenwanderung im normalen und entzündeten Gewebe. Die Hauptrolle der Chemokine liegt in der Aktivierung von Integrinen für die Leukozytenadhäsion auf endothelialen Zellen und der Chemotaxis von Leukozyten im Gewebe. Die Spezifität der Leukozytenwanderung wird auf vielen Ebenen geregelt (Kim, 2004).

Erstens wird sie bewirkt durch unterschiedliche Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in verschiedenen Geweben. Zweitens wird sie gewährleistet durch eine begrenzte und differenziertere Expression von Chemokinrezeptoren durch die verschiedenen Unterarten und Aktivierungsstadien von Leukozyten. Drittens macht die gemeinsame Expression von vielen Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen die Leukozytenwanderung noch spezifischer. Das Navigieren von Leukozyten in verschiedene Gewebe, zum Beispiel entzündete Haut, Dünndarm und Lymphknoten, erfordert unterschiedliche Chemokine und Chemokinrezeptoren. Aber auch Nicht-chemokine, wie Lipidmediatoren, antimikrobielle Peptide, Komplementfaktoren und andere normale Bestandteile unseres Körpers regulieren die Leukozytenwanderung.

Kim führt folgende Beispiele an (2005):

Sphingosin 1-Phosphat und homöostatische Chemokine regulieren den Aufenthalt von Leukozyten in Lymphknoten und deren Auswandern in die Blutbahn.

Dendritische Zellen wandern durch das Endothel von Venolen in die Lymphknoten, und Chemokine und Nicht-chemokine wie z.B. Chemerin können diese Wanderung regulieren. Dendritische Zellen des Magens und Retinoinsäure induzieren auf T-Zellen die Expression von Integrin alpha4/beta7 und CCR9, wodurch diese in den Magen wandern. Wenn regulatorische T-Zellen mit Antigen geprimt werden, regulieren sie CXCR 5 sehr schnell hoch um in die Lymphknoten zu wandern und dort im Keimzentrum B- und T-Zellen zu unterdrücken.

1.4 Chemokine

Chemokine sind eine Familie von Proteinen mit ähnlicher Struktur, die von Zellen gebildet werden, um gerichtete Wanderung / Austausch von Informationen zu bewirken.

Mitglieder der Chemokine Familie zerfallen hauptsächlich in zwei Hauptgruppen:

CC Chemokine mit zwei aneinanderhängenden Cystein Resten nahe dem Aminoende und CXCR Chemokine in denen die äquivalenten beiden Cystein Reste von einer anderen Aminosäure getrennt werden (Janeway, 2001). Chemokine werden von den unterschiedlichsten Zellarten produziert:

So gibt es publizierte Daten zu Immunzellen (Janeway, 2001), Bindegewebszellen (Horuk, 2001), Endothelzellen (Feil, 1998), Trophoblasten (Red-Horse, 2001), und Knochenmarkszellen (Forster, 2001).

In der folgenden Tabelle werden die Chemokine aufgelistet, die im Zusammenhang mit den von uns untersuchten Rezeptoren stehen:

CXC	Chemokin	Systematischer Name	Rezeptor	Produziert von	Zielzelle
	IL8 (Interleukin 8)	CXCL 8	CXCR1, CXCR2	Monozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen	Neutrophile
	NAP2 (Neutrophil activating protein 2)	CXCL 7	CXCR2	Monozyten	Neutrophile
	MIG (Monokine induced by gamma Interferon)	CXCL 9	CXCR3	Hepatozyten, Keratinocyten, Gewebsfibroblasten (aktiviert)	Interferon(IFN) produzierende Zellen, DC
	SDF (Stroma derived factor)	CXCL 12	CXCR4	Stromazellen	Neutrophile
	IP10 (Interferon gamma inducible Protein 10)	CXCL 10	CXCR3	Keratinocyten, Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten (proinflammatorisch aktiviert)	T-Zellen
	I-TAC (Interferon inducible T cell alpha chemoattractant)	CXCL 11	CXCR3	Keratinocyten, Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten (proinflammatorisch aktiviert)	IFN produzierende Zellen, DC
	GRO α (Growth related oncogene alpha)	CXCL1	CXCR2	Keratinocyten, Epithelzellen, Neutrophile	
CC	RANTES (=Regulated upon activation on normal T cells expressed and secreted)	CCL 5	CCR1, CCR3, CCR5	T-Zellen, Endothelzellen, Thrombozyten	Lymphoblasten
	MCP2 (Macrophage chemoattractant protein)	CCL 8	CCR2	Makrophagen, Fibroblasten, Keratinocyten,	Neutrophile
	TECK (Thymus expressed chemokine)	CCL 25	CCR9	Thymozyten	T-Zellen
	MIP3 (Macrophage inflammatory protein)	CCL 19	CCR 6 CCR 7	Makrophagen, dendritische Zellen (DC)	DC, B-Zellen, naive T-Zellen

*Tab. 1: Chemokine, welche für die Rezeptoren spezifisch sind, die in dieser Arbeit untersucht wurden
(Aus: Gouwy M: Cytokine and Growth Factor, Reviews 16 (2005) 561-580)*

Tabelle 1 zeigt nur einen kleinen Abriss der großen Gruppe der Chemokine. Ferner werden die produzierenden Zellen, der Rezeptor und die entsprechenden Zielzellen genannt. Die Nomenklatur wird innerhalb von Veröffentlichungen sehr abwechselnd benutzt.

1.5 Chemokinrezeptoren

Die Chemokine binden auf der Zelloberfläche an spezialisierte Rezeptoren, die Chemokinrezeptoren. Diese Chemokinrezeptoren sind Teil einer großen Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Janeway, 2001). Die zwei größten Gruppen von Chemokinen wirken auf verschiedene Arten von Rezeptoren:

CC Chemokine binden an CC Chemokinrezeptoren, wovon bisher 9 Stück bekannt sind, genannt CCR 1 bis 9. CXCR Chemokine binden an CXCR Rezeptoren. Hiervon gibt es 5, genannt CXCR 1 bis 5. Diese Rezeptoren werden auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Wir haben in der vorliegenden Arbeit die in der Tabelle unterstrichenen Rezeptoren untersucht.

Rezeptor	Expression auf	Rolle bei Krankheit, Antagonist	Funktion, Besonderheiten
CCR 1	Mono, N, Eo, Ba, T, B, M	Multiple Sklerose(MS), Transplantatabstossung <i>BX 471</i>	Früher Schritt in der Systemic Inflammatory Response
CCR 2	Mono, M, T, NK, DC	MS, Atherosklerose <i>Spiropiperidine</i>	Chron. Entzündung, induziert Makrophagenwanderung
CCR 5	Mono, M, lymph.Organe, Astrozyten, Endothel des ZNS, Langerhanszellen	HIV <i>AOP, Met-RANTES</i>	HIV 1 Ko-rezeptor
<u>CCR 6</u>	T, Mono, M, DC	Evtl. Psoriasis	Rekrutierung von unreifen DC zur Entzündung, Akkumulation von reifen DC in T-Zell-Gebieten
<u>CCR 7</u>	T, B., DC,	Einfluss auf HIV-Progression	Lymphozyten und DC Trafficking. Deutlich vermehrt bei Infektion mit HHV 6+7 und EBV
<u>CCR 9</u>	T, Dünndarmepithel		Lymphozytenrekrutierung in den Dünndarm
CXCR 1+2	N, T, Mono, Melanomzellen, Synovial-fibroblasten	Alzheimer <i>SB 225002 (CXCR2)</i>	Hohe Sequenzhomologie, wahrscheinlich Duplikation eines Vorläufergens, evtl. Rolle bei abnormem Neuronenwachstum
<u>CXCR 3</u>	In IL2 aktivierten T, nicht aber in ruhenden T+B+Mono+N		Selektive Rekrutierung von T-Effektorzellen v.a. bei TH1-Reaktionen und Allograftzerstörung
<u>CXCR 4</u>	N, M, T, B, hämatopoetische Zellen, Gefäßendothel, Neuronen, Astrozyten	HIV <i>T22</i>	Korezeptor für T-tropische HIV 1

Tab. 2: Übersicht über die bisher bekannten Chemokinrezeptoren. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rezeptoren sind unterstrichen.

Abkürzungen:

Mono=Monozyten, N=neutrophile Granulozyten, Eo=eosinophile Granulozyten, B=B-Zellen, T=T-Zellen, M=Makrophagen, NK=natürliche Killerzellen, DC=dentritische Zellen

Obwohl jeder dieser Rezeptoren nur eine einzige Klasse von Chemokinen (also CXC oder CC) bindet, können sie mehrere Mitglieder derselben Klasse mit hoher Affinität binden, wie z.B. der CXCR-2 Rezeptor neben IL-8 auch NAP-2, und die drei Isoformen von GRO (alpha, beta, gamma) bindet. Darüber hinaus können etliche Chemokine an verschiedene Chemokinrezeptoren binden und diese aktivieren, wie z.B. RANTES, welches an die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 binden kann.

Obwohl Chemokine ursprünglich definiert waren als Abwehrproteine, ist inzwischen bekannt, dass ihr Repertoire weit über diese Rolle hinausgeht.

Zum Beispiel haben Chemokine wie das „growth related oncogene“ (GRO) wachstumsregulierende Eigenschaften, während andere Mitglieder der CXCR Familie Mediatoren oder Inhibitoren der Angiogenese sind und somit ein wichtiges Ziel der

Onkologie sein könnten. Neuere Arbeiten zeigen dass der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Immunsystems, des Kreislauf- und zentralen Nervensystems spielen. Darüber hinaus spielen Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Aidsvirus, HIV 1 (Horuk, 2001). Das Zusammennehmen dieser Ergebnisse erweitert die biologische Rolle von Chemokinen von einfachen Immunmodulatoren zu einem viel umfassenderen Spektrum als ursprünglich vermutet wurde.

1.6 Chemokinrezeptoren in der Dezidua

Zur Rolle der Chemokinrezeptoren in der Dezidua im Rahmen der Schwangerschaft gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen:

So fanden Wu und Mitarbeiter (2005) mittels Durchflusszytometrie, dass CXCR4 von den meisten uterinen NK Zellen (LGL) exprimiert wird, wohingegen CCR6 nur schwach vorhanden ist, und CCR9 gar nicht exprimiert wird. Interessanterweise bilden Cytotrophoblasten den Liganden für CXCR4, SDF-1, so dass hier ein „Anlocken“ der LGL von den Cytotrophoblasten angenommen werden kann (Drake, 2004).

Nach den Ergebnissen von Red-Horse (2001) - dieses wurde allerdings mit molekularbiologischen Methoden erzielt - findet sich in dezidualen Leukozyten der Frühschwangerschaft viel mRNA für CCR1 und CXCR4, sowie – wenn auch wenig – RNA für CCR4+5, CXCR3 und den Fractalkaline-Rezeptor CX3CR1.

Zur Expression der Rezeptoren auf Nichtimmunzellen im Deziduabereich gibt es praktisch keine publizierten Ergebnisse. Eine Arbeit von Drake (2004) beschreibt die mRNA von CXCR4, CXCR6, CCR5 und CCR7 in Trophoblasten von frühen Plazenten, allerdings gehen die Autoren nicht auf die invasiven Trophoblasten der Dezidua ein.

1.7 Chemokinexpression in der Dezidua

Anders als für die Rezeptoren ist die Chemokin-Produktion der dezidualen Zellen gut untersucht: Red-Horse et al. (2001) fanden mittels in-situ Hybridisierung eine diffuse Expression von zahlreich Chemokinen wie zum Beispiel HCC-1 (Hemofiltrate CC chemokine 1), ITAC, GCP-2 (Granulocyte chemoattractant protein 2), und IP-10.

Als Hauptproduzenten bezeichnen sie die dezidualen Leukozyten, hier besonders Makrophagen, sowie Stromazelle und CTB.

Während die gleichen Autoren in ihrer Arbeit von 2001 noch den Chemokinen einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation der Dezi-
dua zuordnen, nehmen sie diese These in einer Arbeit von 2004 zurück und rücken den
Einfluss auf das Trophoblastenwachstums in den Vordergrund.

Zur Expression der Rezeptoren auf Proteinebene gibt es bisher, abgesehen von der lei-
der nur in Chinesisch publizierten Arbeit von Wu (2004), in der laut Abstract CXCR4
per Immunhistologie nachgewiesen wurde, keine Arbeiten.

1.8 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war eine qualitative Darstellung des Verteilungsmusters von
Chemokinrezeptoren in der Dezidua der Frühschwangerschaft. Ferner sollte eine mor-
phologische Zuordnung positiver Zellen zu den einzelnen Populationen (Cy-
totrophoblasten, Stromazellen, Leukozyten) stattfinden.

Darüber hinaus soll geklärt werden, ob es in der Frühschwangerschaft, in unserem Fall
der 6., 7. und 8. Schwangerschaftswoche, zu Veränderungen der Rezeptorverteilung
kommt.

Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit erhoffen wir uns Rückschlüsse auf die Mechanis-
men, welche für das invasive Cytotrophoblasten Wachstum und die im menschlichen
Körper einmalige Zusammensetzung des Immunzelleninfiltrates verantwortlich sind.

2 Material und Methode

2.1 Verwendete Materialien

Die verwendeten Materialien und Bezugsadressen sind in folgender Liste aufgezählt.

Artikel	Firma	Bezugsort
Methanol	Baker	Deventer, Holland
Xylene	Baker	``
DAKO Pen	DAKO	Hamburg, Deutschland
Mayers Hämatoxin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ziegennormalserum	DAKO	Hamburg, Deutschland
DAB	DAKO	"
Tris Puffersubstanz	Sigma	St. Louis, USA
NaCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaOH 1M	Merck	Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Technischer Alkohol		Uni-Bezug
HCl rauchend 37%-ig	Merck	Darmstadt, Deutschland
Citronensäuremonohydrat	Merck	Darmstadt, Deutschland
LSAB 2 HRP-Kit	DAKO	Hamburg, Deutschland
Ak-Verdünnungsmedium	DAKO	Hamburg, Deutschland
PBS DulbeccoA	Oxoid	Hampshire, England
Beriglobin	Behring	Marburg, Deutschland
HistoGreen	laborintern hergestellt	
VitroClud	Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Superfrost-OT	Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Schlittenmikrotom HN 40	Leica	Benzheim, Deutschland
Eukitt	Merck	Darmstadt, Deutschland
Mikrowelle	Siemens	Erlangen, Deutschland

Tab. 3: verwendete Materialien

Angesetzte Lösungen:

Tris/NaCl 25mM Tris-Puffersubstanz+100mM NaCl pH 7,4- 7;6

Citratpuffer 10mM Citronensäuremonohydrat (1,02g in 500 ml A.dest) pH auf 6,0 mit 1N NaOH einstellen

2.2 Gewebe und Lagerung

Insgesamt wurden 15 Deziduagewebe aus legaler Abtreibung (im Rahmen der Fristenlösung) untersucht:

Zwei aus der 6. SSW, drei aus der 7. SSW, sechs aus der 8. SSW, drei aus der 9. SSW und eines aus der 10. SSW. Das Votum der Ethikkommission liegt vor.

Sofort nach der Exzision wurde das Gewebe in 8 %iges PBS gepuffertes Formalin gelegt. Einbettung in Paraffinblöcke.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das eingebettete Gewebe bei Raumtemperatur gelagert.

2.3 Aufbereitung des Gewebes

Von den Paraffinblöcken wurden 2 µm dicke Schnitte mittels eines Schlittenmikrotoms abgeschnitten und auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte die Vorbehandlung:

Vorbehandlung der Schnitte

Entparaffinieren: 2 x Xylol 10 min
2 x reiner Alkohol 5 min
absteigende Alkoholreihe über 5 Stufen zum A.dest.
(schwenkend bis der jeweilige Alkohol ohne Schlieren abläuft)

Antigen-Demaskierung: Kochen mit Citratpuffer in der Mikrowelle bei 750 Watt 3 x 5 min – (nach jeweils 5 min Kochzeit mit kaltem Puffer nachfüllen)
20 min abkühlen lassen

H2O2-Block: 3%-ig in Methanol 10 min bei RT
Danach mehrmaliges Spülen mit Aqua dest.

Proteinblock: wahlweise Ziegennormalserum 1 : 5 in PBS - oder
Beriglobin 1 : 50 in PBS 15 min bei RT
Danach wurde die Lösung nur abgekippt und nicht mehr gespült.

2.4 Färbevorgang

2.4.1 Verwendete Antikörper

Folgende monoklonale Antikörper wurden verwendet (Siehe Tabelle 4)

Antigen	Firmenname	Klon	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
CCR6	R&D	53103.111	1:100	1h bei Raumtemperatur (RT)
CCR7	Pharmingen	2H4	1:100	4°C über Nacht
CCR9	R&D	112509	1:150	1h bei RT
CXCR2	R&D	48311.211	1:150	4°C über Nacht
CXCR3	R&D	49801.111	1:4000	1h bei RT
CXCR4	Sigma	44716.111	1:200	4°C über Nacht
Pan-Cytokeratin	Immunotec	AE1/AE3	1:100	4°C über Nacht

Tab. 4: verwendete Antikörper

2.4.2 Die Immunperoxidasefärbung

Einfachfärbung

1.) Auftragen des Primärantikörpers in der ausgetesteten Verdünnung (s. Tab. 4) in Antikörper-Verdünnungsmedium und Inkubation für 60 Minuten bei RT oder bei 4°C über Nacht. Danach 5 maliges Spülen mit PBS.

2.) Die Detektion erfolgte mit dem LSAB 2 HRP – Kit . Jedes Reagenz 15 min inkubieren und zwischen jedem Reagenz ausgiebig spülen mit PBS.

Reagenz 1: biotinylierter Brückenantikörper – Ziege anti Maus

Reagenz 2: Avidin HRP (Meerrettichperoxidase) markiert; Aivdin hat eine hohe Affinität zu Biotin ⇒ Komplexbildung

Danach 5 maliges Spülen mit PBS Puffer.

3.) Inkubation mit dem Substrat DAB für 5 Minuten, dann 5 maliges Spülen mit Puffer (PBS), anschließend je einmal mit Leitungswasser und Aqua dest.

4.) Die Kernfärbung erfolgte durch Inkubation in Hämatoxylin für eine Minute, anschließend in Leitungswasser zum Bläuen für 5 Minuten.

5.) Anschließend wurden die Schnitte über aufsteigende Alkoholreihe zum absoluten Alkohol und über Xylol als Intermedium entwässert und mit VitroClud und Deckgläschen eingedeckt.

Doppelfärbung (in tabellarischem Ablauf)

Prim. AK:	CCR9 1:150	45 min RT
Dedektion:	LSAB 2 HRP	je Reagenz 15 min RT
Substrat:	DAB	5 min RT
Zwischenschritt:	Mikrowelle – Citrat pH 6,0 vorgewärmt – 5 min 750 Watt kochen 10 min abkühlen – A. dest	
H ₂ O ₂ -Block:	0,3%-ig in A. dest	10 min RT
Proteinblock:	Beriglobin 1:50	15 min RT – abkippen
Prim. AK II:	Pan CK 1:100	4°C über Nacht
Detection:	LSAB 2 HRP	Reagenz I 30 min RT Reagenz II 15 min RT
Substrat:	HistoGreen	10 min RT

Aufsteigende Alkoholreihe – Xylol – Einbetten der Schnitte in Eukitt.

2.5 Verwendete Mikroskope

1) Die Auswertung der Präparate wurde mit einem Orthoplan Mikroskop (Leica) vorgenommen.

Okular 12,5x

Objektive 10x, 25x, 40x

2) Die Photographien wurden mit einer Canon Digitalkamera EOS 300 aufgenommen.

2.6 Vorgehensweise beim Mikroskopieren

Die Schnitte wurden alle zeilenweise von links oben nach rechts unten durchgemustert. Nekrotische Areale und solche mit Artefakten oder eindeutig unspezifischer Färbung gingen nicht in die Auswertung ein. Aufgrund des uneinheitlichen Färbeverhaltens liess sich nur eine semiquantitative Auswertung vornehmen:

Nur Zellen, die eindeutig als spezifisch gefärbt zu identifizieren waren, galten als positiv gefärbt.

Liessen sich solche nicht feststellen, galten sie als nicht gefärbt.

3 Ergebnisse

3.1 Gegenüberstellung des gleichen Gewebsabschnitts

Im folgenden werden exemplarisch für alle ausgewerteten Gewebeprouben Serienschnitte einer Dezidua basalis mit invasiven Cytotrophoblasten (Abbildung 1), welche gut mit Pan-Cytokeratin angefärbt sind, aufgeführt. Die Vergrößerung der linken Bilder ist 100x, die der rechten 250x.

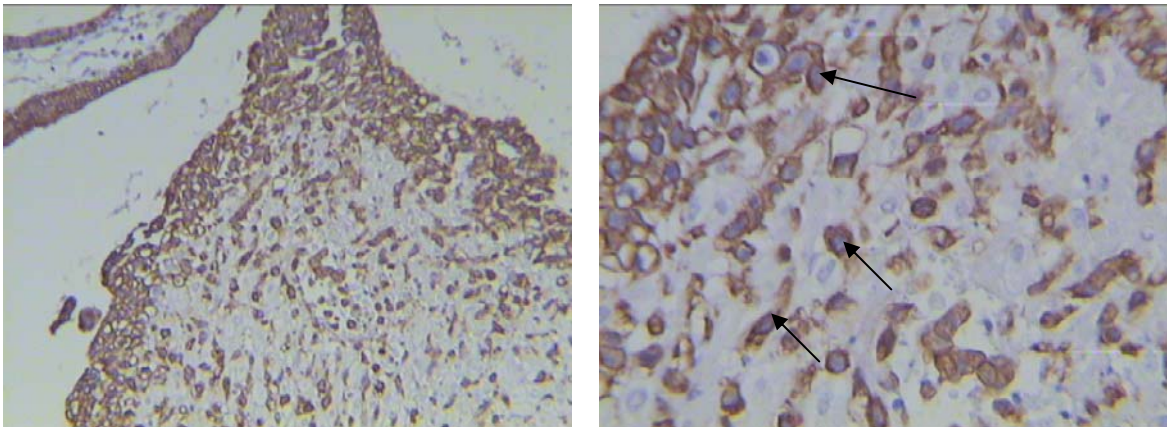


Abb. 1: Pan-Cytokeratin: Die invasiven Cytotrophoblasten sind eindeutig gefärbt (schwarze Pfeile).

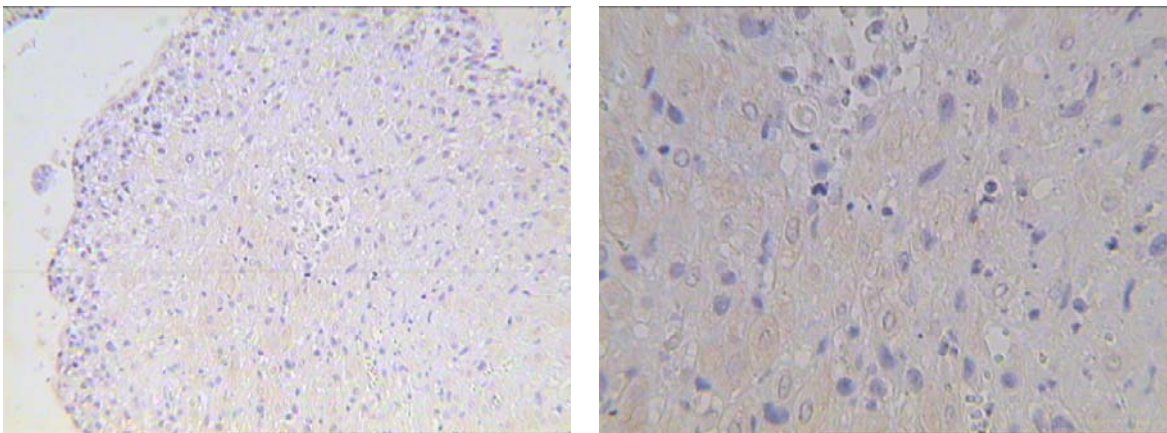


Abb. 2: CXCR2: Ausser einer leichten Hintergrundfärbung der Stromazellen ist keine spezifische Färbung für CXCR2 in Dezidua basalis nachzuweisen

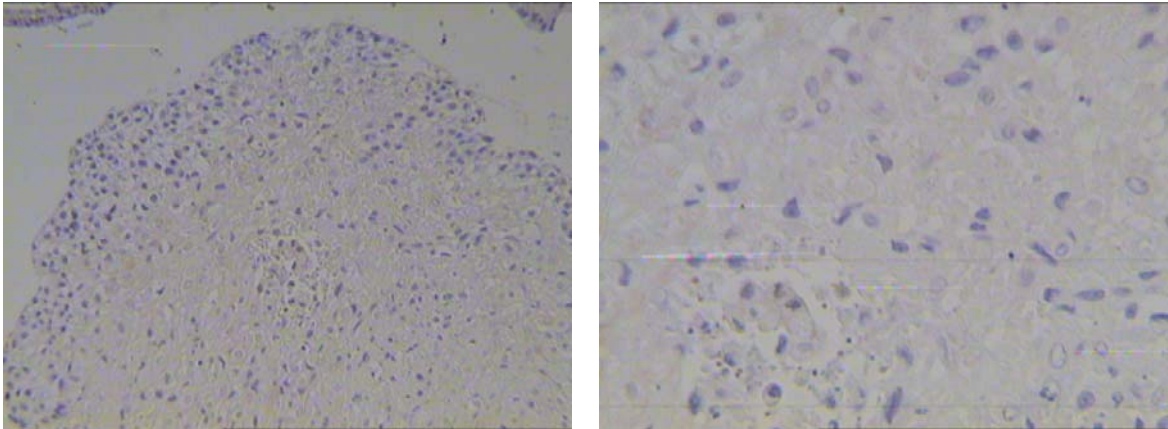


Abb. 3: CXCR3: Es wurde keine spezifische Färbung für CXCR-3 im untersuchten Gewebeabschnitt gefunden.

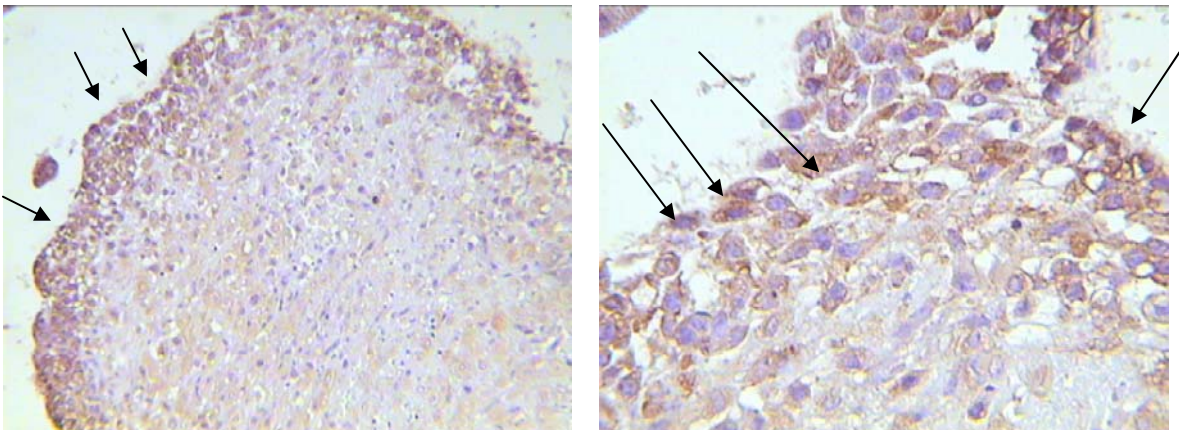


Abb. 4: CXCR4: Für CXCR4 findet sich eine kräftige Anfärbung der invasiven Cytotrophoblasten, vor allem zur Peripherie hin (schwarze Pfeile). Im Zentrum des Gewebeabschnitts zeigt sich keine spezifische Färbung.

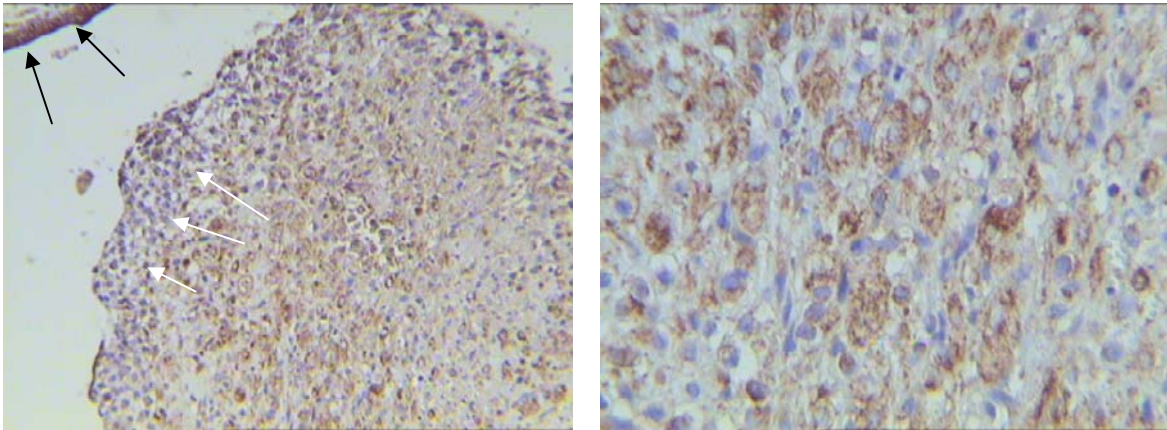


Abb. 5: CCR6 findet sich deutlich auf dem Synzytiotrophoblast (schwarze Pfeile links oben) und im Zentrum des Deziduaabschnitts. Von der Morphologie her ähneln diese Zellen Makrophagen, CTB und Leukozyten. Die peripheren CTB zeigen deutlich weniger Färbung (weiße Pfeile).

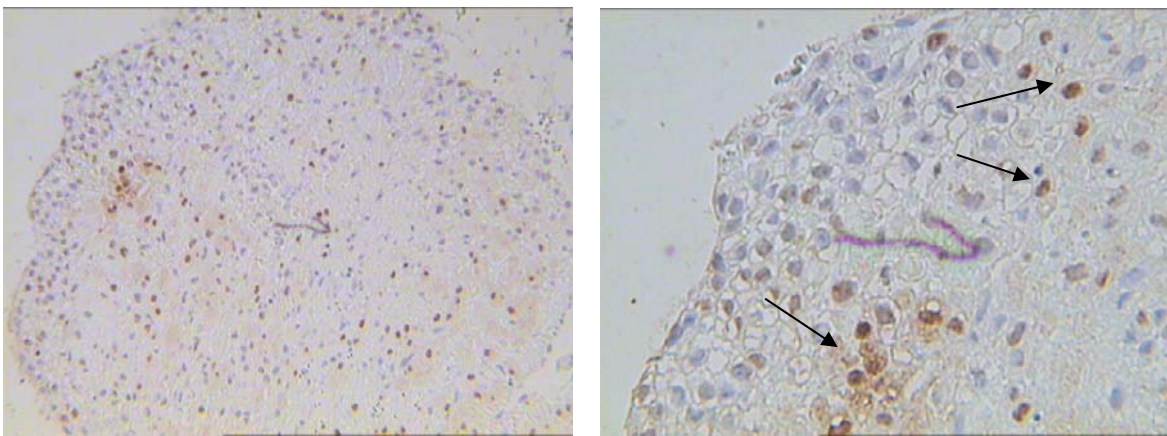


Abb. 6: CCR9 zeigt eine Kernfärbung in den invasiven Cytotrophoblasten (schwarze Pfeile).

CCR7 zeigt keine Färbung in diesem Bereich und wird daher nicht gezeigt.

3.2 Die Antikörper im einzelnen

Das Färbeverhalten der Stromazellen zeigte für alle Antikörper ein gleiches Muster. Dieses soll vorweg erläutert werden und ist exemplarisch für die anderen Antikörper nur bei CXCR3 illustriert.

So gab es Areale mit stärkster Färbung von Stromazellen. Diese lagerten sich Arteriolen zum Teil zwiebelschalenartig an und erinnerten morphologisch an undifferenzierte Stromazellen.

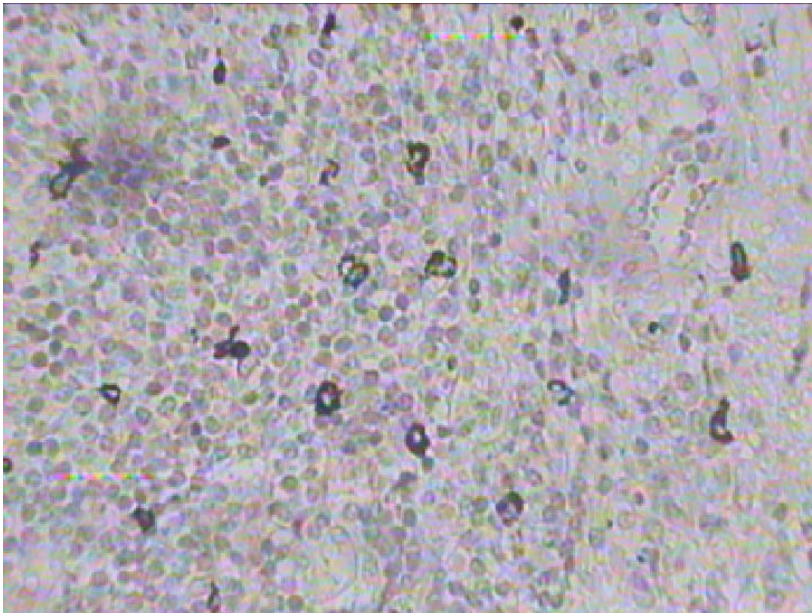
Die gefärbten dezidualisierten Zellen zeigten eine homogene Färbung über die ganze Zelle mit allen verwendeten Antikörpern. Wir bezweifeln, dass es sich hierbei um eine spezifische Färbung handelt, sondern gehen von einer unspezifischen Bindung der Antikörper an von der Zelle produzierte Proteoglykane aus.

Dann gab es wiederum Areale, die weitgehend negativ färbten.

3.2.1 CXCR3

Als Positivkontrolle wurde Tonsille gefärbt (Abbildung 7):

Es färbten sich polymorphe Zellen mit deutlichem Zytoplasmasaum vor allem im Parakortex in Sinusnähe. Morphologisch entsprachen sie Makrophagen/Dendritischen Zellen.



*Abb. 7: CXCR3-Färbung an Tonsille, positive Zellen braun (DAB)
Kernfärbung Hematoxylin, Vergr: 250x .*

Decidua:

Es zeigte sich eine meist positive Färbung an Leukozyten, welche aufgrund der Anzahl, Morphologie und des Verteilungsmusters eher nicht zu den LGL gezählt werden können.

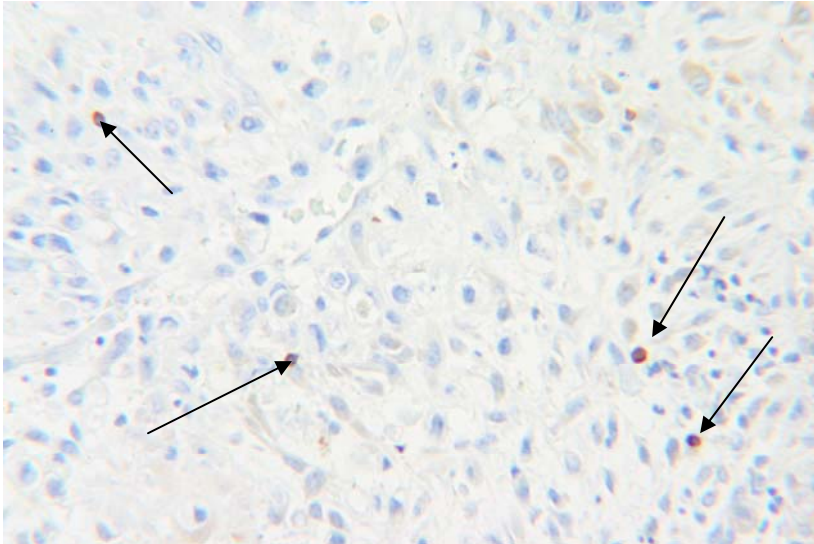


Abb. 8: CXCR3 positive Lymphozyten (schwarze Pfeile), Vergr.:250 x.

Invasive CTB stellten sich negativ dar.

Es konnten aufgrund der Anfärbung drei Arten von Stromazellen unterschieden werden:

1. ungefärbte pflastersteinartige dezidualisierte Zellen (Pfeil, schwarz in Abbildung 9).
2. leicht gefärbte dezidualisierte Zellen. (weiße Pfeile in Abb.9).
3. stark angefärbte, zum Teil fischzugartige Formationen von diffus wachsenden, undifferenzierten, spindelförmigen Stromazellen mit bindegewebsartigen Zellausläufern. Diese lagerten sich in stark gefärbten Arealen zwiebelschalenartig um Gefäße herum an. (Pfeil weiss in Abbildung 10).

In allen Präparaten zeigte das Gefäßendothel keine Färbung, das Drüsenepithel jedoch eine schwache Färbung. Der Synzytiotrophoblast färbte sich bis auf wenige Ausnahmen nicht an.

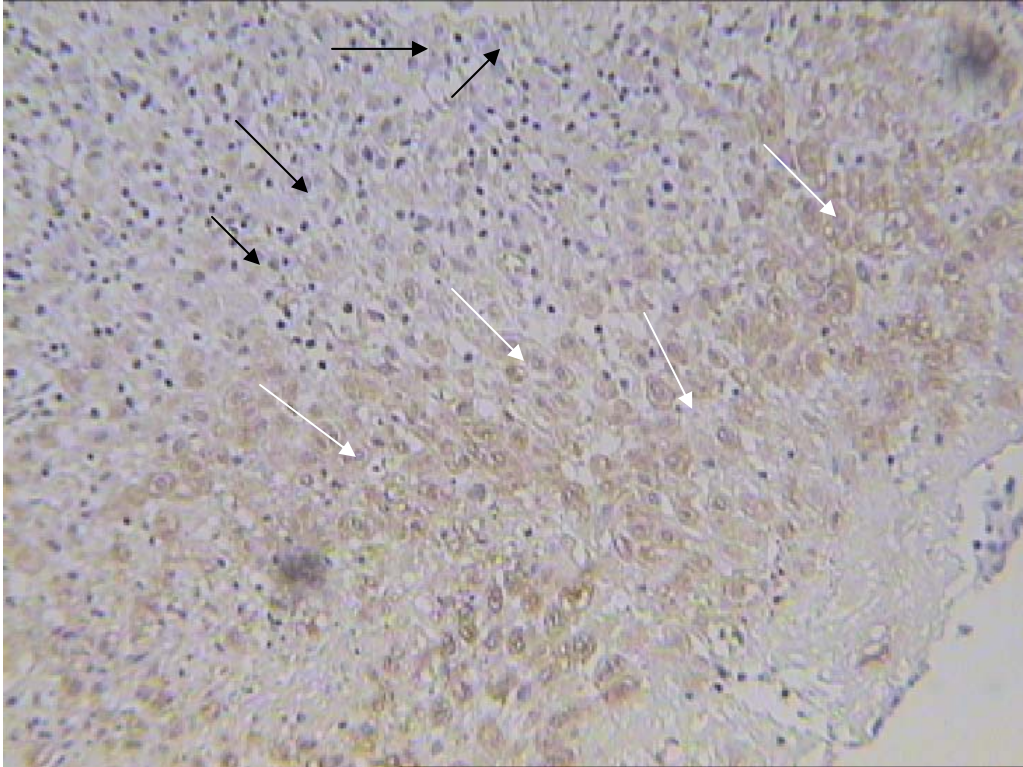


Abb. 9: CXCR3: ungefärbte pflastersteinartige dezidualisierte Zellen (schwarze Pfeile) und leicht gefärbte dezidualisierte Zellen (weiße Pfeile), Vergr.: 250x.

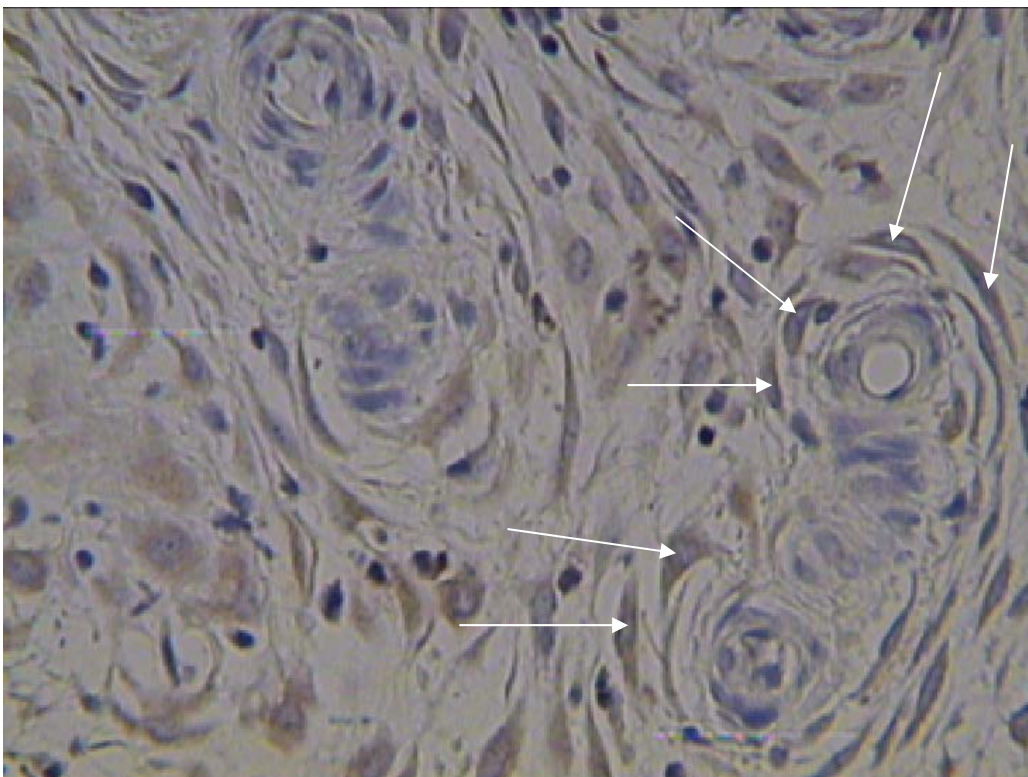


Abb. 10: CXCR3: undifferenzierte, spindelförmige Stromazellen ,den Gefäßen zwiebel-schalenartig anliegend (weiße Pfeile); negatives Gefäßendothel. Vergr.: 300x.

3.2.2 CCR6

Tonsille: besonders stark gefärbt waren manche Zonen zwischen den Follikeln und an der Haube von den Sekundärfollikeln. Diese Zellen entsprachen morphologisch Lymphozyten.

Dezidua:

Bei diesem Antikörper ließ die Mehrzahl der LGL eine sehr ausgeprägte Färbung erkennen, die Lymphozyten weniger deutlich (Abb. 11)

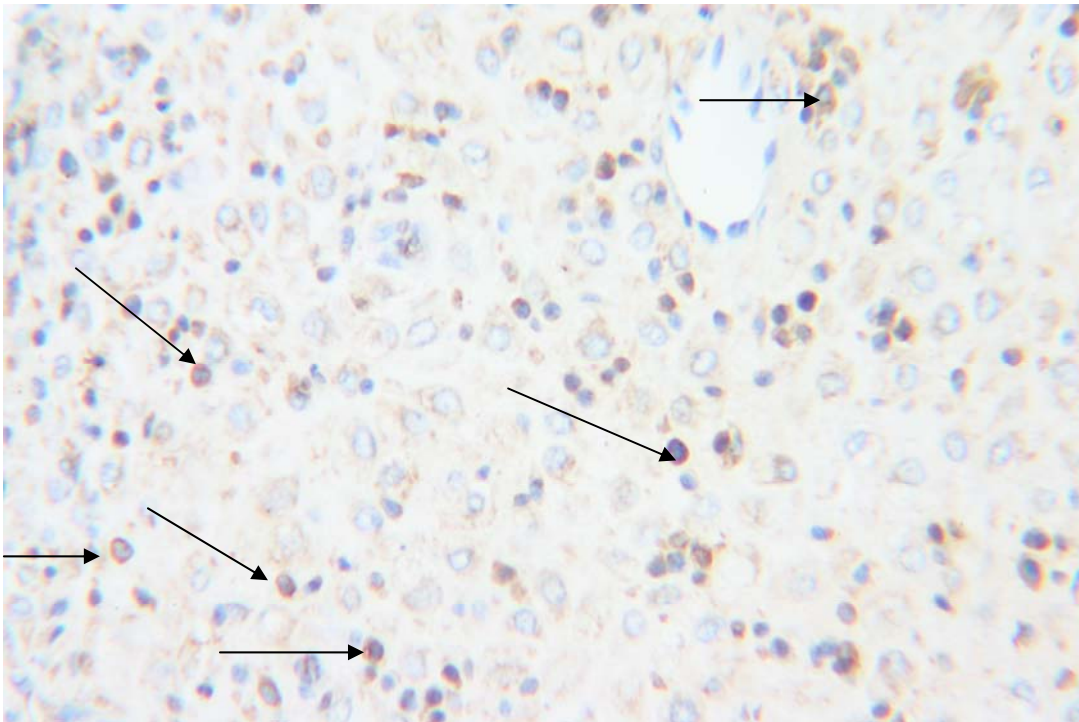


Abb. 11: CCR6: LGL deutlich gefärbt (schwarze Pfeile), Vergr: 300 x.

Im Übrigen färbten sich besonders 2 verschiedene Zellarten:

1. Der Plazentazotte aufliegende Synzytiotrophoblasten (schwarzer Pfeil in Abb. 12).
An Zellensäulen mit beginnender Cytotrophoblasten-Wanderung zeigte sich jedoch keine Färbung dieser Zellen (weisser Pfeil in Abb. 12)

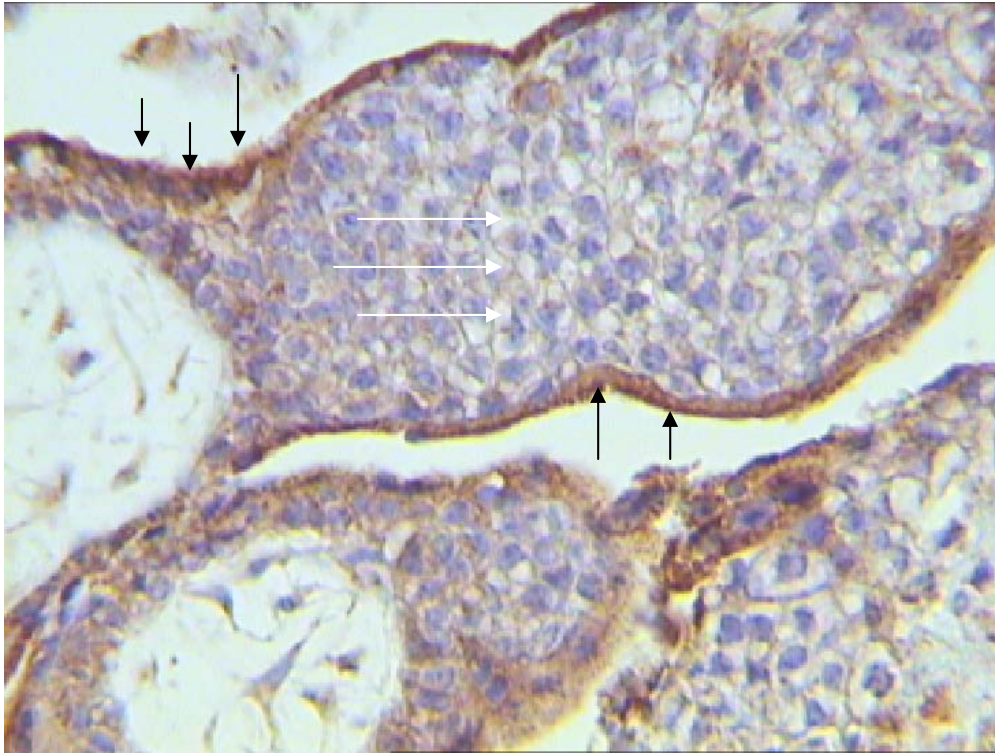


Abb. 12: CCR6: deutliche Färbung des Synzytiotrophoblasten (schwarze Pfeile), hingegen keine Färbung der CTB (weiße Pfeile) Vergr: 300 x

2. Das Lumen der Arteriolen zeigte sich manchmal von stark positiv gefärbten invasiven CTB ausgekleidet. (weiße Pfeil in Abb.13)

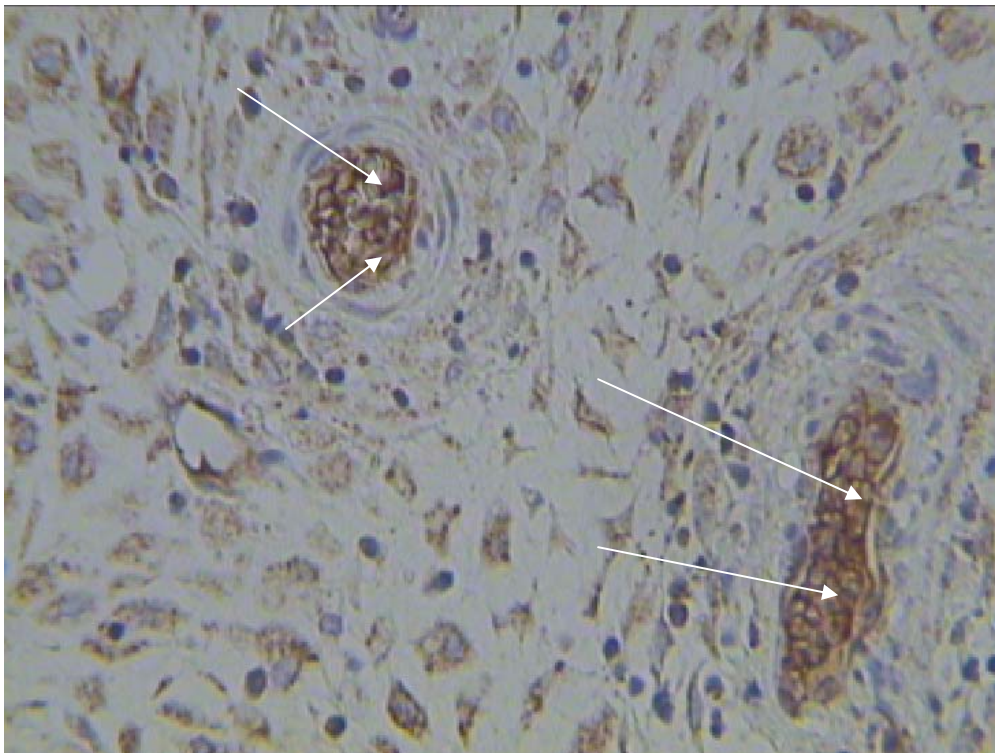


Abb. 13: CCR6: von invasiven CTB ausgekleidete Blutgefäße (weiße Pfeile)

3.2.3 CXCR2

Tonsille: es fanden sich deutlich gefärbte lymphozytäre Zellen, aber nur entlang der Sinus und Kapillaren.

Dezidua :

Hier fanden sich die eingangs erwähnten Formen der Bindegewebszellen:

1. ungefärbte 2. dezidualisierte schwach gefärbte 3. undifferenzierte stark gefärbte

Das Gefäßendothel war negativ, der Synzytiotrophoblast uneinheitlichen negativ bis schwach positiv

Lymphozyten färbten äusserst selten positiv, der CTB war negativ.

3.2.4 CCR7

Tonsille:

Es zeigten sich einzelne spindelförmige Zellen entlang der Sinus gefärbt.

Dezidua:

Hier waren positiv gefärbte Zellen die Ausnahme. Vereinzelt färbten sich positive Zellen von der Morphologie her reifen dendritischen Zellen ähnlich.

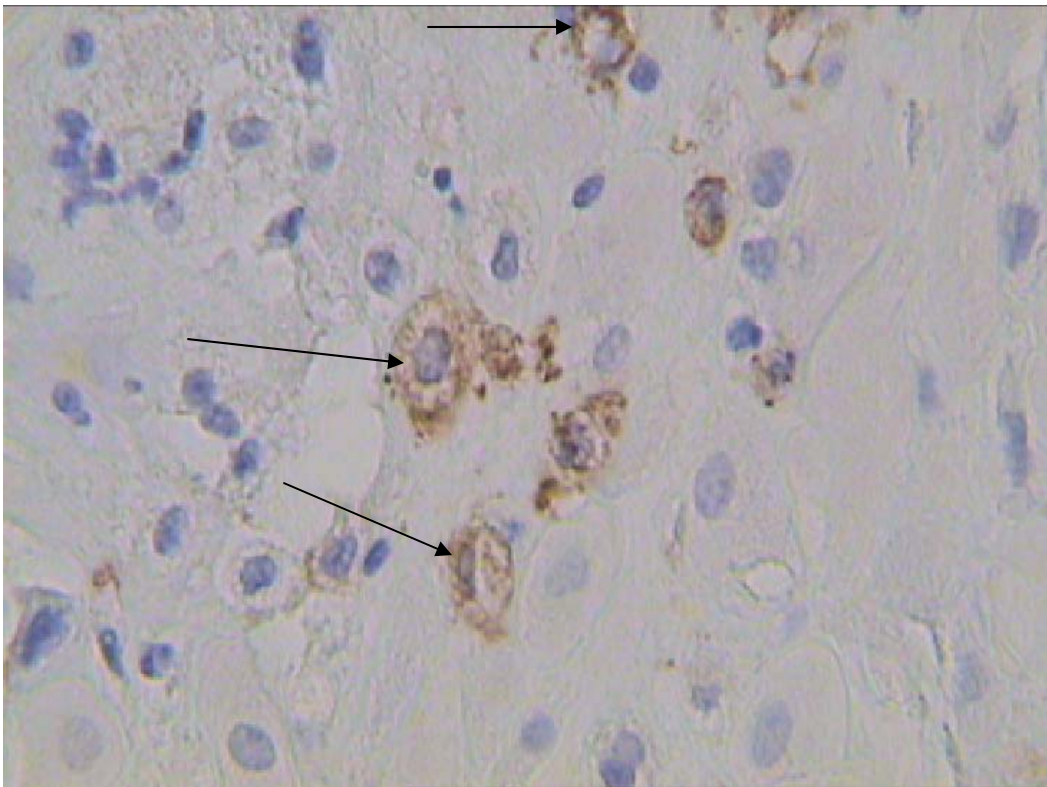


Abb. 14: CCR7: reife dendritische Zellen (schwarze Pfeile) Vergr:350 x.

Das Gefäßendothel war durchgängig negativ.

Lymphozyten, dezidualisierte Zellen, undifferenzierte Stromazellen und CTB stellten sich durchweg negativ dar.

3.2.5 CXCR4

Tonsille:

Vor allem im Randsinus färbten sich lymphozytäre Zellen, im Follikelzentrum keine, in der Follikelperipherie wenige.

Dezidua:

In unseren Präparaten zeigten die CTB in den Plazentazotten eine unregelmäßig schwach bis starke Färbung von CXCR 4.

Besonders an der Spitze (schwarze Pfeile in Abb.15) von auswachsenden Zellsäulen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Intensität.

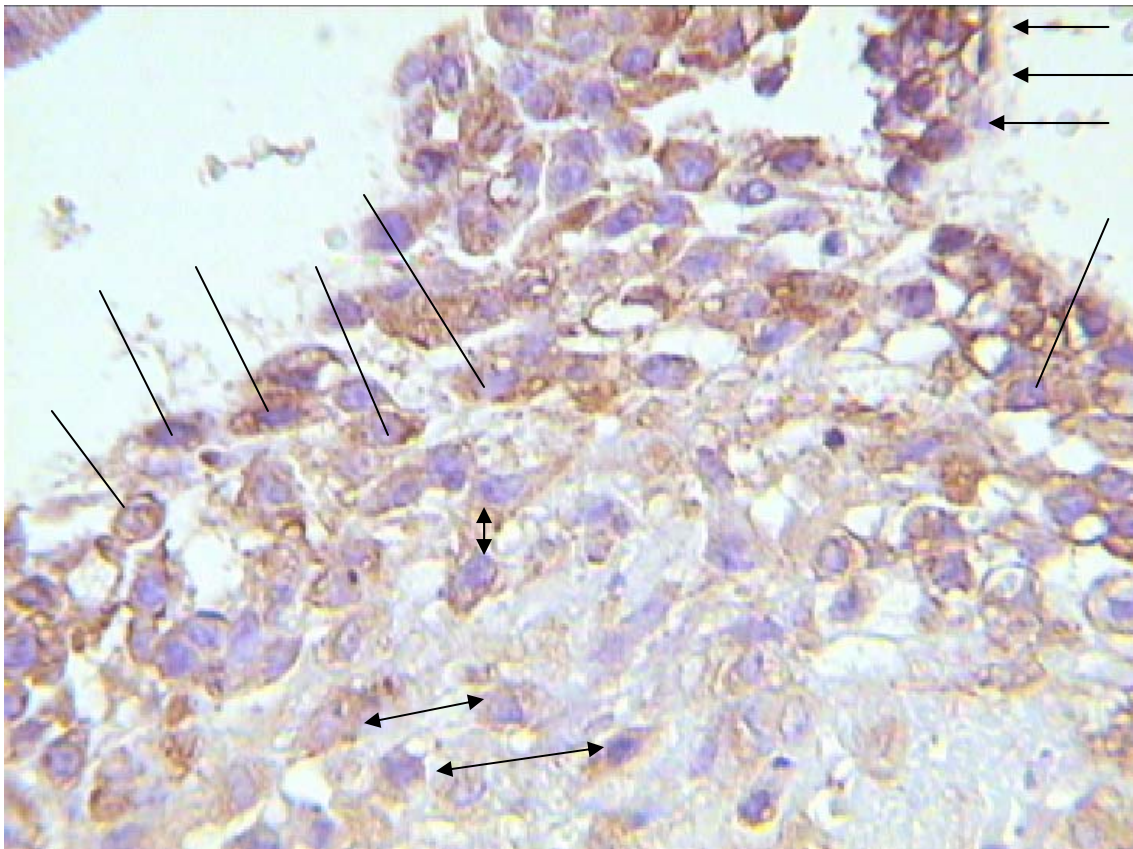


Abb. 15: CXCR4: CTB an der Spitze der Zellsäule zeigen die stärkste Färbung (schwarze Pfeile). Deutliche und in dieser Schicht konstante Färbung zeigen oberflächliche invasive CTB (schwarze Linien). In tieferen Schichten ist die Expression von CXCR4 der invasiven CTB rückläufig (schwarze Doppelpfeile).

Die CTB an der Oberfläche der Dezidua, welche im Begriff sind in die Dezidua einzuwandern, zeigten ein sehr starkes und in dieser Zellschicht auch konstantes Färbeverhalten für CXCR4 (schwarze Linien in Abb.15), welches in tieferen Schichten der Dezidua nicht mehr so deutlich ausgeprägt war (schwarze Doppelpfeile in Abb.15).

Bei den Stromazellen war ein starker Wechsel des Färbeverhaltens in unterschiedlichen Arealen auffallend. Eine Abhängigkeit von Gefäßen ließ sich nicht erkennen, es schien jedoch, als ob drüsenreiche Gebiete sich schwächer färbten als drüsenarme. Es ließen sich die eingangs erwähnten Formen der Stromazellen deutlich voneinander abgrenzen. Das Gefäßendothel musste unterteilt werden: zeigten die Venolen noch eine schwach positive Färbung ließen die Arteriolen eine solche vermissen.

Der Synzytiotrophoblast färbte mäßig bis stark. Eine starke Färbung ließ sich besonders an einzelnen Polen deziduawärts gerichteter Zotten erkennen und an der Spitze von auswachsenden Zellsäulen. Die deciduale Lymphozyten (inkl. LGL) zeigten ein weitgehend negatives Färbeverhalten.

3.2.6 CCR9

Es ergaben sich folgende Färbemuster, wobei vor allem die Kerne gefärbt waren:

1. diffus über das Präparat verteilte, Makrophagen ähnliche Zellen, mit granuliertem Zytoplasma und einer starken Kernfärbung (schwarze Pfeile in Abb. 16)

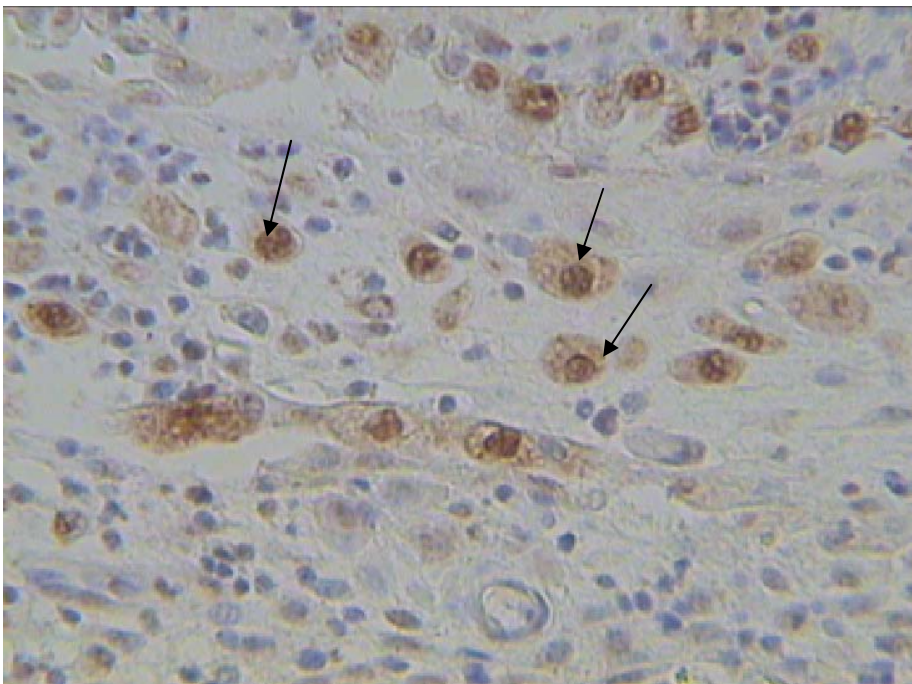


Abb. 16: CCR9: Makrophagen ähnliche Zellen, mit granuliertem Zytoplasma und einer starken Kernfärbung (schwarze Pfeile), Vergr: 350 x

2. spindelförmige Zellen, ebenfalls mit einer starken Kernfärbung (Abb.17)

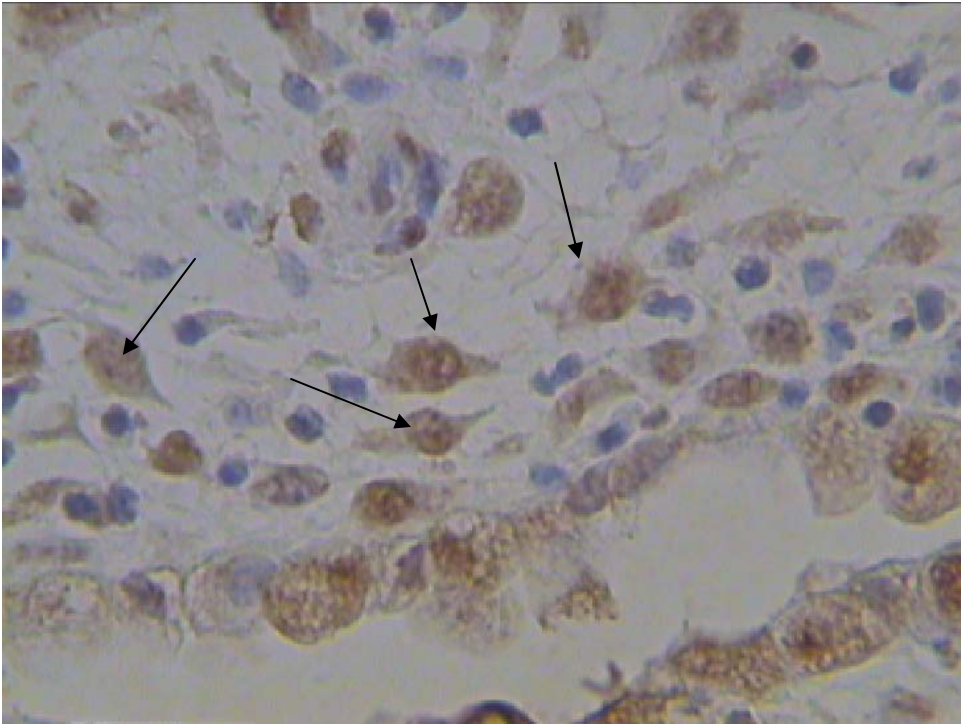


Abb. 17: CCR9: spindelförmige Zellen, mit einer starken Kernfärbung: morphologisch invasiven CTB ähnlich (schwarze Pfeile) Vergr: 350 x.

In der Doppelfärbung mit Cytokeratin stellten sich diese Zellen eindeutig als invasive CTB heraus (Siehe Abb.18)

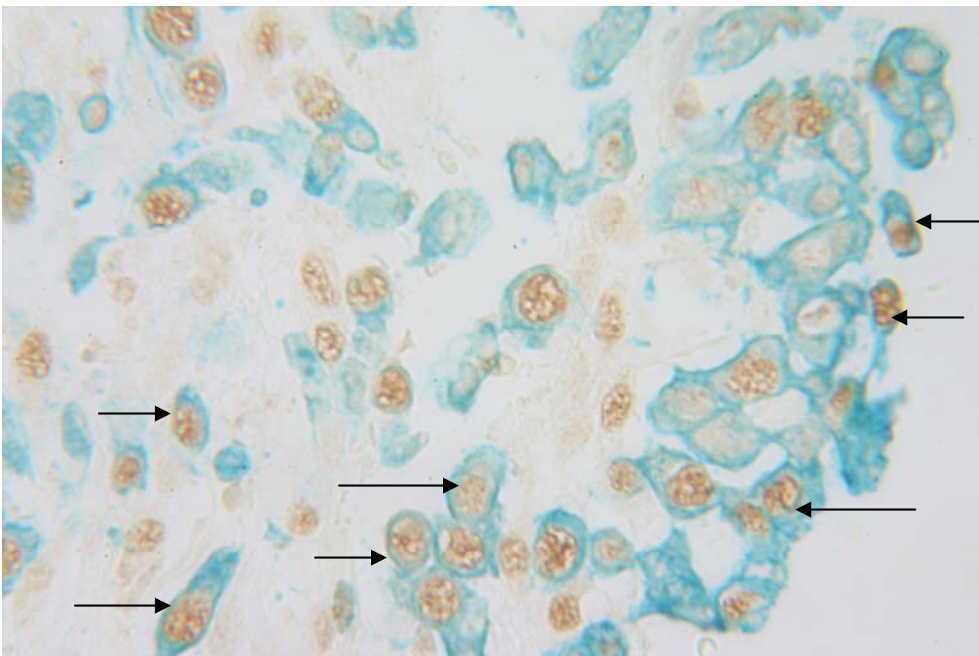


Abb. 18: invasive CTB (schwarze Pfeile): Kern CCR9 positiv (braun), Zytoplasma grün (Zytokeratin); Vergr: 350x.

3. in den Zotten stellten sich die Kerne der basalsten Trophoblastenschicht deutlich dar.

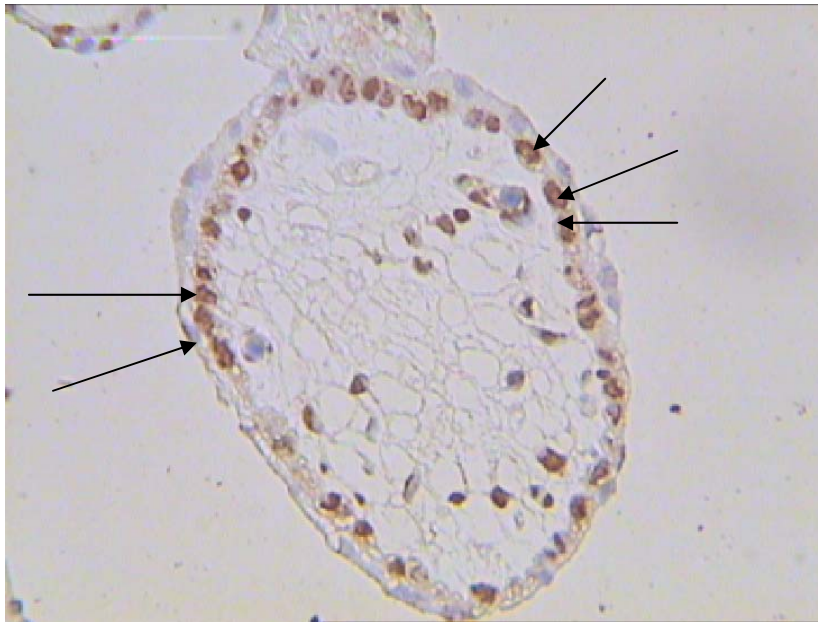


Abb. 19: CCR9: Die Kerne der basalen Trophoblastenschicht zeigen deutliche Expression von CCR9. (schwarze Pfeile)

Lymphozyten ließen sich mit diesem Antikörper nicht färben.

3.3 Synopsis der Befunde

	CCR6	CCR7	CCR 9	CXCR 2	CXCR 3	CXCR 4
CTB	Oberflächlich – Zentral +	–	Kern- membran +	–	–	Oberflächlich + Zentral – bis +
Stromazellen (unreif)	+	–	+	+	+	+
Lymphozyten	Meist +	–	–	Selten +	Meist +	–
Gefäßendothel	– bis +	–	–	–	–	Venole + Arteriole–

Tab. 5: + vorhanden, – nicht vorhanden

4 Diskussion

Chemokine wurden ursprünglich als Abwehrproteine angesehen, mit deren Hilfe das Immunsystem eine gerichtete Antwort gegen in den Organismus eingedrungene Schädlinge initiieren konnte. Heute ist klar, dass ihre Rolle weit darüber hinausgeht. So konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, Organogenese, Entwicklung des Kreislauf- und Nervensystems spielen (Horuk, 2001). Chemokine üben ihre Wirkung über spezielle Rezeptoren, die Chemokinrezeptoren aus. Auch diese sind in den letzten Jahren ins Interesse der Wissenschaft gerückt. Einerseits wegen ihrer Rolle als Eintrittspforte für das HIV 1 in Lymphozyten und Nervenzellen, andererseits scheinen sie bestimmten Tumorzellen die Fähigkeit zur Metastasierung und zum Wachstum zu verleihen (Murakami, 2002; Zeelenberg, 2003; Kucia, 2004; Smith, 2004; Wiley, 2001).

Das Einnisten des kindlichen Gewebes in die Dezidua der Mutter, das diffuse Einwachsen von Cytotrophoblasten (CTB) über das Endometrium bis ins Myometrium, und schlussendlich die Arrosion mütterlicher Blutgefäße durch CTB, lässt Parallelen zu malignem Tumorwachstum erkennen. Der erste Teil der Diskussion widmet sich daher der Chemokinrezeptor Ausstattung der CTB und der dezidualen Stromazellen.

Die bisherige Erforschung von Chemokinrezeptoren bei Malignomen konnte den Rezeptoren CXCR4 und CCR7 eine überragende Rolle zuweisen. So konnte gezeigt werden, dass dem CXCR4 Rezeptor und seinem Liganden SDF mehrere grundlegende Mechanismen zum Wachstum und zur Metastasierung eines Malignoms zugeordnet werden können (Kucia, 2004):

SDF und CXCR4 führen zu:

- erhöhten Zellmobilität durch Veränderung der Zytoskelettproteine z.B. einen signifikanten Anstieg der Zahl und Dicke der T-Aktinbündel
- Zunahme der Adhäsionsmoleküle (z.B. LFA 1, VLA 4 und 5), welche der Tumorzelle erlauben, an Fibrinogen, Fibronectin und vor allem an Gefäßendothel anzudocken.

- Aktivierung von NF- κ B, was vor allem zu einer Sekretion von MMPs, Angiogenesefaktoren, zum Beispiel VEGF, führt. Diese Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorwanderung durch Basalmembranen (MMPs) und der Vaskulogenese des Tumors.
- Positiven Effekt auf Zellproliferation und Zellüberleben zum Beispiel via MAPK p42/44.

Shibuta (2002) zeigte, dass eine CXCR4 Expression mit der Synthesephase des Zellzyklus beim Leberzellkarzinom korrelierte. Dies führte bereits bei einigen Malignomen zu klinischen Erkenntnissen:

Am Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass CXCR4 für die Proliferation von Brustkrebszellen benötigt wird (Smith, 2004) und dass blockierende CXCR 4 Antikörper im Tiermodell die Metastasierungsrate von Mamakarzinom-Zelllinien vor allem in die Lunge reduzieren (Zeelenberg, 2003). Ebenso zeigte der Rezeptor CXCR4 im Non small cell lung cancer sowohl eine Kern-, als auch Zytoplasmafärbung. Hier war eine starke Kernfärbung (bei Abwesenheit des Rezeptors von der Zelloberfläche) mit einer besseren Prognose assoziiert (Spano, 2004). Auch für andere Tumoren scheint CXCR4 eine Rolle zu spielen. So fand Murakami (2002) heraus, dass die Expression von CXCR4 die Metastasierungsrate von B 16. Melanomzellen in die Lungen von Mäusen erhöht. Dieser Rezeptor scheint also nicht nur für das Wachstum, sondern auch für eine organspezifische Metastasierung verantwortlich zu sein.

Wie verhalten sich unsere Ergebnisse?

In unseren Präparaten zeigten die CTB in den Plazentazotten eine unregelmäßig schwach bis starke Färbung von CXCR4. Besonders an der Spitze von auswachsenden Zellsäulen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Intensität. Die in die Dezidua einwandernden invasiven CTB zeigen eine starke Färbung für CXCR4. Dieses Ergebnis wird auch von anderen Autoren gestützt: Drake und Koautoren (2004) fanden einen starken Gehalt an mRNA für CXCR4 in den Plazentazotten. Auch mittels RT-PCR konnte CXCR4 in Zotten aus dem ersten Trimenon von Ishii (2000) nachgewiesen werden.

Bei den immunhistochemischen Schnitten von Douglas (2001) färbte sich die Synzytiotrophoblastenschicht ebenfalls positiv. Diese Resultate beziehen sich alle auf Trophoblasten in der Plazenta, welche sehr gut untersucht zu sein scheinen. Erstaunlich wenig ist jedoch über die CXCR4 Expression von invasiven CTB in der Dezidua bekannt.

Bei uns zeigten die CTB an der Oberfläche der Dezidua, welche also im Begriff sind in die Dezidua einzuwandern, ein sehr starkes und in dieser Zellschicht auch konstantes Färbeverhalten für CXCR4, welches in tieferen Schichten der Dezidua nicht mehr so deutlich ausgeprägt war. Aus diesem Befund kann gefolgert werden, dass dem CXCR 4 Rezeptor nur am Anfang des invasiven Wachstums der CTB eine bedeutende Rolle zukommt: sei es als chemotaktischer Wegweiser für die CTB oder (in Analogie zu den Tumorzellen) als wichtiger Kofaktor für die Zellproliferation. Interessanterweise sind genau diese äußeren CTB auch diejenigen welche eine starke Proliferation aufweisen, während die CTB in den tieferen Schichten der Dezidua keine Anzeichen für Zellteilung aufweisen (Bulmer, 1988).

Einen ähnlichen Vorgang, den Erwerb und darauffolgenden Verlust eines Rezeptors auf dem Invasionsweg von Cytotrophoblasten beschreibt Sato (2003) für CCR1.

In diesem Zusammenhang wäre interessant, die dezidualen Zellarten auf ihre Produktion von CXCR4 Liganden zu untersuchen. Nach den Ergebnissen von Red-Horse (2001) sollen besonders Blutgefäße und die CTB selbst SDF produzieren. Die Blutgefäße könnten so CTB den Weg zum mütterlichen Gefäßsystem zeigen, welches ja von CTB zum Teil ausgekleidet wird. Der CTB könnte sich selbst ein Proliferationssignal im Sinne eines autokrinen Loop liefern. Diesen Mechanismus beschrieb Forster (2001) für bestimmte Knochenmarkszellen und Sun (2003) für Prostatakrebszellen.

Nur wenige Zellen in der Dezidua weisen den CCR7 auf. Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich aufgrund von Lage und Morphologie um reife DC handelt. Von CCR7 ist bekannt dass er wichtig für die Wanderung von antigenpräsentierenden Zellen von der Peripherie in die Lymphknoten durch afferente Lymphgefäße ist (Hromas, 1997). Dies ist ein Weg, den auch lymphogen metastasierende Neoplasien nehmen.

So verwundert es nicht, dass der Erwerb von CCR7 zu einem dramatischen Anstieg an regionalen Lymphknotenmetastasen bei B 16. Melanomzellen im Tiermodell hervorruft (Wiley, 2001). Forster drückt es so aus (2001): "Lektion gelernt von den Lymphozyten! CCR7 Rezeptor beteiligt in der lymphogenen Metastasierung von Melanomen!". In der Tat scheinen Tumorzellen diesen Rezeptor auf die gleiche Art wie antigenpräsentierende Zellen zu nutzen, um in die regionale Lymphknoten zu gelangen.

In den von uns gefärbten Schnitten zeigte keine Population von Trophoblasten positive Anfärbungen für CCR7. Zu einem ganz anderen Ergebnis kam Drake (2004): Sie stellten mittels RNase-Protection Assay einen hohen Gehalt von CCR7 in placentaren CTB fest. Nach genauer Studie der abgebildeten Banden besteht jedoch Grund zur Annahme, dass von den Autoren die Banden falsch zugeordnet wurden. Unserer Meinung nach bezeichneten sie die CXCR5 Bande als CCR7 Bande. Leider hatten wir keinen CXCR5 Antikörper zur Verfügung um diesen Aspekt zu überprüfen. Wenn man hinsichtlich CXCR4 und CCR7 die CTB mit neoplastischen Zellen vergleicht, zeigt sich folgendes:

CXCR4 bewirkt bei Neoplasien organspezifische Metastasierung vor allem in die Lunge, und CCR7 vor allem in die Lymphknoten. Nach unseren Ergebnissen müsste sich also ein von den CTB ausgehender (CXCR4 positiver, CCR7 negativer) Tumor vor allem in die Lunge und nicht in die Lymphknoten metastasieren. Dies ist tatsächlich der Fall: Das Chorionkarzinom, ein von Trophoblasten ausgehender Tumor, folgt genau diesem Schema: häufig Lungenmetastasen, so gut wie keine Lymphknotenmetastasen (Riede, 1995). Auch benigne CTB lassen sich in der Lunge von Schwangeren nachweisen, sind also offensichtlich hierher eingewandert (Yagel, 1994).

Trophoblasten scheinen sich also vergleichbar wie Tumorzellen mit dem gleichen Set an Chemokinrezeptoren zu verhalten. Dies lässt die Plazenta als geeignetes Modell für Tumoren erscheinen.

Eine deutliche Färbung vieler Zellen innerhalb der Dezidua zeigte sich mit dem Antikörper gegen CCR6. Zu diesem gibt es aus der Literatur noch keine Daten zur Expression in der Dezidua, und allgemein ist von CCR6 ist noch nicht allzu viel bekannt. Dieser Rezeptor

spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von unreifen dendritischen Zellen zum Ort einer Entzündung (Horuk, 2000), ebenso wird er mit der Pathogenese der Psoriasis in Verbindung gebracht (Homey, 2000). Für CCR6 ist bisher nur MIP 3 alpha als Ligand bekannt (Papadakis, 2000). Bei unseren Färbungen zeigte sich folgendes:

Während der Synzytiotrophoblast in den Plazentazotten deutlich färbte, zeigte der Cytotrophoblast in den Zellsäulen der Zotten nur ein sehr schwaches Färbemuster. Dies behielt er bis in die oberflächlichsten Schichten der Dezidua bei, wo mit zunehmender Invasionstiefe eine deutliche Färbung imponierte. Dieses Bild ist genau gegensätzlich zu dem mit CXCR4 erreichten. Für CCR6 scheinen die extravillösen und proliferierenden Zellen negativ zu sein. Der Rezeptor scheint also für das Wandern innerhalb der Dezidua - nicht in die Dezidua- nötig zu sein und keine Rolle bei der Proliferation zu spielen. Zellbiologische Untersuchungen, gerade auch zum Vorkommen des Liganden MIP 3 alpha in der Dezidua, dürften hierzu nähere Erkenntnisse liefern, leider sind jedoch bisher keinerlei Daten zu MIP-3alpha in der Dezidua bekannt.

Das Färbepild von CCR9 zeigte bei uns unerwartet eine Kernfärbung, war doch ein Chemokinrezeptor überwiegend an der Zellmembran erwartet worden. Allgemein ist über CCR9 folgendes bekannt: Er spielt eine Rolle (Quiping, 2004):

1. Bei der Entwicklung des mukosalen Immunsystems des Dünndarms: CCR 9 und Integrin alpha 4 Beta 7 dient den Lymphozyten als Adresscode zum Homing in den Dünndarm.
2. Bei der Migration, Reifung und Selektion von CD 4 und CD 8 positiven Thymozyten.
3. Bei der Apoptoseresistenz von CD 4 positiven T-Zellen in akuter und chronischer lymphatischer Leukämie: der Ligand CCL25(TECK) (Quiping, 2004) führt durch den Rezeptor zu einer erhöhten Expression von LIVIN. Dies ist ein Mitglied der "Inhibitor of Apoptosis Protein" Familie.

Bei Quiping (2004) finden sich die ersten Berichte, dass das Paar CCL 25/CCR 9 bei unterschiedlichen Zellarten unterschiedliche Wirkungen hervorruft. Nach unserem Kenntnisstand ist die vorliegende Arbeit die erste, die nachweist, dass sich dieser Rezeptor auf der Kernmembran von invasiven Cytotrophoblasten findet.

Über die Bedeutung dieser Beobachtung lässt sich indessen nur spekulieren: Viele der oben genannten biologischen Vorgänge sind für invasive CTB von Bedeutung: Hier besonders Migration und Reifung wie bei Thymozyten, Apoptoseresistenz und Infiltration wie bei den Leukämiezellen. Weiterführende Untersuchungen an Zellkulturen lassen interessante Ergebnisse erwarten. Wir erhoffen Antworten auf zwei Fragen:

1. Welche Bedeutung hat die nukleäre Expression ?
2. Welche Funktion vermittelt dieser Rezeptor bei einer bestimmten Zellpopulation?

Erstaunlicherweise zeigten nur die basalsten Kerne von Cytotrophoblasten in den Zotten, aber auch vereinzelt Bindegewebszellen in Zottenstroma und Dezidua dieses Färbemuster, während Synzytiotrophoblast und Gefäßendothel und Immunzellen durchweg negativ waren.

Ob und wie die Stromazellen der Dezidua und das Gefäßendothel eine Rolle im Rahmen der Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion spielen, ist noch unklar. Die Rolle der Stromazellen in dem Orchester von Rezeptoren und Liganden ist wenig erforscht. Als Lieferanten für die im Uterus im Überfluss vorkommenden Chemokine kristallisierte Red-Horse (2001) die Stromazellen neben den örtlichen Leukozyten, hier vor allem Makrophagen, und CTB heraus.

Bei unseren Rezeptoranalysen ergab sich ein äußerst unklares Färbemuster der dezidualen Stromazellen hinsichtlich der Expression der untersuchten Chemokinrezeptoren.

So gab es Areale mit stärkster Färbung von Stromazellen. Diese lagerten sich Arteriolen zum Teil zwiebelschalenartig an, als ob sie die Konzentration eines im Blut gelösten Liganden messen wollten. Möglich wäre auch der umgekehrte Gedanke: diese Zellen produzieren Chemokine und exprimieren als Messfühler die entsprechenden Rezeptoren. Dann gab es wiederum Areale, die weitgehend negativ färbten.

Innerhalb der Stromazellen muss noch zwischen reifen, dezidualisierten Zellen und undifferenzierten spindelförmigen Stromazellen unterschieden werden (Dallenbach-Hellweg, 1985). Die gefärbten dezidualisierten Zellen zeigten eine homogene Färbung über die ganze Zelle mit allen verwendeten Antikörpern. Wir bezweifeln, dass es sich hierbei um eine spezifische Färbung handelt, sondern gehen von einer unspezifischen

Bindung der Antikörper an von der Zelle produzierte Proteoglykane aus. Trotz unseres Proteinblocks in der Gewebeaufbereitung scheint sich dieser Effekt bei proteoglykanreichen Zellen nicht vermeiden zu lassen. Kollegen, die am Knorpelzellen arbeiten, berichten Ähnliches. Bei den undifferenzierten Stromazellen färbten alle CXCR deutlich, ebenso CCR6. Eine deutliche Kernfärbung ergab CCR9, während CCR7 negativ war.

Laut Hanna (2003) kommt der Stromazelle eine wichtige Funktion dabei zu, die LGL in der Dezidua zu halten. Hierzu produzieren sie CXCL9 und 10, also beides Liganden für CXCR3. Den Sinn dieser Rezeptor-Ausstattung einer mesenchymalen Zelle herauszufinden, fällt in Anbetracht der zahlreichen Rezeptor Ligand Paare nicht leicht. So wird ein Rezeptor von mehreren Liganden aktiviert. Die Tatsache, dass stark gefärbte Areale mit zum Teil zwiebelschalenartigem Umlagern von Arteriolen und schwach oder gar nicht gefärbte zu beobachten waren, zeigt, dass es innerhalb der Dezidua sehr große Unterschiede im Aktivitätszustand von Zellbereichen gibt.

Dies lässt einen Einfluss von außen auf den Aktivitätszustand vermuten. Von "außen" nähert sich bekannterweise die Cytotrophoblasten Front, so dass ein „cross talk“ zwischen dieser und der Stromazelle wahrscheinlich ist. Auch die Tatsache, dass die Stromazellen via Sekretion von CXCL9 und 10 haargenau diese Zellen (LGL) in der Dezidua festhält, welche der CTB via Sekretion von CXCL12 angelockt hat (Hanna, 2003), lässt auf eine "Komplizenschaft" dieser beiden Zellarten schließen. Es wäre interessant dem in weiteren Untersuchungen nachzugehen.

Zur Expression von Chemokinrezeptoren auf Gefäßendothelzellen findet sich eine grundlegende Arbeit (Feil, 1998). Die Autoren benutzten Zellen aus humanen Nabelschnurgefäßen und Mikrogefäßen der Haut und kamen zu folgendem, vereinfachten Ergebnis:

Menschliche Endothelzellen exprimieren kein CCR, aber alle CXCR. Die Expression von CXCR4 ist konstitutiv auf ruhendem Epithel. Die Stimulation mit FGF β erhöht die Expression, mit TNF α erniedrigt die Expression von CXCR4.

Laut Tsuda (2002) produzieren Trophoblasten und endometriale Drüsenzellen TARC (Thymus and Activation Related Chemokine), was zur Infiltration von T2-Helferzellen führt. Mit Beginn der Schwangerschaft kommt es zu einer Umverteilung des T-Helferzellen Systems im Endometrium: beträgt das Verhältnis TH 1/TH 2 in der Proliferationsphase noch 147, so sinkt es in der Sekretionsphase auf 37, und in der Frühschwangerschaft auf 1,3. Die antiinflammatorischen Zytokine der TH 2 Familie (Interleukin 4, 10) und TGF β scheinen einen vorteilhaften Einfluss auf das Wachstum der Plazenta auszuüben und bei normalem Schwangerschaftsverlauf zu dominieren (Mosmann, 1996). Die Anwesenheit von TGF β müsste also die konstitutiv schon vorhandene Expression von CXCR4 auf Endothelzellen verstärken.

Unsere Ergebnisse bekräftigen dies zum Teil, zum Teil widersprechen sie:

CXCR4 zeigte bei Venolen der Dezidua eine leichte Färbung, nicht jedoch die Arteriole. Der Rest der CXCR war negativ, ebenso wie CCR7 und CCR9. CCR6 jedoch, also ein Rezeptor, der laut Tsuda (2002) überhaupt nicht in der Dezidua exprimiert wird, zeigte die stärkste beobachtete Färbung in den Endothelien von Arteriolen. CCR6 hat nur einen einzigen Liganden mit hoher Affinität: LARC (auch MIP 3a genannt). Dieser wird von aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen und Endothelzellen produziert. Die Expression von CCR6 könnte somit einen Mechanismus darstellen, mit dem die Gefässe der Dezidua unreife dendritische Zellen anlocken.

In der Dezidua findet sich ein grosser Anteil an antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, unreife dendritische Zellen) neben den mengenmässig häufigsten Zellen, den LGL. Der zweite Teil der Diskussion widmet sich folglich den Immunzellen in der Dezidua.

Diese bestehen zu ca. 70 % aus den LGL, gefolgt von 20% CD14 positiven Makrophagen und 10% CD3 positiven T-Zellen (Dietl, 1992). LGL weisen eine phänotypische Ähnlichkeit mit NK-Zellen auf, obwohl LGL CD16 negativ sind und keine zytotoxische Aktivität gegenüber den CTB zeigen. Obwohl den CTB die klassischen HLA 1 und HLA 2 Moleküle fehlen,

sind sie wohl durch die Expression atypischer HLA 1 B Moleküle (HLA-G, HLA-E, HLA-C) auf ihrer Oberfläche vor einem NK Angriff geschützt. Eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz der Mutter gegenüber dem kindlichen Gewebe scheinen auch unreife dendritischen Zellen zu spielen. Diese werden in enger räumlicher Assoziation mit LGL und CTB gefunden (Kämmerer, 2002). Denkbar ist hier, dass diese unreifen DC ein inhibitorisches Signal auf T-Zellen ausüben, indem sie diese in der G 0 Phase arretieren, so wie dies in vitro bereits für monozytengenerierte DC gezeigt werden konnte (Steinbrink, 1997).

Laut Hanna (2003) kommt die im menschlichen Körper einmalige Ansammlung von CD16 negativen natürlichen Killerzellen (LGL) in der Dezidua durch die selektive Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren zustande. Der gefäßauskleidende Trophoblast produziert das Chemokin CXCL12, welches die LGL über ihre CXCR4 Rezeptoren zur Migration in die Dezidua veranlasst. Die Retention der LGL in der Dezidua erfolgt über ihre CXCR3 Rezeptoren. Als Ligand hierfür nennen die Autoren von dezidualen Stromazellen produziertes CXCL 9 und CXCL 10. Sind die LGL in der Dezidua „heimisch geworden“, (homing), erfolgt eine deutliche Reduktion der im peripheren Blut noch reichlich vorhandenen Rezeptorausstattung.

Auch in unseren Präparaten zeigte sich eine sehr geringe Rezeptorausstattung der Lymphozyten. Wir haben allerdings die Gesamtheit der lichtmikroskopisch als Lymphozyten zu identifizierenden Zellen bewertet, ohne zwischen den einzelnen Populationen zu unterscheiden. Für CXCR4, CCR7 und CCR9. waren die Lymphozyten weitgehend negativ. CXCR2 zeigte selten positive Färbung. CXCR3 und CCR6 jedoch zeigten in der Mehrzahl der Fälle positive Lymphozyten. Auffallend war, dass diese jedoch deutlich schwächer färbten als die vergleichbaren Zellen in der als Positivkontrolle gefärbten Tonsille. Wu (2005) kam mit Durchflusszytometrie zum Teil zu anderen Ergebnissen. Sie untersuchten allerdings nur LGL und nicht die Gesamtheit der Lymphozyten. Da die LGL aber deren Großteil ausmachen, sehen wir eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben:

Im Einzelnen:

Für CXCR4 zeigten mehr als 83 Prozent der LGL den CXCR4 Rezeptor im FACS (Wu, 2005). Auch Red-Horse (2001) wies in dezidualen Leukozyten einen hohen Gehalt an mRNA für CXCR4 nach, dagegen wies Hanna (2003) den Rezeptor nur bei 37 Prozent der LGL mittels RT-PCR nach, und bei uns waren die Lymphozyten weitgehend negativ. Da allerdings die Trophoblasten eindeutig gefärbt waren, kann davon ausgegangen werden, dass unser Antikörper sowie die Färbetechnik valide waren, so dass wohl auf Proteinebene nur sehr wenig CXCR4 auf Leukozyten in der Dezidua zu finden ist.

Im Fall von CXCR 3 decken sich unsere Ergebnisse mit denen von Hanna (2003) und Wu (2005). Die Mehrzahl der Leukozyten färbte positiv. Hierbei scheint es sich aufgrund der Morphologie und der Häufigkeit der Zellen um LGL zu handeln. Dies bekräftigt die Annahme über die wichtige Rolle dieses Rezeptors für die Retention der LGL in der Dezidua.

Für die Expression von CCR6 und 9 auf Leukozyten der Dezidua decken sich unsere Ergebnisse mit denen von Wu (2005): CCR6 leicht vorhanden, CCR9 nicht exprimiert. Übereinstimmend mit Red-Horse (2001) fand sich eine gelegentliche CXCR2 Expression, aber entgegen den Ergebnissen von Wu (2005) (leichte Expression) keine Expression von CCR7 auf Leukozyten.

Die Diskrepanz dieser Ergebnisse lässt sich wohl auf Unterschiede in der Vorbehandlung der Gewebe und Nachweisverfahren und der verwendeten Antikörper zurückführen. Allen Arbeiten gemeinsam jedoch ist der Nachweis von CXCR3. Hier scheinen alle Leukozyten hohe Level zu exprimieren. Dies ist vor folgendem Hintergrund interessant: Der CXCR3 Rezeptor wird stark von Interleukin 2 aktivierten T-Lymphozyten exprimiert, aber ist nicht in ruhenden T-Zellen nachweisbar. Er ist in die selektive Rekrutierung von Effektor T-Zellen involviert und wird vor allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen von T-Helfer-1-Typ gefunden, zum Beispiel in Synovia von rheumathoider Arthritis.

Ebenso scheint er eine Rolle bei der Transplantatabstoßung zu spielen. So zeigten CXCR 3 (-/-) Mäuse ein signifikant verlängertes Überleben von Allograft Transplantaten, ebenso wie CXCR3 (+/+) Mäuse nach Behandlung mit blockierenden CXCR3 Antikörpern (Hancock, 2000).

Die Plazenta siedelt sich also auf einem Gebiet an, welches ein hohes Potenzial zur Transplantatabstossung besitzt.

Am Ende der Schwangerschaft könnte es, ausgelöst durch bestimmte Hormone des Kindes, wie z.B. Anstieg des kindlichen Cortisolspiegels, gefolgt von einer Hemmung der placentaren Progesteronproduktion, zu einem Zusammenbruch im Zusammenspiel CTB -LGL-DC kommen. Hypothetisch reifen dann DC aus, hemmen die T-Zellen nicht länger und die nunmehr ungehemmten CXCR3 positiven Lymphozyten stoßen das "Transplantat" ab.

Das "Transplantat" wird geboren. Die Geburt lässt sich somit als Folge einer Entzündungsreaktion der Mutter gegen das Kind interpretieren.

5 Zusammenfassung

Das Einnisten des kindlichen Gewebes in die Dezidua der Mutter, das diffuse Einwachsen von Cytotrophoblasten ins Myometrium, und schlussendlich die Arrosion mütterlicher Blutgefäße durch CTB, lässt Parallelen zu malignem Tumorwachstum erkennen. Chemokinen und ihren Rezeptoren wird bei diesem Vorgang eine Schlüsselrolle zugeschrieben.

Das Ziel dieser Arbeit war daher eine qualitative Darstellung des Verteilungsmusters von Chemokinrezeptoren in der Dezidua der Frühschwangerschaft. Ferner sollte eine morphologische Zuordnung positiver Zellen zu den einzelnen Populationen (Cytotrophoblasten, Stromazellen, Leukozyten) stattfinden.

Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit erhoffen wir uns Rückschlüsse auf die Mechanismen, welche für das invasive Cytotrophoblasten-Wachstum und die im menschlichen Körper einmalige Zusammensetzung des Immunzelleninfiltrates verantwortlich sind. Hiervon erwarten wir Erkenntnisse, die in mögliche neuartige Behandlungsstrategien gegen Tumorkrankheiten einfließen könnten.

Wir kamen zu folgenden Ergebnissen:

Die grösste Anzahl von CXCR4 Rezeptoren zeigten Cytotrophoblasten an der Spitze von auswachsenden Zellsäulen der Plazenta und an der Oberfläche der Dezidua. Im Gegensatz dazu waren die CTB an der Basis der Zellsäulen und in den tiefen Schichten der Dezidua deutlich schwächer gefärbt. Diesem Rezeptor kommt wohl eine entscheidende Rolle bei der Chemotaxis, Zellproliferation und dem infiltrativen Wachstum zu. Neue Veröffentlichungen aus der Onkologie zeigen, dass durch Blockade dieses Rezeptors die Proliferation und Metastasierung in die Lunge von bestimmten Tumorzelllinien deutlich gesenkt wird.

In den von uns gefärbten Schnitten zeigte keine Population von Trophoblasten positive Anfärbungen für CCR7. Von CCR7 ist bekannt dass er wichtig für die Wanderung von antigenpräsentierenden Zellen von der Peripherie in die Lymphknoten durch afferente Lymphgefäße ist. Dies ist ein Weg, den auch lymphogen metastasierende Neoplasien mithilfe dieses Rezeptors nehmen. Das negative Färbeverhalten deckt sich mit dem klinischen Verhalten von invasiven CTB: Sie werden in Lymphknoten praktisch nicht gefunden.

Mit zunehmender Invasionstiefe der CTB ließ sich eine stärkere Expression von CCR6 erkennen. Dieses Bild ist genau gegensätzlich zu dem mit CXCR4 erreichten. Der Rezeptor scheint also für das Wandern innerhalb der Dezidua - nicht in die Dezidua-nötig zu sein und keine Rolle bei der Proliferation zu spielen.

Das Färbepild von CCR9 zeigte bei uns unerwartet eine Kernfärbung, war doch ein Chemokinrezeptor überwiegend an der Zellmembran erwartet worden. Nach unserem Kenntnisstand sind wir die ersten, die nachweisen, dass sich dieser Rezeptor auf der Kernmembran von invasiven Cytotrophoblasten findet. Über die Bedeutung dieser Beobachtung lässt sich indessen nur spekulieren.

Bei unseren Rezeptoranalysen ergab sich ein äußerst unklares Färbemuster der dezidua-len Stromazellen hinsichtlich der Expression der untersuchten Chemokinrezeptoren. So gab es Areale mit stärkster Färbung von Stromazellen. Dann gab es wiederum Areale, die weitgehend negativ färbten. Dies zeigt, dass es innerhalb der Dezidua sehr große Unterschiede im Aktivitätszustand von Zellbereichen gibt.

In unseren Präparaten zeigte sich eine sehr geringe Rezeptorausstattung der Lymphozyten. CXCR3 und CCR6 jedoch zeigten in der Mehrzahl der Fälle positive Lymphozyten. Auffallend war, dass diese jedoch deutlich schwächer färbten als die vergleichbaren Zellen in der positiv Kontrolle gefärbte Tonsille. Die Dezidua in der Frühschwangerschaft scheint also durch das Herunterregulieren von Chemokinrezeptoren auf immunkompetenten Zellen ein Raum der Immuntoleranz zu sein. Die Mechanismen, welche einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Immuzellinfiltrates haben, scheinen anhand der vielen Rezeptor-Ligand Paare sehr komplex. Diese Arbeit konnte zu diesem Mechanismus leider keine zufriedenstellende Antwort geben.

Darüber hinaus scheint uns -aufgrund des unregelmässigen Färbeverhaltens- die immunhistochemische Einfachfärbung nur eingeschränkt aussagefähig zu sein. Doppelfärbungen werden eine höhere Spezifität der Ergebnisse liefern.

6 Literaturverzeichnis

Bulmer JN, Morrison L, Johnson PM:

Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations.

J Reprod Immunol. 1988 Dec;14(3):291-302.

Dallenbach-Hellweg G, Poulsen H:

Atlas der Histopathologie des Endometrium

Springer Berlin Heidelberg Tokio 1985 : 12-29

Damsky CH, Fisher SJ:

Trophoblast pseudo-vasculogenesis:faking it with endothelial adhesion receptors

Curr Opin Cell Biol (1998)10: 660-666

Dietl J, Ruck P, Horny HP, Handgretinger R, Marzusch K, Ruck M, Kaiserling

E, Griesser H, Kabelitz D:

The decidua of early human pregnancy: immunohistochemistry and function of immunocompetent cells.

Gynecol Obstet Invest. 1992;33(4):197-204

Douglas GC, Thirkill TL, Sideris V, Rabieh M, Trollinger D, Nuccitelli R:

Chemokine receptor expression by human syncytiotrophoblast.

J Reprod Immunol. 2001 Feb;49(2):97-114.

Drake PM, Red-Horse K, Fisher SJ:

Reciprocal chemokine receptor and ligand expression in the human placenta: implications for cytotrophoblast differentiation.

Dev Dyn. 2004 Apr;229(4):877-85.

Feil C, Augustin HG:

Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 9;247(1):38-45.

Fernekom U, Kruse A:

Regulation of leukocyte recruitment to the murine maternal/fetal interface. *Chem Immunol Allergy.* 2005;89:105-17.

Forster R, Ohl L, Henning G :

Lessons learned from Lymphocytes: CC Chemokine receptor-7 involved in lymphogenic metastases of melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.(Bethesda),* 93: 1588-1598, 2001

Hancock WW, Lu B, Gao W et al :

Requirement of chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000; 192: 1515-20

Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, Prus D, Markel G, Gazit R, Katz G, Haimov-Kochman R, Fujii N, Yagel S, Peled A, Mandelboim O:

CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood.* 2003 Sep 1;102(5):1569-77. Epub 2003 May 1.

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A:

Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 and CC Chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000; 164: 6621-32

Horuk R :

Chemokine receptors
Cytokine and Growth Factor Reviews 12 (2001) 313-335

Hromas R, Kim CH, Klemsz M:

Isolation and characterisation of Exodus-2, a novel C-C chemokine with a unique 37-amino acid carboxyl terminal extension

J Immunol 1997; 159: 2554-8

Ishii M, Hayakawa S, Suzuki MK, Yoshino N, Honda M, Nishinarita S, Chishima F, Nagaishi M, Satoh K:

Expression of functional chemokine receptors of human placental cells.

Am J Reprod Immunol. 2000 Dec;44(6):365-73.

Janeway, CA,(et al.) :

“Immunobiology: the immune system in health and disease .”

Garland Publishing 5th ed. (2001) 295-340; 72-75

Kämmerer U :

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung humaner immunkompetenter Zellen an der feto-maternalen Grenzzone.

Habilitationsschrift an der Universität Würzburg (2002)

Kämmerer U, Schoppet M, et al. :

Decidua contains potent immunostimulatory CD 83+ dendritic cells

Am J Pathol 2000; 157(1):159-169

Kim CH:

Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking.

Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2004 Dec;4(4):343-61. Review.

Kim CH :

The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond.

Curr Opin Hematol. 2005 Jul;12(4):298-304. Review.

King A, Loke YW :

Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2 stimulated decidual cells.

Cell. Immunol. 129 (1990): 435-448

Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ:

CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion.

J Mol Histol. 2004 Mar;35(3):233-45. Review.

Kumar A, Kumar S, Dinda AK, Luthra K:

Differential expression of CXCR4 receptor in early and term human placenta.

Placenta. 2004 Apr;25(4):347-51.

Lataillade JJ, Clay D et al.:

Stromal cell derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G0/G1 transition in CD 34⁺ cells: Evidence for an autocrine/paracrine mechanism.

Blood 99:1117-1129 (2002)

Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemissen AM, Thiel E, Scheibenbogen C :

Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis.

J Invest Dermatol. 2004 Mar;122(3):685-90.

Mosmann TR, Sad S:

The expanding universe of T-Cell subsets: TH1, Th2 and more

Immunol Today 17 (1996): 138-146

Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST:
Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic
potential of murine B16 melanoma cells.
Cancer Res. 2002 Dec 15;62(24):7328-34.

Papadakis KA, Prehn J, Nelson V, Cheng L, Binder SW, Ponath PD, Andrew DP,
Targan SR. :
The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in
the regional specialization of the mucosal immune system.
J Immunol. 2000 Nov 1;165(9):5069-76.

Qiuping Z, Jei X, Youxin J, Wei J, Chun L, Jin W, Qun W, Yan L, Chunsong H,
Mingzhen Y, Qingping G, Kejian Z, Zhimin S, Qun L, Junyan L, Jinquan T :
CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4+ T cells from
patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of
livin activation.
Cancer Res. 2004 Oct 15;64(20):7579-87

Red-Horse K, Drake PM, Fisher SJ:
Chemokine Ligand and Receptor Expression in the Pregnant Uterus.
American J. of Pathology, Vol. 159, No. 6, December 2001

Riede U-N und Schaefer H-E, eds:
Allgemeine und spezielle Pathologie
Georg Thieme Verlag ; Stuttgart (1995) ,895

Sato Y, Higuchi T, Yoshioka S, Tatsumi K, Fujiwara H, Fujii S:
Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards
invasive phenotype.
Development. 2003 Nov;130(22):5519-32.

Shibuta K, Mori M, Shimoda K, Inoue H, Mitra P, Barnard GF:
Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and
cell-cycle variation during in vitro differentiation.
Jpn J Cancer Res. 2002 Jul;93(7):789-97.

Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, Luker
GD:
CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer.
Cancer Res. 2004 Dec 1;64(23):8604-12

Spano JP, Andre F, Morat L, Sabatier L, Besse B, Combadiere C, Deterre P,
Martin A, Azorin J, Valeyre D, Khayat D, Le Chevalier T, Soria JC:
Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of
expression and correlation with outcome.
Ann Oncol. 2004 Apr;15(4):613-7.

Starkey PM :
The decidua and placentation.
In: The Human Placenta (hrsg. Redman CWG, Sargent IL , Starkey PM)
Blackwell, London, Edinburgh, Boston, 1993

Starkey PM, Sargent IL, Redman CW:
Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and
isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry.
Immunology. 1988 Sep;65(1):129-34.

Steinbrink K, Wölf M, Jonuleit H:
Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.
J. Immunol. 159 (1997): 4772-4780

Sun YX, Wang J, Shelburne CE et al. :

Expression of CXCR 4 and CXCL 12 (SDF-1) in human prostate cancers (Pca) in vivo.

J Cell Biochem 89: 462-473 (2003)

Tsuda H, Michimata T, Hayakawa S, Tanebe K, Sakai M, Fujimura M, Matsushima K, Saito S:

A Th2 chemokine, TARC, produced by trophoblasts and endometrial gland cells, regulates the infiltration of CCR4+ T lymphocytes into human decidua at early pregnancy.

Am J Reprod Immunol. 2002 Jul;48(1):1-8.

Wiley H, Gonzales EB, Maki W, Wu M, Hwang ST :

Expression of CC chemokine receptor-7 (CCR7) and regional lymph node metastasis of B 16 murine melanome.

J. Natl.Cancer Inst. (Bethesda), 93: 1638-1643, 2001

Wu X, Jin LP, Yuan MM, Zhu Y, Wang MY, Li DJ:

Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56brightCD16- NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1.

J Immunol. 2005 Jul 1;175(1):61-8.

Yagel S, Shpan P, Dushnik M, Livni N, Shimonovitz S:

Trophoblasts circulating in maternal blood as candidates for prenatal genetic evaluation.

Hum Reprod. 1994 Jun;9(6):1184-9.

Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E:

The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases.

Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3833-9.

Lebenslauf

Dr. Thomas Bittner geboren am 18. April 1974 in Reutlingen
Domerschulstr.11
97070 Würzburg

Schulbildung

1980-1984 Besuch der Grundschule in Veitshöchheim
1984-1993 Besuch des Siebold-Gymnasiums in Würzburg
9. Juli 1993 Abitur

Hochschulbildung

WS 1993/1994 Studium der Chemie / Mathematik an der Universität Würzburg
Seit SS 1994 Studium der Zahnmedizin an der Universität Würzburg
24. Oktober 1996 zahnärztliche Vorprüfung
30. Juni 1999 zahnärztliche Prüfung
20. Juli 1999 Approbation als Zahnarzt
Seit WS 2000/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
5. September 2001 ärztliche Vorprüfung
19. September 2002 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
28. Februar 2005 Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
4. April 2005 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit August 2005 Beginn einer Doktorarbeit der Humanmedizin an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
25. April 2006 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
27. April 2006 Approbation als Arzt

Berufsbildung

Oktober 1999 bis August 2000 Tätigkeit als Vorbereitungsassistent in allgemein Zahnärztlicher Praxis
Januar 2003 bis Dezember 2005 Tätigkeit als Vorbereitungsassistent in kieferorthopädischer Praxis
Seit Mai 2006 Tätigkeit als Assistenzarzt an der Klinik für MKG-Chirurgie Würzburg