

Seite 1

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Psychosomatik der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Schallstress in der späten Schwangerschaft auf  
hormonelle und immunologische Faktoren im Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clemens Steinert

aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. P. Arck  
                             2. PD Dr. med. habil. U. Markert  
                             3. PD Dr. rer. nat. H. Fliege

Datum der Promotion:      19.11.2010

**Inhaltsverzeichnis**

	<i>Seite</i>
<b>1.        <i>Einleitung</i></b>	<b>1 - 15</b>
1.1        Stress und Schwangerschaft	1
1.2        Stress und Fetale Programmierung	2 - 4
1.3        Immunologische Prozesse während der maternalen Adaptation an die Schwangerschaft	4 - 11
1.4        Stressreaktion und Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden-System	12 - 14
1.5        Die Rolle von Progesteron in der Schwangerschaft	14 - 15
<b>2.        <i>Fragestellung</i></b>	<b>16 - 17</b>
<b>3.        <i>Material und Methoden</i></b>	<b>18 - 31</b>
3.1        Versuchstiere	18
3.1.1      Verpaarung der Versuchstiere	19
3.1.2      Stressexposition	19 - 20
3.2        Gewebegewinnung	20 - 22
3.2.1      Blutentnahme und Tötung der Versuchstiere	20
3.2.2      Entnahme der inguinalen Lymphknoten	21
3.2.3      Isolierung des Uterus und Gewinnung der Amnionflüssigkeit	21 - 22
3.2.4      Entnahme des Gehirns	22

3.3	Bearbeitung des Gewebes und Auswertung	22 - 31
3.3.1	Durchflusszytometrische Analyse von Uterus, inguinalen Lymphknoten und Blut	22 - 25
3.3.2	Immunohistochemische Färbung	25 - 27
3.3.3	Quantitative Analyse der CRH mRNA Expression im mütterlichen Gehirn mittels In situ Hybridisierung	27 - 29
3.3.4	Bestimmung der Corticosteron-Konzentration in der Amnionflüssigkeit und im mütterlichen Serum mittels Radioimmunoassay	29 - 30
3.3.5	Bestimmung der Progesteron-Konzentration im mütterlichen Serum und in der Amnionflüssigkeit mittels Radioimmunoassay	30 - 31
3.4	Statistische Methoden	31
<b>4.</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>32 - 45</b>
4.1	Immunzellen im Uterus	32 - 37
4.1.1	CD4 <sup>+</sup> Zellen im Uterus	32 - 33
4.1.2	FoxP3 <sup>+</sup> Zellen im Uterus	33 - 34
4.1.3	CD11c <sup>+</sup> Zellen im Uterus	35
4.1.4	CD54 <sup>+</sup> Zellen im Uterus	36
4.1.5	CD49b <sup>+</sup> Zellen im Uterus	36 - 37
4.2	Immunzellen in den inguinalen Lymphknoten	37 - 38
4.2.1	CD4 <sup>+</sup> Zellen in den inguinalen Lymphknoten	37
4.2.2	CD11c <sup>+</sup> Zellen in den inguinalen Lymphknoten	37 - 38

4.3	Immunzellen im Blut	39 - 42
4.3.1	CD49b <sup>+</sup> Zellen im Blut	39 - 40
4.3.2	CCR5 <sup>+</sup> Zellen im Blut	40 - 41
4.3.3	CCR7 <sup>+</sup> Zellen im Blut	41- 42
4.4	Expression CRH mRNS <sup>+</sup> Zellen im mütterlichen Gehirn	42 - 46
4.4.1	Expression CRH mRNS <sup>+</sup> Zellen im Nucleus paraventricularis	42 - 43
4.4.2	Expression CRH mRNS <sup>+</sup> Zellen in der Amygdala	44
4.5	Corticosteron-Konzentration im mütterlichen Serum und in der Amnionflüssigkeit	45
4.6	Progesteron-Konzentration im mütterlichen Serum und in der Amnionflüssigkeit	46
<b>5.</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>47 - 54</b>
<b>6.</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>55 - 56</b>
<b>7.</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>57 - 71</b>
<b>8.</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b><i>Erklärung</i></b>	<b>74</b>

# 1. **Einleitung**

## 1.1 *Stress und Schwangerschaft*

Stress in der Schwangerschaft ist ein häufig berichtetes Phänomen. Nicht nur im Alltagsbewusstsein wird Stresserleben in der Regel ein negativer Einfluss auf die Schwangerschaft beigemessen, auch Erkenntnisse aus der medizinischen Forschung bestätigen diese Annahme (Knackstedt *et al.*, 2005). Besteht beispielsweise der begründete Verdacht auf eine drohende Schwangerschaftskomplikation, so herrscht in der geburtsmedizinischen Praxis dahingehend Einigkeit, dass stressbehaftete Situationen oder Tätigkeiten perinatal möglichst zu vermeiden sind (DGGG Leitlinien, 2008).

Die im Zuge einer Schwangerschaft zu erwartenden Herausforderungen betreffen neben den physiologischen Adaptationsprozessen des mütterlichen Organismus an den Fötus auch weitreichende Veränderungen in der sozialen Lebenssituation aller Beteiligten. Da die Schwangerschaft aus diesen Gründen selbst schon zur Gruppe der „kritischen Lebensereignisse“ gezählt wird (Holmes und Rahe, 1967), stehen zuvor vorhandene Verarbeitungsstrategien für zusätzlich auftretende „kritische Lebensereignisse“ meist nur noch in abgewandelter Form zur Verfügung. Reichen die individuellen Ressourcen der Schwangeren dann nicht aus, die auftretenden Belastungen zu bewältigen, so manifestiert sich negatives mütterliches Stresserleben (O'Hare, 1995).

Im Zuge der soziokulturellen Transformationsprozesse der vergangenen 50 Jahre haben sich im Hinblick auf die Familienstruktur und parallel dazu auch in der Arbeitswelt tiefgreifende Veränderungen ergeben (Fenster, 1995). Die sinkende Geburtenrate in Deutschland geht dabei einher mit dem steigenden Alter der Mütter bei der Geburt ihres ersten Kindes und einer fallenden Zahl von Mehrkindfamilien (Statistisches Bundesamt, 2007).

Beide Tatsachen, das im Durchschnitt höhere Alter der Schwangeren und die später einsetzende Erstschwangerschaft, sind mit einem größeren mütterlichen Stressempfinden assoziiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Schwangere höheren Alters ein erhöhtes Risiko für Fehlgeburten aufweisen als jüngere Frauen (Arck *et al.*, 2008).

## 1.2 Stress und Fetale Programmierung

Vor dem Hintergrund von epidemiologischen Untersuchungen, in denen retrospektiv die individuellen Körpermaße bei der Geburt als Marker der intrauterinen Entwicklung mit dem Auftreten von Risikofaktoren für Krankheiten im Erwachsenenalter in Beziehung gesetzt wurden (Barker *et al.*, 1989), entstand in den 1990er Jahren die Hypothese der „Fetalen Programmierung von Krankheiten des Erwachsenenalters“ (Barker, 1995). Diese Hypothese postuliert im Wesentlichen einen Zusammenhang zwischen Einflüssen, die während der Pränatalperiode auf die Schwangere und das ungeborene Kind wirken, und einer erhöhten Prädisposition der Nachkommen im späteren Erwachsenenalter bestimmte Krankheiten zu entwickeln. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der systolische Blutdruck, der bei Probanden im Alter von 50 Jahren gemessen wurde, negativ mit ihrem Gewicht bei der Geburt korreliert (Barker *et al.*, 1990). Diese Abhängigkeit wird noch deutlicher, wenn man neben dem Geburtsgewicht auch das Verhältnis der Größe der Plazenta zum systolischen Blutdruck berücksichtigt. Den höchsten systolischen Blutdruck im Alter von fünfzig Jahren hatten diejenigen Probanden mit dem kleinsten Gewicht bei der Geburt und der schwersten Plazenta.

In den vergangenen zwanzig Jahren sind viele Krankheiten auf mögliche pränatale Ursachen hin untersucht worden. Dies sind neben Herz-Kreislaufkrankungen auch Diabetes Mellitus (Mericq *et al.*, 2005), Tumorerkrankungen (Löff *et al.*, 2007), Osteoporose (Javaid *et al.*, 2006), Asthma (Rona *et al.*, 2005) und neuropsychiatrische Erkrankungen (Malaspina *et al.*, 2008), um nur die wichtigsten zu nennen. Der großen Zahl untersuchter Krankheiten steht eine ähnlich große Zahl von untersuchten Einflussfaktoren gegenüber, wobei die folgenden drei Größen deutlich im Vordergrund stehen: Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, Infektionen und psychologische Herausforderungen.

Auch wurde in den vergangenen Jahren umfangreich beforscht welchen Einfluss Stress in der Schwangerschaft auf den physischen und psychischen Gesundheitszustand der Neugeborenen hat. Die Ergebnisse dieser Studien sind nicht einheitlich; sie weisen allerdings eine deutliche Tendenz auf, wonach pränataler Stress einen negativen Einfluss auf die spätere gesundheitliche Entwicklung der Nachkommen ausüben kann (Beydoun und Saftlas, 2008).

Wie in anderen Forschungsfeldern auch, besitzen hier Human-Studien eine wichtige medizinische Aussagekraft bezüglich krankheitsassoziierter Mechanismen. Jedoch können diese auch schnell an ihre Grenzen geraten. So wird in Human-Studien zum Thema „fetale Programmierung“ meist das Geburtsgewicht als Marker der intrauterinen Entwicklung herangezogen. Obgleich eine einfach zu messende Größe, ist das Geburtsgewicht doch ein eher grobes Maß für die intrauterine Entwicklung und unterliegt einer Vielzahl von Faktoren. Auch sind den Möglichkeiten der experimentellen Einflussnahme auf Schwangere aus ethischen Gründen enge Grenzen gesetzt. Nicht zuletzt aus diesen Gründen sind die oben genannten Studien durch eine Reihe von tierexperimentellen Arbeiten ergänzt worden. Mit Blick auf die Erforschung der Auswirkungen von pränatalem Stress auf das ungeborene Leben bieten sich hier ganz andere Möglichkeiten Einblicke in die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen zu gewinnen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Schallstress oder Bewegungseinschränkung in der frühen Schwangerschaft einen signifikanten Einfluss auf die Abortrate trächtiger Mäuse ausübt (Clark et al., 1993; Arck et al., 1995). Dabei wird angenommen, dass die Reaktion des mütterlichen Körpers auf den Stressor die für eine erfolgreiche Implantation und Differenzierung der befruchteten Eizelle essentielle maternale Adaptation stört. Nur das feinabgestimmte Zusammenspiel neuroendokriner und immunologischer Faktoren sichert dem genetisch fremden Feten das Überleben innerhalb des mütterlichen Milieus. Wird dieses komplexe System negativ beeinflusst, ist die erfolgreiche Implantation gefährdet. Aber auch auf die lebend geborenen Nachkommen hat die pränatale Schallstressexposition einen nachgewiesenen Einfluss. Im Jahre 2006 gelang es ein Mausmodell für fetale Programmierung von Asthma zu etablieren (Pincus-Knackstedt et al., 2006). Hierbei erfolgt die Stressexposition innerhalb eines vulnerablen Zeitfensters während der späten Schwangerschaft. Die adulten Tiere werden einer Induktionsbehandlung unterzogen und im Anschluss auf klinische Symptome und immunologische Marker von Asthma untersucht. Der Vergleich mit einer nicht gestressten Kontrollgruppe ergab eine erhöhte Anfälligkeit der perinatal gestressten Tiere auf experimentelle Induktion hin Asthma zu entwickeln. Auch konnten Veränderungen im Hinblick auf die Immunantwort nach Antigenkontakt und auf die Expression von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) im Hypothalamus gegenüber den nicht gestressten Nachkommen der Kontrollgruppen beobachtet werden. Die Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für einen Zusammenhang zwischen Stress in der Schwangerschaft und der Anfälligkeit der Nachkommen im späteren Erwachsenenalter

bestimmte Krankheiten zu entwickeln. Allerdings ließ auch dieser Versuch die Frage danach unbeantwortet, auf welchem Weg dies – vermutlich noch während der Schwangerschaft - vermittelt wird.

### 1.3 *Immunologische Prozesse während der maternalen Adaptation an die Schwangerschaft*

Die Schwangerschaft stellt sowohl das Immunsystem als auch das endokrine System der Mütter vor eine schwierige Aufgabe. Da die embryonalen Gene zu einem Teil paternalen Ursprungs sind, sind die embryonalen Gewebe aus Sicht des mütterlichen Immunsystems als teilweise fremd zu betrachten. Damit eine sich entwickelnde Schwangerschaft nicht durch Angriffe des mütterlichen Immunsystems gegen den Keim gefährdet wird, liegt die Annahme nahe, dass toleranzinduzierende Mechanismen existieren müssen, die dieses wirksam verhindern (Medawar, 1953). Tatsächlich konnten in den zurückliegenden Jahren verschiedene Mechanismen beschrieben werden, die diesen Zweck erfüllen könnten (Chaouat *et al.*, 1983, Loke und King, 1991, Clark *et al.*, 1999). Neuere Studien, die sich mit der Rolle des Immunsystems im Rahmen der Schwangerschaft beschäftigen, sehen im mütterlichen Immunsystem allerdings nicht nur den „Feind“ den es während der Schwangerschaft zu unterdrücken gilt. Für eine Vielzahl von Aufgaben ist eine Kooperation zwischen fetalen Zellen und mütterlichen Immunzellen unbedingt notwendig (Ashkar *et al.*, 2000; Karimi *et al.*, 2008).

Da der Fetus nicht in direkten Kontakt zum mütterlichen Gewebe tritt, liegt die Annahme nahe, dass diese kooperativen bzw. schützenden Mechanismen überwiegend im Bereich der feto-maternalen Schnittstelle angesiedelt sind. Eines der ersten Phänomene, welches im Zusammenhang mit der immunologischen Toleranz gegenüber fetalen Zellen nachgewiesen wurde, war die Beobachtung, dass die in direktem Kontakt zu mütterlichen Zellen lokalisierten fetalen Trophoblastzellen nur in sehr geringem Ausmaß die klassischen HLA Klasse Ia und II Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren. An ihrer Stelle finden sich auf der Zellmembran invasiver Trophoblastzellen und fetaler Endothelzellen vielmehr die so genannten „nicht klassischen“ monomorphen HLA Ib Moleküle, wie beispielsweise HLA-G (Kovats *et al.*, 1990, Ishitani *et al.*, 2003), die zudem auch in ihrer löslichen Form im Bereich der feto-maternalen Schnittstelle nachgewiesen wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass HLA Ib Moleküle an Rezeptoren auf Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen), der zahlenmäßig größten Immunzellpopulation in der Dezidua, binden. Diese Rezeptoren können zum einen sogenannte „killer-inhibitory-signals“ vermitteln, zum anderen können sie Einfluss nehmen auf Art und Ausmaß der durch NK-Zellen produzierten Zytokine (Verma *et al.*, 1997). Die Trophoblast-Zellen können dadurch einem Angriff durch NK-Zellen entgehen, sie erhalten Signale, die sie für die erfolgreiche Invasion ins mütterliche Gewebe dringend benötigen und zusätzlich werden weitere NK-Zellen aus der Peripherie in Richtung der Dezidua mobilisiert. (Hanna *et al.*, 2006)

Das angeborene Immunsystem, zu dem auch die NK-Zellen zu rechnen sind, wird im Allgemeinen als eine Art „first line response“ auf mögliche Bedrohungen durch körperfremde Strukturen angesehen. Diese Rolle wird ihm zum einen aufgrund der Tatsache zugesprochen, dass das angeborene Immunsystem die Fähigkeit besitzt unmittelbar auf tatsächliche Bedrohungen reagieren zu können, d.h. ohne einen verzögerten Beginn, wie er für die Effektoren des adaptiven Immunsystems charakteristisch ist. Zum anderen können Antigen präsentierende Zellen (APC) mittels Zytokinen und kostimulatorischer Signale die Charakteristik einer etwaigen Reaktion des adaptiven Immunsystems in verschiedene Richtungen dirigieren (Janeway und Medzhitov, 2002).

Eine zentrale Rolle wird dabei den Dendritischen Zellen (DC) zugesprochen (Mellman und Steinman, 2001). DC bevölkern vornehmlich solche Gewebe, die an Grenzflächen zwischen der äußeren Umwelt und dem Körper lokalisiert sind, wie beispielsweise die Haut, den Magen-Darm-Trakt oder den Uterus (Kämmerer *et al.*, 2000; Banchereau *et al.*, 2000).

In ihrer jeweiligen Umgebung sind DC permanent auf der Suche nach körperfremden oder Gefahr signalisierenden Strukturen (Matzinger, 2002). Sie sind dabei in der Lage durch direkten Kontakt oder mittels sezernierter Signalmoleküle über eine Entfernung hinweg Informationen an andere Immunzellen weiterzugeben (Mariella *et al.*, 2005, De Jong *et al.*, 2005). Diese von den DC ausgesendeten Informationen spiegeln sozusagen den immunologischen „Zustand“ eines jeweiligen Gewebes wider und veranlassen die Signal empfangenden Effektor-Zellen dazu entsprechend zu reagieren. Gegenüber harmlosen Nahrungsantigenen, wie sie häufig im Magen-Darm-Trakt anzutreffen sind, ist die adäquate Reaktion Toleranz (Mowat, 2003, Mahnke *et al.*, 2003), gegenüber eindringenden Krankheitserregern hingegen Abwehr bzw. Angriff.

Auch im Rahmen einer Schwangerschaft wird DC eine wichtige immunmodulierende Funktion zugesprochen. Es wird angenommen, dass DC einerseits in der Lage sind bei T-Zellen einen Zustand der Anergie zu induzieren, andererseits Einfluss auf ihre Differenzierung zu nehmen (Piemonti *et al.*, 2000). Das von DC exprimierte Enzym Indoleamine 2,3 Dioxigenase (IDO) greift durch den Abbau der für die Funktion von T-Zellen essentiellen Aminosäure Tryptophan hemmend auf den Funktionszustand von T-Zellen ein und macht sie anfälliger für apoptotische Signale (Munn *et al.*, 1998, Fallarino *et al.*, 2002).

Die molekularen Prozesse, über die DC in die Differenzierung der verschiedenen Effektor-T-Zell-Populationen eingreifen, sind trotz intensiver Forschung bislang erst wenig verstanden. Sicher scheint nur zu sein, dass auch hier eine koordinierte Interaktion zwischen DC und anderen Immunzellen zumeist notwendig, aber nicht immer hinreichend ist.

So konnte *in vitro* beobachtet werden, dass humane DC, die gemeinsam mit sog. „IL18-induced NK-helper cells“ kultiviert wurden, vermehrt IL-12p70 sezernieren und auf diesem Wege die Th-Zell-Differenzierung in Richtung auf den Th-1 Phänotyp vorantreiben (Mailliard *et al.*, 2005).

Interessanterweise konnte in Versuchen an Mauszellen gezeigt werden, dass die IL12p70 Sekretion nach Interaktion von DC und uterinen NK-Zellen (uNK-Zellen) von der gleichzeitigen Anwesenheit von Trophoblastzellen abhängig ist. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trophoblastzellen verminderte sich nämlich die IL12p70 Sekretion durch DC signifikant gegenüber der Kultivierung von DC und uNK-Zellen alleine (Blois *et al.*, 2008). Auch bezogen auf die Induktion von Regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) durch DC ist ein Zusammenspiel von Immunzellen, Trophoblastzellen und Zytokinen unabdingbar. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass DC nach Interaktion ihres Rezeptors CD200R mit dem auf Trophoblastzellen exprimierten Molekül CD200 unter Anwesenheit von IL-4 vermehrt TGF- $\beta$  und IL-10 sezernieren und die Entwicklung von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-regulatorischen-Zellen (Treg-Zellen) vorantreiben (Gorczynski *et al.*, 2005). Treg-Zellen ihrerseits sind in der Lage andere T-Zellen zu inaktivieren und Einfluss auf ihre Zytokinproduktion zu nehmen.

Die Abwesenheit von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Treg-Zellen führt im allogenen Mausmodell zu einem Abbruch der Schwangerschaft innerhalb weniger Tage (Aluvihare *et al.*, 2004).

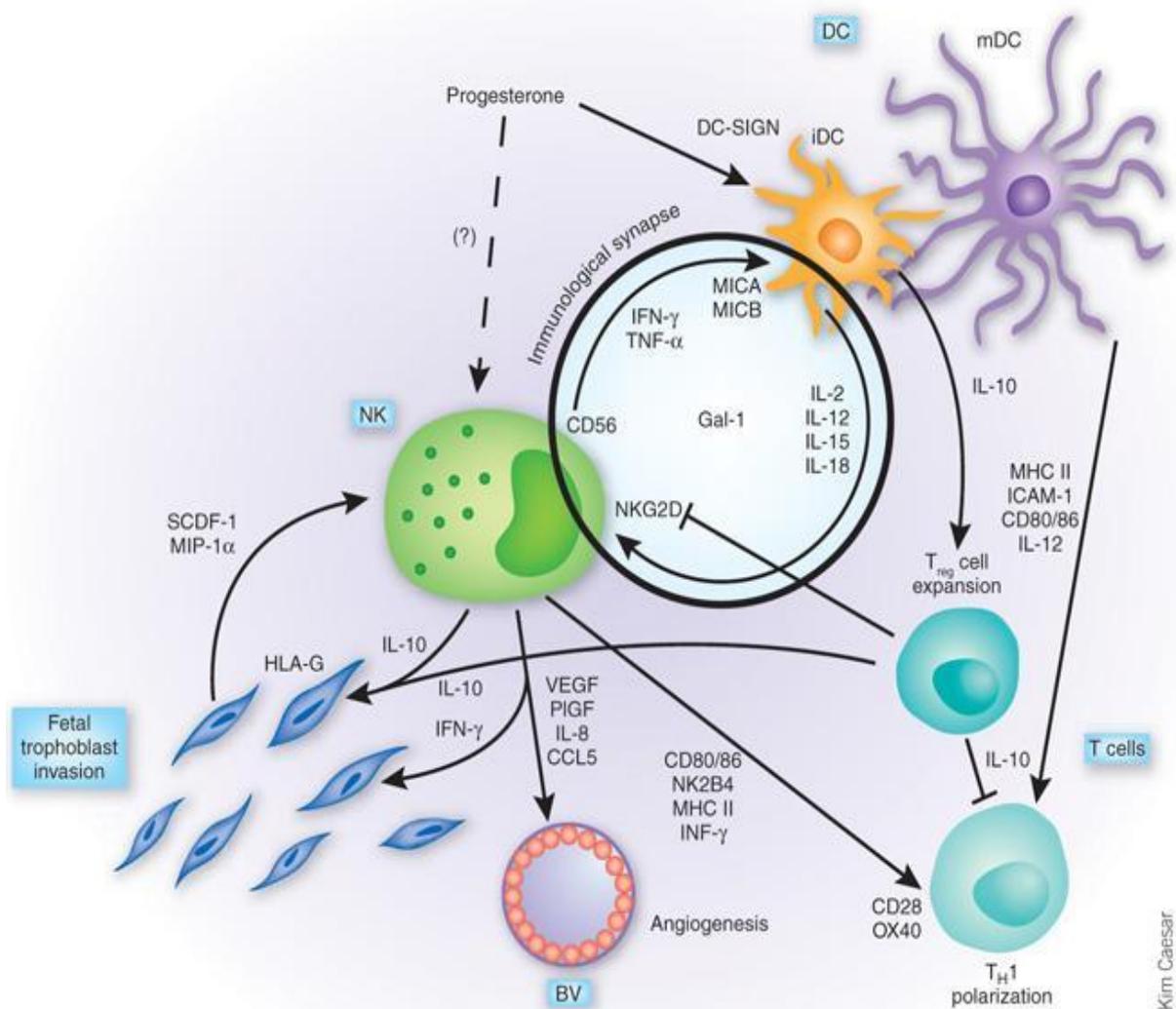


Abb. 1: BV, Blutgefäß; CCL, CC chemokine Ligand; ICAM, Interzelluläres Adhäsions Molekül; MIP-1, macrophage inflammatory protein-1; MIC, MHC class I-related chain; mDC, mature DC; PlGF; placental growth factor; SIGN, specific ICAM-3-grabbing nonintegrin; SCDF-1, stromal cell-derived factor-1; T<sub>H</sub>1, T helper type 1; TNF-, Tumor Nekrose Faktor-; VEGF, vascular endothelial growth factor. Der gepunktete Pfeil weist auf einen möglichen Aktivierungsweg hin. NKG2D, natural killer cell group 2 subfamily of the killer cell C-type lectin receptor; NK2B4, NK-Zellen Rezeptor 2B4, auch bekannt als CD244. (übernommen aus Karimi *et al.*, 2008)

Ganz allgemein spielt das Verhältnis der verschiedenen Zytokine an der fetomaternalen Schnittstelle während der Schwangerschaft eine ausgesprochen wichtige Rolle und wird aktuell kontrovers diskutiert. Während die erfolgreiche Schwangerschaft lange Zeit als ein Th-2 (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) Phänomen galt (Wegmann *et al.*, 1993), wird diese paradigmatische Sichtweise heute mehr und mehr in Frage gestellt (Chaouat *et al.*, 2002) und als eine "Übersimplifizierung" verstanden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine für eine erfolgreiche

Schwangerschaft unabdingbar sind. Als entscheidenden Faktor müsse man in dieser Hinsicht die zeitliche Komponente verstehen. Abhängig vom zeitlichen Voranschreiten der Schwangerschaft seien verschiedene Zytokine notwendig, und zwar sowohl vom Th1- als auch vom Th2-Typ. (Carp, 2004, Knackstedt *et al.*, 2003).

Mit Blick auf die Komplexität des Zusammenspiels zwischen dem sich entwickelnden Fötus und dem mütterlichen Immunsystem liegt der Gedanke nahe, dass ein durch perinatales Stresserleben der Mütter gestörtes Equilibrium des Immunsystems an der feto-maternalen Schnittstelle die Entwicklung des Keims nachhaltig negativ beeinflussen kann. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt einer solchen Störung während der Schwangerschaft könnte auch der jeweilige Effekt auf den Fötus variieren. Während Störungen zu einem eher frühen Zeitpunkt die Schwangerschaft in toto in Frage stellen und zu einer Fehlgeburt führen, könnten sich Störungen zu einem späteren Zeitpunkt als Organ-Fehlentwicklung oder Neigung zur Entwicklung von Krankheiten im späteren Erwachsenenalter manifestieren.

Die im oberen Abschnitt angesprochenen Immunzell-Populationen exprimieren jeweils charakteristische Marker-Moleküle, an Hand derer sie einer experimentellen Phänotypisierung zugänglich sind.

Im Falle der NK-Zellen ist es das Oberflächenmolekül CD49b, auch bekannt als Integrin alpha 2 Kette (ITGA2, GP1a), welches sich auf der überwiegenden Zahl von ihnen findet und allgemein als Pan-NK-Zell-Marker bezeichnet wird (Arase *et al.*, 2001). CD49b bildet zusammen mit der Integrin beta 1 Kette (ITGB1, CD29) den heterodimeren Very Late Appearing Antigen-2 (VLA-2) Rezeptor. Die am besten bekannte Funktion des VLA-2 Rezeptors ist die Bindung an Kollagen bzw. Kollagen plus Laminin (Goldman *et al.*, 1992). Die Familie der VLA-Rezeptoren umfasst bisher mindestens sechs Vertreter (VLA-1 bis VLA-6). Die VLA-Rezeptoren sind heterodimere Adhäsionsmoleküle und bestehen aus einer identischen Beta-Untereinheit und jeweils verschiedenen Alpha-Ketten. Ihre Funktion ist die Vermittlung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen, wobei neben der adhaesiven Komponente meist die Signaltransduktion im Vordergrund steht. Eine wichtige Rolle spielen die VLA-Rezeptoren bei der Extravasion und Lokomotion von Leukozyten (Werr *et al.*, 2000). Zur weiteren Differenzierung innerhalb der NK-Zell-Population kann die Koexpression von CD3 zusammen mit Cd49b herangezogen werden. CD3 ist ein Bestandteil des T-Zell-Antigenrezeptor-Komplexes und dient zusammen mit CD49b als Surrogatmarker

zur Detektion von NKT-Zellen (Ballas und Rasmussen, 1990). NKT-Zellen stehen sowohl hinsichtlich ihrer phänotypischen als auch ihrer morphologischen Erscheinung zwischen klassischen T- und NK-Zellen (Watanabe *et al.*, 1995). Die Antigen-spezifität des T-Zellrezeptors der CD49b/CD3 exprimierenden NKT-Zellen ist noch weitestgehend unbekannt. NKT-Zellen fungieren aufgrund ihrer schnellen Aktivierbarkeit, gekennzeichnet durch rasche Effektoraktivitäten in Form von Zytotoxizität und der Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen, als eine der ersten Verteidigungslinien des Immunsystems. Diese Wirkung erzielen sie meist nicht direkt, sondern über die Aktivierung weiterer Immunzellen, insbesondere NK-Zellen. Generell amplifizieren NK-Zellen das NKT-Zellsignal, und NKT-Zellen sind hierbei umso wichtiger, je schwächer das Ausgangssignal ist (Smyth *et al.* 2002).

Ein vielfach zur Phänotypisierung von DC herangezogenes Oberflächenmolekül ist CD11c, auch bekannt als Integrin  $\alpha$ X Kette (ITGAX). CD11c bildet zusammen mit der Integrin  $\beta$ 2 Kette (ITGB2, CD18) ein heterodimeres Trans-Membranprotein der Integrinfamilie. CD11c findet sich auf nahezu allen myeloiden Dendritischen Zellen, aber auch, wenn auch in deutlich geringerer Zahl, auf Makrophagen, NK-Zellen und Neutrophilen (Blois *et al.*, 2004). Aufgrund seiner hohen Expressionsdichte in der überwiegenden Zahl myeloider DC wird CD11c als Marker für diese Zellpopulation angesehen. Das Integrin CD11c/CD18 ist ein Mitglied der CD18 Integrinfamilie zu der auch CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1) und CD11d ( $\alpha$ D) gehören (Springer *et al.*, 1986). Mitglieder dieser Familie weisen die gleiche  $\beta$ -Kette auf und variieren jeweils in ihrer  $\alpha$ -Kette. Obwohl sie sich in ihrer Größe und Aminosäuresequenz unterscheiden, teilen die vier bekannten  $\alpha$ -Ketten der CD18 Familie doch wichtige funktionelle Strukturmerkmale. CD11c fungiert als Oberflächenrezeptor für gelöste Faktoren und Proteine wie beispielsweise LPS, Fibrinogen, iC3b (Ingalls und Golenbock, 1995, Loike *et al.*, 1991, Malhotra *et al.*, 1986) und bindet an verschiedene Zelladhaesionsmoleküle wie z.B. ICAM-1, ICAM-4 und VCAM-1 (Blackford *et al.*, 1996, Ihanus *et al.*, 2007). Obwohl die genaue Funktion von CD11c im Rahmen der immunmodulatorischen Aktivität von DC nicht bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass CD11c eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung einnimmt (Castro *et al.*, 2008).

Um innerhalb der DC Population aktivierte DC von nicht aktivierten DC abzugrenzen können CD11c-positive Zellen zusätzlich auf die Koexpression von sog. Aktivierungsmarkern hin untersucht werden. Neben anderen sind dafür die Oberflächenmoleküle CD54 und CD80 gut geeignet.

CD54 oder alternativ das Intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) ist ein aus 507 Aminosäuren bestehendes Transmembran-Molekül der Immunglobulin Superfamilie, das auf aktivierten Endothelzellen, Monozyten, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten exprimiert wird (Kirchhausen *et al.*, 1993). Die Expression von CD54 kann im Rahmen einer Immunreaktion durch die Wirkung von IL-1 und TNF $\alpha$  deutlich gesteigert werden. Bevorzugte Liganden für CD54 sind die Integrine LFA-1 und Mac-1 auf Leukozyten (Springer, 1994). Es wird angenommen, dass CD54 eine wichtige kostimulatorische Rolle im Rahmen der MHC-I vermittelten Antigenerkennung durch CD8 positive T-Zellen zukommt (Lebedeva *et al.*, 2004).

CD80 (B7.1.), ebenfalls ein Molekül der „Immunglobulin superfamily“, wird hauptsächlich an der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen exprimiert. Die Rezeptoren für CD80 sind CD28 und „cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“ (CTLA-4, CD152) und werden überwiegend auf T-Zellen exprimiert. Die beiden Rezeptoren nehmen allerdings gegensätzliche Rollen bei der Aktivierung ihrer Zielzellen ein (Manzotti *et al.*, 2006). Während die über CD28 vermittelten Signale zur T-Zell Proliferation und verstärkten IL-2 Sekretion führen (Lenschow *et al.*, 1996), resultiert aus der Bindung von CD80 an CTLA-4 eine Inhibierung der IL-2 Produktion und eine verminderte Zellzyklus-Progression bei T-Zellen (Walunas *et al.*, 1994). Unterstrichen wird die immunsupprimierende Rolle der CD80/CTLA-4-Interaktion durch die Beobachtung im Tierversuch, dass CTLA-4<sup>-</sup>Mäuse an einem massiven lymphoproliferativen Syndrom leiden und innerhalb der ersten vier Wochen nach Geburt versterben (Tivol *et al.*, 1995).

Zur Charakterisierung der wichtigen Gruppe der T-Helfer-Zellen dient das CD4 Molekül. CD4 ist ein so genannter Korezeptor, der hauptsächlich auf T-Zellen exprimiert wird und dort gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor das antigenbeladene MHC-Klasse II Molekül erkennt. CD4 ist ein 433 Aminosäuren großes Glykoprotein mit einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt und einem aus vier hintereinander liegenden Immunglobulindomänen bestehenden extrazellulären Anteil. In der immunologischen Forschung ist CD4 ein etablierter Marker für T-Helferzellen.

Um innerhalb der CD4<sup>+</sup> Zellen Treg-Zellen zu identifizieren können diese auf die zusätzliche Expression von CD25 und CD103 bzw. FoxP3 hin selektiert werden. CD25 ist identisch mit der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (IL-2R $\alpha$ ), welche gemeinsam mit der IL-2 Rezeptor  $\beta$ -Kette (IL-2R $\beta$ , CD122) und der „common cytokine-receptor  $\gamma$ -chain“ ( $\gamma$ c, CD132) den hoch affinen IL-2 Rezeptor auf aktivierten T-Zellen bildet (Nelson und

Willerford, 1998). Anfänglich wurde die über IL-2 vermittelte klonale Expansion von aktivierten T-Zellen als Haupteffekt der IL-2 Rezeptor Aktivierung betrachtet. Neuere Studien legen den Funktionsschwerpunkt hingegen auf die Beteiligung des IL-2 Signalwegs an der Homeostase von CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen (Sakaguchi *et al.*, 1995, Turka und Walsh, 2008). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Toleranz vermittelnde T-Zellen auf ihrer Oberfläche zusätzlich zu CD4 auch CD25 exprimieren (Sakaguchi *et al.*, 2001, Piccirillo und Shevach, 2004).

CD103, die  $\alpha$ -Kette des  $\alpha$ E $\beta$ 7 Integrins, ist ebenfalls ein spezifischer Marker für Treg-Zellen der Maus (Lehmann *et al.*, 2002) und des Menschen (Allakhverdi *et al.*, 2006). Über die Bindung an E-Cadherin ist das  $\alpha$ E $\beta$ 7 Integrin an der Akkumulation von Treg-Zellen in entzündlichen Geweben mitbeteiligt (Suffiav *et al.*, 2005.).

Der in T-Zellen exprimierte „forkhead/winged helix transcription factor p3“ (Foxp3) ist, anders als die zwei zuvor beschriebenen Oberflächenmarker, ein intrazelluläres Molekül mit der Funktion eines Transkriptions-Faktors. Es konnte gezeigt werden, dass Foxp3 maßgeblich an der Bildung und Differenzierung von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen beteiligt ist (Fontenot *et al.*, 2003, Hori *et al.*, 2003). Ein eindrucksvoller Beleg dafür ist die Beobachtung, dass sowohl Mäuse (Godfrey *et al.*, 1991) als auch Menschen (Bennett *et al.*, 2001, Wildin *et al.*, 2001) mit Mutationen im Foxp3-Gen von Geburt an unter schweren Autoimmunerkrankungen leiden. Seit seiner Entdeckung diente Foxp3 in einer großen Zahl von Experimenten als Marker für Treg-Zellen (Fontenot *et al.*, 2005, Schwartz, 2005). Eine weitere Gruppe von Oberflächen Molekülen, die weniger als Marker einer bestimmten Zellpopulation Verwendung finden als viel mehr Auskunft über die dominierende Dynamik einer bestehenden Immunreaktion geben, ist die Familie der CC-Motiv Chemokinrezeptoren (CCR).

CCR5 ist ein Rezeptor, der auf nahezu allen gewebeinfiltrierenden T-Lymphozyten exprimiert wird, hauptsächlich allerdings von Th1 Lymphozyten (Qin *et al.*, 1998). Mögliche Bindungspartner von CCR5 sind RANTES, MIP-1 $\alpha$  und Mip1- $\beta$ .

Der CC-Motiv Chemokinrezeptoren 7 (CCR-7) ist ein Leukozyten "Homing-Rezeptor". Die Liganden für CCR7, CCL19 und CCL21 werden, im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinen, konstitutiv im Gewebe exprimiert und nicht nur im Falle einer Entzündung oder Infektion (Rot und von Andrian, 2004). Unter homöostatischen Bedingungen wird über die Interaktion von CCR7 mit seinen Liganden die routinemäßige Migration von Immunzellen in die sekundären lymphatischen Gewebe gesteuert (Bromley *et al.*, 2005). Auch für die genaue Positionierung der Leukozyten in

bestimmten funktionellen Kompartimenten innerhalb der lymphatischen Organe scheinen Interaktionen mit CCR7 verantwortlich zu sein (Förster *et al.*, 1999).

#### 1.4 Stressreaktion und Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System

Stresserleben wirkt über eine Reihe von Effektorsystemen auf den gesamten Körper. Die zwei zentralen Regelkreise der Stressreaktion sind dabei das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-Axis, HPA-Achse) und das Locus ceruleus-Noradrenalin(LC-NE)/Autonome (sympathische) Nervensystem (Chrousos und Gold, 1992). Beide Systeme sind sehr eng miteinander verknüpft und interagieren – wie im Folgenden beschrieben - auf verschiedenen Ebenen (Saper *et al.*, 1976).

Als Haupteffekt einer Aktivierung der HPA-Achse wird eine gesteigerte Cortisolausschüttung aus der Nebennierenrinde angesehen. In als belastend erlebten Situationen werden über Projektionen aus dem limbischen System Nervenzellen im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (Para ventricular nucleus, PVN) aktiviert, die CRH in den hypophysären Portalkreislauf sezernieren.

An corticotropen Zellen der Adenohypophyse stimuliert CRH die Synthese und Freisetzung von Corticotropin (adrenocorticotropes Hormon, ACTH) (Rivier *et al.*, 2003). ACTH ist ein Spaltprodukt des Proopiomelanocortin (POMC), aus dem nach posttranslationaler Prozessierung neben ACTH noch bis zu neun weitere funktionelle Peptide wie z.B. Melanozyten-stimulierende Hormone (MSH),  $\gamma$ -Lipotropin ( $\gamma$ -LPH) und  $\beta$ -Endorphin freigesetzt werden können. ACTH wiederum bindet an Zellen der Zona Fasciculata der Nebennierenrinde, wodurch es die Synthese und Ausschüttung von Cortisol stimuliert.

Das Glukokorticoide Cortisol wiederum hat umfangreiche Wirkungen auf die verschiedensten Stoffwechselprozesse des menschlichen Körpers. Es stimuliert die Gluconeogenese in der Leber, wirkt katabol auf den Protein- und Fettstoffwechsel, erhöht bei ausreichender Konzentration die Kaliumausscheidung und die Natriumretention, steigert die Empfindlichkeit von Adrenozeptoren gegenüber Catecholaminen und wirkt in großem Umfang immunsuppressiv (Voigt, 2001).

Die basale Aktivität der HPA-Achse folgt einer zirkadianen Rhythmik ergänzt durch kurzzeitig höherfrequente pulsatile Sekretion mit einem Tagesmaximum kurz vor und nach dem Aufstehen am Morgen und einem Minimum gegen Mitternacht.

Neben der direkten Wirkung von CRH auf die HPA-Achse stimulieren einige CRH-positive Zellen auch Neuronen des sympathischen Nervensystems im Locus coeruleus des Hirnstamms, von wo aus wiederum alle Zentren der HPA-Achse durch sympathische Innervation beeinflusst werden können. Ebenso aktivieren Zytokine, vor allem der Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 und IL-6, über hypothalamische Neurone die Kortisolachse (Sapolsky *et al.*, 1987, Akira *et al.*, 1990).

Auf allen genannten Ebenen bestehen ausgeprägte Feedback-Mechanismen, die dafür Sorge tragen einen überschießenden Konzentrationsanstieg der geregelten Hormone abzuwenden und in einem angemessenen Zeitrahmen wieder auf ein normales Aktivitätsniveau zu bringen (Hodges, 1984). So hemmt beispielsweise Cortisol die Freisetzung von CRH und ACTH aus dem Hypothalamus bzw. der Hypophyse durch negatives Feedback, während Adrenalin ihre Freisetzung durch positives Feedback stimuliert (Kovacs und Makara, 1988).

CRH wird außer in den oben genannten Bereichen noch in verschiedenen weiteren Regionen des ZNS exprimiert, wie beispielsweise im Cortex, im Limbischen System und in weiteren Kerngebieten des Hirnstamms, die mit der Regulation autonomer Körperfunktionen assoziiert sind. Es wird angenommen, dass CRH dort als Neurotransmitter bzw. Neuromodulator wirkt, über den eine Reihe biologischer Reaktionen wie ängstliches Verhalten, Nahrungsaufnahme, Lernen, Blutdruckregulation und Sexualverhalten beeinflusst werden. Darüber hinaus wird CRH eine proinflammatorische Wirkung zugesprochen, die sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen nachgewiesen werden konnte (Karalis *et al.*, 1991, Crofford *et al.*, 1992).

Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, so liegt die Einschätzung nahe, dass CRH nicht alleine die endokrine Stressreaktion dirigiert, sondern vielmehr die verschiedenen an der Stressreaktion beteiligten Ebenen, also das vegetative Nervensystem, das Verhalten und das Immunsystem integriert und steuert.

Aber auch außerhalb des ZNS finden sich in verschiedenen Spezies CRH-produzierende Zellen. So ist beispielsweise für den Menschen die Produktion von CRH in der Plazenta seit langem belegt (Grino *et al.*, 1987). Es konnte zudem beobachtet werden, dass im Verlauf der Schwangerschaft der Spiegel von in der Plazenta synthetisiertem CRH exponentiell ansteigt und zum Zeitpunkt der Niederkunft einen Spitzenwert erreicht (Emanuel *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass in Schwangerschaften, die mit einer Frühgeburt endeten, der Anstieg des placentaren

CRH deutlich steiler war als bei Schwangerschaften, die sich über die durchschnittlichen 38 Wochen oder noch darüber hinaus erstreckten (Torricelli *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass CRH beim Menschen als „plazentare Uhr“ wirkt und die Dauer der Schwangerschaft entscheidend bestimmt (McLean *et al.*, 1995).

Dem steht der ausgeprägte hemmende Effekt gegenüber, den eine Aktivierung der HPA-Achse auf das weibliche Fortpflanzungssystem ausübt (Rivier *et al.*, 1986). So inhibiert CRH und das durch CRH induzierte  $\beta$ -Endorphin die Sekretion von GnRH aus dem Hypothalamus und Cortisol wirkt auf der Ebene der Hypophyse inhibierend auf die Ausschüttung von Lutenisierendem Hormon (LH). Diese Mechanismen scheinen auch für das bekannte Phänomen der stressinduzierten *Amenorrhoe* verantwortlich zu sein und haben damit eine weitreichende reproduktionsmedizinische Relevanz (Chrousos *et al.*, 1998).

### 1.5 Die Rolle von Progesteron in der Schwangerschaft

Progesteron ist ein eng mit der Schwangerschaft assoziiertes Steroidhormon. Es ist sowohl für die Etablierung einer Schwangerschaft als auch für deren Aufrechterhaltung bis zur erfolgreichen Niederkunft essentiell (Graham und Clarke, 1997). Diese Tatsache wird eindrucksvoll dadurch demonstriert, dass beim Menschen die Verabreichung von Progesteronrezeptor-Antagonisten innerhalb der ersten sieben Schwangerschaftswochen zum zeitnahen Abort führt (Das und Catt, 1987). Ebenfalls zu einem Abort führt die Entfernung des Progesteron produzierenden Corpus Luteum im Nagetier-Modell (Deanesly, 1973).

Neben seiner wichtigen Rolle bei der Ovulation und der Transformation des Endometriums wirkt Progesteron in hohem Maße immunmodulatorisch (Elger *et al.*, 1987, Miyaura und Iwata, 2002). Die immunmodulatorische Kapazität von Progesteron wird dabei maßgeblich von dem sogenannten Progesteron induzierten Blocking Faktor (PIBF) vermittelt (Szekeres-Bartho *et al.*, 1985). PIBF wird nach Bindung von Progesteron unter anderem von Leukozyten und Trophoblastzellen sezerniert und entfaltet daraufhin seine Wirkung auf die verschiedenen Zellpopulationen (Anderle *et al.*, 2008, Szekeres-Bartho und Wegmann, 1996). Zu den bisher beschriebenen Wirkungen, die PIBF auf Zellen des Immunsystems ausübt, gehört die Verschiebung des Verhältnisses zwischen Th1- und Th2-Zellen zu Gunsten von Th2-Zellen (Piccinni

*et al.*, 1995), die Suppression der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen (Szekeres-Bartho *et al.*, 1997) und eine gesteigerte Synthese von asymmetrischen Antikörpern durch B-Zellen (Kelemen *et al.*, 1996), um nur die wichtigsten zu nennen. Es wird daher davon ausgegangen, dass eine adäquate Menge an Progesteron für eine erfolgreiche Schwangerschaft essentiell ist. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass die negativen Auswirkungen von psychoemotionalem Stress auf die weiblichen Reproduktionsorgane in großem Maße über inhibierende Wirkungen auf Progesteron vermittelt werden (Wiebold *et al.*, 1986, Chrousos *et al.*, 1998; Nepomnaschy *et al.*, 2007). So konnte im Mausmodell für stressinduzierte Aborte gezeigt werden, dass experimentell gestresste Tiere verringerte Progesteron- und PIBF-Level und eine verminderte Zahl von Progesteronrezeptoren im Bereich der feto-maternalen Schnittstelle aufwiesen. Durch die Verabreichung von Dydrogesteron, einem Progesteron-Agonist, normalisierte sich die Konzentration von PIBF wieder und die zuvor beobachteten negativen Effekte auf die Schwangerschaft der Versuchstiere konnten verhindert werden (Joachim *et al.*, 2003).

## 2. Fragestellung

Der Einfluss von Umweltfaktoren während der Schwangerschaft, wie z.B. eine gesteigerte Stresswahrnehmung, auf die Vulnerabilität für bestimmte Krankheiten im späteren Leben des Kindes konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen belegt werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu dieser gesteigerten Vulnerabilität führen, sind bislang jedoch erst wenig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Mediatoren und Mechanismen bei trächtigen Mäusen und den noch ungeborenen Nachkommen daraufhin untersucht, ob sie sich in Abhängigkeit von einer Stressbehandlung verändern und somit ,möglicher Weise, an der "fetalen Programmierung" durch Stress beteiligt sind.

Dabei wurde sich des gleichen Versuchsdesigns bedient, wie es auch in der Arbeit von Pincus-Knackstedt *et al.* Verwendung fand, mit dem Unterschied, dass die trächtigen Tiere noch vor der Geburt ihrer Nachkommen getötet und die zu untersuchenden Gewebe entnommen wurden. In der genannten Arbeit wurden die Tiere syngen verpaart.

Um eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf die Verhältnisse beim Menschen zu ermöglichen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Teil der zellulären Untersuchungen, z.B. die durchflusszytometrischen Analysen, sowohl an Geweben von syngen wie auch von allogenen verpaarten Tieren praktiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung eines modifizierten Mausmodells für Fetale Programmierung von Krankheiten des Erwachsenenalters untersucht, inwiefern sich eine Stressexposition in der späten Schwangerschaft auf das immunologische Gleichgewicht an der Feto-Maternalen Schnittstelle, auf das oberste Regelsystem der HPA-Achse und auf die Serum- bzw. Amnionkonzentration des bedeutendsten Stress- bzw. Schwangerschaftshormons auswirkt.

Die speziellen Fragestellungen lauten:

(1) Welchen Einfluss hat eine Schallstressexposition in der späten Schwangerschaft auf den Phänotyp der Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems, die maßgeblich an den immunologischen Anpassungsvorgängen während der Schwangerschaft beteiligt sind, wie z.B. Th-Zellen, Treg-Zellen, DC und NK-, bzw. NKT-Zellen **im Uterusgewebe** der trächtigen Mäuse?

(2) Welchen Einfluss hat eine Schallstressexposition in der späten Schwangerschaft auf den Phänotyp der Zellen des angeborenen, bzw. des erworbenen Immunsystems, am Beispiel von NK-, bzw. NKT-Zellen und CCR5<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> Leukozyten, **im Blut** der trächtigen Mäuse?

(3) Welchen Einfluss hat eine Schallstressexposition in der späten Schwangerschaft auf den Phänotyp der Zellen des angeborenen, bzw. des erworbenen Immunsystems, namentlich Th-Zellen, Treg-Zellen und DC, in den, den Uterus **drainierenden, inguinalen Lymphknoten** der trächtigen Mäuse?

(4) Lassen sich in den Gehirnen trächtiger Mäuse, die in der späten Schwangerschaft einer Schallstressexposition ausgesetzt waren, messbare Veränderungen der Expression von CRH mRNA im PVN des Hypothalamus oder in der Amygdala nachweisen?

(5) Lassen sich im Serum trächtiger Mäuse, die in der späten Schwangerschaft einer Schallstressexposition ausgesetzt waren, oder in der Amnionflüssigkeit ihrer ungeborenen Nachkommen messbare Veränderungen der Corticosteron-Konzentration oder der Progesteron-Konzentration nachweisen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Die im Folgenden beschriebenen Experimente und Untersuchungen sind an Mäusen, bzw. an aus Mäusen entnommenem Gewebe, durchgeführt worden. Die Maus ist in der Biomedizinischen Forschung ein gängiger Modellorganismus, an dem bereits viele wissenschaftliche Fragestellungen untersucht worden sind. Die technisch relativ einfache Verpaarung der Tiere und die umfangreichen Kenntnisse vom Verlauf der Trächtigkeit bei der Maus waren notwendige Voraussetzungen für das Gelingen der Experimente. Auch legt die Ähnlichkeit von Mensch und Maus, in Hinblick auf die Plazentamorphologie und den Aufbau sowie die Funktion der HPA-Achse, die Arbeit am Mausmodell nahe. In der Stressforschung sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Maus-Stämme, BALB/c und CBA/J, etablierte Arbeitsmittel. Für den ersten Versuch wurden weibliche BALB/C Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im reproduktionsfähigen Alter von sechs bis acht Wochen ausgewählt, für den zweiten Versuch fiel die Wahl auf weibliche Mäuse des Stammes CBA/J (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im gleichen Alter.

Nach der Ankunft in der Versuchstiereinrichtung wurden die Tiere für eine Woche ungestört in ihren Käfigen gehalten um eine optimale Gewöhnung an die veränderte Umwelt zu gewährleisten und Effekte des durch den Transport bedingten Stresses auf die Versuchstiere zu minimieren. Die Tiere wurden in Gemeinschaftskäfigen in der Versuchstierhaltung der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow (Berlin, Deutschland) mit einem künstlichen zwölfstündigen Tag/Nacht Rhythmus gehalten und mit Wasser und entsprechender Tiernahrung *ad libitum* versorgt. Die Versorgung der Tiere und der Aufbau des Versuches wurden durch die zuständige lokale Behörde für die Durchführung von Tierversuchen, dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGeSo, Berlin, Deutschland) geprüft und genehmigt, sowie nach den Richtlinien des LaGeSo für die Behandlung von Versuchstieren durchgeführt.

### 3.1.1 Verpaarung der Versuchstiere

Im ersten Versuch wurden weibliche BALB/c Mäuse syngam mit männlichen BALB/c Tieren verpaart. Im zweiten Versuch wurden weibliche CBA/J Mäuse mit männlichen BALB/c Mäusen allogam verpaart. Dafür wurden zwei weibliche Tiere mit jeweils einem männlichen Tier über Nacht in einem gemeinsamen Käfig untergebracht. Am folgenden Morgen wurden die Tiere auf das Vorhandensein eines Vaginal-Plugs hin untersucht. Das Erscheinen eines Vaginalplugs markiert die stattgefundenene Konzeption. Das Gestationsalter bei Auffinden des Vaginalplugs wurde auf Tag 0,5 (Gestation day, GD) festgelegt. Anschließend wurden die trächtigen Tiere per Zufall entweder der Stressgruppe oder der Kontrollgruppe zugeteilt.



Abb. 2: Grafische Darstellung des Versuchsablaufs. Das Auffinden eines Vaginal-Plugs bezeichnet Tag 0,5 der Schwangerschaft. An Tag 12,5 der Schwangerschaft erfolgte die erste Stressbehandlung, an Tag 14,5 der Schwangerschaft erfolgte die zweite Stressbehandlung. An Tag 16,5 der Schwangerschaft erfolgte die Probenentnahme. GD, Gestation day.

### 3.1.2 Stressexposition

Die Stressexposition erfolgte bei beiden Versuchen in gleicher Weise. An GD 12,5 und an GD 14,5 wurden die trächtigen Tiere für die Dauer von 24 Stunden definiertem Schallstress ausgesetzt. Zu diesem Zweck wurde im Käfig der zu behandelnden Tiere ein Nagetierabwehrgerät (Wühlmausfrei, Conrad Electronics, Berlin, Deutschland) platziert, so dass die Tiere der Geräuschquelle nicht ausweichen konnten (Arck *et al.*, 1995a; Joachim *et al.*, 2003). Das Nagetierabwehrgerät erzeugte in unregelmäßigen Abständen vier mal pro Minute ein Geräusch mit einer Frequenz von 300 Hz und einer Lautstärke von 75-80 dB. Die Tiere der Kontrollgruppe blieben für die Dauer des Versuchs ungestört, abgesehen von tierpflegerischen Tätigkeiten und der Organentnahme am Ende des Versuchs.

Die Verwendung des in dieser Arbeit benutzten Nagetierabwehrgeräts als Stressor ist in der Stressforschung ein etabliertes Verfahren. In zahlreichen Versuchen, bei denen ein Nagetierabwehrgerät gleicher Bauart verwendet wurde, konnten Effekte der Schallstressexposition auf die Schwangerschaft nachgewiesen werden. So zeigte sich beispielsweise eine verminderte Expression von Galectin-1 (Gal-1), einem immunmodulatorischen Glycan-Bindungsprotein im Myometrium und der Dezidua trächtiger Tiere nach Stressexposition. Aber auch in anderen Forschungsbereichen ist dieser Stressor etabliert: so konnten Effekte auf Faktoren, welche das Haarwachstum beeinflussen, nachgewiesen werden, wie beispielsweise eine vermehrte intrafollikuläre Apoptose nach Stressexposition.

Der Versuchsaufbau und damit auch die Verwendung des besagten Stressors ist aus einem weiteren Grund zweckdienlich: die inhaltliche Nähe dieser Arbeit zu der in Abschnitt 2 erwähnten Originalarbeit von Pincus *et al*, in der das selbe Nagetierabwehrgerät benutzt wurde, macht im Sinne der Kontinuität seine Verwendung auch in dieser Arbeit notwendig.

## 3.2 *Gewebegewinnung*

### 3.2.1 *Blutentnahme und Tötung der Versuchstiere*

An GD 16,5, zwei Tage nachdem die Tiere der Stressgruppe der zweiten Stressexposition unterzogen wurden, sind alle Mäuse getötet und die vorgesehenen Gewebeproben entnommen worden. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen eine hohe Dosis Ketamin (Ketanest, Parke-Davis, Freiburg, Deutschland, 10 mg/kg Körpergewicht) mit 2% Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal appliziert. Nach Eintritt der völligen Areflexie wurde den narkotisierten Tieren mittels Retrobulbärpunktion Blut entnommen. Anschließend erfolgte ihre Tötung durch Dislokation der Halswirbelsäule. Das entnommene und mit 30 µl Heparin versetzte Blut wurde bis zur Weiterbehandlung bei 4°Celsius gelagert.

### 3.2.2 *Entnahme der inguinalen Lymphknoten*

Die Haut der Versuchstiere wurde entlang der Linea Alba von der Mitte des Sternums bis kurz vor den Schwanzansatz transversal durchtrennt und das Fell nach caudal hin entfernt. Pro Tier wurden zwei inguinale Lymphknoten entnommen in PBS (Dulbecco's PBS, Cat. No:H15-002, PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria) überführt und bis zur Weiterbehandlung für die durchflusszytometrische Analyse bei 4°Celsius gelagert.



*Abb. 3: Links: Das verwendete Nagetierabwehrgerät (Wühlmausfrei, Schallgeber 75-80 db bei einer Frequenz von 300 KHz in Intervallen von ca. 15 s) in einem Käfig zusammen mit Tieren der Stressgruppe. Die Tiere konnten der Stressbelastung auf diese Weise nicht entgehen. Rechts: Entnommener Uterus mit sieben Implantationsstellen.*

### 3.2.3 *Isolierung des Uterus und Gewinnung der Amnionflüssigkeit*

Das Bauchfell der Versuchstiere wurde entlang der Linea Alba vom Unterrand des Sternums bis kurz vor die Symphyse transversal durchtrennt und der Zugang zur cavita abdominalis und zu kleinem und großem Becken eröffnet. Der fruchttragende Uterus wurde von anhaftendem Fett und versorgenden Gefäße befreit. Anschließend erfolgte die Durchtrennung des uterinen Bandapparats und der Vagina um den kompletten Uterus samt der Embryos entnehmen zu können. Pro Tier wurde eine vollständige Implantationsstelle, bestehend aus dem maternalen Uterusgewebe, der Plazenta und dem Embryo samt Fruchthüllen, vom restlichen Uterus abgetrennt. Die Implantationsstelle wurde mit Einbettmedium überschichtet und in -20° Celsius kaltem Methanol langsam gekühlt um anschließend in flüssigem Stickstoff komplett durchgefroren zu werden. Bis zur Weiterverarbeitung zwecks immunhistochemischer Färbung lagerten die entnommenen Implantationsstellen bei -80° Celsius im

Tiefkühlschrank. Aus dem verbliebenen Uterus wurden alle Embryoplazentaren-Einheiten entfernt, die mütterlichen Gewebeanteile hingegen wurden bei 4°Celsius in PBS bis zur Weiterbehandlung für die durchflusszytometrische Analyse gelagert. Die zuvor vom Uterus separierten Embryoplazentaren-Einheiten wurden in PBS gewaschen um daraufhin mittels Punktion Flüssigkeit aus der Amnionhöhle zu entnehmen. Die Amnionflüssigkeit wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° Celsius im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.4 *Entnahme des Gehirns*

Um das Gehirn dem knöchernen Schädel entnehmen zu können wurde zunächst das Fell samt Haut vom Kopf der Versuchstiere entfernt. Ausgehend vom Foramen Magnum erfolgte dann die Durchtrennung des Os occipitale laterale über dem Condylus occipitalis um oberhalb der Pars squamosa des Os temporale das Os interparietale, das Os parietale und das Os nasale bis zur Sutura nasofrontalis zu durchschneiden. Nachdem auf der Gegenseite in gleicher Weise verfahren wurde, konnte das Schädeldach abgehoben und das Gehirn mit einem scharfen Löffel unterhalb des Hirnstamms vom Rückenmark getrennt werden. Das entnommene Gehirn wurde mit Hilfe von Einbettmedium (Tissieue-Tec, O.C.T. 4583, Sakura Finetek Europe Zoeterwoude, Niederlande) auf einer Korkplatte befestigt und in -20° Celsius kaltem Methanol langsam gekühlt um anschließend in flüssigem Stickstoff komplett durchgefroren zu werden. Bis zur Weiterverarbeitung mittels In situ Hybridisierung lagerten die entnommenen Gehirne bei -80° Celsius im Tiefkühlschrank.

### 3.3 *Bearbeitung des Gewebes und Auswertung*

#### 3.3.1 *Durchflusszytometrische Analyse von Uterus, inguinalen Lymphknoten und Blut*

Das auf 4° Celsius gekühlte Blut wurde mit 1 ml Lysepuffer und 9 ml H<sub>2</sub>O versetzt. Nach 8 Minuten Einwirkzeit wurde das Lysat aus roten Blutkörperchen und Puffer abgesaugt und das verbliebene Leukozytenkonglomerat am Boden des Reagenzglas in 10 ml frischem PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun bei 4°Celsius mit 1500 rpm

für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die verbliebenen Zellen bis auf Weiteres bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert.

Die in 4° Celsius kaltem PBS befindlichen inguinalen Lymphknoten wurden über ein Zellsieb (Cell Strainer, REF 352360, BD Biosciences) mit einer Maschenweite von 100 µm in ein mit 10 ml PBS gefülltes Reagenzglas überführt. Das Netz sollte große Zellen und Extrazelluläre Matrix sowie den überwiegenden Teil des Fettes zurückhalten und von der Leukozytenfraktion abtrennen. Die überführten und in PBS gelösten Zellen wurden anschließend bei 4° Celsius mit 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die verbliebenen Zellen bis auf Weiteres bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert.

Das für die durchflusszytometrische Analyse vorgesehene Uterusgewebe wurde sorgfältig in kleine Stücke zerschnitten und in ein mit 25 ml HBSS (GIBCO HBSS, 14025-050 Invitrogen, Paisley, UK) gefülltes Becherglas überführt, welchem anschließend 200 U/ml Hyaluronidase (Nr. H3506; Sigma-Aldrich, Stadt, Germany), 1mg/ml Kollagenase (Typ C-2139; Sigma-Aldrich, Stadt, Germany) und 0,2 mg/ml DNase (Nr. 1284932; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) beigegeben wurde. Das zerkleinerte Uterusgewebe wurde bei 37° Celsius für 20 Minuten der degestiven Wirkung des Enzymgemischs ausgesetzt. Anschließend wurde die Suspension über ein Sieb (Cell Strainer, REF 352360, BD Biosciences) mit einer Maschenweite von 100 µm in ein mit 10 ml PBS gefülltes Reagenzglas überführt. Die Zellsuspension wurde nun vorsichtig mit 3 ml Lympholite (Lympholite-M, CL5030, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby Ontario, Kanada) überschichtet und bei Raumtemperatur mit 2100 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Die Zugabe von Lympholite begünstigte die Anreicherung von Leukozyten in einer bestimmten Phase der Suspension, so dass eine gezielte Entnahme dieser Zellen möglich wurde. Die entnommenen Zellen wurden dann in ein mit 10 ml FACS Puffer gefülltes Reagenzglas eingebracht und bei 4° Celsius mit 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wurde der Überstand abgesaugt und die verbliebenen Zellen bis zur Weiterbehandlung bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert. In den Gewebeproben wurden Oberflächenmoleküle, sog. „Cluster of Differentiation“ (CD), mit monoklonalen Antikörpern markiert um sie der durchflusszytometrischen Analyse zugänglich zu machen (siehe Tabelle 1). Die Auswahl der jeweils gefärbten Oberflächenmoleküle orientierte sich dabei an den etablierten Markern für die unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen.

Im Lymphknoten wurden monoklonale Antikörper gegen CD4 (RM4-5, 553048, BD

Pharmingen), den T-Zell-Antigenrezeptor-Korezeptor, CD25 (3C7, 553075, BD Pharmingen), die Interleukin-2-Rezeptor alpha Kette (IL2R $\alpha$ ) und CD103 (M290, 557494, BD Pharmingen), die Integrin alpha-E-Kette (ITGAE), als Marker für T-Helferzellen (CD4) bzw. T-Regulatorische-Zellen (CD4, CD25, CD103) verwendet. Um Aussagen über Dendritische Zellen (DC) machen zu können kamen darüber hinaus monoklonale Antikörper gegen CD11c (HL3, 553800, BD Pharmingen), die Integrin alpha-X-Kette, CD80 (RMMP, MCA1586 Serotec), den kostimulatorischen Rezeptor B7 und CD54 (3E2, 553253, BD Pharmingen), das Intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) zum Einsatz. Im Blut lag ein Fokus der Untersuchung auf NK-Zellen und NKT-Zellen, daher wurden monoklonale Antikörper gegen CD49b, die Integrin alpha 2 Kette (ITGA2), als Marker für NK-Zellen und gegen CD3 (145-2C11, 553061, BD Pharmingen), einen Bestandteil des T-Zell-Antigenrezeptor-Komplexes, welcher in Kombination mit CD49b als ein Marker für NKT-Zellen gilt, verwendet. Des weiteren wurde die Expression von Aktivierungs- und Rekrutierungsmarkern von Leukozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper gegen CD195 (C34-3448, 559922, BD Pharmingen), den C-C-Motiv-Chemokinrezeptor-5 (CCR-5), CD197, den C-C-Motiv-Chemokinrezeptor-7 (CCR-7) und CD11a, die Integrin alpha-L-Kette (ITGAL) eingesetzt. Im Uterus wurden die T-Zellmarker CD4, CD25 und CD103, die NK-Zellmarker CD49b und CD3 sowie die Marker für DC, CD11c, CD80 und CD54 verwendet.

#### *Verwendete monoklonale Antikörper*

GEWEBE	Färbung NR.	FITC	PE	APC
Lymphknoten	1	CD 80	CD54	CD11c
Lymphknoten	2	CD103	CD4	CD25
Uterus	1	CD 80	CD54	CD11c
Uterus	2	CD103	CD4	CD25
Uterus	3	CD3	CD49b	-
Blut	1	CD3	CCR7	-
Blut	2	CD3	CD49b	CCR5

*Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der verschiedenen Kombinationen von monoklonalen Antikörpern mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen und ihr Einsatz zur Analyse der verschiedenen Gewebe.*

Die Färbung der entnommenen Zellen erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll, welches nicht zwischen den Herkunftsgeweben der jeweiligen Zellsuspension unterschied. Die bei 4°Celsius bereitgehaltenen Zellen wurden mit FACS-Puffer (50 µl pro Färbung) verdünnt, mit 2% Mausnormalserum (Mouse Serum, X0910, DAKO A/S ,Glostrup Dänemark) versetzt und für 20 Minuten ruhen gelassen. Parallel dazu wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper jeweils in separaten Gefäßen mit FACS-Puffer im Verhältnis von 1:100 (Phycoerythrin und Allo phycoocyanin) bzw 1:50 (Fluorescein Isothiocyanate) bereitgehalten. Anschließend wurden jeweils 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Antikörpermix bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden alle Zellen in 2 ml PBS (Dulbecco's PBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen und bei 4°Celsius für 10 Minuten mit 1500 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand nahezu vollständig abgesaugt, so dass einzig die gefärbten Zellen zurückblieben. Die Messung erfolgte an einem 4-Farb-Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien). Unter Verwendung von einfachgefärbten Zellen und Antikörper-Isotypkontrollen wurden die Geräteeinstellungen angepasst und im Verlauf des Versuchs nicht mehr verändert. Pro Tier und Messung wurden jeweils 20000 Zellen ausgewählt, die sich an Hand von Größe und Granularität der Lymphozytenpopulation zurechnen ließen. Die ausgewählten Zellen wurden anschließend auf die Expression von speziellen Oberflächenmolekülen hin untersucht. Die Verwendung dreier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichte es das gleichzeitige Vorhandensein von bis zu drei verschiedenen Oberflächenmolekülen auf ein und der selben Zelle zu untersuchen. Die Messung und die Auswertung erfolgten unter Verwendung des Computerprogramms CELLQuest (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien).

### 3.3.2 *Immunhistochemische Färbung*

Mit einem Kryostaten (Frigocut E, Fa. Reichert, Nussloch, Deutschland) wurden aus den tiefgefrorenen Implantationsstellen 10 µm dicke Schnitte gefertigt. Die Auswahl der Schnitte erfolgte nach einheitlichen Kriterien. Die Plazenta musste dabei transversal angeschnitten sein und Anteile des „mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy“ (MLAp) enthalten. Im Anschluss kamen die Objektträger für 15 Minuten bei -20°C in ein Fixierungsbad aus 100%igem Aceton um bis zum Zeitpunkt der Färbung eingefroren zu bleiben.

In den Schnitten wurden folgende Strukturen immunhistochemisch angefärbt: CD4, der T-Zell-Korezeptor, CD11c, die Integrin alpha-X-Kette, CD54, das Intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1(ICAM-1), CD49b, die Integrin alpha 2 Kette und FoxP3, ein Transkriptionsfaktor. Die Schnitte wurden jeweils einer immunchemischen Färbung unterzogen und anschließend mit Haematoxylin gegengefärbt. Die aufgetauten und für 15 Minuten in TBS rehydrierten Schnitte wurden für 30 Minuten in 30%iges Methanol mit 3% Wasserstoffperoxid gegeben. Um endogenes Biotin und Avidin zu blocken und unspezifische Proteinstrukturen zu maskieren erfolgte eine Behandlung mit kommerziellem Avidin-, bzw. Biotinblock und mit einem Proteinblock. Anschließend wurden die Schnitte mit monoklonalen Ratten-Antikörpern gegen CD 54, CD11c und CD49b inkubiert. Dabei wurden aus jedem Tier zwei konsekutive Schnitte pro Oberflächenmarker ausgewählt. Im Falle der CD11c und CD49b Antikörper betrug die Inkubationszeit 24 Stunden, die Antikörperbindung mit CD54 wurde hingegen schon nach einer Stunde beendet. In einem weiteren Schritt gab man das Enzym Alkalische Phosphatase auf die Schnitte, welches sich über eine Avidin Markierung an den biotinierten Fc-Teil der monoklonalen Antikörper heftete. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurden die Schnitte mit dem aktivierten Chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid (DAB Chromogen, S3000, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) überschichtet, woraufhin sich nach 15 Minuten gegebenenfalls eine Farbreaktion einstellte. Die Antikörper waren im Verhältnis von 1:100 in TBS mit einem 2%igen Anteil Mausnormalserum gelöst. Die Färbung von CD4 und FoxP3 (eFJK-16s, 13-5773, Bioscience Inc., San Diego, CA, USA) erfolgte in abgewandelter Form. Nach den Blocks wurden die Schnitte zunächst für eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert. Im Falle von CD4 handelte es sich um einen monoklonalen Ratte-Anti-Maus Antikörper, der im Verhältnis von 1:100 in TBS mit einem 2%igen Anteil Mausnormalserum gelöst wurde. Als primärer Antikörper gegen FoxP3 kam ebenfalls ein monoklonaler Ratte-Anti-Maus Antikörper zum Einsatz, der im Verhältnis von 1:100 in TBS mit einem 2%igen Anteil Mausnormalserum gelöst wurde. Da FoxP3 intrazellulär lokalisiert ist, wurde dem Antikörpergemisch 0,2% Triton (Triton X-100, Cat.No. 37240, Serva GmbH Heidelberg, Deutschland) beigemischt um die Durchlässigkeit der Zellmembran für die Antikörper zu gewährleisten. In einem weiteren Schritt wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Ziege-Anti-Ratte sekundär Antikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Der sekundär Antikörper war ebenfalls im Verhältnis von 1:100 in TBS mit einem 2%igen Anteil Mausnormalserum gelöst und gegen den Fc-Teil des primären

Ratten Antikörpers gerichtet. Die anschließenden Färbe-Schritte erfolgten analog dem oben beschriebenen Protokoll für CD4, CD54 und CD11c. Zum Abschluss wurden alle Schnitte für vier Minuten mit Haematoxillin gegengefärbt.

Als Negativkontrolle fungierten Schnitte, bei deren Färbung der jeweils spezifische Antikörper weggelassen wurde. Als Positivkontrolle wurden Kryoschnitte einer Milz verwandt. Die Negativkontrollen zeigten keine spezifische Immunreaktivität.

Die Schnitte wurden bei einer 200fachen Vergrößerung unter einem Zeiss Axioscope Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung verfolgte zwei verschiedene Ansätze. Im Falle der Oberflächenmarker CD4, CD11c und CD49b diente die immunhistochemische Färbung einzig dem Nachweis, dass die mit dem Durchflusszytometer gemessenen Zellen auch tatsächlich dem Uterusgewebe entstammen und ihr Vorhandensein nicht auf Verunreinigungen durch Blut oder Peritonealzellen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden pro Färbung und Tier 15 Gesichtsfelder eines Schnittes auf positive Zellen hin untersucht und ihr Vorhandensein gegebenenfalls fotografisch dokumentiert.

Die gegen FoxP3 bzw. CD54 gefärbten Schnitte wurden hingegen einer quantitativen bzw. semiquantitativen Analyse unterzogen. Für FoxP3 wurde ein Schnitt pro Tier ausgewertet, indem in 30 Gesichtsfeldern alle positiven Zellen gezählt wurden. Die Gesamtzahl aller positiven Zellen wurde dann durch die Anzahl der Gesichtsfelder geteilt und somit die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt. Um die Präsenz CD54 positiver Zellen zu quantifizieren wurde ein Schnitt pro Tier ausgewählt und die Intensität des positiven Signals an der Feto-Maternalen Grenzzone in 30 Gesichtsfeldern bestimmt. Dabei wurde sich einer semiquantitativen Bewertungsskala bedient, an Hand derer zwischen: keine Expression (0), mäßige Expression (+1), mittelstarke Expression (+2) und starke Expression (+3) unterschieden wurde. Die aus der Intensitätsbestimmung ermittelten Werte für jedes der 30 Gesichtsfelder pro Schnitt wurden addiert und daraus ein die Gesamtintensität repräsentierender Zahlenwert gebildet.

### 3.3.3 *Quantitative Analyse der CRH mRNA Expression im mütterlichen Gehirn mittels In situ Hybridisierung*

Von den Gehirnen der Versuchstiere wurden mit einem Kryostaten 15 µm dicke coronare Schnitte angefertigt, die zum einen Anteile des hypothalamischen PVN

(Bregma, -0.82 mm) und zum anderen der Amygdala (Bregma, -1.46 mm) enthielten. Das Auffinden der für die Untersuchung relevanten Hirnregionen erfolgte an Hand von Orientierungsschnitten. Dabei wurde jeder zehnte Schnitt einer Übersichtsfärbung mit 1%igem Toluidine Blau (Sigma-Aldrich, Stadt, Deutschland) unterzogen und die aktuelle Schnittebene mit Hilfe eines anatomischen Atlas des Mäusegehirns bestimmt. Die ausgewählten Schnitte wurden dann auf Raumtemperatur erwärmt und für 10 Minuten in 4%iges Paraformaldehyd in PBS gestellt. Nach einem ausgiebigen Waschschrift in PBS kamen die Schnitte dann für zehn Minuten in Triethanolamin und wurden danach kurz mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für jeweils drei Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Zwischen dem ersten und dem zweiten Bad in 100%igen Ethanol kamen die Schnitte zusätzlich für drei Minuten in 100 %iges Chloroform. Anschließend wurden die Schnitte an der Luft getrocknet.

Um die CRH mRNA Expression im mütterlichen Gehirn bestimmen zu können fand eine Sonde für CRH mRNA Verwendung, welche aus den komplementären Basen der Positionen 496-537 (5'-CCT GTT GCT GTG AGC TTG CTG AGC TAA CTG CTC TGC CCT GGC-3') der CRH mRNA bestand. Mit Hilfe des Enzyms Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) wurde an das 3'-Ende der Sonde ein radioaktiv (<sup>35</sup>S) markiertes dATP Molekül gekoppelt. Im folgenden Schritt wurden die ausgewählten Schnitte mit einer Mischung aus radioaktiv markierter Sonde und Hybridisierungs-Puffer überschichtet, mit „Coverslips“ (Nescofilm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgedeckt und bei 37° Celsius für 20 Stunden in einer Feuchtigkeitskammer zum Zweck der Hybridisierung belassen. Am nächsten Tag wurden zuerst alle Objektträger ausgiebig in 58° Celsius warmem SSC gewaschen um daraufhin in 23° Celsius warmem ddH<sub>2</sub>O gespült zu werden. Die gespülten Schnitte trockneten anschließend an der Luft, bevor sie in einer Dunkelkammer gleichmäßig mit einer autoradiographischen Emulsion (Kodak NTB-3, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) bedeckt wurden. Anschließend kamen die Schnitte für zwei Stunden zum Trocknen in eine lichtundurchlässige Plastikkiste. Die getrockneten Schnitte wurden daraufhin in ebenfalls lichtdichte Objektträgeraufbewahrungskästen gesteckt.

Vor dem Versiegeln mit schwarzem Elektro-Isolierband wurde in jeden Objektträgeraufbewahrungskasten ein Säckchen mit Kieselgel als Trockenmittel gegeben. Die Objektträger verblieben unter den oben beschriebenen Bedingungen für vier Wochen bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Einwirkzeit kamen alle Schnitte unter Dunkelkammerbedingungen für fünf Minuten in den Entwickler (Kodak D-

19, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA). Darauf folgten zwei mal fünf Minuten im Fixierungsbad (Kodak Rapidfix, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) und eine finale Wäsche in ddH<sub>2</sub>O. In einem letzten Schritt wurden alle Schnitte noch mit Haematoxylin und Eosin gegengefärbt.

Die Schnitte wurden bei einer 200fachen Vergrößerung unter einem Zeiss Axioscope Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Um die Anzahl positiver Zellen im PVN bzw. in der Amygdala ermitteln zu können wurden diejenigen Zellen der Zielregion als positive Zellen gezählt, welche innerhalb ihres Zellkörpers eine mehr als drei mal so hohe Anzahl an Silbergranula aufwiesen, wie die Zellen des Hintergrunds. Die Bestimmung der Fläche, welche die Silbergranula innerhalb der positiven Zellen bedeckte, erfolgte unter Verwendung des Auswertungsprogramms „Open Lab“ (Improvision, Coventry, UK) am Computer. Pro Versuchstier und untersuchter Hirnregion wurden jeweils vier konsekutive Hirnschnitte ausgezählt.

#### 3.3.4 *Bestimmung der Corticosteron Konzentration in der Amnionflüssigkeit und im mütterlichen Serum mittels Radioimmunoassay*

Um die Konzentration von Corticosteron in der Amnionflüssigkeit und im mütterlichen Serum zu bestimmen wurde ein kommerzielles Radioimmunoassay (ImmuChem™ Double Antibody Corticosterone, MP Biomedicals, Orangeburg, New York, USA) verwendet. Das Assay funktionierte nach dem Prinzip der kompetitiven Bindung, wobei radioaktivmarkiertes (<sup>125</sup>I) Corticosteron aus dem Test-Kit mit nicht markiertem Corticosteron aus dem Serum, bzw. der Amnionflüssigkeit um eine gegebene Anzahl von Bindungsstellen konkurriert. Von jeder Probe wurden 10 µl Serum bzw. Amnionflüssigkeit mit 2 ml Steroiddiluent aus dem Test-Kit verdünnt. 0,1 ml der verdünnten Proben, sowie 0,1 ml der mitgelieferten Corticosteron-Kalibrierlösungen (25 ng/ml -1000 ng/ml Corticosteron ) wurden jeweils zusammen mit 0,2 ml mit <sup>125</sup>I markiertem Corticosteron in ein Reagenzglas umgefüllt. Anschließend wurde allen Proben und den Kalibrierlösungen jeweils 0,2 ml Anti-Corticosteron hinzugefügt und alles für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde jedem Reagenzglas 0,5 ml Fällungslösung zugegeben und alles sorgfältig gevortext. Um den Komplex aus Corticosteron und Anti-Corticosteron besser vom Überstand trennen zu können wurden alle Röhrchen mit 2500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, bevor der Überstand abgesaugt wurde. Abschließend wurde in einem Gamma-Zähler

die Radioaktivität in dem am Boden der Röhren verbliebenen Fällungsprodukt gemessen. Um die Corticosteron-Konzentration in den Proben zu ermitteln wurde mit Hilfe der mitgelieferten Kontrollen und Standards eine Aktivitäts-/Konzentrations-Kurve konstruiert, aus der sich zu jeder gemessenen Gammastrahlen-Aktivität einer Probe die korrespondierende Corticosteron-Konzentration ablesen ließ. Von jedem Tier wurden zwei Amnionflüssigkeit- bzw. Serum-Proben gemessen und der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet. Die theoretische Sensitivität des Assays betrug 7,7 ng/ml bei einem Intra-Assay-Variations-Koeffizienten von 7,1% und einem Inter-Assay-Variations-Koeffizienten von 7,2%.

### 3.3.5 *Bestimmung der Progesteron Konzentration in der Amnionflüssigkeit und im mütterlichen Serum mittels Radioimmunoassay*

Die Bestimmung der Progesteron Konzentration in der Amnionflüssigkeit und im mütterlichen Serum erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Radioimmunoassays (DSL-3900 ACTIVE, DSL Inc., Webster, Texas, USA). Das Assay funktionierte nach dem Prinzip der kompetitiven Bindung, wobei radioaktivmarkiertes ( $I^{125}$ ) Progesteron aus dem Test-Kit mit nicht markiertem Progesteron aus dem Serum, bzw. der Amnionflüssigkeit um eine gegebene Anzahl von Bindungsstellen konkurriert. Die Menge des radioaktivmarkierten ( $I^{125}$ ) Progesterons ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration unmarkierten Progesterons aus den Gewebeproben. Ebenfalls im Kit enthaltene Standards und Kontrollen dienten der Erstellung eines Konzentrationsdiagramms, aus dem die Progesteron Konzentration in der jeweiligen Probe abgeleitet werden konnte. Im ersten Schritt wurden jeweils 25  $\mu$ l Probe bzw. Standard/Kontrolle in die mit Progesteron-Antikörpern beschichteten Teströhren gegeben. Anschließend wurde unverzüglich 500  $\mu$ l Progesteron-Reagenz (mit  $I^{125}$  markiert) in jedes Röhren gefüllt und bei 37°Celsius im Wasserbad für 60 Minuten inkubiert. Nach verstreichen der Inkubationszeit wurden alle Röhren simultan in einen Behälter für radioaktiven Abfall dekantiert und auf einer saugfähigen Unterlage ausgeklopft. Zur Bestimmung der radioaktiven Aktivität kamen alle Teströhren anschließend für eine Minute in einen Gammazähler. Um die Progesteron-Konzentration in den Proben zu ermitteln wurde mit Hilfe der mitgelieferten Kontrollen und Standards eine Aktivitäts-/Konzentrations-Kurve konstruiert, aus der sich zu jeder gemessenen Gammastrahlen-Aktivität einer Probe die korrespondierende Progesteron-

Konzentration ablesen ließ. Von jedem Tier wurden zwei Amnionflüssigkeit- bzw. Serum-Proben gemessen und der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet. Die theoretische Sensitivität des Assays betrug 0,12 ng/ml bei einem Intra-Assay-Variations-Koeffizienten von 6% und einem Inter-Assay-Variations-Koeffizienten von 10%.

### 3.4 *Statistische Methoden*

Um die erhobenen Daten einer statistischen Analyse zugänglich zu machen wurde, sofern dies nötig war, nach jedem Experiment zunächst der Mittelwert der Ergebnisse für jedes einzelne Versuchstier gebildet. Nachdem durch diesen Schritt jeweils nur ein Wert pro gemessenem Parameter pro Tier errechnet wurde, wurden die Ergebnisse der Stressgruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests konnten die Daten als normalverteilt identifiziert werden. Daraus folgte, dass zur Überprüfung der Annahme, dass kein statistischer Unterschied zwischen den erhobenen Daten besteht, die statistische Signifikanz mittels T- Test für zwei unabhängige Stichproben ermittelt wurde. Die Wahrscheinlichkeit (P-Wert) für beobachtete Unterschiede wurde auf folgenden Niveaus ermittelt: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ . Die statistische Daten-Auswertung erfolgte mittels der Computerprogramme Microsoft Excel XP<sup>®</sup> und SPSS 15.0<sup>®</sup>.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Immunkompetente Zellen im Uterus

#### 4.1.1 $CD4^+$ Zellen im Uterus

Die mit monoklonalen Antikörpern gegen  $CD4$  behandelten Schnitte der Implantationstellen wiesen in beiden Verpaarungskombinationen  $CD4$  positive Zellen im Uterusgewebe auf (siehe Abb. 4).

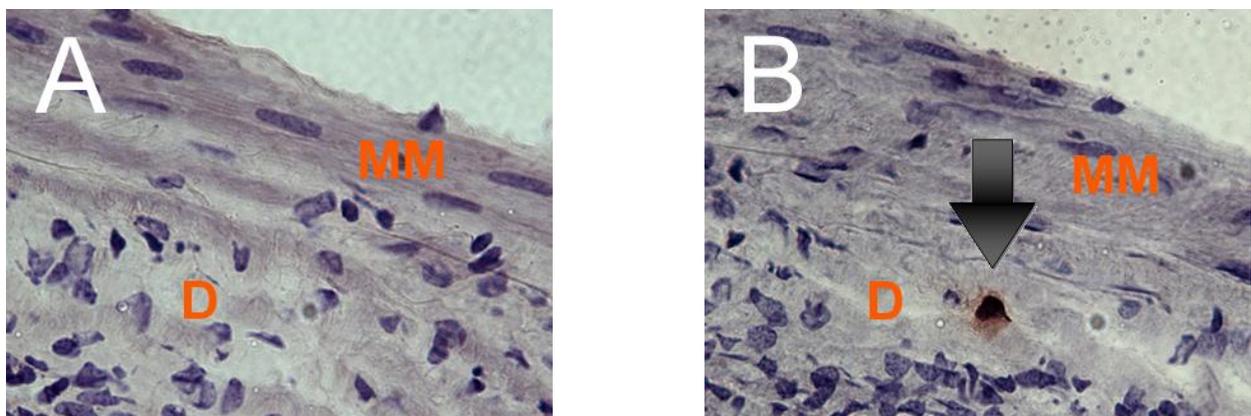


Abb. 4: (A) Repräsentativer Ausschnitt aus dem Uterus, negativ Kontrolle der  $CD4$  Färbung (B) Repräsentativer Ausschnitt aus dem Uterus, Versuchstier  $CD4$  Färbung. Auf dem Foto ist eine  $CD4^+$  Zelle am Übergang vom Myometrium (MM) zur Dezidua (D) zu erkennen (Pfeil).

Die durchflusszytometrische Analyse der aus dem Uterus der Versuchstiere gewonnenen Gewebeproben ergab hinsichtlich der Anzahl  $CD4^+$ ,  $CD4^+/CD25^+$  bzw.  $CD4^+/CD25^+/CD103^+$  Zellen sowohl bei den syngen als auch bei den allogenen verpaarten Tieren nahezu keine Unterschiede zwischen den Stressgruppen und den Kontrollgruppen (Siehe Tabelle 2). Lediglich war bei den allogenen verpaarten Tieren eine leicht erhöhte Zahl  $CD4$  positiver Zellen in der Stressgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe festzustellen (siehe Abb. 5). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

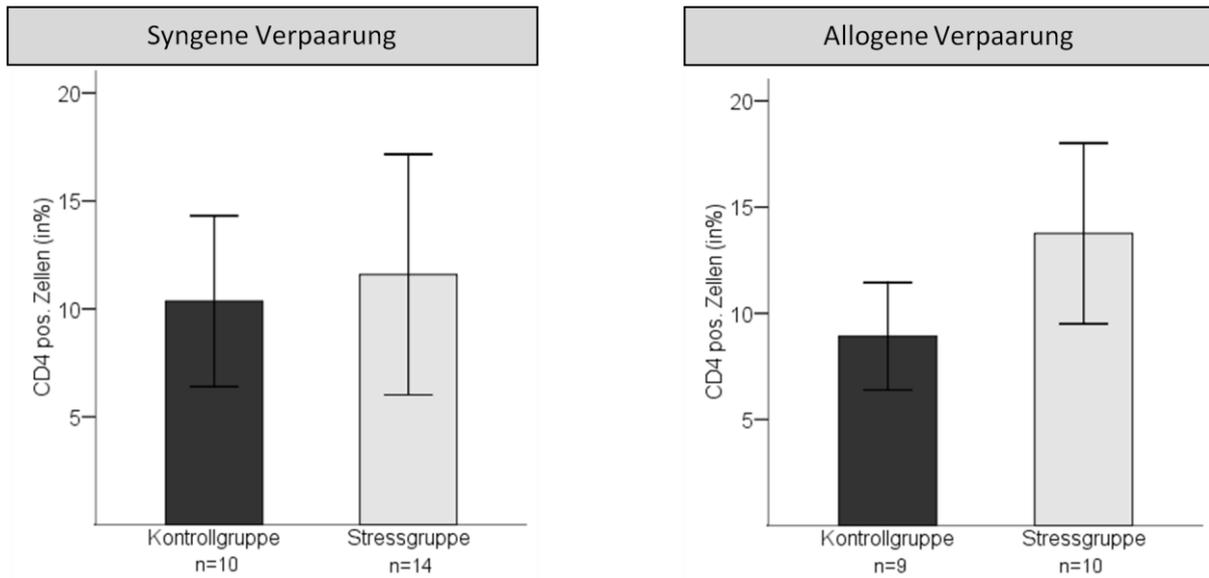


Abb. 5: Prozentualer Anteil der Leukozyten im Uterusgewebe, die an ihrer Oberfläche das CD4 Molekül exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination. Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.1.2 FoxP3<sup>+</sup> Zellen im Uterus

Der immunhistochemische Nachweis von Foxp3<sup>+</sup> Zellen mittels monoklonaler Antikörper gegen Foxp3 gelang sowohl im Uterusgewebe der Tiere der Stressgruppe als auch im Uterusgewebe der Kontrolltiere (siehe Abb. 6).

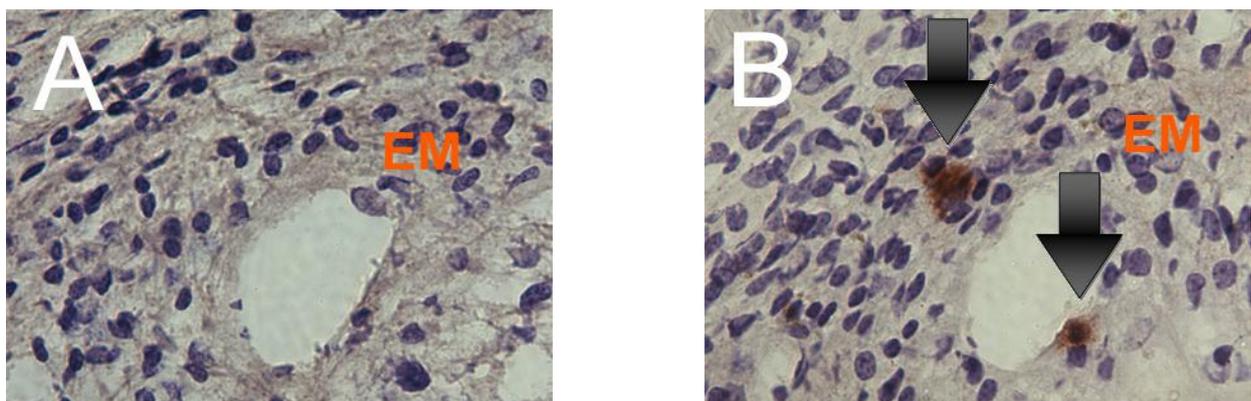


Abb. 6: (A) Repräsentativer Ausschnitt aus dem Uterus, negativ Kontrolle der FoxP3 Färbung (B) Repräsentativer Ausschnitt aus dem Uterus, Versuchstier FoxP3 Färbung. Auf dem Foto sind zwei FoxP3<sup>+</sup> Zellen in direkter Nachbarschaft zu einem Gefäß im Endometrium (EM) zu erkennen.

Die statistische Analyse ergab für die Tiere der Kontrollgruppe eine durchschnittliche Anzahl von  $3,5 \pm 1,4$  Foxp3<sup>+</sup> Zellen gegenüber  $6,5 \pm 1,4$  Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Gewebe der gestressten Tiere. Der gemessene Unterschied war jedoch nicht signifikant.

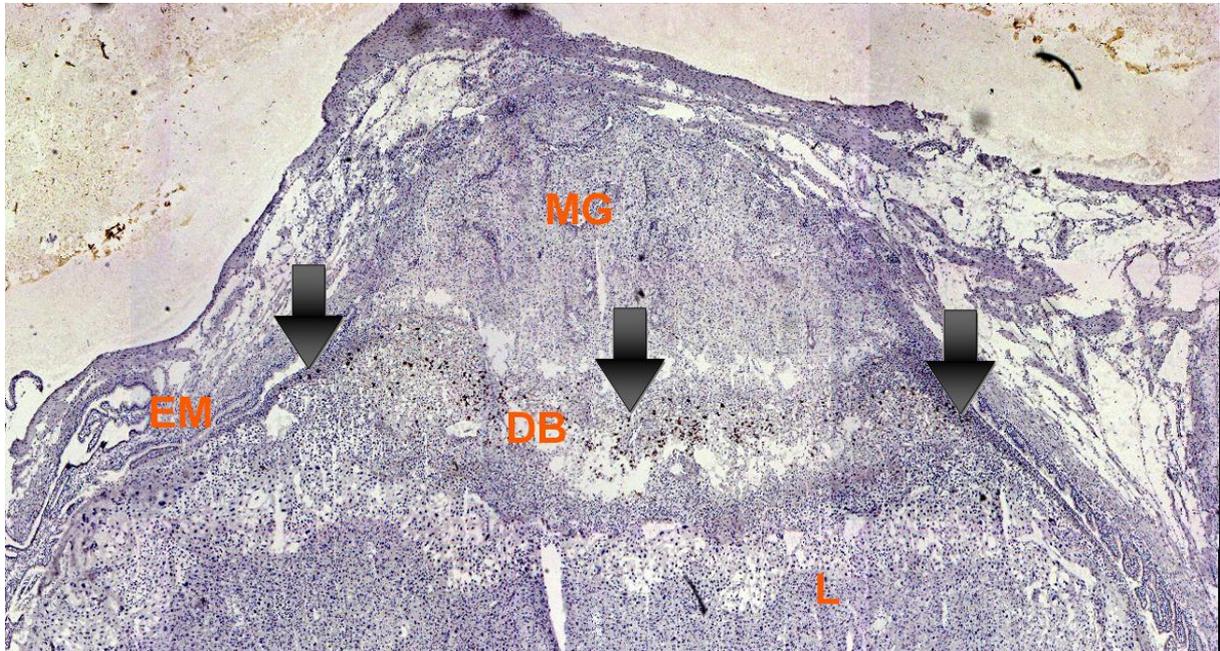


Abb.7: Repräsentative Totalaufnahme einer Implantationsstelle. Zu sehen (Pfeile) sind FoxP3<sup>+</sup> Zellen (DAB) im Bereich der Dezidua basalis(DB) und des lateralen Endometriums (EM). Labyrinth (L), Metrial Gland (MG).

#### Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Uteruszellen.

	syngen	allogen	CD4	CD4/ CD25	CD4/ CD25/ CD103	CD11c	CD11c/ CD54/C D80	CD49b	CD3/C D49b
Kontrolle	+	-	10,36 ± 1,98	1,32 ± 0,36	0,24 ± 0,06	18,15 ± 2,26	12,67 ± 1,7	16,95 ± 1,88	6,01 ± 1,97
Stress	+	-	11,59 ± 2,79	1,09 ± 0,35	0,27 ± 0,11	22,96 ± 1,98	15,17 ± 1,69	18,91 ± 1,26	7,55 ± 1,14
Kontrolle	-	+	8,92 ± 1,26	1,56 ± 0,29	0,45 ± 0,11	18,38 ± 3,41	14,21 ± 2,78	13,46 ± 1,55	6,84 ± 0,59
Stress	-	+	13,76 ± 2,13	1,23 ± 0,25	0,41 ± 0,05	18,15 ± 3,46	12,6 ± 2,72	18,77 ± 2,15	11,9 ± 1,6

Tabelle 2: Angegeben ist jeweils der Mittelwert (± Standardfehler des Mittelwerts) des prozentualen Anteils der positiven Zellen in den jeweiligen Gruppen beider Verpaarungskombinationen.

#### 4.1.3 *CD11c<sup>+</sup> Zellen im Uterus*

In den mit monoklonalen Antikörpern gegen CD11c behandelten Schnitten der Implantationstellen konnten sowohl bei den syngen als auch bei den allogenen verpaarten Tieren CD11c<sup>+</sup> Zellen im Uterusgewebe nachgewiesen werden (Siehe Abb. 8).

Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD11c<sup>+</sup> Zellen und der CD11c<sup>+</sup>/CD54<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> Zellen ergab, hinsichtlich ihrer Anzahl, keine Unterschiede zwischen den Stressgruppen und den Kontrollgruppen. Sowohl in der syngeneten Verpaarungskombination als auch in der allogenen Verpaarungskombination war die Zahl der CD11c<sup>+</sup> Zellen und der CD11c<sup>+</sup>/CD54<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> Zellen bei beiden Gruppen nahezu gleich (Siehe Tabelle 2).

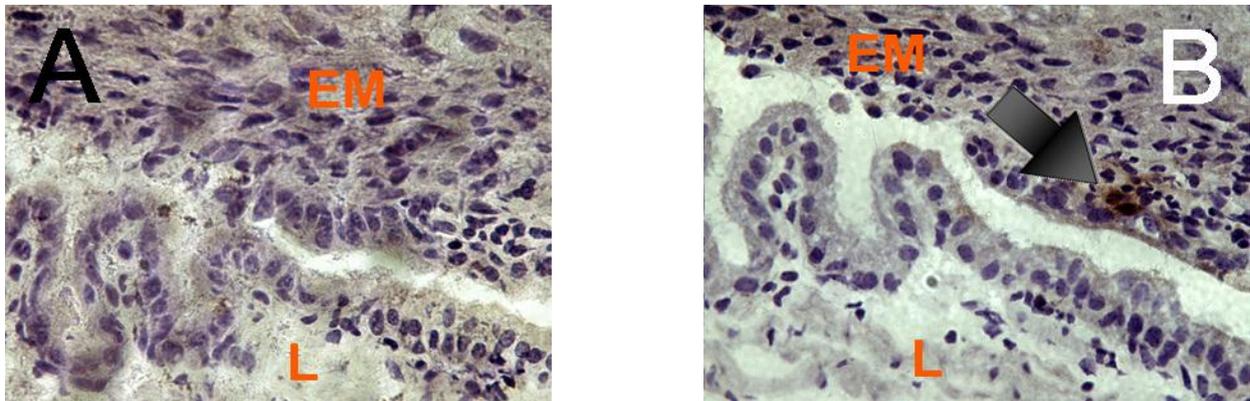


Abb. 8: (A) Repräsentativer Ausschnitt aus dem Uterus, negativ Kontrolle der CD11c Färbung (B) Repräsentativer Ausschnitt aus dem Uterus, Versuchstier CD11c Färbung. Auf dem Foto sind zwei CD11c<sup>+</sup> Zellen am Übergang vom Endometrium (EM) zum Labyrinth (L) zu erkennen (Pfeil).

#### 4.1.4 *CD54<sup>+</sup> Zellen im Uterus*

Die semiquantitative Analyse der CD54 Expression in der Dezidua ergab sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Stressgruppe durchschnittlich ein starkes Signal (+2) (siehe Abb. 9).

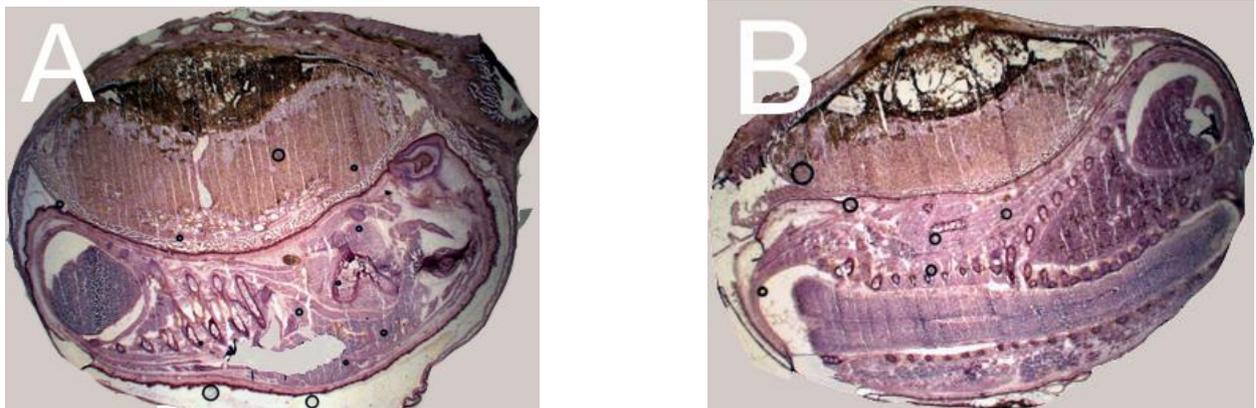


Abb. 9: (A) Repräsentativer Anschnitt einer Implantationsstelle mit Uterus, Dezidua und Fötus CD54 Färbung, Kontrollgruppe (B) Repräsentativer Anschnitt einer Implantationsstelle mit Uterus, Dezidua und Fötus CD54 Färbung, Stressgruppe.

#### 4.1.5 *CD49b<sup>+</sup> Zellen im Uterus*

In den mit monoklonalen Antikörpern gegen CD49b behandelten Schnitten der Implantationstellen fanden sich in beiden Gruppen CD49b<sup>+</sup> Zellen.

Die Analyse der CD49b<sup>+</sup> Zellen mittels Durchflusszytometrie ergab keine durch Stressbehandlung hervorgerufenen signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Anzahl im untersuchten Uterusgewebe (Siehe Tabelle 2).

Hingegen ergab die Untersuchung der CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> Zellen, dass ihre Anzahl in der Stressgruppe höher als in der Kontrollgruppe war. Der Unterschied war bei den syngen verpaarten Tieren nicht signifikant, in der allogenen Verpaarungskombination war der Unterschied hingegen signifikant (Siehe Abb. 10).

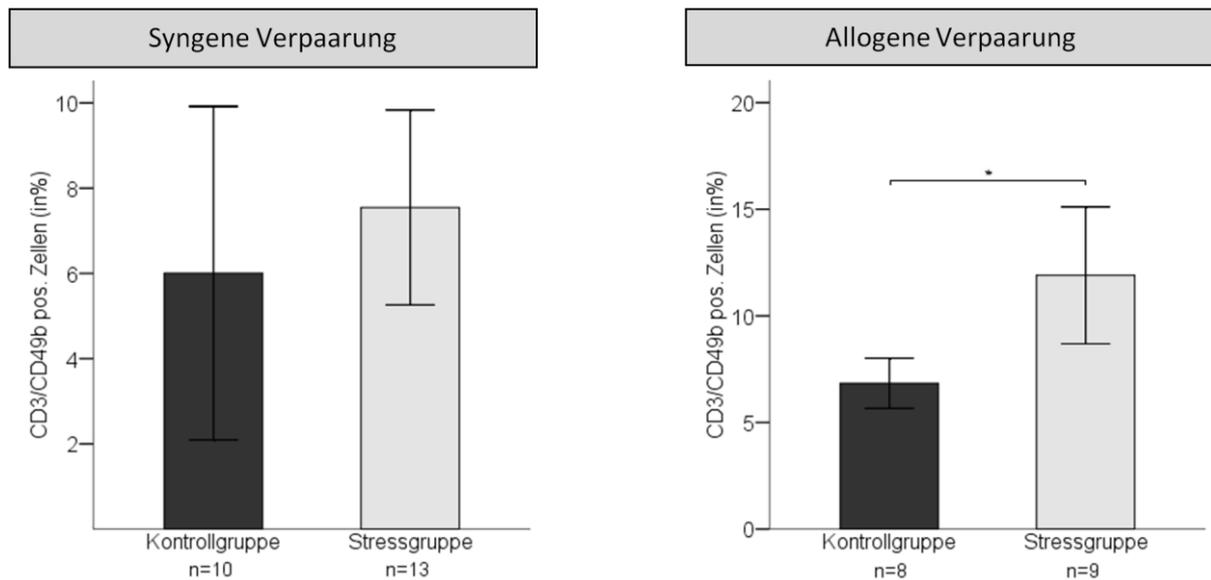


Abb. 10: Prozentualer Anteil der Leukozyten im Uterus, die an ihrer Oberfläche CD49b zusammen mit CD3 exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination. Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

## 4.2 Immunkzellen in den inguinalen Lymphknoten

### 4.2.1 CD4<sup>+</sup> Zellen in den inguinalen Lymphknoten

Die durchflusszytometrische Analyse der aus den inguinalen Lymphknoten der Versuchstiere gewonnenen Gewebeproben ergab hinsichtlich der Zahl CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup> Zellen sowohl bei den syngen als auch bei den allogenen verpaarten Tieren nahezu keinen Unterschied zwischen der Stressgruppe und der Kontrollgruppe (Siehe Tabelle 3).

### 4.2.2 CD11c<sup>+</sup> Zellen in den inguinalen Lymphknoten

Es konnte mittels Durchflusszytometrie eine Abnahme von CD11c<sup>+</sup> Zellen im Lymphknotengewebe der Tiere der Stressgruppe, verglichen mit den Kontrolltieren, festgestellt werden. Diese Tendenz ließ sich sowohl bei den syngen verpaarten Tieren als auch bei den allogenen verpaarten Tieren beobachten (siehe Abb. 11). Der Unterschied war jedoch in beiden Versuchen nicht signifikant.

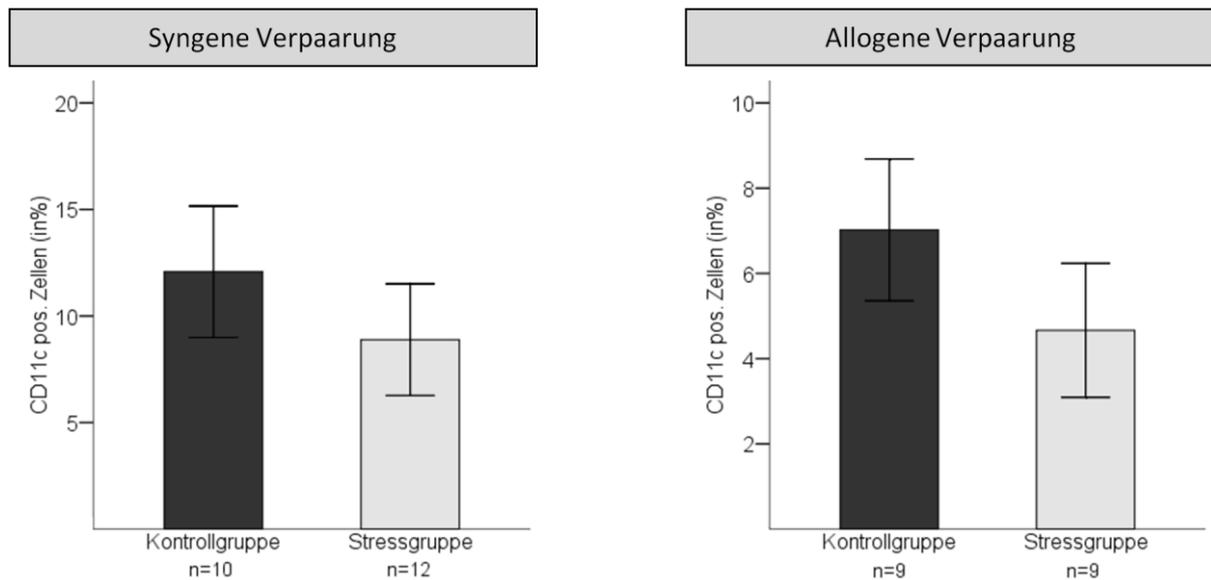


Abb. 11: Prozentualer Anteil der Leukozyten aus den inguinalen Lymphknoten, die an ihrer Oberfläche das CD11c Molekül exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination. Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

#### Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphknotenzellen.

	syngen	allogen	CD4	CD4/ CD25	CD4/ CD25/ CD103	CD11c	CD11c/ CD54/ CD80
Kontrolle	+	-	47,2 $\pm 5,41$	0,95 $\pm 0,14$	0,69 $\pm 0,1$	12,08 $\pm 1,54$	1,49 $\pm 0,31$
Stress	+	-	52,99 $\pm 2,98$	1,24 $\pm 0,11$	0,91 $\pm 0,06$	8,89 $\pm 1,31$	1,48 $\pm 0,24$
Kontrolle	-	+	73,48 $\pm 3,47$	1,44 $\pm 0,17$	1,11 $\pm 0,16$	7,0 $\pm 0,83$	1,37 $\pm 0,31$
Stress	-	+	71,6 $\pm 3,05$	1,37 $\pm 0,13$	0,93 $\pm 0,07$	4,66 $\pm 0,79$	1,46 $\pm 0,76$

Tabelle 3: Angegeben ist jeweils der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts) des prozentualen Anteils der positiven Zellen in den jeweiligen Gruppen beider Verpaarungskombinationen.

Die Anzahl der CD11c<sup>+</sup>/CD54<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> Zellen war sowohl in der syngenen als auch in der allogenen Verpaarungskombination bei der Stressgruppe und der Kontrollgruppe ähnlich hoch (Siehe Tabelle 3).

### 4.3 Immunzellen im Blut

#### 4.3.1 CD49b<sup>+</sup> Zellen im Blut

Die durchflusszytometrische Analyse der Blutproben ergab eine höhere Anzahl CD49b<sup>+</sup> Zellen bei den Tieren, die der Stress-Exposition ausgesetzt wurden, verglichen mit den Kontrolltieren.

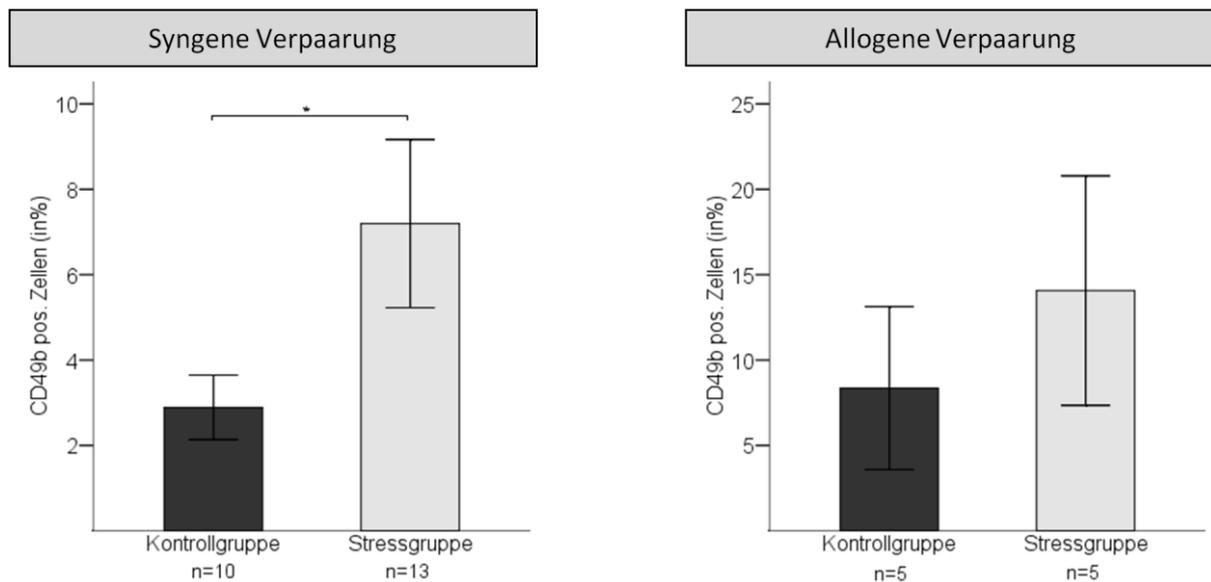


Abb. 12: Prozentualer Anteil der Leukozyten im Blut, die an ihrer Oberfläche das CD49b Molekül exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination; Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

Bei den syngen verpaarten Tieren war der Unterschied signifikant, bei den allogenen verpaarten Tieren war der Unterschied lediglich tendenziell (Siehe Abb. 12).

Auch die Untersuchung der CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> Zellen ergab eine höhere Zahl bei den Tieren der Stressgruppe verglichen mit den Kontrolltieren. In der syngenen Verpaarungskombination war die Anzahl an CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> Zellen in der Stressgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied in der allogenen Verpaarungskombination erreichte hingegen kein signifikantes Niveau (Siehe Abb. 13).

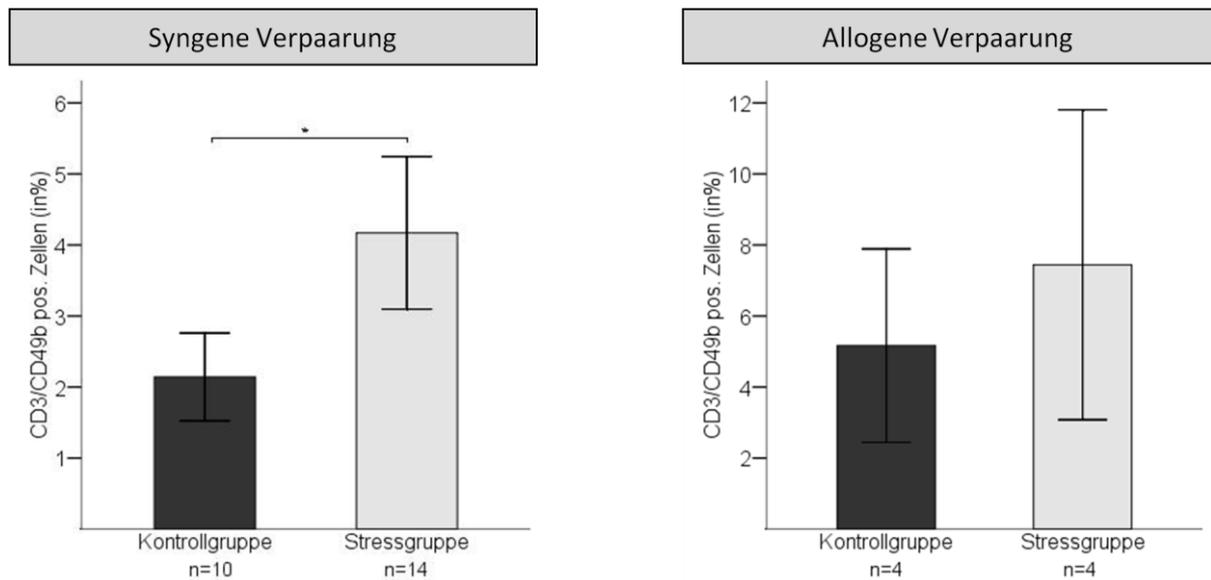


Abb. 13: Prozentualer Anteil der Leukozyten im Blut, die an ihrer Oberfläche CD49b zusammen mit CD3 exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination. Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.3.2 CCR5<sup>+</sup> Zellen im Blut

Die Untersuchung der CCR5<sup>+</sup> Zellen ergab in der syngenen Verpaarungskombination eine signifikant geringere Anzahl CCR5<sup>+</sup> Zellen bei den Tieren der Stressgruppe verglichen mit den nicht gestressten Tieren.

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Blutzellen.

	syngen	allogen	CD49b	CD3/ CD49b	CCR5	CCR7
Kontrolle	+	-	2,89 $\pm 0,38$	2,14 $\pm 0,31$	66,33 $\pm 2,44$	80,42 $\pm 1,82$
Stress	+	-	7,2 $\pm 0,98$	4,17 $\pm 0,54$	50,72 $\pm 3,95$	62,09 $\pm 6,09$
Kontrolle	-	+	8,36 $\pm 2,39$	5,16 $\pm 1,36$	19,44 $\pm 2,24$	28,47 $\pm 7,3$
Stress	-	+	14,07 $\pm 3,36$	7,44 $\pm 2,18$	19,33 $\pm 2,81$	31,85 $\pm 7,51$

Tabelle 4: Angegeben ist jeweils der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts) des prozentualen Anteils der positiven Zellen in den jeweiligen Gruppen beider Verpaarungskombinationen.

Bei den allogenen verpaarten Tieren konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden (Siehe Abb. 14).

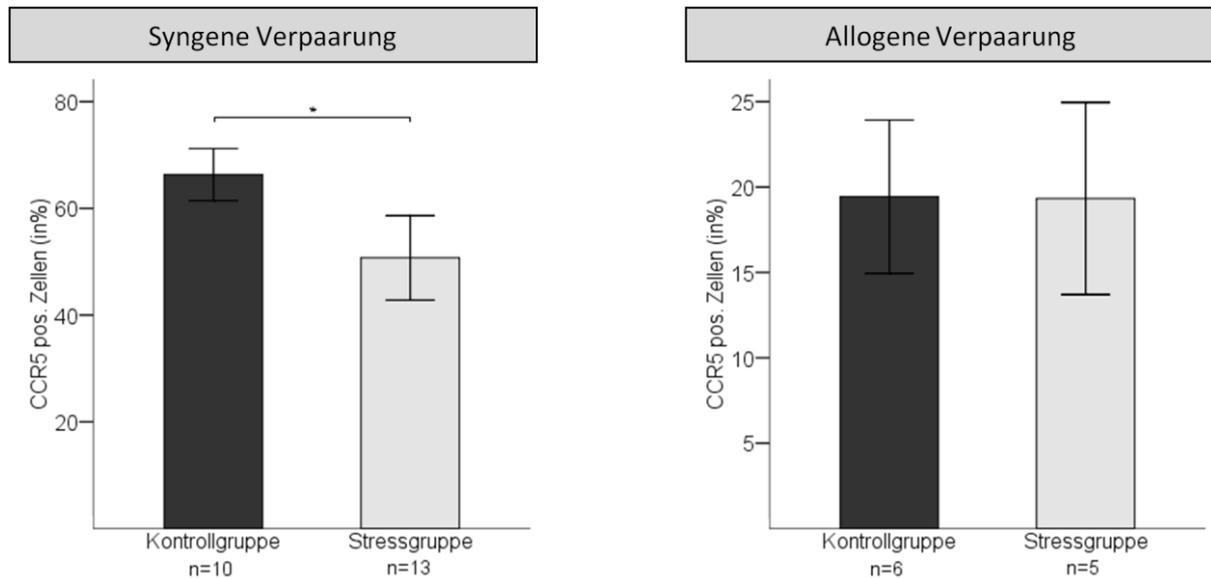


Abb. 14: Prozentualer Anteil der Leukozyten aus dem Blut, die an ihrer Oberfläche das CCR5 Molekül exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination. Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.3.3 CCR7<sup>+</sup> Zellen im Blut

Die durchflusszytometrische Analyse der CCR7<sup>+</sup> Zellen ergab (siehe Abb. 15) in der syngenen Verpaarungskombination eine signifikant kleinere Zahl CCR7 positiver Zellen in der Stressgruppe als in der Kontrollgruppe. Bei den allogenen verpaarten Tieren konnte kein Unterschied, bezogen auf CCR7<sup>+</sup> Zellen, zwischen beiden Gruppen beobachtet werden.

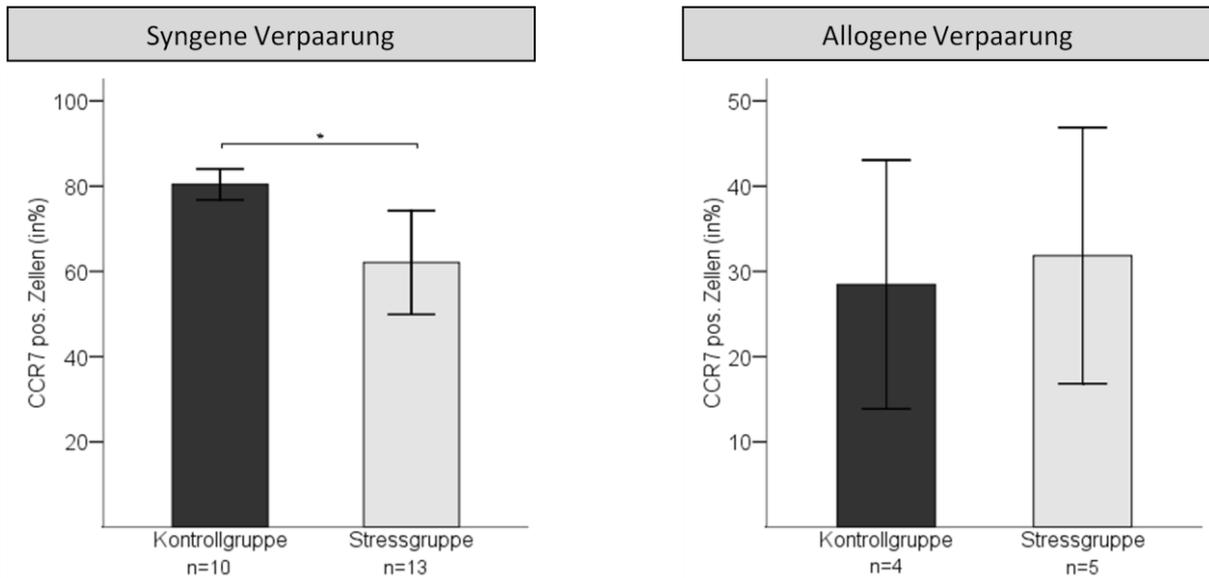


Abb. 15: Prozentualer Anteil der Leukozyten aus dem Blut, die an ihrer Oberfläche das CCR7 Molekül exprimieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: syngene Verpaarungskombination. Rechts: allogene Verpaarungskombination. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.4 Expression CRH mRNS<sup>+</sup> Zellen im mütterlichen Gehirn

##### 4.4.1 Expression CRH mRNS<sup>+</sup> Zellen im Nucleus paraventricularis

Die Analyse der CRH mRNS Expression im PVN des Hypothalamus mittels In situ Hybridisierung ergab eine annähernd gleiche Anzahl von CRH mRNS<sup>+</sup> Zellen im PVN bei den Tieren der Stressgruppe und denen der Kontrollgruppe (Abb. 17).

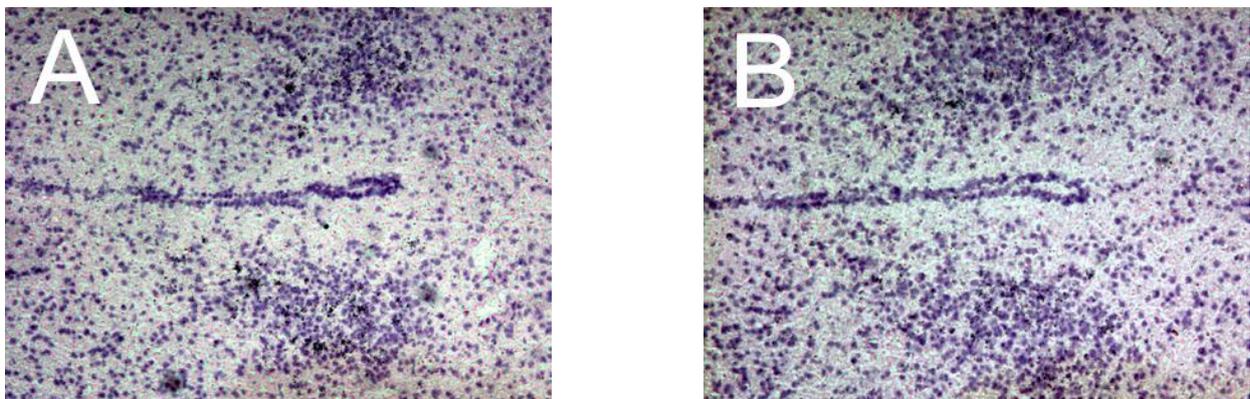


Abb. 16: (A) Repräsentativer Ausschnitt eines Dünnschnitts durch das Gehirn eines Versuchstiers mit angeschnittenem dritten Ventrikel samt bilateralem PVN. Mittels ISH sichtbar gemachte CRH mRNS (dunkle Silbergranula); Kontrollgruppe. (B) Repräsentativer Ausschnitt eines Dünnschnitts durch das Gehirn eines Versuchstiers mit angeschnittenem dritten Ventrikel samt bilateralem PVN. Mittels ISH sichtbar gemachte CRH mRNS (dunkle Silbergranula); Stressgruppe.

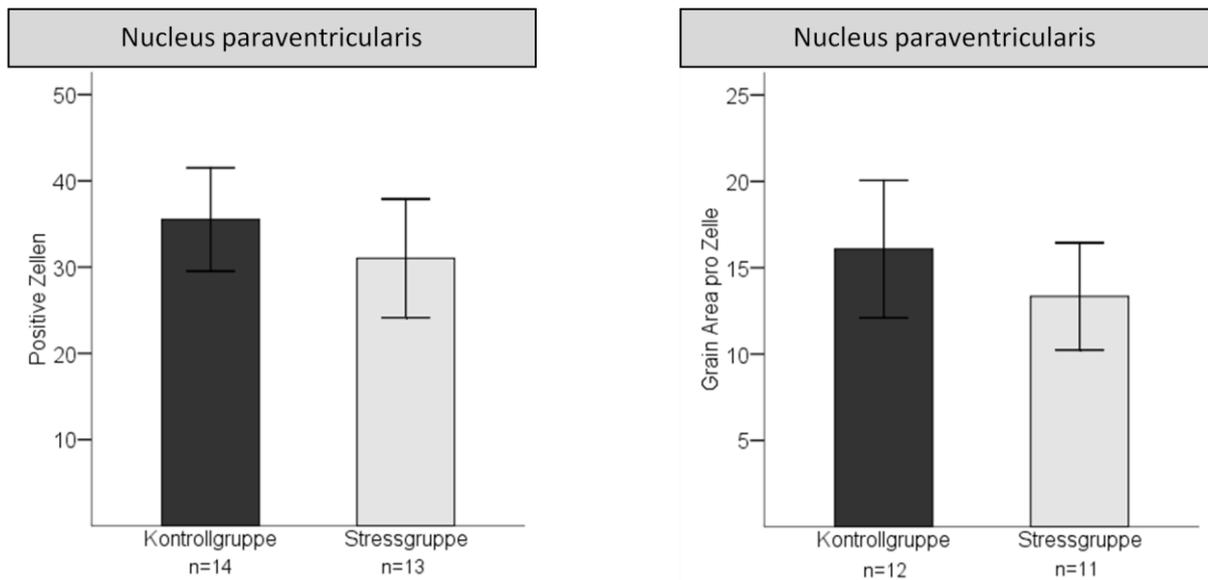


Abb. 17: CRH mRNA Expression im PVN. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: Anzahl CRH mRNA<sup>+</sup> Zellen. Rechts: Durch Silbergranula bedeckte Fläche innerhalb einer positiven Zelle. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

Zu dem gleichen Ergebnis kommt die vergleichende Analyse der Fläche, welche innerhalb einer positiven Zelle mit Silbergranula bedeckt ist. Auch bezogen auf diesen Parameter war kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Stressgruppe festzustellen (siehe Abb. 17).

#### 4.4.2 Expression CRH mRNS<sup>+</sup> Zellen in der Amygdala

Die Untersuchung der zentralen Anteile der Amygdala auf die Expression von CRH mRNS hin ergab keinen Unterschied bezüglich der Anzahl positiver Zellen zwischen der Stressgruppe und der Kontrollgruppe.

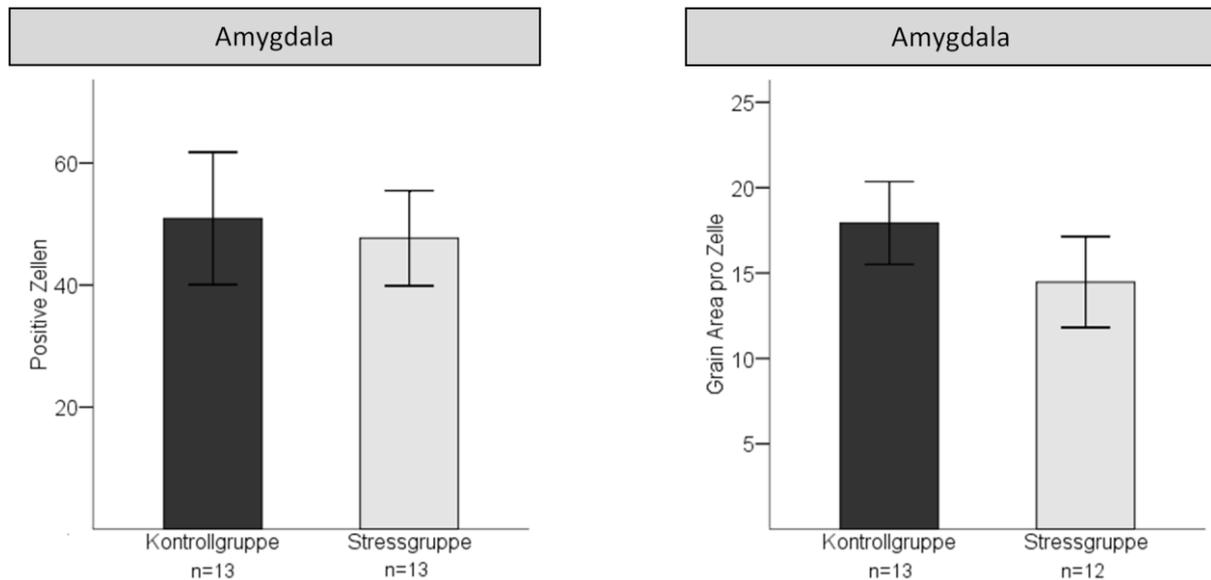


Abb. 18: CRH mRNS Expression in der Amygdala. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: Anzahl Positiver Zellen. Rechts: Durch Silbergranula bedeckte Fläche innerhalb einer positiven Zelle. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

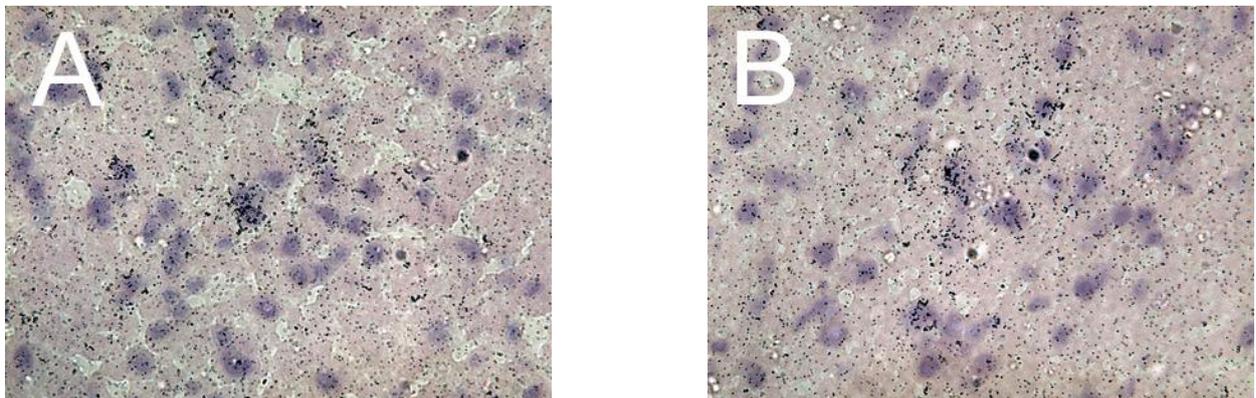


Abb. 19: Repräsentativer Ausschnitt eines Dünnschnitts durch das Gehirn eines Versuchstiers mit angeschnittener Amygdala. Mittels ISH sichtbar gemachte CRH mRNS (dunkle Silbergranula); (A) Kontrollgruppe. (B) Stressgruppe.

Allerdings war die durchschnittliche Fläche, welche innerhalb einer positiven Zelle mit Silbergranula bedeckt ist, in der Stressgruppe kleiner als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied in der pro positiver Zelle durch die Silbergranula eingenommenen Fläche erreichte jedoch kein signifikantes Niveau (siehe Abb. 18).

#### 4.5 Corticosteron-Konzentration im mütterlichen Serum und in der Amnionflüssigkeit

Die Untersuchung der Corticosteron-Konzentration im Serum und in der Amnionflüssigkeit mittels Radioimmunoassay zeigte keine Unterschiede zwischen der Stressgruppe und der Kontrollgruppe (siehe Abb. 20)

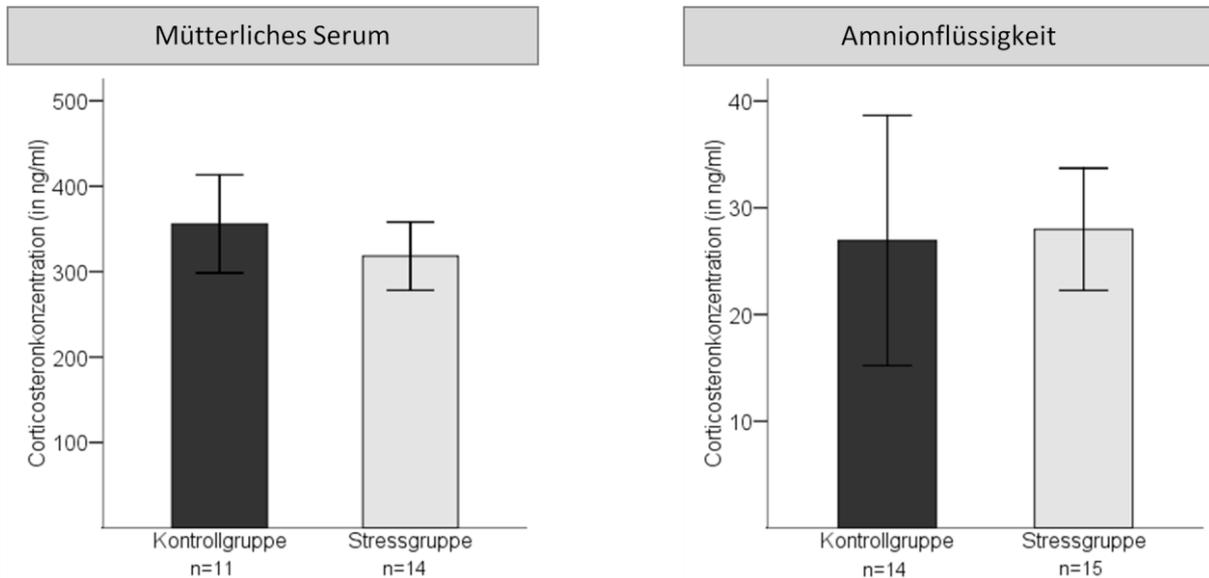


Abb. 20: Corticosteron-Konzentration in ng/ml. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: Konzentration im mütterlichen Serum. Rechts: Konzentration in der Amnionflüssigkeit. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

#### 4.6 Progesteron-Konzentration im mütterlichen Serum und in der Amnionflüssigkeit

Die Bestimmung der Progesteron-Konzentration im mütterlichen Serum und in der Amnionflüssigkeit mittels Radioimmunoassay ergab bei den Tieren, die dem Geräuschstressor ausgesetzt waren, eine geringere Progesteron-Konzentration verglichen mit den Kontrolltieren. Im Serum war der Unterschied signifikant, in der Amnionflüssigkeit wurde hingegen kein signifikantes Niveau erreicht (siehe Abb. 21).

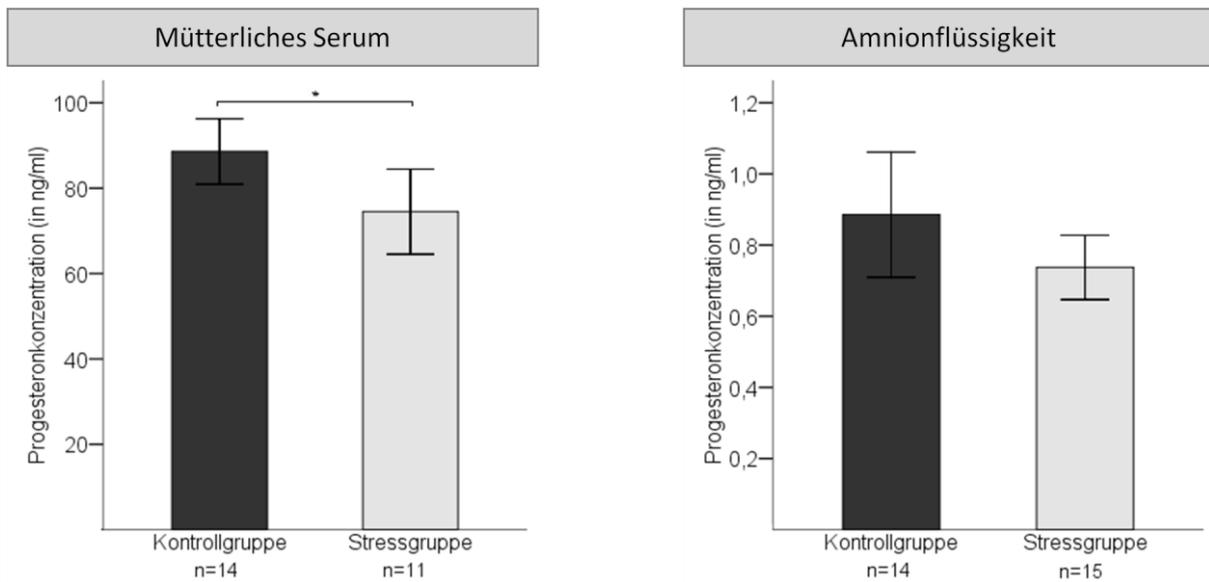


Abb. 21: Progesteron-Konzentration in ng/ml. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts). Links: Konzentration im mütterlichen Serum. Rechts: Konzentration in der Amnionflüssigkeit. Die statistische Signifikanz wurde über den T-Test für zwei unabhängige Stichproben bestimmt (\* $P < 0,05$ ).

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das immunologische Gleichgewicht trächtiger Mäuse durch eine Schall-Stress-Exposition in der späten Schwangerschaft beeinflusst wird.

Die durchflusszytometrische Analyse des Uterusgewebes der trächtigen Tiere ergab allerdings lediglich bei der allogenen Verpaarungskombination eine signifikant höhere Zahl von CD49b<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> NKT-Zellen (eine Übersicht über NKT-Zellmarker findet sich bei Godfrey *et al.*, 2004) bei den Tieren der Stressgruppe verglichen mit den Kontrolltieren. Die Untersuchungen der übrigen Zellpopulationen im Uterusgewebe (Th-Zellen, Treg-Zellen, DC und NK-Zellen) zeigten hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Stressgruppen und den Kontrollgruppen.

Im Blut der trächtigen Tiere konnte, bezogen auf die untersuchten Marker für NK- (CD49b) und NKT-Zellen (CD3/CD49b), eine höhere Anzahl positiver Zellen bei den Tieren der Stressgruppen, verglichen mit den Kontrollgruppen, nachgewiesen werden. Bei einer gleichzeitig verringerten Zahl von CCR5<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> Leukozyten im Blut der stressexponierten Tiere. Allerdings waren die Unterschiede nur jeweils in der syngenen Verpaarungskombination signifikant, im Blut der allogenen verpaarten Tieren konnten nur entsprechende Trends bei den NK- und NKT-Zellen beobachtet werden. Die Analyse des Gewebes der inguinalen Lymphknoten zeigte darüber hinaus keine statistischen Unterschiede in der Anzahl der untersuchten Zellpopulationen (Th-Zellen, Treg-Zellen und DC) zwischen den Stressgruppen und den Kontrollgruppen.

Die oben genannten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Gruppe der NK- und NKT-Zellen eine wichtige Rolle im Rahmen der immunologischen Reaktion auf eine Stress-Exposition in der späten Schwangerschaft einnimmt.

Obwohl nicht in jedem untersuchten Gewebe und nicht in beiden Verpaarungskombinationen eine signifikant höhere Zahl von NK- und NKT-Zellen gemessen werden konnte, konnte doch zumindest eine tendenziell höhere Zahl nach Stress-Exposition bei beiden Verpaarungskombinationen sowohl im Uterus als auch im Blut beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine durch die Stress-Exposition bewirkte systemische Mobilisierung von NK- und NKT-Zellen in Richtung der Peripherie. Und tatsächlich, obwohl noch nicht restlos aufgeklärt, gibt es deutliche Anzeichen dafür, dass sich uNK-Zellen im Uterus nicht aus sich selbst heraus vermehren, sondern vielmehr aus anderen Geweben in den Uterus einwandern

und dort unter gewebespezifischen Bedingungen phänotypisch modifizieren (Chantakru *et al.*, 2002).

Bei den Th-Zellen konnte keine solche Veränderung in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Doch diese Feststellung hat nur einen bedingten Aussagewert, da sie das Verhältnis der einzelnen Subgruppen der CD4<sup>+</sup> Zellen zueinander unberücksichtigt lässt. Die gängigste Einteilung der Subgruppen erfolgt dabei an Hand ihres Zytokinprofils. CD4<sup>+</sup> Zellen des Th1 Phänotyps produzieren in der Hauptsache solche Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12), die im Rahmen der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen eine Rolle spielen, wohingegen die Zellen des Th2-Typs Zytokine produzieren, die an der von B-Zellen getragenen humoralen Immunantwort beteiligt sind (z.B. IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ). An Hand der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten lässt sich keine Aussage machen bezüglich des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup> Zellen, die überwiegend Th1-Zytokine produzieren, zu denen, die überwiegend Th2-Zytokine produzieren. Da sich das Verhältnis der von CD4<sup>+</sup> Zellen sezernierten Zytokine entscheidend auf den Verlauf einer Schwangerschaft auswirkt ist es wichtig festzuhalten, dass die alleinige Beobachtung einer unveränderten Zahl von CD4<sup>+</sup> Zellen nach Stress-Exposition nicht gleichzusetzen ist mit einem unveränderten Zytokinmilieu an der fetomaternalen Schnittstelle.

Die im Zusammenhang mit den Th-Zellen genannte Limitierung gilt in ähnlicher Weise auch für die Ergebnisse bezüglich der DC und bedingt für Treg-Zellen. Der Umstand einer unveränderten Zahl von DC und Treg-Zellen nach Stress-Exposition ist nicht gleichzusetzen mit einem unveränderten Funktionszustand der genannten Zellen. An diesem Punkt wären weiterführende Untersuchungen mittels Zellkultur und Zytokin-Assay von Nöten um genauere Aussagen treffen zu können.

Auch wenn die quantitative Analyse der mittels immunhistochemischer Färbung identifizierten Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Uterus keinen Unterschied zwischen den Tieren der Stressgruppe und den Kontrolltieren ergeben hat, konnte dennoch erstmalig die örtliche Lokalisierung von Foxp3<sup>+</sup> Zellen im Uterus der späten Schwangerschaft bei der Maus gezeigt werden. Wie auf Abb. 9 gut zu erkennen, finden sich die FoxP3 positiven Zellen entlang der Grenze zwischen Dezidua und Plazenta und im Bereich des lateralen Endometriums perlschnurartig angeordnet.

Einen gewissen Einblick in die veränderte Dynamik der Adaptation des maternalen Immunsystems an die Schwangerschaft in Folge der Stress-Exposition erlauben jedoch die Untersuchungen über die CCR5<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> Leukozyten im Blut der Versuchstiere.

Da die Expression von CCR5 vornehmlich auf TH1-Zellen beschrieben werden konnte (Annunziato *et al.*, 1999), ist eine niedrigere Zahl von CCR5<sup>+</sup> Zellen im Blut ein Hinweis für die relative Abnahme von Th1 Zellen im Blut der gestressten Tiere. Innerhalb der Leukozytenpopulation wird CCR7 hauptsächlich von T-Zellen und DC exprimiert, auf DC steigt die Expression von CCR7 nach Aktivierung allerdings nachweislich an (Ohl *et al.*, 2004, Dambrosio *et al.*, 2000). Eine niedrigere Zahl von CCR7<sup>+</sup> Zellen im Blut der Stressgruppen legt demnach eine verminderte Migration von DC und Lymphozyten zwischen der Peripherie und den sekundären lymphatischen Geweben nahe.

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass das oberste Regelsystem der HPA-Achse durch eine Schallstress-Behandlung in der späten Schwangerschaft beeinflusst wird. Die beobachtete Abnahme der CRH mRNA Expression im PVN des Hypothalamus und in der Amygdala war nicht signifikant. Demnach liefert die Analyse mittels In situ Hybridisierung keine Anhaltspunkte für eine Beeinflussung der HPA-Achse auf der Ebene des ZNS durch Stress in der späten Schwangerschaft.

Dieses Ergebnis ist vereinbar mit Ergebnissen früherer Arbeiten, in denen bei Ratten in der späten Schwangerschaft eine verminderte Ansprechempfindlichkeit der gesamten HPA-Achse gegenüber Stress beobachtet wurde (Johnstone *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass dieses Phänomen den Fötus vor einem übermäßigen Einwirken von erhöhten Glukokortikoid-Konzentrationen schützen könnte (Neumann *et al.*, 1998, McCormick *et al.*, 1995). Als Erklärung für die verminderte Ansprechempfindlichkeit der HPA Achse könnte eine verminderte Produktion der CRH mRNA<sup>+</sup> Zellen im PVN des Hypothalamus verantwortlich sein. Bei der Ratte konnte diese verminderte Produktion in der späten Schwangerschaft sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter der Einwirkung von Stress beobachtet werden (Russell *et al.*, 2000, Brunton *et al.*, 2000). Ähnliche Ergebnisse liegen auch für die Maus vor. So konnten Douglas *et al.* zeigen, dass schwangere Mäuse in der späten Schwangerschaft keinen Anstieg der Plasma ACTH- und Corticosteron-Konzentration nach Stress-Exposition aufwiesen (Douglas *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eindeutig einen Einfluss auf die Serumkonzentration des bedeutendsten Schwangerschaftshormons, Progesteron, durch eine Schallstressexposition in der späten Schwangerschaft. Die im Serum der trächtigen Tiere beobachtete signifikante Abnahme von Progesteron in Folge der

Stress-Exposition, konnte auch in der Amnionflüssigkeit beobachtet werden. Der Unterschied zwischen Stressgruppe und Kontrollgruppe erreichte hier jedoch kein signifikantes Niveau. Einen Einfluss auf die Konzentration des wichtigsten Stresshormons, Corticosteron, durch die Schall-Stress-Exposition in der späten Schwangerschaft konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, weder im Serum der trächtigen Tiere noch in der Amnionflüssigkeit. Die Tatsache, dass sich die Schall-Stress-Exposition nicht auf die Konzentration von Corticosteron auswirkt, wird ihre Ursachen in den selben Mechanismen haben, die schon in Bezug auf die CRH mRNA Expression im PVN und der Amygdala erwähnt worden sind. Die bei verschiedenen Spezies beobachtete verminderte Ansprechempfindlichkeit der HPA Achse während der Schwangerschaft wäre eine hinreichende Erklärung dafür. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der Serumkonzentration von Progesteron steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Untersuchungen, die ebenfalls eine Abnahme von Progesteron im Serum von gestressten Tieren nachgewiesen haben (Wiebold *et al.*, 1986, Joachim *et al.*, 2003). Im Unterschied zu den bisherigen Untersuchungen, die alle in der frühen Schwangerschaft durchgeführt worden sind, konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass eine Schallstress-Exposition in der späten Schwangerschaft bei der Maus zu einer erniedrigten Progesteron-Konzentration im Serum der trächtigen Tiere führt ohne durch einen gleichzeitigen Anstieg der Corticosteron Konzentration im Serum begleitet zu sein. Der Gedanke liegt also nahe, dass nicht allein die inhibierende Wirkung einer aktivierten HPA-Achse auf die Progesteron Produktion für einen stressbedingten Abfall der Progesteron-Konzentration verantwortlich zu machen ist.

Im Tierreich gibt es eindrucksvolle Beispiele dafür, wie sich exogene Einflüsse während der Embryonal-, bzw. Fetalperiode auf die Individuen einer Spezies auswirken (Bateson, 2001). So haben Schildkröten und andere Reptilien zu Beginn ihrer Entwicklung noch die Kapazität sich entweder in ein weibliches oder ein männliches Individuum zu entwickeln. Die Entscheidung für ein definitives Geschlecht hängt von der Umgebungstemperatur während des mittleren Drittels der Embryonalperiode ab. In Schildkröteneiern, die sich bei einer Temperatur von unter 30° Celsius entwickeln, entstehen männliche Individuen, liegt die Temperatur durchschnittlich darüber, entschlüpfen den Eiern weibliche Schildkröten (Bull, 1980). Dies ist ein Beispiel dafür, dass ein einzelner Einfluss ein ganzes Entwicklungsprogramm in einem Organismus

ablaufen lassen kann. Allerdings ist hierbei nicht gesichert, in wie fern die Anpassung der Geschlechtsausprägung an die Umgebungstemperatur einen Vorteil für das Überleben der Art darstellt.

Bei einem anderen Beispiel liegt dies deutlicher auf der Hand: bei Daphnien, einer Gattung von Krebstieren, konnte gezeigt werden, dass die Nachkommen von Müttern, die dem Einfluss von Kairomonen (Duftstoffe, die Organismen die Anwesenheit von Feinden anzeigen) ausgesetzt waren, eine Art „Helm“ ausbildeten, der sie vor ihren Fraßfeinden schützen konnte (Tollrian, 1994).

Dabei liegt die Interpretation nahe, dass der mütterliche Organismus als eine Art Sensor fungiert und abhängig von den herrschenden Umweltbedingungen (Fraßfeinde, Nahrungsangebot, klimatische Bedingungen) in den Nachkommen bestimmte Entwicklungsprogramme initiiert oder andere unterbindet um ihnen möglichst optimal angepasste Startbedingungen zu ermöglichen. Folgt man dieser Interpretationsweise, so könnte man die Beobachtung, dass sich ein mangelhafter physischer Zustand einer Schwangeren auf das fetale Wachstum auswirkt, auch als Anpassung der Nachkommen an widrige Aufwuchsbedingungen werten. In diesen Kontext ist auch der Begriff des „thrifty phenotype“ einzuordnen. In der biomedizinischen Forschung versteht man darunter die Koexistenz von Ausprägungen eines Individuums (schwächerer Körperbau, modifizierter Metabolismus), welche sich in Folge einer ungünstigen intrauterinen Versorgungslage bei den Nachkommen einstellt und es ihnen ermöglicht z. B. an ein reduziertes Nahrungsangebot nach der Geburt besser angepasst zu sein (Hales und Barker, 1992).

Dieser an sich sinnvolle Mechanismus könnte allerdings dann zu Problemen führen, wenn die Bedingungen, unter denen ein Individuum aufwächst, mehr oder weniger stark von den Bedingungen abweichen denen ihre Mütter während der Schwangerschaft ausgesetzt waren. In diesem Zusammenhang gibt es aufschlussreiche Studien, in denen untersucht wurde, welche Auswirkungen Krieg und Hungersnot auf die intrauterine Entwicklung und auf das Aufwachsen von Individuen haben. So litt gegen Ende des Zweiten Weltkriegs ein Großteil der niederländische Bevölkerung unter der von den deutschen Okkupationstruppen unterbundenen Nahrungsmittelversorgung ihres Landes. Es konnte gezeigt werden, dass Babys von Müttern, die während dieser Zeit schwanger waren und besonders während des letzten Trimesters unter der Nahrungsmittelknappheit litten, mit einem reduzierten Geburtsgewicht auf die Welt kamen. Interessanterweise konnte darüber hinaus bei den heranwachsenden Babys

eine verminderte Glukosetoleranz festgestellt werden. Beide Phänomene könnten in einer Umwelt mit reduziertem Nahrungsangebot, z.B. einer mangelhaften Versorgung mit Glukose, von Vorteil sein. In einer Gesellschaft, in der jedoch ein Überangebot an Nahrungsmitteln anzutreffen ist, wie es für die Staaten der westeuropäischen Nachkriegs-Ära charakteristisch ist, führt diese Konstellation leicht zu Maladaptationsprozessen mit einem erhöhten Risiko für z.B. Diabetes Typ II (Ravelli, 1998).

Es sind verschiedene Wege denkbar, über die pränatales Stresserleben ein Individuum bis in das Erwachsenenalter hinein beeinflussen könnte. Es erscheint dabei hilfreich zwischen zwei Qualitäten von Veränderungen zu unterscheiden. Einer direkten Qualität und einer indirekten. Direkt in dem Sinne verstanden, dass durch einen pränatalen Einfluss direkt maternale bzw. fetale Strukturen physisch modifiziert werden, mit dem Ergebnis, dass sich im Organismus dauerhafte Veränderungen einstellen. Im Gegensatz dazu wären indirekte Veränderungen solche, die keinen direkten physischen Einfluss auf maternale bzw. fetale Strukturen nehmen, sondern lediglich zu einem veränderten Verhalten der Schwangeren führen, welches sich wiederum indirekt auf ihre Nachkommen auswirkt.

Ein einfaches Beispiel dafür, wie sich mütterliches Stresserleben indirekt auf ihre Nachkommen auswirken könnte, lässt sich an Hand von Rauchverhalten während der Schwangerschaft aufzeigen. So könnten Frauen, die in stressbehafteten Situationen vermehrt den Antrieb verspüren Zigaretten zu rauchen, auch während der Schwangerschaft diesem Verlangen in solchen Situationen nachgeben und damit die Entwicklung des Fötus indirekt beeinflussen (Goedhart *et al.*, 2009).

Daneben sind in der Vergangenheit in einer Vielzahl von Experimenten Beobachtungen gemacht worden, die Hinweise auf pränatale Einflüsse geben, die direkt Veränderungen in maternalen bzw. fetalen Strukturen bewirken, jedoch bisher nicht mit einem bestimmten Krankheitsbild verknüpft sind (Jansson *et al.*, 2002, Regina *et al.*, 2001).

Als potentielle Mechanismen dafür, wie pränatale Einflüsse vermittelt werden und wie sie ihre Wirkung auch über einen langen Zeitraum hinweg aufrechterhalten können, werden drei grundsätzliche Möglichkeiten diskutiert (Lucas, 1991).

Erstens könnte ein bestimmter Einfluss Auswirkungen auf die absolute Zahl von Zellen in einzelnen Organen nehmen. Ausgehend von der Beobachtungen, dass die verschiedenen Gewebe zu bestimmten Zeiten während der Fetalperiode einen enormen Wachstumsschub durchmachen, liegt die Möglichkeit nahe, dass Einflüsse, die

während dieses sensiblen Zeitfensters auf die Zellproliferation wirken, quasi die Grenze des maximal möglichen zellulären Wachstums festschreiben und damit auch die maximale Leistungsfähigkeit der betreffenden Organe limitieren. So konnte gezeigt werden, dass die Nachkommen von während der Schwangerschaft mangelernährten Versuchstieren in einigen Organen eine verringerte Anzahl von Zellen aufwiesen als die Nachkommen von nicht mangelernährten Kontrolltieren (Lechner *et al.*, 1986, Joshi *et al.*, 2003).

Zweitens konnte gezeigt werden, dass sich pränatale Einflüsse auf die Genexpression von fetalen Zellen auswirken, die sich auch noch nach der Geburt im Organismus der Nachkommen nachweisen ließen (Fine *et al.*, 1999, Adeeko *et al.*, 2003,). Sofern diese Veränderungen die Expression von an wichtigen metabolischen Regelkreisen beteiligten Genen betraf, konnten sie auch mit deren Pathologie in Verbindung gebracht werden (Chapman *et al.*, 2000).

Drittens ist es denkbar, dass sich Einflüsse während der Fetalperiode auf die klonale Selektion von Zellen auswirken und damit jeweils einen bestimmten Phänotyp von Zellen bei ihrer Expansion begünstigen. Beispielsweise könnten, unter der Bedingung einer reduzierten Verfügbarkeit von Fettsäuren, solche Zellen einen Selektionsvorteil erhalten, die über eine etwas effektivere bzw. aktivere Zellmaschinerie zur Fettsäuresynthese verfügen als ihre Schwesterzellen. Geschähe dies in einer hoch proliferativen Phase während der Organogenese, würden die Zellklone des bevorzugten Phänotyps das betreffende Organ dominant besiedeln (Waterland und Garza, 1999).

Auch wenn es darum geht die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Hinsicht auf das Modell der „Fetalen Programmierung von Krankheiten des Erwachsenenalters“ zu verorten, ist eine Bezugnahme auf die genannten Mechanismen sinnvoll.

Die erhöhte Präsenz von NK- und NKT-Zellen im Blut und im Uterusgewebe der gestressten Versuchstiere könnte zu funktionellen und strukturellen Veränderungen von Endothel- und Trophoblast-Zellen in der Plazenta führen. Da diese Zellen ihrerseits wiederum regulierend auf den Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Kind wirken, könnte darüber sowohl die klonale Selektion von fetalen Zellen beeinflusst als auch die in utero Reifung von Organen limitieren werden. Obwohl die vorliegenden Ergebnisse keine Belege für eine veränderte Funktion von Trophoblast- oder Endothelzellen liefern, so ist doch in Hinblick auf die bisher publizierten Daten zur Interaktion von NK-Zellen mit Trophoblast- und Endothelzellen der angeführte Zusammenhang zumindest naheliegend (Moffett-King, 2002, Hanna *et al.*, 2006, Le Bouteiller und Tabiasco, 2006).

Noch deutlicher ist der Zusammenhang zwischen der geringeren Progesteron Konzentration im Serum der gestressten Tiere und den Mechanismen der „fetalen Programmierung“. Da Progesteron eine Fülle von Aufgaben im Rahmen der Schwangerschaft und der fetalen Entwicklung erfüllt (Spencer und Bazer, 2002), könnte seine Abnahme auf eben diese Mechanismen wirken und darüber die Genexpression fetaler Zellen beeinflussen, spezifisch ausgestattete Zellen in ihrer Proliferation unterstützen (Arck *et al.*, 2007) und, vermittelt durch Wachstumsfaktoren, die Reifung ganzer Organe verändern (Mark *et al.*, 2006).

An Hand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich folglich sowohl immunologische als auch endokrine Faktoren benennen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in der durch Stress bewirkten „Fetalen Programmierung“ eine entscheidende Rolle spielen.

## **6. Zusammenfassung**

Es ist seit längerem bekannt, dass Umweltfaktoren die pränatale Entwicklung eines Individuums nachhaltig beeinflussen können. Sofern diese Beeinflussung eine Störung der Organogenese oder wichtiger Regelkreise zur Folge hat ist anzunehmen, dass sie auch hinsichtlich der Vulnerabilität für bestimmte Krankheiten wirksam sein könnte. Da sich psychoemotionales Stresserleben auf eine ganze Reihe von physiologischen Prozessen in einem Organismus auswirken kann, liegt die Annahme nahe, dass auch Stresserleben während der Schwangerschaft auf die Entwicklung der Nachkommen einen anhaltenden Einfluss ausüben könnte.

Im Verlauf der Schwangerschaft finden im mütterlichen Organismus eine Reihe von Anpassungsprozessen statt, deren planmäßiger Ablauf eine möglichst optimale Versorgung und Entwicklung des Fötus gewährleisten soll. Im Uterusgewebe kommt dem Immunsystem im Rahmen dieser Adaptation eine entscheidende Rolle zu. Im Zusammenspiel mit endokrinen Faktoren ist es die Interaktion zwischen fetalen Trophoblastzellen und mütterlichen Immunzellen, die dafür Sorge trägt, dass sich notwendige Strukturen etablieren können, die das Überleben des Keims sichern.

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass Schallstress in der späten Schwangerschaft zu Veränderungen immunologischer und hormoneller Parameter bei den Nachkommen führte. Welche Mechanismen auf Seiten der schwangeren Versuchstiere allerdings im einzelnen für die beobachteten Veränderungen bei ihren Nachkommen verantwortlich zu machen sind, ist bislang nur in Ansätzen verstanden.

In der vorliegenden Arbeit, die an die oben genannten Studien anschließt, wurde untersucht, inwiefern sich eine Stressbehandlung in der späten Schwangerschaft auf die Frequenz von T-Zellen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen, im Uterus, im Blut und in den inguinalen Lymphknoten der trächtigen Tiere auswirkt. Darüber hinaus wurde an Hand der Expression von Cortikoliberin im Gehirn der trächtigen Tiere und der Corticosteron- und Progesteron-Konzentration im Serum der Muttertiere und in der Amnionflüssigkeit untersucht, ob sich die Stressexposition auch auf wichtige hormonelle Regelkreise auswirkt.

Dazu wurden in zwei unterschiedlichen Experimenten einmal BALB/c Mäuse syngen verpaart und einmal weibliche BALB/c Mäuse mit DBA/2J Männchen allogenen verpaart und die schwangeren Tiere an Tag 12,5 und 14,5 der Schwangerschaft einer

Schallstressexposition unterzogen. An Gestationstag 16,5 wurden die Versuchstiere getötet und die für die Untersuchungen benötigten Organe entnommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen eindeutig, dass die Stressbehandlung in der späten Schwangerschaft einen Einfluss auf das immunologische Gleichgewicht an der fetomaternalen Schnittstelle ausübt. Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte eine höhere Anzahl CD49b<sup>+</sup> Zellen und CD3<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup> Zellen im Blut und im Uterusgewebe der gestressten Tiere nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im Blut der syngen verpaarten Tieren bei der Stressgruppe eine signifikant kleinere Zahl von CCR5<sup>+</sup> Zellen und CCR7<sup>+</sup>Zellen gemessen werden. Die Frequenz der CD4<sup>+</sup> Zellen und der CD11<sup>+</sup> Zellen wurde durch die Stressbehandlung hingegen nicht signifikant beeinflusst. Die Bestimmung der Progesteron-Konzentration mit Hilfe eines Radioimmunoassays ergab eine signifikant geringere Serumkonzentration bei den gestressten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren. Bezogen auf die Konzentration von Corticosteron konnte jedoch kein solcher Unterschied festgestellt werden. Auch hinsichtlich der Expression von Cortikoliberin im Gehirn der trächtigen Tiere war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellbar . In Anbetracht der herausragenden Rolle, die das Immunsystem und die hormonelle Regulation im Rahmen der Adaptation des mütterlichen Organismus an eine Schwangerschaft einnimmt, können die beobachteten Veränderungen als Ausdruck von Mechanismen verstanden werden, die an einer durch Stress bedingten veränderten fetalen Entwicklung beteiligt sind und die betroffenen Tiere im weiteren Leben möglicherweise anfälliger für die Herausbildung bestimmter Krankheiten machen.

## 7. Literaturverzeichnis

Adeeko A, Li D, Doucet J, Cooke GM, *et al.* Gestational exposure to persistent organic pollutants: maternal liver residues, pregnancy outcome, and effects on hepatic gene expression profiles in the dam and fetus. *Toxicol Sci* 2003;72:242-52.

Akira S, Hirano T, Taga T, *et al.* Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 1990;4:2860-7.

Allakhverdi Z, Fitzpatrick D, Boisvert A, *et al.* Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1342-9.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG, Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus *Nat Immunol* 2004;5:266–71.

Anderle C, Hammer A, Polgár B, *et al.* Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol* 2008;79:26-36.

Annunziato F, Galli G, Romagnani P, *et al.* Chemokine receptors and other surface molecules preferentially associated with human Th1 or Th2 cells. *Microbes Infect* 1999;1:103-6.

Arase H, Saito T, Phillips JH, *et al.* Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 2001;167:1141-4.

Arck PC, Merali FS, Manuel J, *et al.* Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release as a mechanism triggering resorptions in mice. *Am J Reprod Immunol* 1995;33:74-80.

Arck PC, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, *et al.* Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:268-79.

Arck PC, Rücke M, Rose M, *et al.* Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women. *Reprod Biomed Online* 2008;17:101-13.

Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA, Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000;192:259–70.

Ballas ZK, Rasmussen W, NK1.1<sup>+</sup> thymocytes. Adult murine CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> thymocytes contain an NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>hi</sup>, CD44<sup>hi</sup>, TCR-V beta 8<sup>+</sup> subset. *J Immunol* 1990;145:1039-45.

Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.

Barker DJ, Osmond C, Golding J, *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989;298:564-7.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, *et al.* Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990;301:259-62.

Barker DJ, Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995;1:418-23.

Bateson P, Fetal experience and good adult design. *Int J Epidemiol* 2001;30:928-934.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.

Beydoun H, Saftlas AF, Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;22:438-66.

Blackford JH, Reid W, Pappin DJ, *et al.* A monoclonal antibody, 3/22, to rabbit CD11c which induces homotypic T cell aggregation: evidence that ICAM-1 is a ligand for CD11c/CD18. *Eur J Immunol* 1996;26:525–31.

Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, *et al.* Lineage, Maturity, and Phenotype of Uterine Murine Dendritic Cells Throughout Gestation Indicate a Protective Role in Maintaining Pregnancy. *Biol of Reprod* 2004;70:1018–23.

Blois SM, G Barrientos, MG Garcia, *et al.* Interaction between dendritic cells and natural killer cells during Pregnancy in mice. *J Mol Med* 2008;86:837-52.

Bromley SK, Thomas SY, Luster AD, Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature Immunol* 2005;6:895–901.

Brunton PJ, Ma S, Shipston MJ, *et al.* Central mechanisms underlying reduced ACTH stress responses in pregnant rats: Attenuated acute gene activation in the parvocellular paraventricular nucleus (PPVN) *Eur J Neurosci* 2000;12,(Suppl):417

Bull JJ, Sex determination in reptiles. *Q Rev Biol* 1980;55:3–21.

Chantakru S, Miller C, Roach LE, *et al.* Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK-cell population of early pregnancy. *J Immunol* 2002;168:22–28.

Chaouat G, JP Kolb, TG Wegmann, , The murine placenta as an immunological barrier between the mother and the fetus. *Immunol Rev* 1983;75:31-60.

Chaouat, G, Zourbas S, Ostojic S, *et al.* A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002;53:241-56.

Chapman C, Morgan LM, Murphy MC, Maternal and early dietary fatty acid intake: Changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats. *J Nutr* 2000;130:146–51.

Carp H, Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus* 2004;13:630-4.

Castro FV, Tutt AL, White AL, *et al.* CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur J Immunol* 2008;38:2263–73.

Chrousos GP, Gold PW, The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*1992;267:1244–52.

Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW, Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* 1998;129:229- 34.

Clark DA, Banwatt D, Chaouat G, Stress-triggered abortion in mice prevented by alloimmunization. *Am J Reprod Immunol* 1993;29:141-7.

Clark DA, Arck PC, Chaouat G, Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 1999;41:5-22.

Crofford LJ, Sano H, Karalis K, Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 1992;90:2555-64.

Das C, Catt KJ, Antifertility actions of the progesterone antagonist RU 486 include direct inhibition of placental hormone secretion. *Lancet* 1987;2:599-604.

Dambrosio D, Iellem A, Colantonio L, *et al.* Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunol Today* 2000;21:183-6.

Deanesly R, Termination of early pregnancy in rats after ovariectomy is due to immediate collapse of the progesterone-dependent deciduas. *J Reprod Fertil* 1973;35:183-91.

De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML, Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:289-307.

Douglas AJ, Brunton PJ, Bossch OJ, *et al.* Neuroendocrine Responses to Stress in Mice:Hyporesponsiveness in Pregnancy and Parturition. *Endocrinology* 2003;144:5268–76.

Elger W, Fahrnich M, Beier S, *et al.* Endometrial and myometrial effects of progesterone antagonists in pregnant guinea pigs. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:1065-74.

Emanuel RL, Robinson BG, Seely EW, Corticotrophin releasing hormone levels in human plasma and amniotic fluid during gestation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;40:257-62.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002a;9:1069-77.

Fallarino F, Vacca C, Orabona C, *et al.* Functional expression of indolamine 2,3-dioxygenase by murine CD8  $\alpha^+$  dendritic cells. *Int Immunol* 2002b;14:65-8.

Fenster L, Schaefer C, Mathur A, *et al.* Psychologic stress in the workplace and spontaneous abortion. *Am J Epidemiol* 1995;142:1176–83.

Fine EL, Horal M, Chang TI, *et al.* Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 1999;48:2454-62.

Förster R, Schubel A, Breitfeld D, *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99:23–33.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY, Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005;22:329–41.

Geburten in Deutschland, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2007.

Godfrey VL, Wilkinson JE, Rinchik EM, *et al.* Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5528–32.

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, *et al.* "NKT cells: what's in a name?". *Nat Rev Immunol* 2004;4:231-7.

Goedhart G, van der Wal MF, Cuijpers P, *et al.* Psychosocial problems and continued smoking during pregnancy. *Addict Behav* 2009;34:403-6.

Goldman R, Harvey J, Hogg N, VLA-2 is the integrin used as a collagen receptor by leukocytes. *Eur J Immunol* 1992;22:1109-14.

Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I, Augmented Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transpl* 2005;79:1180–3.

Graham JD, Clarke CL, Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997;18:502–19.

Grino M, Chrousos GP, Margioris AN, The corticotropin releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1208-14.

Hales CN, Barker DJP, Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595–601.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12:1065–74.

Hodges JR, The hypothalamo-pituitary-adrenocortical system. *Br J Anaesth* 1984;56:701-10.

Holmes TH, Rahe RH, The Social Readjustment Rating Scale. *J Psychosom Res* 1967;11:213-8.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.

Ihanus E, Uotila LM, Toivanen A, *et al.* Red cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4. *Blood* 2007;109:802–10.

Ingalls RR, Golenbock DT, CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995;181:1473–9.

Ishitani A, Sageshima N, Lee N, *et al.* Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 2003;171:1376-84.

Janeway CA Jr, Medzhitov R, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.

Jansson T; Ekstrand Y, Wennergren BC, *et al.* Alterations in the activity of placental amino acid transporters in pregnancies complicated by diabetes. *Diabetes* 2002;51:2214–9.

Javaid MK, Crozier SR, Harvey NC, *et al.* Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet* 2006;367:36-43.

Joachim RA, Zenclussen AC, Polgar B, *et al.* The progesterone derivate dydrogesterone abrogates murine stress triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids* 2003;68:931-40.

Johnstone HA, Wigger A, Douglas AJ, *et al.* Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. *J Neuroendocrinol* 2000;12:811–22.

Joshi S, Garole V, Daware M, *et al.* Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in Wistar rats. *Metabolism* 2003;52:13-8.

Karimi K, Blois SM, Arck PC, The upside of natural killers. *Nat Med* 2008;14:1184-5.

Karalis K, Sano H, Redwine J, *et al.* Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 1991;254:421-3.

Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AD, *et al.* Human decidua contains potent immunostimulatory CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Am J Pathol* 2000;157:159-69.

Kelemen K, Bogнар I, Paal M, *et al.* A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *J Cell Immunol* 1996;167:129-34.

Kirchhausen T, Staunton DE, Springer TA, Location of the domains of ICAM-1 by immunolabeling and single-molecule electron microscopy. *J Leukoc Biol* 1993;53:342-6.

Knackstedt MK, Zenclussen AC, Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:210-20.

Knackstedt MK, Hamelmann E, Arck PC, Mothers in stress: consequences for the offspring. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:63-9.

Kovacs KJ, Makara GB, Corticosterone and dexamethasone act at different brain sites to inhibit adrenalectomy-induced adrenocorticotropin hypersecretion. *Brain Res* 1988;474:205–10.

Kovats S, Main EK, Librach C, *et al.* A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;13:220-3.

Lebedeva T, Anikeeva N, Kalams SA, *et al.* Major histocompatibility complex class I-intercellular adhesion molecule-1 association on the surface of target cells: implications for antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 2004;113:460-71.

Le Bouteiller P, Tabiasco J, Killers become builders during pregnancy: *Nat Med* 2006;12:991–2.

Lechner AJ, Winston DC, Bauman JE, Lung mechanisms, cellularity and surfactant after prenatal starvation in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1986;60:1610-4.

Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, *et al.* Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13031–36.

Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaftshochdruck/Gestose der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (DGGG); Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen AWMF 015/018 (S2); Stand August 2008

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA, CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–58.

Löf M, Sandin S, Hilakivi-Clarke L, *et al.* Birth weight in relation to endometrial and breast cancer risks in Swedish women. *Br J Cancer* 2007;15:134-6.

Loike JD, Sodeik B, Cao L, *et al.* CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A  $\alpha$  chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1044–4.

Loke YW, King A, Recent developments in the human maternal-fetal immune interaction. *Curr Opin Immunol* 1991;3:762-6.

Lucas A, Programming by early nutrition in man: In: Bock GR, Whelan J, eds. The childhood environment and adult disease. (CIBA Foundation Symposium 156.) Chichester: Wiley 1991:38-55.

Mahnke K, Knop J, Enk AH, Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'. Trends in Immunol 2003;24:646-51.

Mailliard RB, Alber SM, Shen H, *et al.* IL-18-induced CD83<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> NK helper cells. J Exp Med 2005;202:941-53.

Malaspina D, Corcoran C, Kleinhaus KR, *et al.* Acute maternal stress in pregnancy and schizophrenia in offspring: a cohort prospective study. BMC Psychiatry 2008;21:71-8.

Malhotra V, Hogg N, Sim RB, Ligand binding by the p150,95 antigen of U937 monocytic cells: properties in common with complement receptor type 3 (CR3). Eur J Immunol 1986;16:1117–23.

Manzotti CN, Liu MK, Burke F, *et al.* Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. Eur J Immunol 2006;36:1413–22.

Mariella DC, Sivoria S, Castriconib R, *et al.* Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. Trend in Microbiol 2005;13:128-36.

Mark PJ, Smith JT, Waddell BJ, Placental and fetal growth retardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. Placenta 2006;27:208-14.

Matzinger P The danger model: a renewed sense of self. Science 2002;296:301-5.

McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, *et al.* Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. Dev Brain Res 1995;84:55–61.

McLean M, Bisits A, Davies J, *et al.* A placental clock controlling the length of human pregnancy. Nat Med 1995;1:460-3.

Medawar PB, Some immunological and endocrine problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953;7320–37.

Mellman I, Steinman RM, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106:255-8.

Mericq V, Ong KK, Bazaes R, *et al.* Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children. *Diabetologia* 2005;48:2609-14.

Miyaura, H, M Iwata, Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol* 2002;168:1087–94.

Moffett-King A, Natural killer cells and pregnancy. *Nat Immunol* 2002;3:656–63.

Mowat AM, Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331–41.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, *et al.* Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191–3.

Nelson BH, Willerford DM Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 1998;70:01–81.

Nepomnaschy PA, Sheiner E, Arck PC, *et al.* Stress, immune function, and women's reproduction. *Ann NY Acad Sci* 2007 ;1113:350-64.

Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, *et al.* Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J Physiol* 1998;508:289–300.

O'Hare T, Creed F, Life events and miscarriage. *Br J Psychiatry* 1995;167:799–805.

Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004;21:279–88.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, *et al.* Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cells clones. *J Immunol* 1995;155:128–33.

Piccirillo, CA, Shevach EM, Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 2004;16:81–8.

Piemonti L, Monti P, Sironi M, *et al.* Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:4443–51.

Pincus-Knackstedt MK, Joachim RA, Blois SM, *et al.* Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation. *J Immunol* 2006;15:8484-92.

Qin S, Rottman JB, Myers P, *et al.* The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101:746–54.

Ravelli ACJ, van der Meulen JHP, Michels RPJ, Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173–7.

Regina S, Lucas R, Miraglia SM, *et al.* Intrauterine food restriction as a determinant of nephrosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2001;37:467-76.

Rivier C, Rivier J, Vale WW, Stress-induced inhibition of reproductive function: Role of endogenous corticotropin releasing factor. *Science* 1986;231:607–9.

Rivier CL, Grigoriadis DE, Rivier JE, Role of corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in modulating the rat adrenocorticotropin response to stressors. *Endocrinology* 2003;144:2396–403.

Rona RJ, Smeeton NC, Bustos P, *et al.* The early origins hypothesis with an emphasis on growth rate in the first year of life and asthma: a prospective study in Chile. *Thorax* 2005;60:549-54.

Rot A, von Andrian UH, Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:891–28.

Russell JA, Ma S, Shipston MJ, *et al.* Global reduction in hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis stress responses in pregnant rats: attenuated feedforward mechanisms: International Congress of Endocrinology, Sydney, Australia, (Abstract P7)

Sadhu C, Ting HJ, Lipsky B, *et al.* CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type Hypersensitivity. *J of Leuk Biol* 2007;81:1396-403.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.

Saper CB, Lowey AD, Swanson LW, *et al.* Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* 1976;117:305-12.

Sapolsky, R, Rivier C, Yamamoto G, *et al.* Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 1987;238:522–4.

Schwartz RH, Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Natl Immunol* 2005;6:327–30.

Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, *et al.* NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 2002;14:165-71.

Spencer TE, Bazer FW, Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 2002;7:1879-98.

Springer TA, Miller LJ, Anderson DC, p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family. *J Immunol* 1986;136:240–5.

Springer TA, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301–14.

Suffia I, Reckling SK, Salay G, *et al.* A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2005;174:5444–55.

Szekeres-Bartho J, Kilar FG, Falkay V, *et al.* The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;9:15–8.

Szekeres-Bartho J, Wegmann TG, A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance: *J Reprod Immunol* 1996;31:81-92.

Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay G, *et al.* The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol* 1997;177:194-9.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4 *Immunity* 1995;3:541–47.

Tollrian R, Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (Sars). *Arch Hydrobiol* 1994;130: 69–75.

Toricelli M, Ignacchiti E, Giovannelli A, Maternal plasma corticotrophin-releasing factor and urocortin levels in post-term pregnancies. *Eur J Endocrinol* 2006;154:281-5.

Turka LA, Walsh PT, IL-2 signaling and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Front Biosci* 2008;13:1440–6.

Verma S, King A, Loke YW, Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997;27:979-83.

Voigt K, Endokrines System; in *Lehrbuch der Physiologie* / hrsg. von Rainer Klinke und Stefan Silbernagel. 3. Aufl.- Stuttgart; New York: Thieme 2001. 443-92.

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1:405–13.

Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, *et al.* Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1<sup>+</sup> T cells in various immune organs. NK1.1<sup>+</sup> T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 1995;155:2972-83.

Waterland RA, Garza C, Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;69:179–97.

Wegmann T G, Lin H, Guilbert L, *et al.* Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.

Werr J, Johansson J, Eriksson E E, *et al.* Integrin  $\alpha 2\beta 1$  (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. *Blood* 2000;95:1804-9.

Wiebold JL, Stanfield PH, Becker WC, *et al.* The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 1986;78:185–92.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18–20.

## **9. Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

## 10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Labor für Psychoneuroimmunologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin unter Anleitung von Frau Prof. P.C. Arck. Ich möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Mitarbeit in ihrer Arbeitsgruppe und für die geduldige und freundliche Unterstützung und Beratung während der gesamten Arbeit danken.

Dr. A. Friebe danke ich für die Einarbeitung in die durchflusszytometrische Analyse.

Dr Alison J Douglas danke ich für die Einarbeitung in die In situ Hybridisierung und den Umgang mit Radioimmunoassays.

Für die engagierte Unterstützung bei der technischen Durchführung dieser Arbeit bedanke ich mich sehr herzlich bei P. Busse, E. Hagen, P. Moschansky, und R. Pliet.

Meinen Eltern danke ich für den interessierten und liebevollen Beistand, mit dem sie mein Studium und die Promotionsarbeit unterstützt haben.

„Ich, Clemens Steinert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der Einfluss von Schallstress in der späten Schwangerschaft auf hormonelle und immunologische Faktoren im Mausmodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 03.11.2011

Unterschrift