

**Etablierung einer einseitigen Plazenta-Perfusionsmethode
zur Untersuchung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens
zweier T-Zell-Leukämiezelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Sebastian Schamberger

geboren am 22.10.1986 in Neuhaus a. Rwg.

2013

Gutachter:

1. Prof. Dr. Udo Markert, Jena
2. Prof. Dr. James F. Beck, Jena
3. Prof. Dr. Udo Jeschke, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. Juli 2013, Jena

„Mit jedem Menschen ist etwas Neues in die Welt gesetzt,
was es noch nicht gegeben hat, etwas Erstes und Einziges.“

Martin Buber (1878-1965)

Für meine Familie und meinen lieben, verstorbenen Opa Hans



Aung Myint

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Vorbereitungen des Endometriums auf die Schwangerschaft	2
1.2 Fertilisation und Furchung	3
1.3 Implantation	4
1.4 Dezidua graviditatis	6
1.5 Plazentation	7
1.6 Die reife Plazenta	8
1.6.1 Aufbau	8
1.6.2 Funktionen.....	11
1.7 Der Fötus als „Eindringling“	13
1.7.1 Humanes Leukozyten-assoziiertes Antigen.....	14
1.7.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen	15
1.7.3 Indoleamin-2,3-dioxygenase	16
1.7.4 Th2-Phänomen	16
1.7.5 Hormone	19
1.7.6 Weitere ausgewählte schwangerschaftsfördernde Mechanismen.....	20
1.8 Leukämie	21
1.8.1 Akute lymphatische Leukämie	23
2 ZIELSTELLUNG	25
3 METHODIK	26
3.1 Zelllinien	28
3.1.1 CCRF-CEM.....	28
3.1.2 JURKAT	29
3.1.3 Einfrieren und Auftauen der beiden Zelllinien.....	30
3.2 Ansetzen der Perfusionslösung	30
3.3 Vorarbeiten	31
3.4 Versuchsaufbau	32
3.5 Vorbereiten und Einspannen der Plazenta	33
3.6 Platzieren der Perfusionsnadeln	34
3.7 Vorspülen	34

3.8	Vorbereiten der Zellen	34
3.8.1	Vorgehen bei der Fluoreszenzmarkierung	35
3.8.2	Fluoreszenzmarker	35
3.9	Perfusion ex vivo	36
3.9.1	Hintergrund	36
3.9.2	Vorteile	37
3.9.3	Nachteile.....	38
3.9.4	Perfusionsdurchführung	38
3.10	Nachspülen	38
3.11	Paraffinschnittherstellung	39
3.11.1	Schneiden und Vorbereitung für das Einbetten	39
3.11.2	Einbetten.....	39
3.11.3	Mikrotomieren und Entparaffinieren.....	40
3.11.4	Färben.....	41
3.12	Gefrierschnittherstellung	42
3.12.1	Einbetten und Schneiden	42
3.12.2	Färben.....	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Kategorisierung der Paraffinschnitte	43
4.1.1	Hängenbleiben der Zellen in Engstellen	44
4.1.2	Morphologische Anpassung an den Villus	46
4.1.3	Anheftung an die Dezidua.....	48
4.1.4	Initiale lymphozytäre Infiltration des Villus	50
4.1.5	Terminale Invasion des Villus	52
4.1.6	Phase der vollendeten Transmigration	54
4.2	Kategorisierung der Gefrierschnitte	56
4.2.1	Hängenbleiben der Zellen in Engstellen	56
4.2.2	Ausbildung von Adhäsionsbrücken.....	58
4.2.3	Morphologische Anpassung an den Villus	60
4.2.4	Initiale lymphozytäre Infiltration des Villus	62
4.2.5	Terminale lymphozytäre Invasion des Villus	66

5	DISKUSSION	68
5.1	Auswertung der Fluoreszenzbilder	68
5.1.1	Adhäsions- und Invasionsverhalten beider Zelllinien	68
5.1.2	Adhäsionsbrücken	71
5.1.3	Penetration des Synzytiums durch zytoplasmatische Zellausläufer	72
5.2	Gefrierschnitttechnik versus Paraffinschnitttechnik	74
5.3	Mögliche Ursachen für die stark verminderte Grün-Fluoreszenz	77
5.4	Theorien zur synzytialen Transmigration	80
5.4.1	Transmigration durch „Schwachstellen“ innerhalb des Synzytiotrophoblasten ...	80
5.4.2	Transmigration durch Enzyme	84
5.5	Veränderung der Perfusionsparameter und deren Auswirkungen auf das Perfusionsergebnis	85
5.5.1	Vor- und Nachspülen	85
5.5.2	Zellanzahl	87
5.5.3	Flussrate	89
5.5.4	Laufzeit der Perfusion	90
5.5.5	Perfusionsvolumen	90
5.6	Bezugnahme auf die zentralen Fragestellungen	91
6	METHODENOPTIMIERUNG UND AUSSICHTEN	92
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	VI
7.1	Quellenverzeichnis der Abbildungen	VI
7.2	Quellenverzeichnis der Diagramme und Tabellen	VIII
7.2.1	Diagrammverzeichnis	VIII
7.2.2	Tabellenverzeichnis	VIII
7.3	Literaturverzeichnis	IX
8	ANHANG	XX
8.1	Perfusionsrelevantes	XX
8.2	Danksagung	XXIII
8.3	Lebenslauf	XXIV
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung	XXV
8.5	Verwendete Geräte und Materialien	XXVI
8.6	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Zelllinien	XXVII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	und andere
Fas	Oberflächenantigen
FasL	Fas-Ligand
FKS	fetales Kälberserum
hCG	humanes Choriongonadotropin
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	humanes Leukozyten-assoziiertes Antigen
IDO	Indoleamin-2,3-dioxygenase
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	Molar
M-CSF	Makropagen Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mod. n.	modifiziert nach

mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid (bezüglich der physiologischen Konzentration von 0,9%)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zelle	natürliche Killerzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIBF	Progesteron-induzierter Blockierfaktor
PL	Perfusionslösung
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
ST	Synzytiotrophoblast
Tab.	Tabelle
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vergr.	Vergrößerung
ZT	Zytotrophoblast

Zusammenfassung

Hintergrund: Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Adhäsions- und Invasionsverhalten zweier T-Zell-Leukämie-Zelllinien innerhalb einer menschlichen Plazenta untersucht.

Methoden: Im Mittelpunkt steht die Etablierung eines neuartigen Perfusionsmodells auf einer schiefen Ebene. Sie besteht aus einem abfallenden Kunststoffrahmen, in den die Plazenta eingespannt und einseitig perfundiert wird. Hierfür wurden zuvor die beiden Zelllinien (CCRF-CEM und JURKAT) mit Fluoreszenzfarbstoffen (CellTracker green und CellTracker orange der Firma Invitrogen) angefärbt. Anschließend wurden sie in Perfusionslösung überführt in die maternale Seite der Plazenta perfundiert. Eine Pumpe gewährleistete eine kontinuierliche und gleichmäßige Flussrate des Perfusats. Der Versuchsaufbau bedient sich des Prinzips der einseitigen Perfusion im geschlossenen System. Insgesamt wurden 5 Perfusionen mit jeweils leicht abgeänderten Parametern und jeweiligem Wechsel der Farbstoffe zwischen den beiden Zelllinien durchgeführt. Nach erfolgter Perfusion wurden Gefrier- und Paraffinschnitte von den Geweben angefertigt und anhand von Fluoreszenzaufnahmen analysiert. Die Untersuchungen wurden rein deskriptiv ausgewertet und sollen als Vorarbeiten zur Methodenetablierung für größere, auch statistisch auswertbare Untersuchungen dienen.

Ergebnisse: Die hier beschriebene Methode der Perfusion auf einer schiefen Ebene konnte etabliert werden. Die umfangreiche Auswertung der Gefrier- und Paraffinschnitte ergab das Vorhandensein von perfundierten markierten Zellen sowohl an als auch in kindlichen Plazentastrukturen. Anhand dieser Beobachtungen entwickelte sich eine Vorstellung der (vermutlichen) transmigratorischen lymphozytären Prozesse:

- *Intervillöse Phase*, in der die Zelle frei im intervillösen Raum zirkuliert,
- *Adhäsions- und Anpassungsphase*, in der sie durch Adhäsionsmoleküle einen Kontakt mit dem Synzytiotrophoblasten herstellt und sich morphologisch an ihn lagert,
- *Infiltrationsphase*, in der die Zelle in den Villus migriert,
- *Phase der vollendeten Transmigration*, in der sich der Lymphozyt bereits im fetalen Endothel befindet.

Schlussfolgerungen: Am Ende dieser noch langen Versuchsreihe steht die Hoffnung, Beiträge zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien schwangerer Krebspatientinnen zu erbringen, um das Risiko der Übertragung der Krankheit von der Schwangeren auf ihr Ungeborenes zu reduzieren.

1 Einleitung

Die Schwangerschaft ist ein physiologisch einzigartiger und zugleich faszinierender Vorgang, der von der Befruchtung bis zur Geburt im Durchschnitt 267 Tage beträgt.

Sie ruft im weiblichen Organismus komplexe Veränderungen hervor. Diese sind z.B. die Modifikation des Herz-Kreislauf-Systems, des endokrinen Systems sowie des respiratorischen Systems. All dies hat den Sinn, die Versorgung und das Wachstum des Fötus optimal zu ermöglichen (Rath et al. 2010). Allerdings kommt es dabei nicht selten zu Komplikationen.

Da bis heute noch viele dieser Pathomechanismen unerforscht sind, soll mit dieser Arbeit das Adhäsions- und Invasionsverhalten von T-Lymphozyten mit einer speziell entwickelten Perfusionsapparatur zur einseitigen Perfusion genauer betrachtet und ein Grundlagenwissen in dieser Thematik geschaffen werden.

1.1 Vorbereitungen des Endometriums auf die Schwangerschaft

Die Uterusschleimhaut, auch Endometrium genannt, ist eine dünne Schleimhaut an der Innenseite der Gebärmutter. Sie besteht aus einer konstanten Basalis und einer darüber liegenden Funktionalis. Die Funktionalis ist dem Menstruationszyklus unterworfen. So wird sie bei ausbleibender Befruchtung am Ende eines Zyklus mitsamt der Eizelle ausgestoßen (in diesem Zusammenhang wird das Endometrium auch als *Dezidua menstrualis* bezeichnet). Wird die Keimzelle hingegen befruchtet, bleibt das aus Drüsen bestehende *Stratum functionale* intakt und gewährt ihr die Implantation.

Diesen endometrialen Veränderungen liegen hormonelle Modifikationen zugrunde. Den Hauptanteil hierzu tragen die Steroidhormone Östrogen und Progesteron bei.

Beide Botenstoffe, vorrangig jedoch Östrogen, führen zur postmenstrualen Regeneration sowie zum Neuaufbau der Funktionalis (Wen et al. 2009). Möglich ist dieses Volumen- und Größenwachstum durch Einlagerung von Glykogen und Lipiden in das Zytoplasma (Moore und Persaud 2007).

Neben der Zunahme an Masse bildet sich in der Funktionalis ein dichtes Kapillarnetz aus, das auf der Proliferation der Spiral- und Basalarterien beruht. Ausschlaggebend dafür ist u.a. die durch Progesteron-induzierte Expression angiogener Faktoren, wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) (Wen et al. 2009) in uterinen Stromazellen (Hyder und Stancel 1999).

Daneben führt Progesteron zur Hochregulierung der Sekretion aus den Uterusdrüsen (Moore und Persaud 2007) sowie zur Induktion der Dezidualreaktion (Welsch 2006 [siehe 1.3]). Weitere schwangerschaftsfördernde Eigenschaften dieses Hormons werden im Punkt 1.7.5 angesprochen.

Auch aus immunologischer Sicht verändert sich das Endometrium. Es wandern natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ein und leisten einen entscheidenden Beitrag zum Erhalt der Schwangerschaft (Kane et al. 2009).

1.2 Fertilisation und Furchung

Zum Zeitpunkt der Ovulation verlässt die reife Oozyte das Ovar und wird von den Fimbrien des Eileiters aufgenommen. Dieser kontrahiert und befördert mit seiner ausgeprägten Wandmuskulatur die Oozyte in seinen Pars ampullaris, wo die eigentliche Befruchtung durch die Spermien stattfindet. Der Vorgang von der Ovulation bis zur Befruchtung, die Imprägnation, dauert ca. 24 Stunden. Ist die Oozyte befruchtet, wird sie Zygote genannt. Nun beginnt sie sich zu teilen, man spricht in diesem Zusammenhang auch von Furchung. So differenziert sich die befruchtete Eizelle über das 2-Zellstadium durch fortwährende Mitosen immer weiter, die Zellanzahl vergrößert sich, wobei die Zellen, auch Blastomere genannt, durch die Teilungen immer kleiner werden. Sobald die Zellen ab dem 16-Zellstadium so dicht gepackt sind, dass sich tight junctions zwischen ihnen ausgebildet haben, spricht man von einer Morula. Dieser Vorgang findet etwa am dritten Tag nach der Befruchtung statt (Moore und Persaud 2007).

Ein bis zwei Tage später, sobald die Morula aus etwa 32 Zellen besteht, strömt Flüssigkeit, vorrangig Wasser und Natrium, in ihr Zentrum ein. Auf diese Weise entsteht die Blastozyste aus der Morula (Trück 2009, Bischof und Irminger-Finger 2005).

Die Blastozyste besteht aus zwei unterschiedlichen Zelltypen: Die äußeren Zellen ergeben das Trophoblast. Es dient der Anheftung an die Uterusschleimhaut und befähigt zur Ausbildung der Plazenta. Aus den inneren Zellen geht der Embryoblast hervor, der wie der Name schon vermuten lässt, zum eigentlichen Embryo heranreift.

Bevor sich aber die Blastozyste implantiert, befindet sie sich für etwa 48 Stunden frei beweglich im Uterus und wird durch die dort befindlichen Drüsen gespeist. Sie sondern ein glykogenreiches Sekret ab. Erst nachdem die äußere Schutzhülle des Keimes, die Zona pellucida, aufgelöst ist, kann die eigentliche Implantation beginnen (Moore und Persaud 2007).

1.3 Implantation

Der Begriff umfasst die Apposition, Adhäsion und die Invasion des Keimes in das mütterliche Gewebe (Maltaris et al. 2008, Achache und Revel 2006). Die Implantation ist ein sehr komplexer Vorgang. Er bedient sich verschiedenster Mechanismen, von denen einige dargestellt werden.

Die Blastozyste lagert sich etwa am 6. Tag nach der Befruchtung an die Funktionalis. Sobald ein Kontakt besteht, differenziert sich das Trophoblast in zwei Strukturen (Moore 1996):

- die einkernigen, proliferierenden Zytotrophoblasten (ZT), die die innere Zellschicht ausmachen und daher i.d.R. keinen Kontakt zum mütterlichen Blut aufweisen. Sie besitzen eine hohe mitotische Aktivität. Man unterscheidet zwei Populationen von ZT: die villösen ZT und die extravillösen ZT (siehe auch 1.6.1.4.2). Erstere sind unbewegliche Stammzellen, letztere sind hingegen durch Invasivität gekennzeichnet (Rudloff 2008).
- den differenzierten Synzytiotrophoblast (ST), der die äußere Zellschicht darstellt. Er entsteht durch die Fusion mehrerer ZT und ist somit ein vielkerniges Synzytium (Bracknies 2005). Die Fusion findet während der gesamten Schwangerschaft statt und ist gerade deshalb so wichtig, weil der ST keine eigene DNA-Synthese besitzt. Nur auf diese Weise bezieht er mRNA und Organellsysteme vom ZT und kann so für sich essentielle Proteine produzieren (Pötgens et al. 2004, Schleußner und Seewald 2002). Wie bei jedem anderen vitalen Gewebe gehen gewisse Abschnitte des ST zu gegebener Zeit z.B. durch Alterung zugrunde. Das entstandene apoptotische Material wird in synzytiale Knoten eingelagert und über die Zirkulation an die mütterliche Lunge abgegeben. Dort wird es über Makrophagen entsorgt (Rath et al. 2010 [siehe Abb. 1.1]).

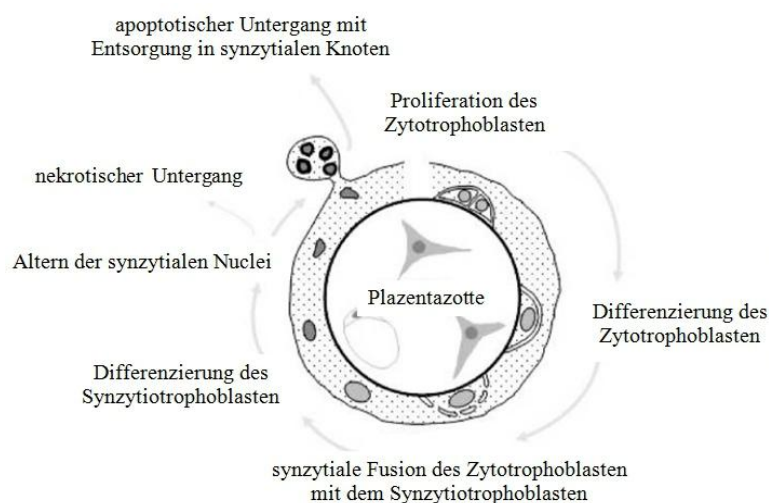


Abb. 1.1: Vereinfachte Zeichnung einer Plazentazotte mit den verschiedenen Differenzierungsstadien eines Zytotrophoblasten, der synzytialen Fusion sowie der Differenzierung des Synzytiotrophoblasten und dessen Untergang (mod. n. Knerr et al. 2004)

Während des Appositionsvorganges lagern sich die Trophoblastzellen an das Endometrium und gehen eine Verbindung mit ihm ein (Achache und Revel 2006). Für die erfolgreiche Etablierung der Adhäsion zwischen ST und Endometrium sind vor allem drei Mechanismen zu erwähnen:

- Erstens besitzt der Trophoblast Mikrovilli auf der Oberfläche, die sich mit dem Endometrium vereinen und durch ihre oberflächenvergrößernde Eigenschaft eine wichtige Rolle beim Stofftransport zwischen werdender Mutter und Fötus spielen (Maltaris et al. 2008, Rath et al. 2010).
- Zweitens weist v.a. der Trophoblast Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), wie Integrine, auf (Achache und Revel 2008, Fitzgerald et al. 2007). Jene binden an die Proteine der extrazellulären Matrix des mütterlichen Stromas (z.B. an Kollagene, Laminine und Fibronektine [Maltaris et al. 2008; Burrows et al. 1996, Trück 2009]) als auch an das uterine Endothel (Thirkill et al. 2004) und gewährleisten so eine Anheftung des Keims an das mütterliche Gewebe.
- Drittens bildet das Endometrium Pinopodien aus. Diese kugelförmigen Vorsprünge an der apikalen Oberfläche des Uterusepithels entziehen Flüssigkeit in der Adhäsionsregion und verhindern so das Wegwaschen der Blastozyste (Ordi et al. 2003, Fitzgerald et al. 2007).

Die Invasion wird u.a. durch proteolytische Enzyme des ST sowie den Fas/FasL-Weg (siehe 1.7.6.1) sichergestellt. Sie lösen die Apoptose um die Blastozyste aus. Auf diese Weise ist der Keim in der Lage, immer weiter in das Endometrium einzudringen und so die Dezidualreaktion auszulösen (Kayisli et al. 2003, Moore und Persaud 2007). Hierbei wandelt sich das Endometrium in die Dezidua graviditatis um (siehe 1.5). Es erfolgen diverse zelluläre und vaskuläre (Moore und Persaud 2007) Veränderungen, die der Implantation dienen. So transformieren sich z.B. die endometrialen Stromazellen zu größeren runden Dezidualzellen (Ramathal et al. 2010).

Ein weiterer positiver Effekt der Apoptose ist, dass sich der Keim von den entstehenden Zelltrümmern (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate) ernähren kann. Die Summe aus den Zelltrümmern und dem glykogenreichen Drüsensekret gewährleistet eine gute nutritive Versorgung bis zur Anbindung an den mütterlichen Blutkreislauf (Moore und Persaud 2007).

Neben den Enzymen spielen auch Zytokine, wie der transformierende Wachstumsfaktor (TGF) β und der Leukämie-inhibierende Faktor (LIF), eine große Rolle bei der Invasion. TGF- β z.B. wird vermehrt bei der Dezidualreaktion exprimiert und hat u.a. ebenso die Aufgabe der dezidualen Apoptoseeinleitung um den Keim (Jones et al. 2006, Dimitriadis et al. 2005, Trück 2009).

Ist die Invasion in Gang gebracht, kommt es bereits am 9. Tag nach der Befruchtung zur Vakuolenausbildung im Endometrium. Diese Lakunen sind mit mütterlichem Blut von arrodieren maternalen Gefäßen, glykogenreichem Sekret und Nährstoffen gefüllt.

Sie verbinden sich durch ihr rasches Wachstum bereits einen Tag später zu einem lakunären Netzwerk und ergeben nach vollendeter Bildung der Zotten den intervillösen Raum.

Am 10. Tag nach der Befruchtung ist der Implantationsvorgang vollständig abgeschlossen, der ST ist mit dem mütterlichen Gewebe gänzlich fusioniert. Endometriales Gewebe verschließt nun noch die Implantationsstelle unter Bildung eines fibrinhaltigen Verschlusspfropfes, der bis zu zwei Tagen optisch nachweisbar ist (Moore 1996).

1.4 Dezidua graviditatis

Die Dezidua graviditatis lässt sich in vier Regionen einteilen (siehe Abb. 1.2):

- Die Dezidua basalis, die direkt über den Chorionzotten (ab der 14. Schwangerschaftswoche bezeichnet man sie als Plazentazotten) liegt.
- Die Dezidua capsularis, die sich an der Chorionseite, die keine Zotten ausgebildet hat, befindet. Sie liegt gegenüber der Dezidua basalis.
- Die Dezidua marginalis, welche Ausläufer der Dezidua basalis darstellen.
- Die Dezidua parietalis, die alle übrigen Deziduateile ausmacht

(Sohn und Holzgreve 2012).

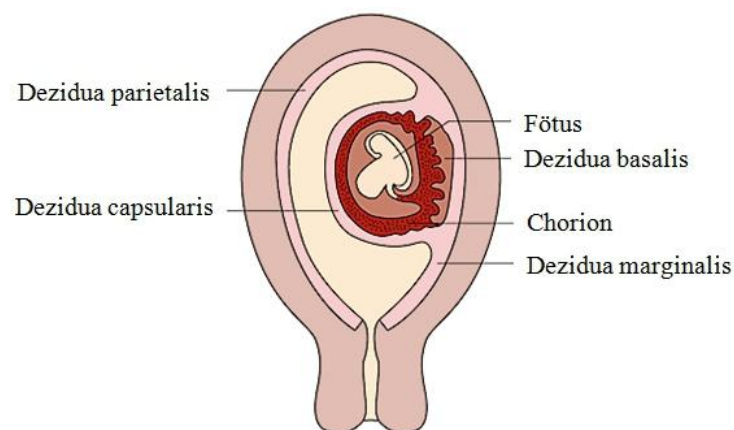


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Dezidua graviditatis (mod. n. URL: http://histologi.haidl.se/Kapitel_22_-_Placenta)

Die Dezidua beherbergt neben Stromazellen (etwa 30%) v.a. Immunzellen (ca. 70%). Letztere lassen sich nach Häufigkeit absteigend unterteilen in:

- deziduale NK-Zellen,
- Makrophagen und
- T-Lymphozyten, wovon zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen im Vergleich zu T-Helferzellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen wesentlich häufiger vorzufinden sind (Geis und Dietl 2001, King et al. 1996).

1.5 Plazentation

Gegen Ende der zweiten Woche wandern ZT-Zellen in die Ausläufer des ST, was zur Ausbildung der Primärzotten führt. Auf diese Weise ist der uteroplazentare Kreislauf hergestellt. Innerhalb der nächsten Woche wandert Mesoderm des Chorions (die äußere Schicht der Fruchthülle des Embryos) in zytotrophoblastische Zentren der Primärzotten ein, die Sekundärzotten entstehen. Am Ende der 3. Woche kommt es zur Ausbildung von Tertiärzotten, indem Blutgefäße in die Sekundärzotten hineinwachsen (Kirsch 2007, Moore 1996).

Die neu entstandenen Gefäße verbinden sich schnell mit denen des mütterlichen Kreislaufs und ergeben ein arterio-kapillär-venöses Netzwerk (Moore 1996).

Bis zur 8. Woche ist die gesamte Chorionhaut von Zotten bedeckt. Da der Fötus und die Chorionhöhle kontinuierlich wachsen, sind die Zotten im Bereich der Dezidua capsularis stetigem Druck ausgesetzt und werden dementsprechend schlecht vaskularisiert.

Die Folge ist die Rückbildung der Zotten, so dass nun ein glatter Bereich entsteht, das Chorion laeve. Die gegenüberliegende Seite, der Bereich der Dezidua basalis, entwickelt sich mit ihren Zotten stetig weiter, was ihr den Namen Chorion frondosum verschafft (Moore und Persaud 2007).

Die Plazenta erfährt bis zur 20. Woche eine Größen- und Volumenzunahme. Von diesem Zeitpunkt an nimmt sie 15-30 % der Deziduaoberfläche ein und der ST bedeckt Zotten mit einer Oberfläche von 10 m² (Schleußner und Seewald 2002).

1.6.1.2 Chorionplatte

Sie ist der fetale Anteil der Plazenta und befindet sich zwischen Amnionhöhle und intervillösem Raum. Sie kann in 4 Schichten unterteilt werden (von peripher nach zentral): Amnionepithel, Bindegewebe mit fetalen Gefäßen, ZT-Zellschicht und ST-Zellschicht (Kirsch 2007). Vom Choriongewebe entspringen die Zotten (siehe 1.6.1.4).

1.6.1.3 Intervillöser Raum

Er stellt den Raum zwischen mütterlichem und kindlichem Kreislauf dar. Er befindet sich zwischen der Basal- und Chorionplatte und ist mit bis zu 750 ml maternalem Blut gefüllt (Schleußner und Seewald 2002). Aus diesem Reservoir ernährt sich der Fötus.

1.6.1.4 Zotten

Die Zotten erstrecken sich von der Chorionplatte bis in den intervillösen Raum, die Haftzotten sogar bis zur Basalplatte. Sie haben eine baumähnliche Verzweigungsstruktur. In einer reifen Plazenta befinden sich zwischen 30-50 dieser Zottenbäume (Kirsch 2007). Sie machen etwa 50% des Gesamtgewichtes aus (Rath et al. 2010).

1.6.1.4.1 Zottenaufbau

Eine Zotte, auch Villus genannt, besteht von peripher nach zentral aus folgenden Schichten:

- dem ST,
- einem Monolayer von villösen ZT (Langhans-Zellen),
- der Basalmembran des Trophoblasten sowie
- dem villösen Stroma (Moore und Persaud 2007, Welsch 2006).

Das villöse Stroma enthält folgende Bestandteile (Rath et al. 2010):

- Mesenchymalzellen und Fibroblasten: Sie sezernieren die extrazelluläre Matrix.
- Myofibroblasten: Sie differenzieren sich aus Fibroblasten und übernehmen regenerative Aufgaben (Strakova et al. 2009).
- Hofbauer-Zellen: Diese sind als fetale Makrophagen der Plazenta mit 10×10^6 pro 20 g plazentarem Nassgewicht reichlich vorhanden (Wetzker et al. 1999). Die Hofbauerzellen sind nicht nur bei entzündlichen Reaktionen beteiligt und dienen zur Phagozytose sondern sie synthetisieren ebenso Zytokine, die das Wachstum und die Differenzierung der Trophoblasten (in vitro) und somit das der Zotten steuert (Makrigiannakis et al. 2008, Tang et al. 2011, Khan et al. 2000, Schleußner und Seewald 2002).
- Gefäße.

1.6.1.4.2 Zottenbaum

Die Villi lassen sich nach Art der Aufzweigung unterteilen in:

- Stammzotten: Sie stellen den größten Zottentypen dar und machen etwa $\frac{2}{10}$ der Gesamtzotten aus. Die Stammzotten sind für die mechanische Stabilisierung der Zottenbäume unabdingbar. Außerdem beinhalten sie fetale Arterien und Venen, die die Grundversorgung des Fötus sichern, wobei der eigentliche Stoffaustausch erst in den Intermediär- und Terminalzotten stattfindet.
- Intermediärzotten: Sie sind Abgänge von den Stammzotten und stellen bis zu $\frac{3}{10}$ der Gesamtzotten dar. In ihnen verlaufen Arteriolen, Venolen und vereinzelte Kapillaren.
- Terminalzotten: Sie gehen aus den Intermediärzotten hervor und sind die feinsten Aufzweigungen innerhalb des Zottenbaumes. Sie nehmen den größten Anteil unter den Zottenarten ein (bis zu $\frac{4}{10}$). Ihre Kapillaren befinden sich eng an dem ZT-Mantel, um so einen schnellen und effizienten Stoffaustausch zu gewährleisten.
- Den Rest der Zotten machen Mesenchymal- und unreife Intermediärzotten als Vorläufer von Intermediär- und Stammzotten aus. Nicht alle dieser Zotten differenzieren sich in die definitiven Villitypen, so dass eine Restzahl an diesen Vorläuferzotten bestehen bleibt.
- Haftzotten (siehe Abb. 1.4): Sie stellen eine Sonderform dar und verbinden die Stammzotten fest mit der Dezidua basalis. Dadurch wird eine konstante Dicke und Höhe der Plazenta sichergestellt (Rath et al. 2010). Die Haftzotten entstehen dadurch, dass der ST am dezidualen Ende einer Terminalzotte abstirbt (Rudloff 2008). Diese Tatsache ermöglicht den villösen zytotrophoblastischen Stammzellen, sich zu extravillösen ZT zu differenzieren. Sie migrieren in die Basalplatte und bilden zwischen ihr und dem dezidualen Ende der Terminalzotte mehrschichtige Zellsäulen aus (Pollheimer und Knöfler 2005, James et al. 2005). Von hier aus invadieren die extravillösen ZT immer weiter in die Dezidua. Je nach Invasionsort unterscheidet man nun zwischen interstitiellen und endovaskulären ZT (siehe Abb. 1.4). Erste befinden sich in Dezidua und Myometrium. Einige dieser ZT fusionieren zu standortfesten, multinukleären Riesenzellen. Letztere hingegen invadieren über die Gefäßwände der Arterien (intramurale Trophoblasten) in deren Lumina und ersetzen das mütterliche Endothel (Rudloff 2006, Rath et al. 2010). Auf diese Weise sichern sie dem Fötus eine Versorgung, weitestgehend unabhängig von Blutdruckschwankungen der werdenden Mutter (Lunghi et al. 2007, Zhou et al. 1997, Hunt 2006, Bischof und Irminger-Finger 2005).

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die extravillösen ZT durch ihre Migration und Invasion ubiquitär außerhalb der Villi in und um die Plazenta anzutreffen sind. Sobald die differenzierten ZT-Zellen an ihrem Bestimmungsort angekommen sind, verlieren sie die Fähigkeit zur Proliferation. Auf diese Weise wird einer ungehemmten „Metastasierung“ vorgebeugt (Rath et al. 2010).

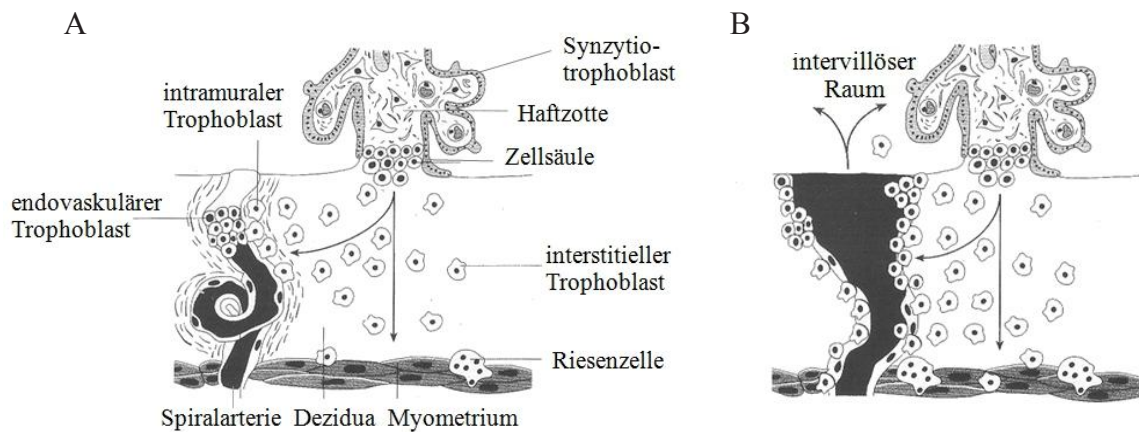


Abb. 1.4: Invasion der extravillösen Zytotrophoblastzellen (mod. n. Rath et al. 2010)

A: Vor der 10. Schwangerschaftswoche haben die extravillösen Zytotrophoblasten, ausgehend von den Zellsäulen, die Dezidua durchquert (interstitieller Trophoblast und Riesenzellen), Gefäße erreicht (intramuraler Trophoblast) und sind in das Gefäßlumen eingewandert (endovaskulärer Trophoblast).

B: Nach der 12. Schwangerschaftswoche lösen sich die Zellhaufen in den Spiralarterien auf und maternales Blut kann in den intervillösen Raum einströmen (Rath et al. 2010).

1.6.2 Funktionen

Wichtige Funktionen der Plazenta sind:

- der Austausch von Nährstoffen, Gasen und Antikörpern zwischen werdender Mutter und Fötus,
- die Hormonbildung,
- die Synthese von Glykogen, Cholesterin und Fettsäuren,
- die Beeinflussung des Immunsystems sowie
- die Ausbildung und das Aufrechterhalten der Plazentaschranke (Moore und Persaud 2007, Kirsch 2007).

1.6.2.1 Die Plazentaschranke

Da sich diese Arbeit mit der Adhäsion und Invasion maternaler Leukämiezellen auf den Fötus beschäftigt und das (Nicht-) Vorhandensein der Plazentaschranke dafür enorm von Bedeutung ist, soll sie an dieser Stelle dargestellt werden.

Die Plazentaschranke trennt den mütterlichen vom kindlichen Kreislauf und hat die Aufgabe, einen kontrollierten Stoffaustausch zu gewährleisten.

Sie setzt sich aus 6 Komponenten zusammen und ist in Abb. 1.5 grafisch dargestellt:

1. dem Synzytium,
 2. dem ZT (Rückbildung nach dem 4. Schwangerschaftsmonat),
 3. der epithelialen Basalmembran,
 4. dem Bindegewebe der Zotte,
 5. der endothelialen Basalmembran und
 6. dem fetalen Endothel
- (Schumacher und Christ 1993).

Am Anfang der Schwangerschaft ist die Plazentaschranke dichter und undurchlässiger als zum Ende hin. Der Grund dafür sind die gealterten ZT um die Zottenbäume. Sie proliferieren ab dem 4. Schwangerschaftsmonat nicht mehr und führen zu einer stetigen Annäherung zwischen Zottenendothel und intervillösen Raum.

Die Plazentaschranke ist u.a. durchlässig für Hämoglobin, Immunglobulin G (IgG) und Nährstoffe, wie Aminosäuren, freie Fettsäuren, Kohlenhydrate und Vitamine. Aber auch potentiell gefährliche Substanzen können die Plazenta durchqueren. Hierzu zählen Alkohol, Nikotin, Kohlenstoffmonoxid sowie Medikamente und deren Abbauprodukte. Ebenso einige Bakterien (wie Chlamydien und Klebsiella) und Viren (wie der Zytomegalie-Virus und der Herpes-simplex-Virus Typ 2) machen vor der Plazentaschranke keinen Halt. Sie können großen plazentaren und fetalen Schaden anrichten. Folgeerscheinungen bei Infektionen mit den oben genannten Erregern können z.B. eine Villitis und Plazentitis sein (Moore und Persaud 2007, Johnson et al. 1985, Chatterjee et al. 2001, Schneider und Miller 2010, Sheikh et al. 2005). Aber auch diverse Erkrankungen der werdenden Mutter, wie Diabetes mellitus und Schwangerschaftshypertonie, können u.a. zu einer Villitis führen (Baker et al. 2008). Ist das Gewebe der Plazenta geschädigt, findet ein erleichterter Übertritt vieler Stoffe und Substanzen von der maternalen auf die fetale Plazentaseite statt (Hemmings et al. 1998, Baker et al. 2008).

Daneben sind auch Tumorzellen in der Lage die Plazentaschranke zu durchqueren. Allerdings ist bis heute nicht bekannt, wie diese Transmigration verwirklicht wird, ob über geschädigte Plazentastrukturen oder über destruktive Mechanismen (siehe 5.4). Gerade aus diesem Grund kommt den Leukämiezellen als ein Vertreter fortan besondere Aufmerksamkeit zu. Sie stellen zusammen mit der Plazenta und dem Perfusionsapparat die zentrale Komponente dieser Arbeit dar.

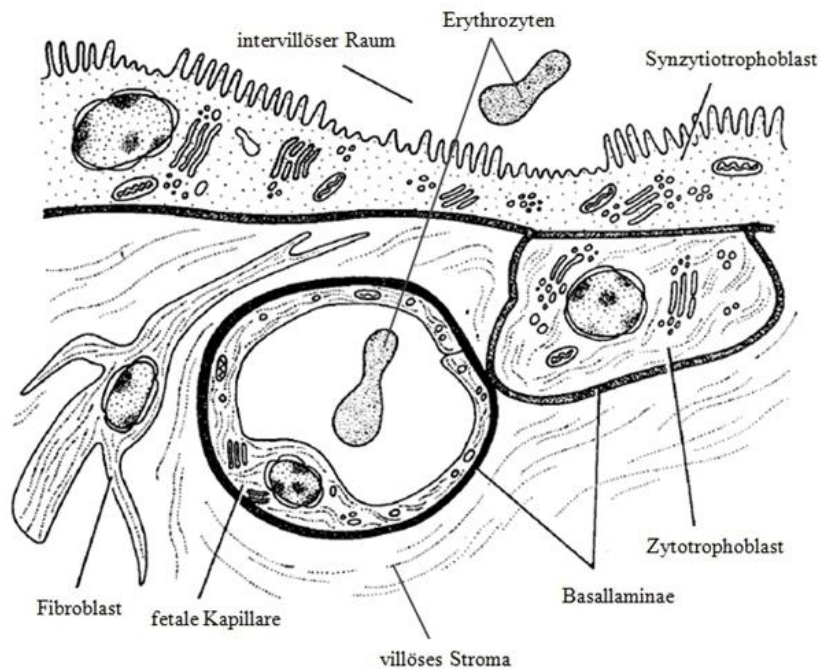


Abb. 1.5: Ultrastruktur der Plazentaschranke nach dem 4. Schwangerschaftsmonat (mod. n. Billington 1992)

Der ST mitsamt seiner Basallamina trennt den mütterlichen vom kindlichen Kreislauf und gewährleistet so (weitestgehend) einen kontrollierten Stoffaustausch.

1.7 Der Fötus als „Eindringling“

In der Schwangerschaft ist das Immunsystem der werdenden Mutter einem großen Zwiespalt ausgesetzt: einerseits muss es den Fötus als Semi-Allograft akzeptieren, quasi als eine tumorähnliche Struktur, andererseits muss es gegen Noxen und Tumorerkrankungen ankämpfen (Ermisch 2010). Aus diesem Grund müssen gewisse Veränderungen stattfinden, um eben diesen Balanceakt zu meistern.

Mor und Cardenas beschreiben die Immunologie der Schwangerschaft als Resultat aus der Kombination von Signalen und Antworten, die vom mütterlichen Immunsystem und dem fetal-plazentaren Immunsystem stammen, mit dem Ziel, dem Embryo ein gesichertes Heranwachsen zu gewährleisten (Mor und Cardenas 2010).

Im Folgenden werden ausgewählte Faktoren zur fetalen Akzeptanz dargestellt.

1.7.1 Humanes Leukozyten-assoziiertes Antigen

In diesem Zusammenhang ist der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) von großer Bedeutung. Er ist im Genom verankert und kodiert Antigene auf der Zelloberfläche. Mit Hilfe dieser Antigene kann das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden. Der MHC wird beim Menschen auch als Humanes Leukozyten-assoziiertes Antigen (HLA) bezeichnet. Man unterscheidet zwischen zwei MHC-Klassen: Der MHC-Klasse-I-Komplex befindet sich auf fast allen kernhaltigen Zellen des Körpers, der MHC-Klasse-II-Komplex auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) (Horn et al. 2005).

Eine Ausnahme stellen die fetalen Gewebe und placentaren Anteile, die mit dem maternalen Gewebe in direktem Kontakt stehen, dar. Auch die villösen ZT, die durch den ST vom maternalen Kreislauf abgeschirmt sind, fallen darunter, denn sie alle exprimieren keinen MHC. Dies hat zur Folge, dass den $\alpha\beta$ -T-Zellen (zytotoxische Zellen), die mit 65-75% den Hauptanteil der T-Zellen im mütterlichen Organismus ausmachen, keine Oberflächenmoleküle des Embryos präsentiert werden und somit eine Interaktion zwischen beiden Organismen ausbleibt (Mincheva-Nilsson 2003).

Lediglich die extravillösen ZT-Zellen, die in die Dezidua basalis, das Myometrium und die Spiralarterien eindringen, synthetisieren MHC-Ib-Antigene. Das in der Literatur am meisten beschriebene ist das HLA-G, ein Antigen mit mannigfaltigen Wirkungen (Mincheva-Nilsson 2003, Geis und Dietl 2001, Hofmeister 2004, Rebmann et al. 2010, Holtz et al. 2003, Szekeres-Bartho 2002).

Hervorzuheben ist dessen Wirksamkeit gegen mütterliche Immunzellen, die für den Fötus potentiell gefährlichen sind. Bei z.B. den Th1-Zellen (siehe 1.7.4) verringert HLA-G die Bildung von schwangerschaftsgefährdenden Zytokinen. Zudem fördert HLA-G die Sekretion von Interleukin (IL) -10 und dient somit dem Shift in Richtung der Th2-Zytokine (Mußil 2005 [siehe 1.7.4 und Tab. 1.1]).

Die zytotoxischen Zellen stellen eine weitere Gruppe der Immunzellen dar, mit denen HLA-G interagiert. Es führt einerseits zur Herunterregulierung der $\alpha\beta$ -T-Zell-mRNA, die für die Expression der T-Zell-Rezeptoren zuständig ist (Morales et al. 2003) und andererseits zur Apoptose der zytotoxischen Zellen über den Fas/FasL Signalweg (Hunt et al. 2005, Makrigiannakis et al. 2008 [siehe 1.7.6.1]).

HLA-G interagiert des Weiteren mit APCs, wie z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen. Es bindet an spezifische Rezeptoren und fördert die Sekretion von immunsuppressiven Substanzen, wie IL-10 und TGF- β (Hunt et al. 2005, Makrigiannakis et al. 2008 [siehe 1.7.4]).

Auch an die NK-Zellen und deren Interaktion mit HLA-G sei an dieser Stelle gedacht. Es existieren diesbezüglich konträre Ansichten (Koopman et al. 2003, Riley und Yokoyama 2008, Donadi et al. 2011). Die eine Gruppe der Wissenschaftler postuliert, dass HLA-G an die NK-Zellen bindet und sie damit inhibiert, bzw. sogar in die Apoptose treibt. Folglich werden die Trophoblasten vor einer NK-Zell-vermittelten-Schädigung geschützt (Aluvihare et al. 2005, Sacks et al. 1999, Mußil 2005, Ermisch 2010). Die andere Gruppe vermutet hingegen, dass HLA-G an spezifische Rezeptoren der NK-Zellen bindet und die Sekretion von schwangerschaftsfördernden Molekülen, wie LIF, bewirkt (Hunt et al. 2005, Makrigiannakis et al. 2008, Moffett-King 2002). In jedem Falle dient aber der Mechanismus dem Überleben des Fötus.

Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass die HLA-G-Expression umgekehrt mit dem Auftreten von Fehlgeburten, Krankheiten, wie z.B. der Präeklampsie (Aldrich et al. 2001) sowie viralen Infektionen, wie HIV und dem Zytomegalie-Virus, korrelieren kann. Niedrige Konzentrationen begünstigen die Infektion, wohingegen hohe Konzentrationen eher eine Prävention herbeiführen (Donadi et al. 2011, Fisher et al. 2000).

1.7.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Neben den in Punkt 1.7.1 angesprochenen zytotoxischen T-Zellen stellen die $\gamma\delta$ -T-Zellen eine weitere Subpopulation der T-Zellen dar. Sie nehmen zwar nur einen geringen Teil der Gesamtpopulation ein (1-10%), tragen aber einen entscheidenden Teil zum Nichtabstoßen des Fötus bei (Mincheva-Nilsson 2003). Die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten haben ein anderes Aktivierungsspektrum und beschränken sich nicht nur auf die klassischen HLAs, so wie es bei den $\alpha\beta$ -T-Zellen der Fall ist. Sie werden stattdessen durch Antigene des nichtklassischen HLA-Gs (Szekeres-Bartho 2002) und durch unprozessierte, nicht peptidische Antigene, wie den Alkylamiden oder Organophosphaten (Kamath et al. 2003), angeregt. Beide Stoffgruppen kommen physiologischerweise im Körper vor, auch im nicht schwangeren Zustand.

In der proinflammatorischen Schwangerschaftsphase (siehe 1.7.4) sezernieren (murine) $\gamma\delta$ -T-Zellen u.a. die beiden Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) $-\alpha$ und Interferon (IFN) $-\gamma$. In der symbiotischen Phase produzieren sie hingegen schwangerschaftsfördernde Moleküle, wie TGF- β , Il-1 β , -6 und -10 (Mincheva-Nilsson 2003). Bedeutende Wirkungen der erwähnten Moleküle sind in Tab. 1.1 zusammengetragen.

Neben den gerade erwähnten Zytokinen exprimieren die $\gamma\delta$ -T-Zellen auch CTLA4, ein Protein, wie es T-Helferzellen auf ihrer Oberfläche aufweisen. Es führt zur Inhibierung der zytotoxischen T-Zellen (Rupp 2005, Mincheva-Nilsson 2003).

1.7.3 Indoleamin-2,3-dioxygenase

Ein wichtiges Enzym für die Immunsuppression ist die Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO). Sie wird u.a. vom ST, uterinen Drüsen und APCs sezerniert. Induktor der Synthese ist das IFN- γ (Blaschitz et al. 2011, Rupp 2005, Makrigiannakis et al. 2008). IDO bewirkt den Abbau von Tryptophan über eine Kynureninkaskade zu Acetoacetat (Horn et al. 2005 [siehe Abb. 1.6]).

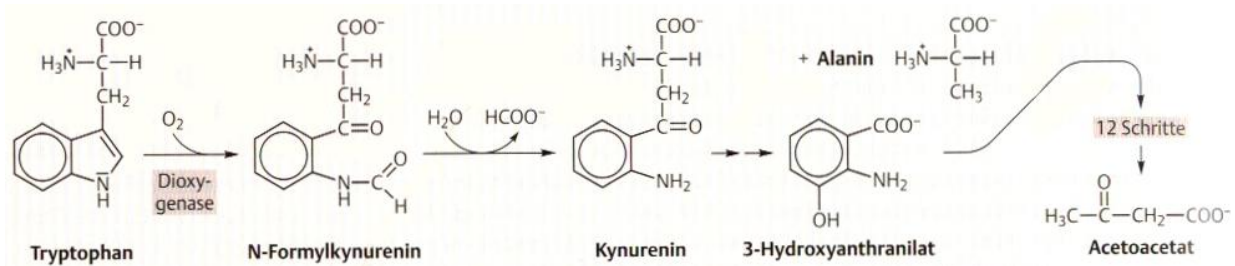


Abb. 1.6: Tryptophanabbau (aus Rassow et al. 2006)
Über Zwischenschritte wird Tryptophan zu Acetoacetat abgebaut.

Die Immunsuppression wird nicht nur durch den entstehenden Tryptophanmangel bewirkt sondern auch durch die bioaktiven Tryptophanderivate (Dai und Zhu 2010). So kommt es durch den Mangel an Tryptophan zur reversibel verminderten T-Zell-Proliferation (Terness et al. 2007, Kudo et al. 2001, Aluvihare et al. 2005) und zur reversiblen Hemmung der natürlichen Killerzellen durch Kynurenin (Rupp 2005, Terness et al. 2007).

Darüber hinaus kann es durch eine erhöhte IDO-Konzentration in der Schwangerschaft sogar zur T-Zell-Anergie (ausbleibende Immunreaktion) kommen (Reipen 2009).

1.7.4 Th2-Phänomen

Wie bereits zuvor erwähnt, beeinflussen Zytokine das mütterliche Immunsystem in großem Maße. Es sind Glykoproteine, die im Körper eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. An dieser Stelle wird eine Auswahl immunmodulatorisch aktiver Zytokine dargestellt.

Die T-Helferzellen können nach ihrer Zytokinproduktion in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Die Typ-I-T-Zellen (Th-1-Zellen) und die Typ-II-T-Zellen (Th-2-Zellen). Erstere synthetisieren u.a. IL-2 und -12, TNF- α und - β sowie IFN- γ (Wegmann et al. 2003, Mor und Cardenas 2010), letztere hingegen u.a. IL-3, -4, -6, -10 und -13 (Geis und Dietl 2001, Chaouat et al. 2004, Wegmann et al. 1993). Die Wirkungen der von den beiden T-Helferzellpopulationen synthetisierten Zytokine sind größtenteils gegensätzlich.

Die Th-1-Zytokine lösen inflammatorische, zytotoxische Reaktionen aus (Ermisch 2010, Chaouat et al. 2004). Sie sind schwangerschaftsschädigend und führen u.a. zur intrauterinen

Wachstumsretardierung (IUGR), zu Störungen der trophoblastischen Funktion und Entwicklung sowie zur Beeinträchtigung des Fötus bis hin zum Abort (Geis und Dietl 2001). Die Th-2-Zytokine halten die Schwangerschaft aufrecht (Szekeres-Bartho 2002, Geis und Dietl 2001).

Th-1-Zellen sind nicht grundsätzlich die „bad guys“ (Chaouat et al. 2004). Die Schwangerschaft besteht aus drei immunologischen Phasen: Während der Implantation, Plazentation und initialen Entwicklung des Fötus stellt die Gebärmutter ein inflammatorisches „Schlachtfeld“ dar. In dieser 1. Phase sind Th-1-Zytokine notwendig, um die vom Keim verursachten dezidualen Läsionen zu regenerieren und ein antimikrobielles Milieu für den Fötus zu schaffen. Die zweite Phase beginnt Anfang des ersten Trimesters und ist durch schnelle fetale Wachstums- und die Entwicklungsvorgänge charakterisiert. Die Schwangere ist in diesem Stadium mit ihrem Allograft in einer symbiotischen Beziehung. Die letzte Phase setzt zur Geburt des Kindes ein. Es ist nun völlig entwickelt und bereit, das Licht der Welt zu erblicken. Daher setzt eine erneute inflammatorische Phase ein, die durch die Kontraktion des Uterus sowie der Entbindung des Kindes mitsamt der Plazenta gekennzeichnet ist (Mor und Cardenas 2010, Saito 2000, Geis und Dietl 2001). Während der beiden proinflammatorischen Phasen überwiegen die Th1-Zytokine, bei der symbiotischen Phase besteht ein Shift zugunsten der Th-2-Zytokine (Ermisch 2010). Somit ist die Zytokinproduktion abhängig vom jeweiligen Schwangerschaftsstadium und dient dem optimalen Gedeihen des Fötus. Die beiden Zelltypen inhibieren sich während der unterschiedlichen Schwangerschaftsstadien gegenseitig (Svensson et al. 2001, Wegmann et al. 1993). So z.B. hemmt IL-10 die IFN- γ -Synthese und Ausschüttung in der symbiotischen Phase (Wegmann et al. 1993).

Tab. 1.1 gibt einen Einblick über die Komplexität einiger Zytokine und deren Wirkungen.

Tab. 1.1: Ausgewählte Zytokine und deren Wirkungen (mod. n. Geis und Dietl 2001)

Zytokin	Funktion
IL-1-β (Th-1-Zytokin, Doria et al. 2012)	Induktion der Frühgeburtlichkeit, Kontrolle der Trophoblastenimplantation, indem es u.a. die Integrinexpression auf der Trophoblastenoberfläche hochreguliert und so zur gesteigerten endometrialen Adhäsion beiträgt (Dimitriadis et al. 2005)
IL-2 (Th-1-Zytokin)	Wachstumsretardierung, Abortinduktion, fetale Resorption, Störung der Embryonalentwicklung, Störung des Trophoblastenwachstums und der Trophoblastenfunktion, Effektor der späteren Hypersensibilitätsreaktion und Phagozytose-vermittelten Zellabwehr, Schutz vor bakteriellen und viralen Infektionen, Induktor von IFN- γ , Aktivierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen, Aktivierung von dezidualen NK-Zellen (Wegmann et al. 1993)

Tab. 1.2: Ausgewählte Zytokine und deren Wirkungen (mod. n. Geis und Dietl 2001)

Zytokin	Funktion
IL-3 (Th-2-Zytokin, Chaouat et al. 2004)	Regulation von Trophoblastenwachstum und –differenzierung, fördert das Überleben des Fötus
IL-4 (Th-2-Zytokin)	Aktivierung von Th-2-Zellen, fördert das Überleben und Wachstum des Fötus sowie die humane Choriongonadotropin (hCG) -Ausschüttung aus dem Trophoblasten, Differenzierung von Th-0-Zellen (Vorläuferzellen) zu Th-2-Zellen, Stimulation der IgE und IgG-Produktion
IL-6 (Th-2-Zytokin)	Effektor der humoralen Immunantwort, Regulation maternaler endokriner Funktionen, Modulation der Trophoblastenfunktion, Hemmung verschiedener Makrophagenfunktionen, fördert die hCG-Ausschüttung aus dem Trophoblasten
IL-10 (Th-2-Zytokin)	Aktivierung von Th-2-Zellen, Differenzierung von Th-0-Zellen (Vorläuferzellen) zu Th-2-Zellen, fördert das Überleben und Wachstum des Fötus, Inhibition von Th-1-Zytokinen (Szekeres-Bartho 2002), Immunsuppression durch Herunterregulieren der $\alpha\beta$ -T-Zell-Proliferation (Hunt et al. 2005), Stimulation der Sekretion durch HLA-G-Expression (Donadi et al. 2010, Mußil 2005), Induktion von VEGF führt zur Vaskulogenese (Thaxton und Sharma 2010)
IL-12 (Th-1-Zytokin, Ermisch 2010)	Aktivierung von Th-1-Zellen, Induktor von IFN- γ
IL-13 (Th-2-Zytokin)	Effektor der humoralen Immunantwort, Regulation maternaler endokriner Funktionen, Modulation der Trophoblastenfunktion, Hemmung verschiedener Makrophagenfunktionen
TNF-α (Th-1-Zytokin)	Induktion der Frühgeburtlichkeit, fetale Resorption, Wachstumsretardierung, Störung der Embryonalentwicklung, Störung des Trophoblastenwachstums und der Trophoblastenfunktion
IFN-γ (Th-1-Zytokin, Wegmann et al. 1993)	Wachstumsretardierung, Abortinduktion, fetale Resorption, Störung der Embryonalentwicklung, Störung des Trophoblastenwachstums und der Trophoblastenfunktion, Aktivierung von Th-1-Zellen, Effektor der späteren Hypersensibilitätsreaktion und Phagozytose-vermittelten Zellabwehr, Schutz vor bakteriellen und viralen Infektionen, Makrophagenrekrutierung, Differenzierung von Th-0-Zellen zu Th-1-Zellen, Aktivierung dNK-Zellen (Wegmann et al. 1993) und $\alpha\beta$ -T-Zellen sowie Inhibierung der Th-2-Zell-Proliferation (Szekeres-Bartho 2002)
TGF-β (Th-2-Typ-Zytokin, Gorczynski et al. 2002)	Kontrolle der Trophoblasteninvasion, Verhinderung von Frühgeburtlichkeit, fördert das Überleben und Wachstum des Fötus, Immunsuppression durch Herunterregulieren der $\alpha\beta$ -T-Zell-Proliferation (Hunt et al. 2005)

1.7.5 Hormone

Mit Beginn der Schwangerschaft verändert sich der innere Hormonhaushalt der Frau grundlegend.

So fängt sie z.B. an, das Steroidhormon Progesteron zu produzieren. Bis zum 4. Schwangerschaftsmonat wird es aus dem Corpus luteum (der kleine Bereich des Ovars, der nach der Ovulation aus dem Follikel hervorgeht und Östrogen und Progesteron synthetisiert) freigesetzt, danach aus der Plazenta (Moore und Persaud 2007, Sadler 2003). Progesteron ist wichtig für die erfolgreiche Implantation und Entwicklung des Keims (Geis und Dietl 2001), da es u.a. zur gesteigerten Synthese von IL, wie LIF und dem Makropagen Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) führt (Arck et al. 2007 [siehe 1.7.6.3]).

Progesteron beeinflusst zudem das Th1/Th2-Gleichgewicht, indem es v.a. an der fetomaternalen Grenzfläche die Umwandlung von Th0-Zellen in Th2-Zellen bewirkt. Folglich werden Th2-Zytokine mit ihren anti-abortiven Eigenschaften sezerniert (Geis und Dietl 2001, Szekeres-Bartho 2002) und die Sekretion von Th1-Zytokinen reduziert (Saito 2000). Progesteron führt des Weiteren zu einer Steigerung der HLA-G-Produktion (Arck et al. 2007). Während der Schwangerschaft werden die Progesteronrezeptoren auf den Lymphozyten hochreguliert (Ermisch 2010). Bindet das Hormon am entsprechenden Rezeptor, kommt es zur Synthese vom Progesteron-induzierten Blockierfaktor (PIBF). Er ist genau wie Progesteron ein effizienter Induktor der Immunsuppression. PIBF bewirkt einerseits den Shift in Richtung der Th2-Zytokine (Hudić et al. 2009, Arck et al. 2007) und andererseits inhibiert er die Arachidonsäuresynthese (Szekeres-Bartho et al. 2001). Die Arachidonsäure ist die Ausgangssubstanz für die Bildung vieler Entzündungsmediatoren, wie z.B. der Leukotriene oder des Prostaglandins E2 (Horn et al. 2005, Rassow et al. 2006). Des Weiteren hemmt PIBF die Degranulation von NK-Zellen und damit deren zytotoxische Wirkung gegenüber dem Fötus (Mußil 2005, Arck et al 2007).

Ein weiteres wichtiges anti-abortives Hormon ist das hCG. Es wird initial von der Blastozyste sezerniert, später dann vom ST (Schuhmacher et al. 2009). Wichtige Effekte des hCGs sind u.a. die Stimulation der Progesteronproduktion im Corpus luteum (Geis und Dietl 2001), die Aktivierung der Suppressor-Zellen, die gesteigerte Angiogenese durch Induktion der VEGF-Expression, die positive Beeinflussung der Trophoblastendifferenzierung und -migration (Schuhmacher et al. 2009) sowie die gesteigerte Ausschüttung von schwangerschaftsfördernden Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie M-CSF und LIF (Makrigiannakis et al. 2008 [siehe 1.7.6.3]).

1.7.6 Weitere ausgewählte schwangerschaftsfördernde Mechanismen

1.7.6.1 *Fas /Fas-Ligand und Bcl-2*

Fas und sein Ligand (FasL) sind Transmembranproteine, die zur TNF-Superfamilie gehören (Rassow et al. 2006). Fas wird auch als „Death receptor“ (Todesrezeptor) bezeichnet und befindet sich u.a. auf aktivierten Lymphozyten (Aluvihare et al. 2005). Er leitet die Apoptose ein, sobald eine Fas/FasL-Interaktion stattfindet (Tanase 2009). Sobald ein maternaler Lymphozyt mit Fas an den FasL des ST bindet, geht er über eine Caspasesignalkette mittels Apoptose zugrunde (Aluvihare et al 2005).

Der Trophoblast co-exprimiert Fas und FasL. Gerade deswegen benötigt er einen Schutzmechanismus vor autokrin eingeleiteten destruktiven Prozessen (Uckan et al. 1997). Diesen protektiven Effekt besitzt Bcl-2, ein anti-apoptotisches Protein, das neben Fas und FasL vom Trophoblasten exprimiert wird (Uckan et al. 1997, Makrigiannakis et al. 2008, Aluvihare et al. 2005).

Th1-Zytokine, wie TNF- α , fördern die Fas-Expression in den Trophoblasten; Th2-Zytokine, wie IL-6 und -10, erniedrigen die Expression und Sensitivität der Trophoblasten bezüglich der Fas-vermittelten Apoptose (Makrigiannakis et al. 2008). An dieser Stelle sei erneut auf die schwangerschaftsfördernden Eigenschaften der Th2-Zytokine verwiesen.

1.7.6.2 *Galectin-1*

Galectin-1 ist ein Glykan-bindendes Protein und scheint ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Nichtabstoßung des Fötus zu spielen. Es wird hauptsächlich in der frühen Schwangerschaftsphase u.a. von dezidualen NK-Zellen, den ZT und dem ST sezerniert (Kopcow et al. 2008, Koopman et al. 2003).

Es bewirkt einen Th2-Shift sowie eine Steigerung der Progesteron- und PIBF-Synthese (Blois et al. 2007). Galectin-1 bewirkt darüber hinaus die Apoptose aktivierter zytotoxischer T-Zellen (Than et al. 2009, Kopcow et al. 2008).

1.7.6.3 *Die „nicht-Th-Zytokine“ LIF und M-CSF (Chaouat et al. 2004)*

LIF ist bei der Implantation von großer Bedeutung (Dimitriadis et al. 2005) Er wird während der Implantationsphase vom Endometrium und vom Keim produziert (Trück 2009, Dimitriadis et al. 2005). Die Hochregulierung von LIF erfolgt durch IL-4, -1 und Progesteron, gehemmt wird es durch viele Th1-Zytokine.

LIF stimuliert u.a. die hCG-Synthese und trägt so einen entscheidenden Anteil zum Erhalt der Schwangerschaft bei (Fitzgerald 2006, Geis und Dietl 2001).

Ein beeindruckender Versuch mit Mäusen zeigt, dass bei ausgeschaltetem LIF die Implantation und Dezidualreaktion deutlich beeinträchtigt sind. Mit einer LIF-Infusion kann dieses Problem behoben werden (Makrigiannakis et al. 2008).

M-CSF, auch als Colony stimulating factor (CSF) -1 bezeichnet, ist wie LIF ein anti-inflammatorisches Zytokin. Es ist von großer Bedeutung bei der Differenzierung und Proliferation des Trophoblasten, womöglich sogar bei der Implantation (Geis und Dietl 2001, Wegmann et al. 1993). Es wird u.a. von dezidualen Stromazellen, NK-Zellen und vom Endometrium synthetisiert (Saito 2000). Seine Synthese wird durch Östrogen, Progesteron (Saito 2000) und IL-1 (Geis und Dietl 2001) erhöht, wobei es selbst die hCG-Produktion fördert (Geis und Dietl 2001).

Niedrige M-CSF-Konzentrationen im Blut der Schwangeren gehen oft mit spontanen Aborten einher (Makrigiannakis et al. 2008).

1.8 Leukämie

Diese maligne Erkrankung ist dadurch gekennzeichnet, dass Leukozyten und deren aktive Vorstufen vermehrt im Knochenmark gebildet werden und andere Zellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) verdrängen. Es verändert sich nicht nur die Zusammensetzung des Knochenmarks sondern auch die des Blutes. So kann es z.B. wegen des Erythrozytenmangels zu Hypoxien kommen oder wegen der niedrigen Thrombozytenanzahl zu Petechien.

Man unterscheidet die erworbenen Leukämien, die durch neoplastische Vorgänge innerhalb eines Menschen bedingt sind, von den angeborenen Leukämien, die durch die Übertragung entsprechender Zellen von einer Schwangeren auf ihr Ungeborenes übertragen werden.

Aufgrund des Verlaufes differenziert man darüber hinaus zwischen der akuten und chronischen Form. Erstere kann sich rasch entwickeln und führt unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod. Letztere hat, wie der Name schon andeutet, einen langsamen Verlauf mit i.d.R. unspezifischen Symptomen, wie Appetitlosigkeit, Unwohlsein, Ermüdung, Lymphknotenschwellungen und gehäuftem Auftreten von (schweren) Infektionen. Sie ist unbehandelt ebenso tödlich, allerdings kann es Jahre dauern (Matzdorff und Fritze 2009).

Zur genauen Klassifizierung unterteilt man die Leukämien zusätzlich zum Verlauf auch nach der Art der Hämatopoese.

Abb. 1.7 veranschaulicht, welche Entwicklung die einzelnen Blutbestandteile durchmachen. Darauf basierend ergibt sich, aus welchen (Vorläufer-) Zellen die myeloischen und lymphatischen Leukämien hervorgehen.

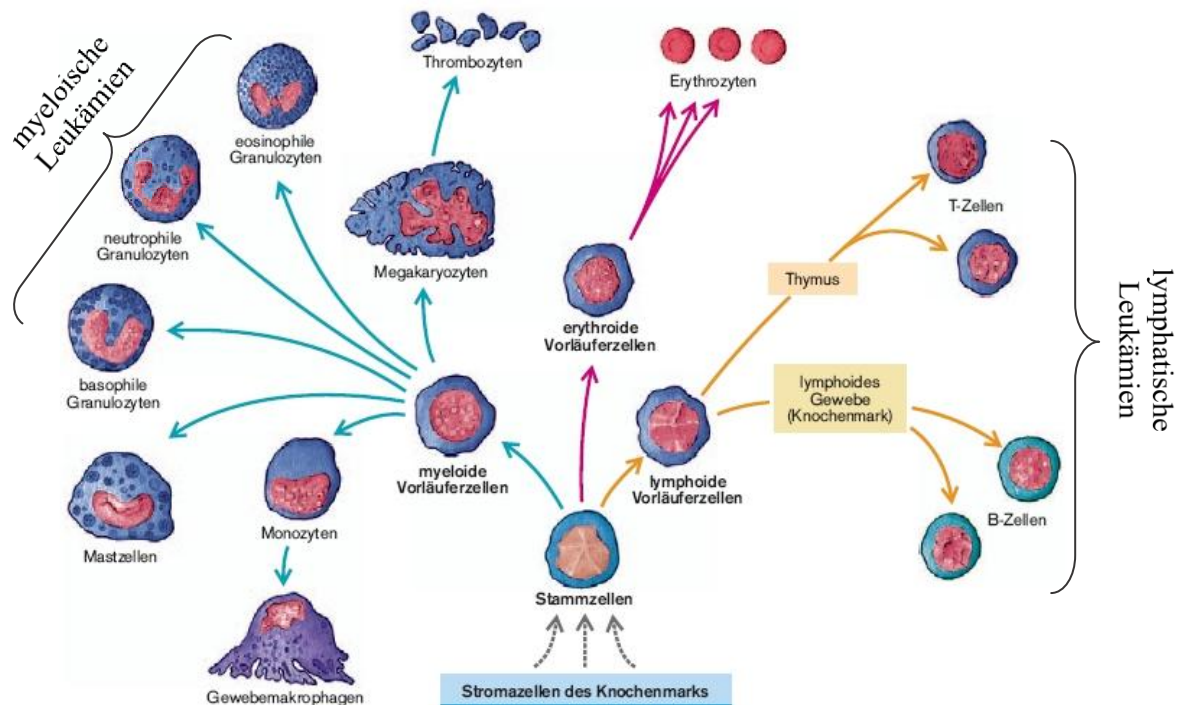


Abb. 1.7: Hämatopoese (Klinke und Silbernagl 2003)

Pluripotente Stammzellen sind Ausgangspunkt für die Entwicklung der Blutzellen. Über erythroide Vorläuferzellen entwickeln sich die Erythrozyten, über myeloide Vorläuferzellen die Granulozyten und über lymphoide Vorläuferzellen die B- und T-Zellen. Myeloische Leukämien entstehen durch ungehemmte Proliferation entdifferenzierter Granulozyten oder entsprechender Vorläuferzellen. Lymphphoide Leukämien haben ihren Ursprung in der ungehemmten Proliferation entdifferenzierter Lymphozyten oder entsprechender Vorläuferzellen.

Die wichtigsten, sich daraus ableitenden Leukämieformen sind:

- die akute myeloische Leukämie (AML),
- die akute lymphatische Leukämie (ALL),
- die chronische myeloische Leukämie (CML) und
- die chronische lymphatische Leukämie (CLL).

Die Ursachen der Leukämien sind weitestgehend unbekannt. Jedoch wirken einige Faktoren begünstigend auf das Entstehen der Krankheit. Hierzu zählen z.B. Erbkrankheiten, wie das Down Syndrom, ionisierende Strahlung sowie Giftstoffe und Zytostatika (Renz-Polster und Krautzig 2008, Matzdorff und Fritze 2009).

Da für diese Arbeit zwei ALL-Zelllinien verwendet wurden, wird jener Leukämietyp fortan dargestellt.

1.8.1 Akute lymphatische Leukämie

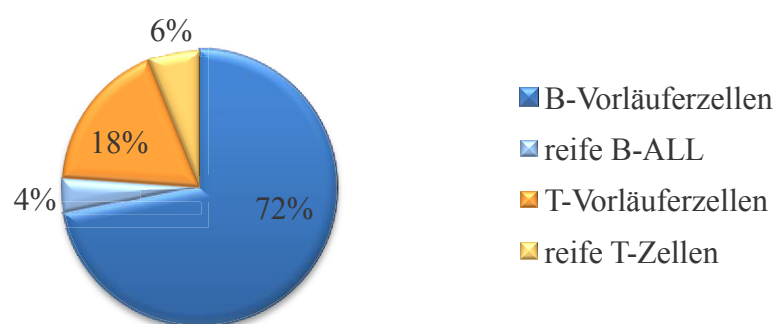
Bei der ALL proliferieren die Vorläuferzellen (Blasten) lymphatischen Ursprungs. Von dieser erworbenen Form der Leukämie sind vorwiegend Kinder betroffen (ca. 80%). Etwa 1,5/100.000 Einwohner erkranken pro Jahr daran (Renz-Polster und Krautzig 2008, Matzdorff und Fritze 2009). Die angeborene ALL kommt mit <1 Erkranktem pro 1 Million Geburten (Jafroodi et al. 2010) deutlich seltener vor.

Je nachdem, welcher Zelltyp betroffen ist, unterscheidet man zwischen der B-Zell-ALL und T-Zell-ALL. Sowohl CCRF-CEM als auch JURKAT gehören zur Gruppe der T-Zell-ALL (Foley et al. 1965, Schneider et al. 1972).

Erkrankte Personen weisen verschiedenste Symptome auf. Einige davon sind Hepatosplenomegalie (Sato et al. 2011), vergrößerte Lymphknoten, Meningeosis leucaemia (Hirnnervschädigung mit u.a. Übelkeit, Erbrechen, Doppelbildern), Mediastinaltumor und Blutungen. Aber auch unspezifische Symptome, wie bei den chronischen Leukämien, treten auf.

Um die ALL von anderen Leukämieformen abzugrenzen, sind ein Blutbild, ein Knochenmarkbefund sowie eine Liquorpunktion erforderlich. Das gewonnene Material wird auf das Vorliegen einer ALL untersucht, auf Krankheitserreger getestet und wichtige Blutdiagnostikparameter werden ermittelt (u.a. Gerinnungs-, Leber-, und Nierenwerte).

Im Falle der positiven ALL-Diagnostik wird der genaue Subtyp mit Hilfe der Immunphänotypisierung bestimmt. Die Unterarten der B- und T-Zell-ALL sind mit der Verteilung im Diagramm 1 festgehalten.



**Diagramm 1: ALL-Subtypen und deren Verteilung
(mod. n. Renz-Polster und Krautzig 2008)**

Das Blut erkrankter Personen weist u.a. lymphatische Blasten, eine Anämie und Thrombozytopenie sowie eine erhöhte LDL- und Harnsäurekonzentrationen (durch Leber- und Nierenfunktionsstörungen) auf. Das Knochenmark erscheint beim Ausstrich hyperblastisch mit >25% lymphatischen Blasten.

Bei einer positiven ALL-Diagnostik muss schnellst möglich eine Therapie erfolgen. Sie hängt vom Risikograd der Erkrankung ab und besteht im Allgemeinen aus:

- einer Vorphasentherapie mit Induktionstherapie und Bestrahlung des zentralen Nervensystems,
- anschließender 1. Konsolidierungstherapie,
- je nach Schweregrad der Krankheit: 2. Konsolidierungstherapie mit weiteren Chemotherapiezyklen (Standardrisiko), 2. Konsolidierungstherapie mit autologer Stammzellspende (hohes Risiko) oder allogener Stammzelltransplantation (Höchstisiko) und
- kontinuierlichen Nachkontrollen bei erfolgreich abgeschlossener Therapie.

Die Prognose ist abhängig von der Ätiologie (angeboren vs. erworben) und dem jeweiligen Subtyp der ALL sowie dem (Nicht-) Bestehen von Risikofaktoren. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Erwachsenen mit der erworbenen ALL ca. 40%, bei Kindern sogar um die 90% (Renz-Polster und Krautzig 2008, Matzdorff und Fritze 2009). Die Prognose bei der angeborenen ALL ist trotz therapeutischer Maßnahmen hingegen schlecht. Van der Linden und Kollegen zeigen, dass die prä- bzw. direkt postnatale Mortalität mit über 80% im sehr hohen Bereich liegt (van der Linden et al 2009).

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels einer neuen Methode das Adhäsions- und Invasionsverhalten zweier T-Zell-Leukämie-Zelllinien innerhalb menschlicher Plazenten histologisch deskriptiv darzustellen.

Diese Thematik ist deshalb wissenschaftlich so interessant, da bisher bis auf eine laborinterne Arbeit (Heinzelmann et al. 2009) keine nachweislichen Erkenntnisse über die transplazentare Metastasierung von Immunzellen vorliegen.

Mit der Schaffung von Grundlagen auf diesem Fachgebiet könnte hinsichtlich ätiologischer sowie epidemiologischer Aspekte weiterführend geforscht werden, so z.B. ob eine Prävalenz für Mütter mit Vorerkrankungen, wie Diabetes oder Erbkrankheiten, besteht.

Diese Arbeit soll perspektivisch dazu beitragen, die Übertragbarkeit von Leukämiezellen und eventuell anderen Tumorzellen von der werdenden Mutter auf ihren Fötus durch medizinische Therapien zu vermindern. Auf diese Weise wird den betroffenen Säuglingen ein guter Start ins Leben ermöglicht, mit Gesundheit, Lebensqualität und Stärke, welche laut Johann Gottlieb Fichte, einem Vertreter des deutschen Idealismus, „das höchste Gut“ darstellen (Fichte 1971).

Als technisches Mittel wird die Perfusion auf einer schiefen Ebene angewandt. Sie stellt die einfachste Methode zur Plazentaperfusion ex vivo dar. Die Etablierung des Verfahrens soll eine Simplifizierung im Vergleich zu den derzeit verwendeten Perfusionsapparaturen bewirken. So könnte bei zukünftigen Experimenten nicht nur viel Zeit und Aufwand hinsichtlich des Aufbaus, der Reinigung und der anfallenden Wartungsarbeiten sondern auch ein Großteil der Materialkosten gespart werden.

Für diese Arbeit stehen 4 methodische Fragen im Raum:

- Werden die Zellen während der Perfusion derart in Mitleidenschaft gezogen, dass sie vorzeitig zugrunde gehen und demzufolge kein Adhäsions- und Invasionsverhalten aufweisen?
- Wie verhalten sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe zueinander?
- Gibt es Unterschiede bei der Auswertung zwischen den Paraffinschnitten und den Gefrierschnitten?
- Sind mit der Plazentaperfusion genaue „Schwachstellen“ in der Plazentaschranke nachweisbar?

3 Methodik

Die im Folgenden beschriebenen Perfusionen wurden mit einer gewissen Variabilität innerhalb der Parameter an Plazenten des 3. Trimenons durchgeführt. Alle diesbezüglichen Details sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Übersicht zu den durchgeführten Perfusionen mitsamt der dazugehörigen Perfusionsparameter

Perfusion, Datum & Zelltyp		Benutzte Zellanzahl (1×10^6)	Zellfärbung	Perfusionsvolumen (ml)	Flussrate (ml/min)	Laufzeit der Perfusion (h)	Vorspülen der Plazenta	Nachspülen der Plazenta	Bemerkung
1 28.2.2011	CCRF-CEM 5. Passage	5	cell tracker orange	100	15	5	1 Stunde mit Perfusions- lösung (PL)	20 Minuten mit NaCl	Perfusionsnadeln relativ tief platziert
	JURKAT 11. Passage	6	cell tracker green						
2 4.3.2011	CCRF-CEM 7. Passage	10	cell tracker green	60	15	2,5	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Stunde mit NaCl • 1 Stunde mit PL 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 Minuten mit PL • 10 Minuten mit NaCl 	Ab 2. Perfusion folgende Änderungen: <ul style="list-style-type: none"> • Perfusionsnadeln ganz oberflächlich appliziert • Klimaanlage aus • Perfusat temperiert • Frischhaltefolie auf Kotyledo
	JURKAT 13. Passage	10	cell tracker orange						
3 7.3.2011	CCRF-CEM 8. Passage	13	cell tracker green	60	12	2,5	<ul style="list-style-type: none"> • 30 Minuten mit NaCl • 30 Minuten mit PL 	<ul style="list-style-type: none"> • 15 Minuten mit NaCl • 30 Minuten mit PL 	Ab 3. Perfusion ist dem NaCl auch Heparin beigemischt (3750 IE auf 1,5 l NaCl)
	JURKAT 14. Passage	13	cell tracker orange						
4 14.3.2011	CCRF-CEM 10. Passage	13	cell tracker orange	60	12	2,5	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Stunde mit NaCl • 30 Minuten mit PL 	<ul style="list-style-type: none"> • 15 Minuten mit PL • 30 Minuten mit NaCl 	
	JURKAT 16. Passage	25	cell tracker green						
5 16.3.2011	CCRF-CEM 12. Passage	12	cell tracker green	60	12	2,5	<ul style="list-style-type: none"> • 30 Minuten mit NaCl • 45 Minuten mit PL 	<ul style="list-style-type: none"> • 15 Minuten mit NaCl • 30 Minuten mit PL 	<ul style="list-style-type: none"> • Plazenta weist intrauterine Wachstumsretardierung auf • Faktor-V-Leiden-Mutation der werdenden Mutter
	JURKAT 18. Passage	20	cell tracker orange						

Zum besseren Verständnis wurde zudem Tab. 8.1 angefertigt (siehe Anhang). Sie vermittelt einen Überblick vom Alter der Mutter, dem Geburtsvorgang sowie der Schwangerschaftswoche bei Entbindung.

Die Auflistung der Daten erfolgte im gegenseitigen Einvernehmen mit den Müttern und darf im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich unter Anonymisierung angegeben werden. Die Herstellerangaben zu den im Folgenden beschriebenen Geräten und Reagenzien finden sich im Anhang.

3.1 Zelllinien

3.1.1 CCRF-CEM

Diese Zelllinie wurde im Jahr 1964 von G. E. Foley und Kollegen aus einem Rezidiv eines 3 Jahre alten Mädchens mit ALL gewonnen (Foley et al. 1965). Die Zellen besitzen eine runde, epitheliale Morphologie und wachsen gleichzeitig sowohl in Suspension als auch in adhärenter Monolage.

3.1.1.1 Kultivierung der Zelllinie und Bestimmung der Zellanzahl

Die Kultivierung erfolgt mit dem Nährmedium RPMI, welchem 10% fetales Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugesetzt werden.

RPMI-Medium ist eine Lösung von Salzen, Glukose, Aminosäuren und Vitaminen. Das FKS stellt den wichtigsten Co-Bestandteil neben dem RPMI-Medium dar. Es enthält viele unabdingbare Spurenelemente und Proteine, darunter Wachstumsfaktoren und Hormone. Das Antibiotikumgemisch Pen/Strep vermindert die Anfälligkeit der Zellkultur gegenüber exogenen Bakterieninvasionen. Es ist wirksam gegen grampositive und gramnegative Bakterien als auch Mykobakterien.

Die Zellen werden mit 20 ml Nährmedium in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, humides Milieu) inkubiert.

Bei optimaler Kultur verdoppeln sich die Zellen nach 24 bis 30 Stunden, was bedingt, dass sie nach 2-4 Tagen passagiert werden müssen.

Hierfür wird das Nährmedium mit den Suspensionszellen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die adhärenente Monolage wird einmal mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um alle Rückstände des Mediums zu entfernen. Nun werden 3 ml Trypsin auf den Monolayer appliziert und unter Inkubationsbedingungen 5 min darauf belassen. In diesem Zeitraum lösen sich Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen.

Die abgelösten Zellen werden nun zu den Suspensionszellen gegeben und bei 1500 Umdrehungen/min (rpm) für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Das am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche Zellpellet wird nun mit 1 ml neuen Nährmedium vermischt und die Zellanzahl bestimmt. Dazu werden 20 µl der Suspension in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 20 µl 0,4%iger Trypanblaulösung vermischt. Jetzt können die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bei 20facher Vergrößerung ausgezählt werden. Lebende Zellen erscheinen hell, tote nehmen den Farbstoff in sich auf und verfärben sich blau. Da Trypanblau zytotoxisch ist, muss die mikroskopische Auswertung schnell erfolgen. Nach der Auszählung werden die Tumorzellen entweder erneut in Kultur aufgenommen, für Versuche verwendet oder bei zu großer Zellanzahl verworfen (Schmitz 2009).

3.1.2 JURKAT

Diese Zelllinie wurde im Jahr 1976 von Schneider und Kollegen im peripheren Blutkreislauf aus dem Rezidiv eines 14-jährigen Jungen mit ALL gewonnen (Schneider et al. 1972).

Die Zellen besitzen eine runde Morphologie und wachsen sowohl vereinzelt als auch bei größerer Zellanzahl in Zellhaufen in Suspension.

3.1.2.1 Kultivierung der Zelllinie

Die Kultivierung erfolgt auch hier mit RPMI-Medium. Diesem werden 10% FKS, 1% Pen/Strep und 2 mM L-Glutamin zugesetzt.

Die Zellen werden mit 20 ml des Nährmediums in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, humides Milieu) inkubiert.

Bei optimaler Kultur verdoppeln sich die Zellen nach 25 bis 35 Stunden. Dementsprechend sollte alle 2-3 Tage passagiert werden. Dies geschieht nach dem gleichen Prinzip wie die CCRF-CEM-Passage. Hier entfällt allerdings die Trypsinierung, da JURKAT ein reiner Suspensionszelltyp ist. Folglich entnimmt man den gesamten Inhalt der Kulturflasche, spült sie mit 5 ml Nährmedium, um weitestgehend alle Zellen zu erfassen und überführt nun die gesamte Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß. Es erfolgt die Zentrifugierung bei 1300 rpm für 3 min mit anschließendem Absaugen des Überstandes.

Das Zellpellet wird mit 1 ml Nährmedium vermischt und die Zellanzahl wird mittels Neubauer Zählkammer und Trypanblaufärbung ermittelt. Wie bei der CCRF-CEM-Zelllinie werden die Zellen entweder erneut in Kultur genommen, für Versuche verwendet oder bei zu großer Zellanzahl verworfen.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen der beiden Zelllinien

Der Einfriervorgang muss schonend durchgeführt werden, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Hierfür wird zuerst die genaue Zellanzahl ermittelt (es werden alle Zwischenschritte bis zum Auszählen der Zellen durchgeführt, wie in Punkt 3.1.1.1 für die CCRF-CEM-Zelllinie bzw. in Punkt 3.1.2.1 für die JURKAT-Zelllinie geschildert ist). Ist dies geschehen, werden 700 µl der gewünschten Zellanzahl in Medium suspendiert. Hinzu kommen 200 µl FKS und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO). Das Gemisch wird in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und sofort in einer Einfrierbox bei -80 °C für 24-48 Stunden gelagert. Danach erfolgt das Überführen in flüssigen Stickstoff. Die eingefrorenen Zellen können so über Jahre gelagert werden.

Für das Auftauen muss das Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden. Das eingefrorene 2 ml Kryoröhrchen wird in das Wasserbad eingeführt und geschwenkt, bis der Inhalt flüssig ist. Dieser wird daraufhin entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit Nährmedium überführt. Die Suspension wird bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der gerade geschilderte Vorgang muss schnell von statten gehen, da das aufgetaute DMSO in derart hoher Konzentration zelltoxisch wirkt. Das Zellpellet wird nun mit 5 ml Medium vermischt, in eine kleine Kulturflasche überführt und inkubiert (Schmitz 2009).

3.2 Ansetzen der Perfusionslösung

Die Perfusionslösung (PL) wurde im Labor angesetzt. Ihre Zusammensetzung ist in Tab. 3.2 festgehalten. Der pH wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Tab. 8.2 (siehe Anhang) beinhaltet die genaue Zusammensetzung des im Labor hergestellten Earle's Puffers.

Tab. 3.2: Zusammensetzung der PL

Masse/ Volumen und Komponente	Masse/ Volumen und Komponente
1,0 l NCTC- 135 Lösung	2 g D-Glucose
0,5 l Earle's Puffer	0,38 g Amoxicillin
60 g BSA	15 g Dextran
	0,75 ml Heparin (\cong 3750 IE)

3.3 Vorarbeiten

Bevor mit der Perfusion begonnen werden konnte, wurden Vorversuche durchgeführt, um ein reproduzierbares Perfusionsergebnis sicherzustellen. Anschließend wurde nach entsprechenden Fluoreszenzmarkern gesucht.

Wichtig war einerseits, dass sich der Marker beim Einbetten weder durch Ethanol noch Xylol auswäscht und andererseits, dass er nach mindestens 24h in 5%igem Formaldehyd keine großen Fluoreszenzverluste aufweist. Aufgrund der Ansprüche stellte sich CFSE als nicht geeignet heraus. CellTracker™ green und CellTracker™ orange hingegen hielten den Tests stand und konnten somit weiter verwendet werden. Die Markierung der Zellen geschah nach einem modifizierten laborinternen Protokoll. Für die definitiven Perfusionen wurde allerdings nach den Angaben des Herstellers gefärbt, um Anwendungsfehler weitestgehend zu vermeiden. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle nicht auf das abgewandelte Procedere bei der Fluoreszenzmarkierung eingegangen und auf Punkt 3.8.1 verwiesen.

Nach dem Anfärben wurden die beiden Suspensionen (bestehend aus fluoreszierenden Zellen und PL) in zwei 10 ml Spritzen aufgenommen und in ein je 1 cm breites Plazentaareal injiziert. Danach erfolgte das Schneiden, die Fixierung mit Formalin, das Einbetten in Paraffin sowie das Mikrotomieren und Färben mit DAPI, wie in den Unterpunkten von 3.11 beschrieben.

Das Mikroskopieren ergab eine Fluoreszenz beider Zelllinien (siehe Abb. 3.1) bei der DAPI-Färbung. Somit waren alle Voraussetzungen für eine „richtige“ Perfusion gegeben.

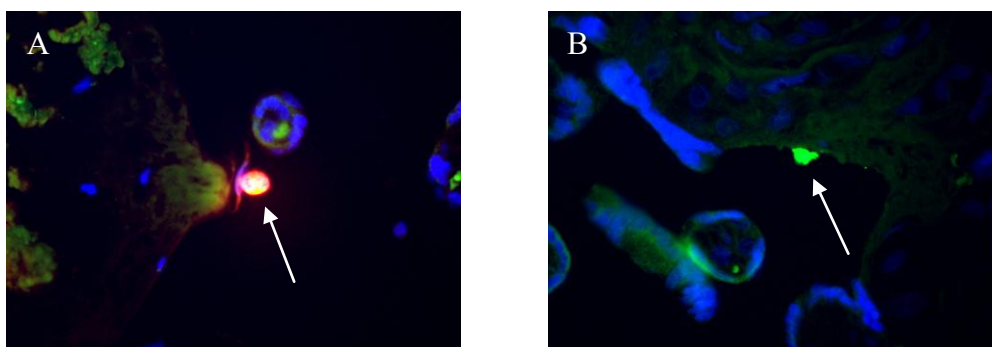


Abb. 3.1: Vorversuch zur Sicherstellung der Fluoreszenzerhaltung
Plazenta (3. Trimenon), injiziert mit Fluoreszenz-gefärbten Zellen; Paraffinschnitte;
A: rot-fluoreszierende CCR5-CEM-Zelle (CellTracker orange); 3erKanal; **B:** grün-fluoreszierende
JURKAT-Zelle (CellTracker green); 2er Kanal; **A/B** Vergr. x400

3.4 Versuchsaufbau

Die benötigten Utensilien sind:

- die schiefe Ebene,
- die Perfusionspumpe,
- Perfusionsschläuche und
- Bechergläser.

Im Mittelpunkt des Versuchsaufbaus steht die schiefe Ebene. Deren Basis besteht aus einem abfallenden Kunststoffsockel. In ihn kann ein Plexiglasrahmen fest eingelegt werden. Um ein Austreten von Flüssigkeit zu vermeiden, ist der Plexiglasrahmen mit Silikon abgedichtet.

In der Acrylglaskonstruktion befinden sich am obersten Punkt drei Befestigungsschrauben, auf welche die Plazenta gespannt wird. Über die Schrauben kommt ein Acrylglassteg, der die Plazenta auf den Schrauben fixiert. Die Apparatur wurde in der technischen Werkstatt des Universitätsklinikums Jena angefertigt.

Ein weiterer unabdingbarer Bestandteil für die Durchführung der Perfusion ist die Perfusionspumpe. Sie hält eine geschlossene Zirkulation im Experiment aufrecht und imitiert somit auf sehr einfache Weise den mütterlichen Kreislauf.

Die Perfusionspumpe besteht aus einer Anzeige und dem eigentlichen Pumpapparat, der Rollenpumpe (ein um sich selbst drehendes Rad mit Walzen). Die Pumpgeschwindigkeit kann manuell geregelt werden.

Um die Rollenpumpe werden zwei direkt in das System passende Schläuche gespannt.

Sie stellen den Blutkreislauf der Schwangeren dar. Der erste Schlauch verbindet das Becherglas mit der Plazenta und verläuft über die Pumpvorrichtung. Der zweite Schlauch ist an dem Plexiglasrahmen befestigt und fängt all das von der Plazenta ablaufende Perfusat wieder auf und befördert es über die Perfusionspumpe zurück in das angewärmte Becherglas. Die Rollenpumpe hält bei diesem Vorgang den geschlossenen Kreislauf aufrecht.

In Abb. 3.2 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt, Abb. 5.13 zeigt ihn fotografisch.

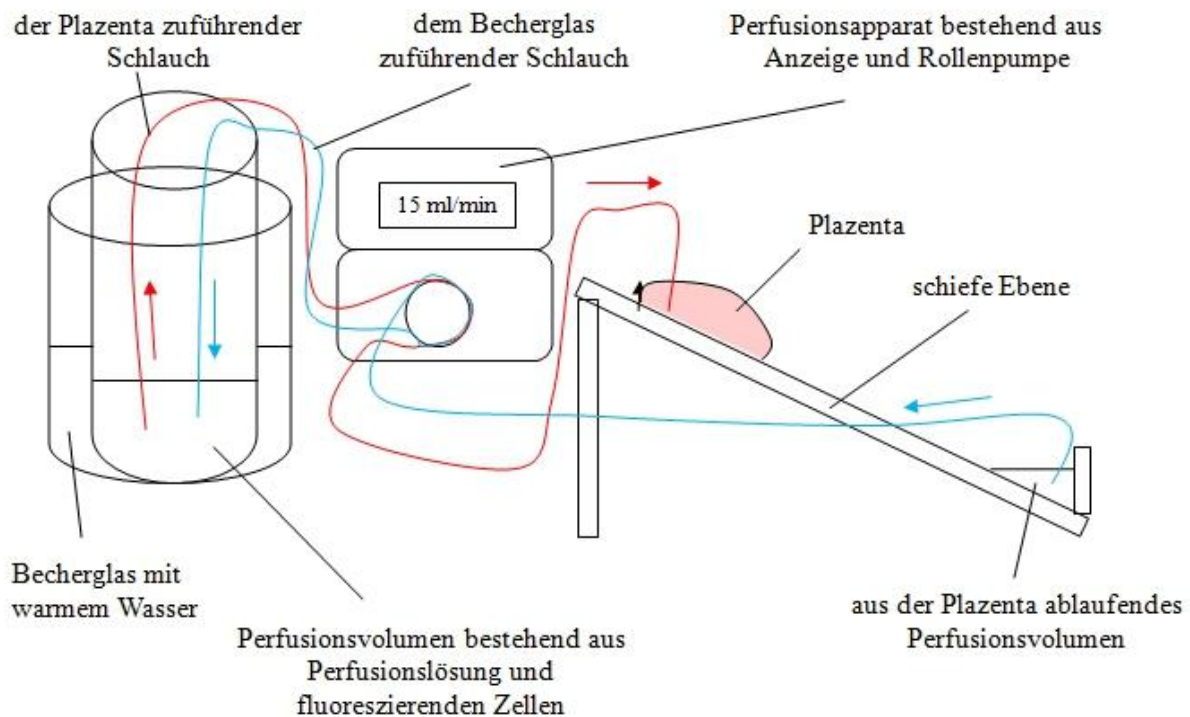


Abb. 3.2: Schematischer Versuchsaufbau

Ein Kunststoffsockel wird in die schiefe Ebene eingelegt. In ihm befinden sich Befestigungsschrauben, auf die die Plazenta gespannt wird. Über den Perforationsapparat (bestehend aus Anzeige und Rollenpumpe) wird eine geschlossene Zirkulation mittels Perforationsschläuchen aufrecht gehalten. Die Pumpgeschwindigkeit kann manuell geregelt werden.

3.5 Vorbereiten und Einspannen der Plazenta

Die Plazenta wird sehr vorsichtig mit einem Papiertuch abgetupft, um alle äußerlichen Blutrückstände- und gerinnsel abzutragen. Jetzt ist eine gute Sicht auf die einzelnen Kotyledonen gegeben und es kann für das Experiment ein augenscheinlich intakter und zentral gelegener Kotyledo ausgewählt werden.

Ist ein entsprechendes Areal ausgemacht, wird es mit einer Präparierschere großzügig vom Rest der Plazenta abgetrennt. Großzügig deshalb, damit erstens der einzelne Kotyledo nicht verletzt wird und zweitens ein größeres Gewebstück zum Einspannen in den Plexiglasrahmen zur Verfügung steht.

Für das Einspannen sind auf der schiefen Ebene drei scharfe Schrauben befestigt. Das Plazentagewebe wird auf die Schrauben gesteckt und mit Hilfe des Acrylglasstegs zusätzlich fixiert.

3.6 Platzieren der Perfusionsnadeln

Ist der Versuchsaufbau vorbereitet und die Schläuche restlos mit NaCl bzw. PL luftleer gemacht, können die Nadeln in die maternale Seite eines Kolyledos platziert werden. Dies muss mit größter Vorsicht geschehen, um eine Verletzung der Zotten und somit der Plazentaschranke zu vermeiden. Aus dem Grund wurden vom ersten Perfusionsversuch abgesehen alle Nadeln sehr oberflächlich appliziert.

3.7 Vorspülen

Das Vorspülen findet im offenen System statt (zum Vergleich siehe 3.9.1). Für den Versuchsaufbau bedeutet dies, dass zwei Bechergläser auf dem Arbeitsplatz Verwendung finden. Das eine wird mit Perfusionsmedium befüllt, das andere bleibt vorerst leer. Nun wird die Pumpe angeschaltet und der Vorspülvorgang beginnt. Dabei sammelt sich das blutige Volumen am Boden des Plexiglasrahmens an und wird in den noch leeren Kolben befördert. Vorspüldauer und -medium wurden in den durchgeführten Perfusionen leicht abgewandelt (siehe Tab. 3.1).

Sinn und Zweck dieses Vorganges ist das weitestgehende Ausspülen der Erythrozyten aus dem zu perfundierendem Kolyledo, denn sie haben sich in den Vorversuchen bei der histologischen Auswertung als störend erwiesen. Das der Lösung zugesetzte Heparin führt zusätzlich zum Auflösen kleiner Thromben. Zudem werden beim Vorspülen abgestorbene Zellen sowie bei der Perfusionsvorbereitung eventuell eingedrungene exogene Partikel weitestgehend ausgespült.

3.8 Vorbereiten der Zellen

Während des Vorspülens wurden beide Zelllinien für den jeweiligen Versuch mit Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Hierfür werden sie soweit passagiert, bis sich die Zellsuspensionen in zwei Reaktionsgefäßen befinden und die Zellanzahlen bekannt sind (siehe 3.1.1.1 und 3.1.2.1). Mit dem Wissen wird aus beiden 1 ml Zellsuspensionen eine gewisse Anzahl an Zellen erneut in Kultur genommen. Der gesamte Restbestand an Tumorzellen wird für das Experiment verwendet.

3.8.1 Vorgehen bei der Fluoreszenzmarkierung

Trotz der erfolgreichen leicht abgeänderten Fluoreszenzmarkierung im Vorversuch wurde für die Perfusion nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt.


Dazu wird der Restbestand der Leukämiezellen in dem Reaktionsgefäß mit Medium auf 2 ml aufgefüllt. In jedes Reaktionsgefäß mit der jeweiligen Zelllinie wird 1 µl Marker hinzugefügt und so eine Konzentration von 0,5 µM eingestellt. Beide Suspensionen werden nun für 35 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugierung bei 2000 rpm für 3 min. Die Überstände werden abgesaugt und die Pellets mit 10 ml frischem Medium vermischt. Die dadurch entstehenden Suspensionen werden für weitere 30 min inkubiert. In diesem Zeitsegment erfährt die Chlormethylgruppe des CellTrackers eine Modifikation, so dass ein Thioester entsteht (siehe 3.9.1). Nun wird bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Überstände werden abgesaugt und die Zellpellets mit PBS gewaschen, um alle letzten Stoffwechselprodukte und nicht umgesetzten Markermoleküle zu entfernen. Die fluoreszierenden Zellgemische werden im Anschluss bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Zellpellets mit 1 ml Medium vermischt. Die Suspensionen beider Zelllinien werden direkt im Anschluss in das Becherglas zur PL gegeben.

3.8.2 Fluoreszenzmarker

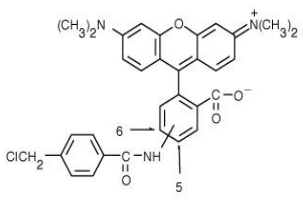
Für die Experimente wurden CellTracker™ Green BODIPY® und CellTracker™ Orange CMTMR von der Firma Invitrogen verwendet. Die Fluoreszenz beider CellTracker basiert auf der Reaktion von Chloromethylgruppen mit Thiolen, unter Einwirkung der Gluthathion-S-Transferase. Dieses Enzym kommt in hoher Konzentration in der Zelle vor. Das entstandene Addukt ist ein fluoreszierender Thioether.

Beide CellTracker besitzen verschiedene Absorptions- und Emissionsmaxima (Invitrogen 2008). Sie sind in Tab. 3.3.1 und 3.3.2 dargestellt.

Tab. 3.3.1: Ausgewählte Eigenschaften des grünen CellTrackers

CellTracker	Absorptionsbereich/ Emissionsbereich (nm)	Molekül- masse (g/mol)	Struktur und Summenformel
CellTracker™ Green BODIPY®	522/ 529	296.5536	 <chem>C14H16BClF2N2</chem>

Tab. 3.3.2: Ausgewählte Eigenschaften des roten CellTrackers

CellTracker	Absorptionsbereich/ Emissionsbereich (nm)	Molekül- masse (g/mol)	Struktur und Summenformel
CellTracker™ Orange CMTMR	541/ 565	554.04	 $C_{32}H_{28}ClN_3O_4$

3.9 Perfusion ex vivo

3.9.1 Hintergrund

Im medizinischen Wörterbuch Pschyrembel® wird der Begriff Perfusion wie folgt definiert: „Durchströmung, z.B. des Körpers oder einzelner Organe mit Flüssigkeit (Blut u.a.)“ (Pschyrembel 2004).

Diese kurze, allgemeine Definition bringt den experimentellen Schwerpunkt der Versuchsreihe genau auf den Punkt und bedarf vorerst keiner weiteren Konkretisierung.

Man unterscheidet zwischen einer einseitigen und zweiseitigen Perfusion. Erstere ist dadurch charakterisiert, dass nur die maternale Seite mit Medien durchströmt wird. Jene Methode wurde in den hier durchgeführten Versuchen verwendet. Bei der zweiseitigen Perfusion werden sowohl die mütterliche als auch kindliche Seite der Plazenta in den Kreislauf eingebunden.

Die Perfusion kann geschlossen oder offen stattfinden. Bei den hier beschriebenen Experimenten erfolgte die eigentliche Perfusion im geschlossenen, das Vor- und Nachspülen hingegen im offenen System.

Bei der geschlossenen Perfusion wird anstatt zwei separater Bechergläser nur eins benötigt. In diesem verlaufen sowohl die der Plazenta zuführenden als auch abgehenden Schläuche. Somit zirkuliert die Suspension kontinuierlich und der mütterliche Kreislauf ist auf sehr einfache Weise nachgestellt. Das offene System ist in 3.7. beschrieben.

Die Plazentaperfusion ex vivo liegt noch nicht lange im Fokus der Forschung. Der Grundstein wurde in den späten 50er Jahren von Troen und Gordon gelegt. Sie trugen dazu bei, den endokrinen Metabolismus der Plazenta besser zu verstehen. Sie fanden heraus, dass während einer 8- stündigen Perfusion der Zitratzyklus innerhalb der Plazenta abläuft und er mit der exogenen Zufuhr von hCG und Estradiol-17β sogar gesteigert werden kann.

Im Ergebnis wurde deutlich, dass auch nach der Geburt die Plazenta für einen Zeitraum von mindestens 9 Stunden vital bleibt (Troen und Gordon 1958). Die Idee der Perfusion außerhalb des Mutterleibs war von nun an nicht mehr nur eine Vorstellung in den Köpfen der Forscher. So kam es, dass sich in den folgenden Jahren weitere Wissenschaftlergruppen, wie z.B. die von Panigel (Panigel et al. 1967) und von Schneider und Miller (Schneider et al. 1972, Miller et al. 1987), mit der Plazentaperfusion beschäftigten. Bis heute besteht ein großes Interesse an der Thematik. So kam es über die Jahre zu bahnbrechenden Ergebnissen z. B. hinsichtlich des Transfers von Medikamenten durch die Plazentaschranke (Myren et al. 2007) und des Übertritts von Allergenen (May et al. 2009).

Dank all der Forschungen verstehen wir heute die Vorgänge innerhalb der Plazenta viel besser und können anhand dieses Wissens mit gewissen Komplikationen in der Schwangerschaft besser umgehen. Letztendlich besteht daher eine größere Wahrscheinlichkeit für betroffene Kinder, durch eine entsprechende Therapie gesund auf die Welt zu kommen.

Doch bis heute gibt es nur geringe Erkenntnisse über das Transmigrationsverhalten von Lymphozyten in deziduales Gewebe, in dem sich während der gesamten Schwangerschaft eine sehr hohe Konzentration an Lymphozyten befindet. Noch weniger ist bekannt über die beim Menschen selten vorkommende Metastasierung verschiedenster Tumoren von der Schwangeren auf den Fötus. In der Literatur sind außer einem Versuch über den transplazentaren Transfer von Immunzellen (Heinzelmann et al. 2009) keine diesbezügliche Perfusionen, lediglich Fallberichte (Jones 1969, Catlin et al. 1999, Tolar et al. 2002, Sato et al. 2011), dokumentiert. Der laboreigene Versuch von Heinzelmann und Kollegen zeigt, dass sich die perfundierten autologen Lymphozyten der Mutter am Synzytium anheften und in der Lage sind, die Dezidua und die Zotten zu infiltrieren (Heinzelmann et al. 2009). Um die Versuchsbedingungen zu optimieren und zu standardisieren, soll der damals beschriebene Versuch auf eine modifizierte Art und Weise erneut mit lymphozytären (Leukämie-) Zelllinien durchgeführt werden und bezüglich der in der Zielstellung (Punkt 2) aufgezählten Fragestellungen ausgewertet werden.

3.9.2 Vorteile

Der größte Vorteil ist die geringe ethische Angreifbarkeit, denn bei den Versuchen ex vivo werden weder die Mutter noch das Kind in Mitleidenschaft gezogen. Da die Plazenta nach der Geburt keine physiologische Funktion mehr erfüllt, wird niemand durch die postnatalen Experimente geschädigt. Erst nach der Information der Mütter über den temporären Verbleib ihrer Plazenten mittels Aufklärungsbogen und deren Einverständniserklärung werden die Versuche durchgeführt (siehe Abb. 8.1).

Weiterhin ist die dünne Plazentaschranke der Termplazenten (siehe 1.6.2.1) für die Forschung vorteilhaft, da potenziell pathologische Vorgänge eher ablaufen und demzufolge beobachtet werden können als bei einer dichteren Plazentaschranke.

3.9.3 Nachteile

Der Versuchsaufbau ist metabolisch relativ stabil, was untypisch für eine Schwangerschaft ist (Bourget et al. 1996). Ein weiterer Nachteil ist, dass meist nur Plazenten des 3. Trimenons perfundiert werden. Vor allem während des 1. Trimenons existieren innerplazentar veränderte Transportmechanismen und ein andersartiger Metabolismus als im letzten Drittel der Schwangerschaft (Vähäkangas und Myllynen 2006). Somit können Modifikationen innerhalb der Plazentaphysiologie sowie Pathomechanismen nur schlecht analysiert und verstanden werden. Zusätzlich erschwerend wirkt die morphologische Variabilität einer jeden Plazenta. Ein weiteres Defizit ist die in den meisten Fällen zugeführte Verletzung der Plazenta, sowohl während der Entbindung (Sastry 1999) als auch bei der Perfusionsdurchführung. Dies kann zur Beeinträchtigung der Ergebnisse führen.

3.9.4 Perfusionsdurchführung

Nach dem Vorspülen wird der Inhalt des Becherglases mit der puren PL bzw. NaCl-Lösung direkt durch die PL mit den fluoreszierenden Leukämiezellen ersetzt. Hierbei muss der artifiziell geschaffene Kreislauf für wenige Sekunden unterbrochen werden, um sicherzustellen, dass beim Wechseln der Lösungen keine Luft in die Perfusionsschläuche gelangt. Nur so können Traumata der Plazenta mit eventuell folgender Schädigung der Plazentaschranke weitestgehend vermieden werden.

Ab jetzt kann für einige Stunden perfundiert werden. Lediglich alle 20 min wird der Inhalt des Becherglases mit einer Glaspipette umgerührt, um eine gewisse Zirkulation innerhalb des Gefäßes und ein Nichtabsetzen der Zellen zu gewährleisten.

3.10 Nachspülen

Von besonderer Bedeutung ist das Ausspülen loser Tumorzellen sowie letzter Erythrozyten und Fremdpartikel aus dem Plazentagewebe. Auf diese Art wird ein aussagekräftigeres Ergebnis erreicht. Nachgespült wurde mit verschiedenen Medien, die Perfusionsdauer wurde teilweise leicht variiert (siehe Tab. 3.1). Wie beim Vorspülen wird für diesen Vorgang ein offener Kreislauf angelegt.

3.11 Paraffinschnittherstellung

3.11.1 Schneiden und Vorbereitung für das Einbetten

Beim Schneiden der Präparate sollte genau darauf geachtet, dass das Gewebe eine Größe von 2x2 cm und eine Dicke von 4 mm nicht überschreitet (Kumar und Rudbeck 2009 [Internetausgabe]). Auf diese Weise kann das Fixierungsmittel das Gewebe optimal durchdringen.

Aus dem perfundierten Kotyledo wurden 4 annähernd viereckige Gewebstücke präpariert, wovon zwei für die Paraffinschnittherstellung bestimmt waren. Hierzu werden die Präparate in 50 ml Reaktionsgefäße mit 5%igem Formaldehyd gelegt. Für eine optimale Fixierung sollte das Formaldehydvolumen mindestens das 20fache des Präparatvolumens einnehmen. Die Proben werden so zwischen 24 bis 96 Stunden im Kühlschrank zwischengelagert (Kumar und Kiemann 2010 [Internetausgabe]).

Die anderen beiden der ursprünglich 4 Gewebstücke waren für die Gefrierschnittherstellung vorgesehen (siehe 3.12).

3.11.2 Einbetten

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte werden auf dem Schüttler bei 50 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Bei Wiederholung eines Schrittes wird jeweils ein neues Reaktionsgefäß mit entsprechendem Inhalt verwendet.

Nach mindestens 24 Stunden in Formaldehyd werden die Proben für je 30 min in Glycin 0,1M in PBS (pH 7,2) gewaschen. Nun erfolgt eine Dehydrierung mit folgenden Ethanolkonzentrationen (siehe Tab. 3.4):

Tab. 3.4: Dehydrierung

Ethanolkonzentration	Anwendung	Dauer
Ethanol 50%	einmalig	30 min
Ethanol 70%	einmalig	30 min
Ethanol 96%	dreimalig	je 30 min
Ethanol 100%	dreimalig	je 30 min

Daraufhin wird eine dreimalige Waschung in Xylol für jeweils 15 min durchgeführt. Jetzt können die Gewebsstücke im 60 °C warmen Trockenschrank in Paraffin getränkt werden.

Dieser 30-minütige Vorgang wird dreimal wiederholt und stellt sicher, dass das gesamte Präparat mit sauberem Paraffin infiltriert ist.

Nun können die Proben einzeln in vorgefertigte Kunststoffschälchen mit Paraffin eingebettet und für mindestens eine Stunde im Kühlschrank belassen werden, um vollständig auszuhärten.

3.11.3 Mikrotomieren und Entparaffinieren

Vor dem Schneiden wird der Paraffinblock kurz in den Gefrierschrank gelegt, um eine Härtezunahme zu erreichen. Anschließend werden von jedem Block am Mikrotom 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte werden daraufhin vorsichtig in ein erwärmtes Wasserbad überführt. Die Oberflächenspannung des Wassers bewirkt ein Glätten der einzelnen Schnitte. Nun erfolgen das Platzieren der Gewebsscheibchen auf geladenen Objektträgern und die einstündige Lagerung im Trockenschrank bei 60 °C. Hierbei wird ein Großteil des Paraffins aus den Schnitten heraus geschmolzen und die Wasserrückstände verdampfen. Letzte Reste des Paraffins werden schließlich mit Lösungsmittel Xylol aus den Gewebsschnitten entfernt. Ist dies geschehen, erfolgt eine Rehydrierung nach folgendem laborinternen Protokoll (siehe Tab. 3.5):

Tab. 3.5: Rehydrierung


Substanz	Dauer
Xylol I	5 min (Perfusion 1 und 2)/ 8 min (Perfusion 3, 4 und 5)
Xylol II	5 min(Perfusion 1 und 2)/ 8 min (Perfusion 3, 4 und 5)
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 96 %	2 min
Ethanol 70%	2 min
Ethanol 50%	2 min
destilliertes Wasser	2 min

3.11.4 Färben

3.11.4.1 DAPI-Färbung

DAPI ist ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, der den Zellkern unter UV-Anregung blau erscheinen lässt. Folgende Tabelle (siehe Tab. 3.6) gibt einen Einblick über die mikroskopischen und strukturellen Eigenschaften von DAPI:

Tab. 3.6: Ausgewählte Eigenschaften von DAPI

Absorptionsmaximum/ Emissionsmaximum (nm)	Molekülmasse (g/mol)	Struktur und Summenformel
360/ 460	350.25	 $C_{16}H_{17}Cl_2N_5$

Nachdem, wie in 3.11.3 beschrieben, rehydriert wurde, kann das Anfärben mit DAPI durchgeführt werden. Hierfür wird „Mounting Medium with DAPI“ verwendet. Der große Vorteil an diesem Einbettmedium ist, dass es aushärtet und eine Fixierung der Deckgläser mit Nagellack überflüssig macht.

Die Gewebsschnitte werden mit 2 Tropfen des Farbstoffes versehen, anschließend mit einem Deckglas abgedeckt und im Kühlschrank gelagert.

3.11.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Dieses Verfahren ist die Standardfärbung in der Routinehistologie und wurde bei 10 entparaffinierten Slides der 1. Perfusion als Referenz zur DAPI-Färbung angewendet. Sie beruht auf dem Anfärben unterschiedlicher Zellstrukturen. Dies ist durch die unterschiedliche Ladung der beiden Farbstoffe möglich. Hämatoxylin ist basisch, lagert sich daher an basophile Strukturen an und färbt sie blau. Dazu gehören vor allem der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum mit den assoziierten Ribosomen. Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt alle azidophilen Strukturen rot. Hierzu zählen v.a. die Proteine des Zytoplasmas (Welsch 2006).

Die HE-Färbung erfolgt in zwei Schritten, der eigentlichen Färbung mit Hämalaun und Eosin sowie der Dehydrierung. Das Vorgehen ist wie folgt (siehe Tab. 3.7.1 und 3.7.2):

**Tab. 3.7.1: Teil 1 - Färbung mit
Hämalaun und Eosin**

Substanz	Dauer
Hämalaunlösung	1 min
Waschen mit Wasser	10 min
destilliertes Wasser	2 min
Eosinlösung	1 min

Tab. 3.7.2: Teil 2 – Dehydrierung

Substanz	Anwendung/ Dauer
Ethanol 70%	einmalige Waschung
Ethanol 95%	zweimalige Waschung
Ethanol 100%	zweimalige Waschung
Xylol	einmalige Waschung
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min

Nach abgeschlossener Fixierung werden 2 Tropfen Histofluid auf den gefärbten Gewebsschnitt gegeben und das Präparat mit einem Deckglas nachhaltig konserviert.

3.12 Gefrierschnittherstellung

3.12.1 Einbetten und Schneiden

Für die Gefrierschnittherstellung werden spezielle Einbettenschälchen benutzt. Der Boden dieser wird zunächst mit Einbettmedium bedeckt. Das Gewebe wird nun vorsichtig auf die dünne visköse Schicht gelegt und hiernach vollständig mit Einbettmedium bedeckt. Bei dem Verfahren ist darauf zu achten, dass das glykol- und harzhaltige Medium luftblasenfrei in das Schälchen appliziert wird. Im Anschluss wird das eingebettete Gewebe in flüssigem Stickstoff langsam auf -196°C heruntergekühlt. Sobald sich das ursprünglich durchsichtige Einbettmedium weißlich verfärbt und das Gewebe einen leichten rosa Farbton annimmt, wird der Gefrierblock aus dem Stickstoff genommen und im Tiefkühler bei -80°C bis zum Schneiden zwischengelagert. Das Anfertigen der Gefrierschnitte mit einer Dicke von $7\mu\text{m}$ wurde freundlicherweise von der MTA K. Beer-Grondke durchgeführt.

Anschließend werden die Schnitte bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.12.2 Färben

Das Färben erfolgte nach einem laborinternen Protokoll wie folgt:

Die Slides tauen 10 min bei Raumtemperatur auf. Im Anschluss werden sie weitere 10 min mit Aceton fixiert. Das Lösungsmittel wird nach abgelaufener Zeit abgeschüttet und die Slides trocknen. Jetzt werden alle Proben 3 mal à 2 min mit 0,1M PBS (pH 7,2) gewaschen. Wie bei den Paraffinschnitten erfolgt auch hier die endgültige Gegenfärbung und Einbettung mit „Mounting Medium with DAPI“ und der Abdeckung durch ein Deckglas. Die Lagerung im Kühlschrank ist auch hier wegen der Fluoreszenzerhaltung unverzichtbar.

4 Ergebnisse

Dank Dipl. biol. Maja Weber erfolgte eine sehr gute Einarbeitung in die Feinheiten der Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurde der Raum gänzlich abgedunkelt, die Präparate wurden ausschließlich für das Mikroskopieren aus dem Kühlschrank genommen. Das Ziel war eine optimale Fluoreszenzerhaltung.

Die angefertigten Schnitte, die mit HE gefärbt waren, konnten für die Fluoreszenzauswertung nicht genutzt werden, da beim Mikroskopieren das gesamte Gewebe fluoreszierte. Es waren keine ALL-Zellen vom Restgewebe zu unterscheiden. Somit wurden für die Analyse nur die mit DAPI-gefärbten Gewebsschnitte verwendet.

Alle Aufnahmen wurden mit Hilfe von 3 Kanälen, dem Rot-, Grün-, und Blaukanal, aufgenommen. Im roten Kanal stechen die rot-fluoreszierenden Zellen besonders heraus. In dem grünen Kanal können die grün-fluoreszierenden Zellen besonders gut ausgemacht werden. Das Paraffin besitzt eine gewisse Eigenfluoreszenz und hinterlässt Artefakte im grünen Kanal. Erythrozyten haben im Paraffinschnitt eine Eigenfluoreszenz im roten und grünen Kanal. Mit Hilfe des blauen Kanals (DAPI-Kanal) werden die Zellkerne zum Fluoreszieren angeregt. So kann festgestellt werden, ob die jeweiligen Zellen einen intakten Zellkern besitzen, also noch vital zu sein scheinen.

Die beschriebenen Zellen bzw. Strukturen sind fortan in jedem Kanal mit Pfeilen gekennzeichnet. Die meisten ab hier dargestellten Bilder sowie weitere ausgewählte Aufnahmen finden sich auf der dieser Arbeit beiliegenden CD.

4.1 Kategorisierung der Paraffinschnitte

Es konnten beide Zelllinien mit Hilfe der Paraffinschnitte nachgewiesen werden. Insgesamt wurden über 850 Paraffinschnitt-Bilder mit je 3 Kanälen erstellt. Sie vermitteln einen guten Eindruck vom (vermutlichen) Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen.

Nach der finalen Sortierung aller Paraffin-Bilder wurde eine Kategorisierung vorgenommen. Sie orientiert sich am vermuteten chronologischen Adhäsions- und Invasionsverhalten der beiden Zelllinien. Von jeder Untergruppe ist ein Bild pro Zelllinie als Untermauerung zu den Hypothesen eingefügt. Es sei noch darauf verwiesen, dass durch die einseitige Perfusion nur der intervillöse Raum von Erythrozyten und herumschwimmenden Tumorzellen freigespült wurde, nicht aber die Zotten mit ihren fetalen Erythrozyten.

4.1.1 Hängenbleiben der Zellen in Engstellen

Die CCRF-CEM-Zellen scheinen sich gehäuft in villösen Engstellen zu verfangen und infolgedessen eine morphologische Veränderung durchzumachen. Es ist denkbar, dass die Zelle in Abb. 4.1 bereits im Begriff ist, die Zotte zu infiltrieren. Zum besseren Verständnis sind einmalig die mikroskopierten Strukturen beschriftet.

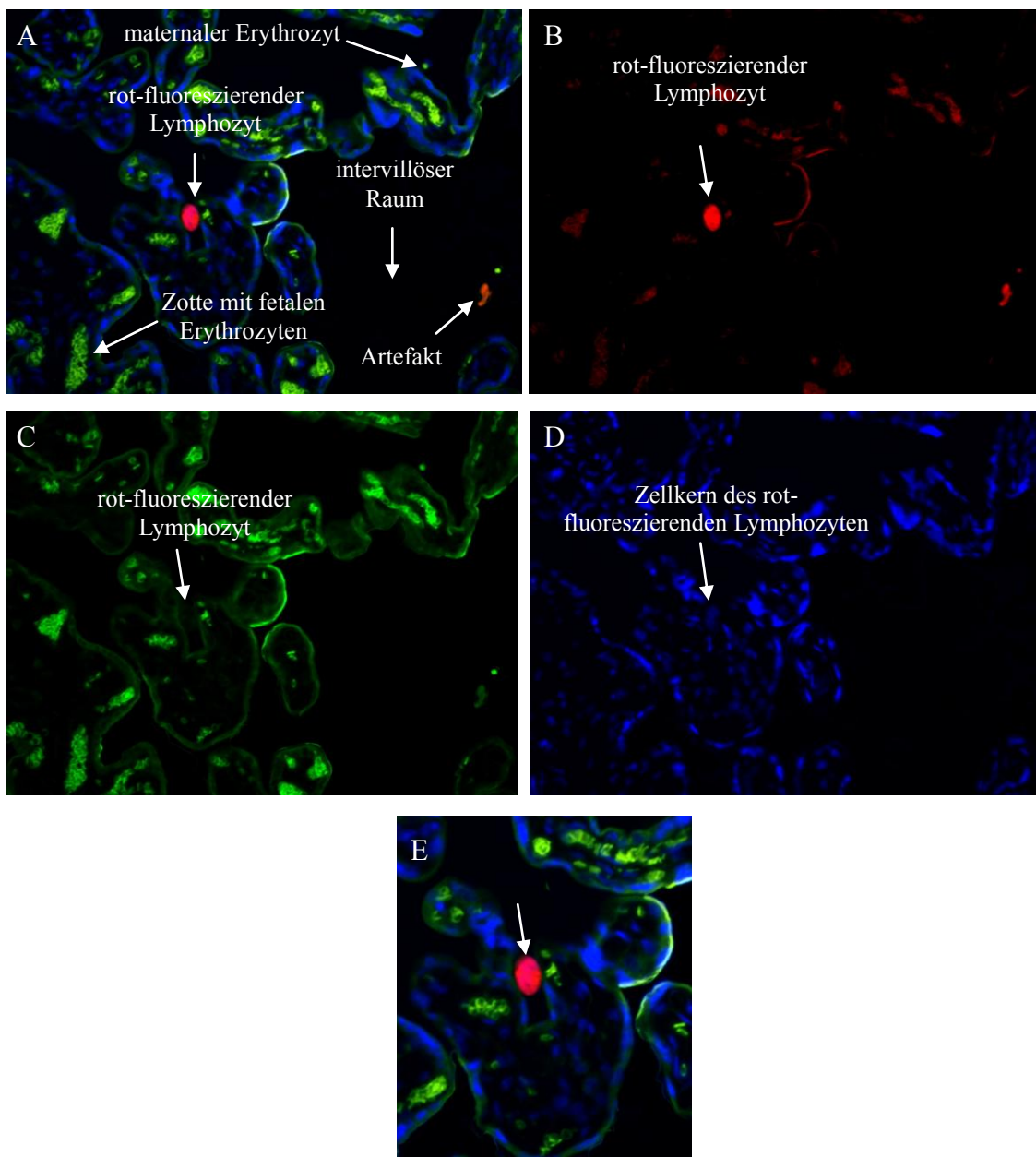


Abb. 4.1: Hängenbleiben einer CCRF-CEM-Zelle in einer villösen Engstelle
 Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
 (CellTracker orange; 1. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
 A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Auch die JURKAT-Zellen scheinen sich gehäuft in villösen Engstellen zu verfangen und infolgedessen eine morphologische Veränderung durchzumachen. Es ist wahrscheinlich, dass sie in diesem Stadium beginnen, das Gewebe zu infiltrieren (siehe Abb. 4.2).

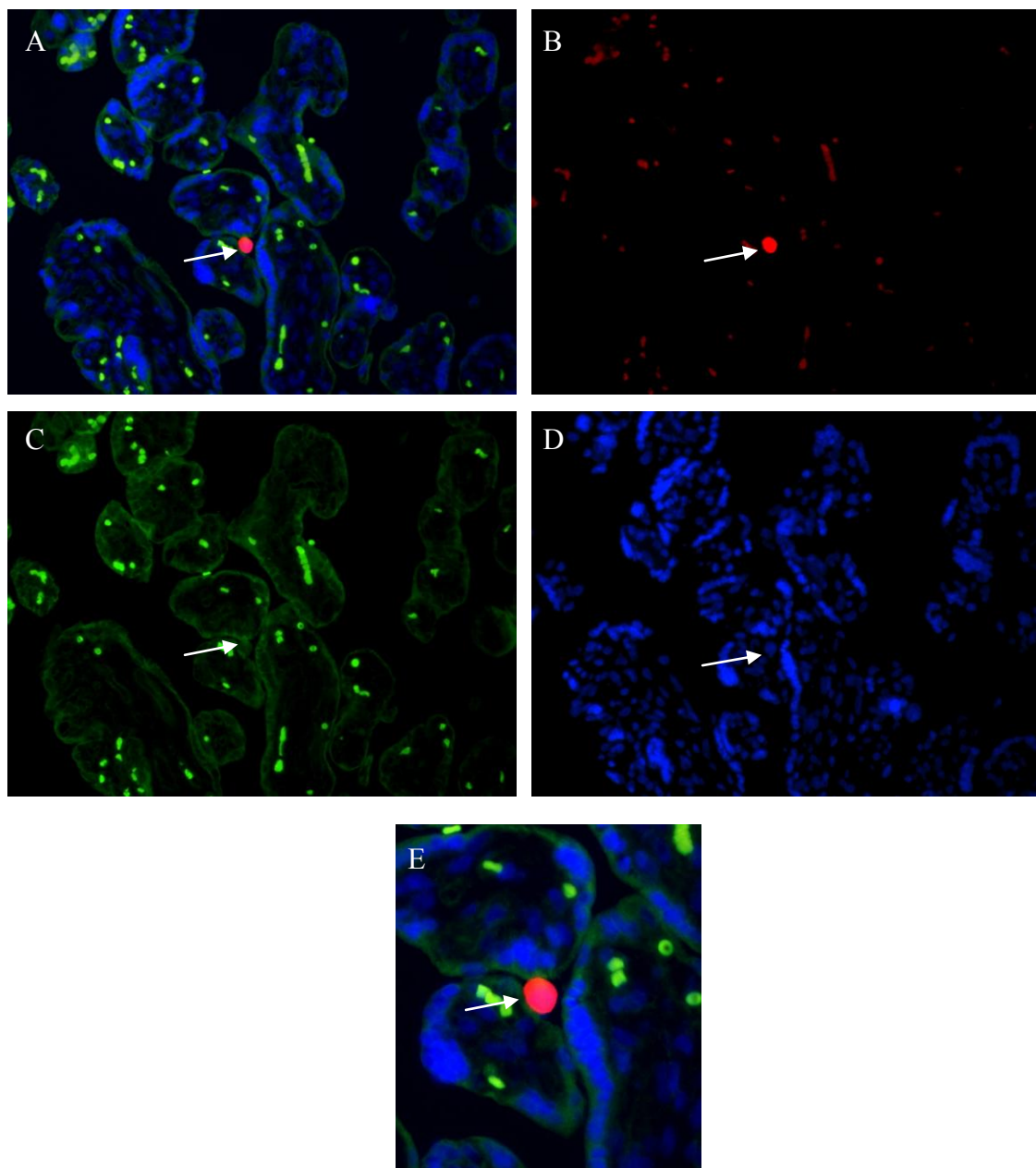


Abb. 4.2: Hängenbleiben einer JURKAT-Zelle in einer villösen Engstelle
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.1.2 Morphologische Anpassung an den Villus

Die CCRF-CEM-Zellen scheinen die Eigenschaft zu besitzen, sich durch Verformung genau an den ST anzulagern und so per Diapedese in das fetale Gewebe zu transmigrieren (siehe Abb.4.3).

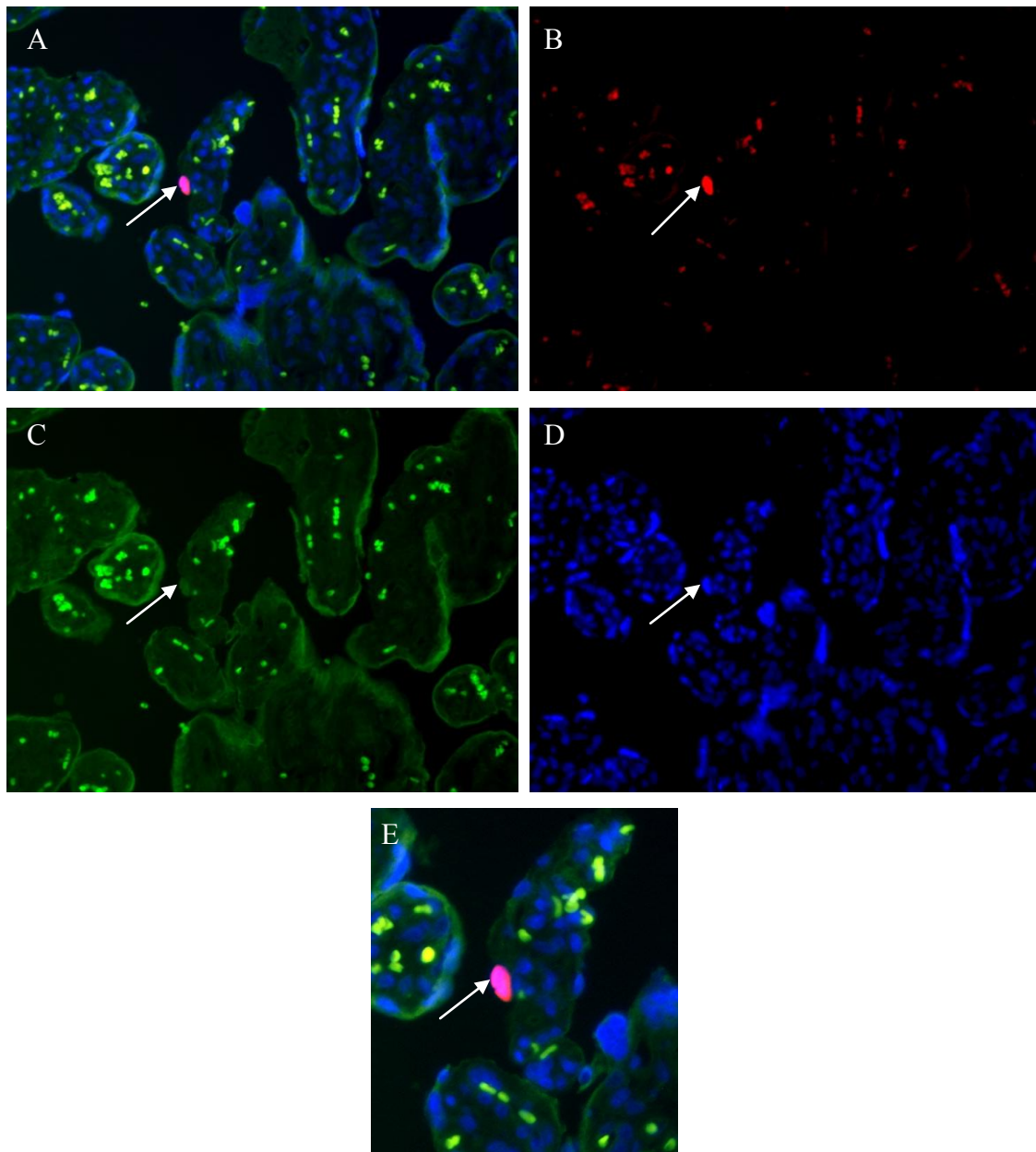


Abb. 4.3: Morphologische Anpassung einer CCRF-CEM-Zelle an einen Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Die JURKAT-Zellen scheinen ebenfalls im Stande zu sein, sich durch Verformung an den ST anzulagern, mit dem Ziel der Transmigration (siehe Abb. 4.4).

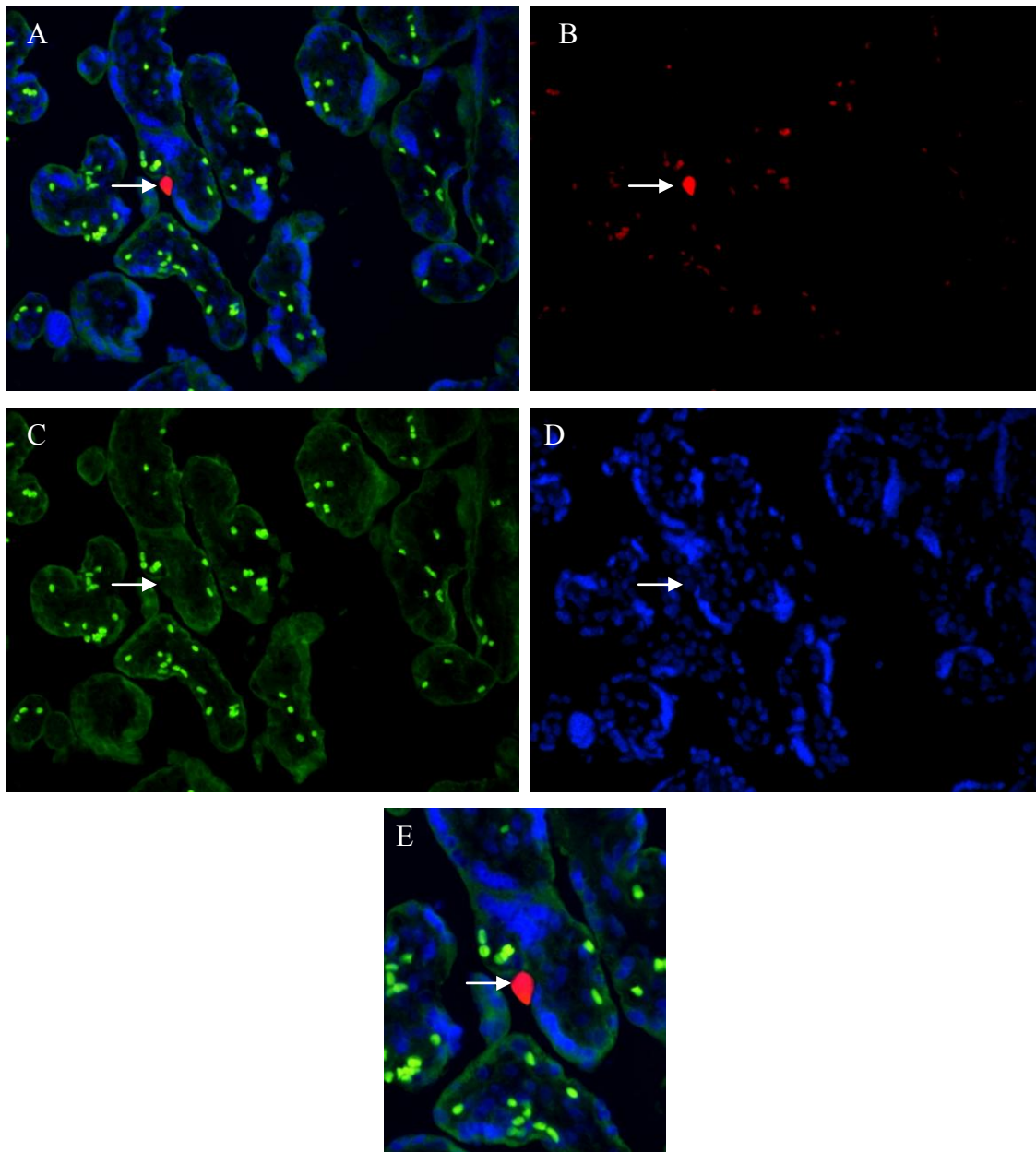


Abb. 4.4: Morphologische Anpassung einer JURKAT-Zelle an einen Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.1.3 Anheftung an die Dezidua

Anhand des Paraffinschnitts kann man darauf schließen, dass die CCRF-CEM-Zellen auch im Stände sind, sich an den synzytialen Überzug der Dezidua anzulagern (siehe Abb. 4.5).

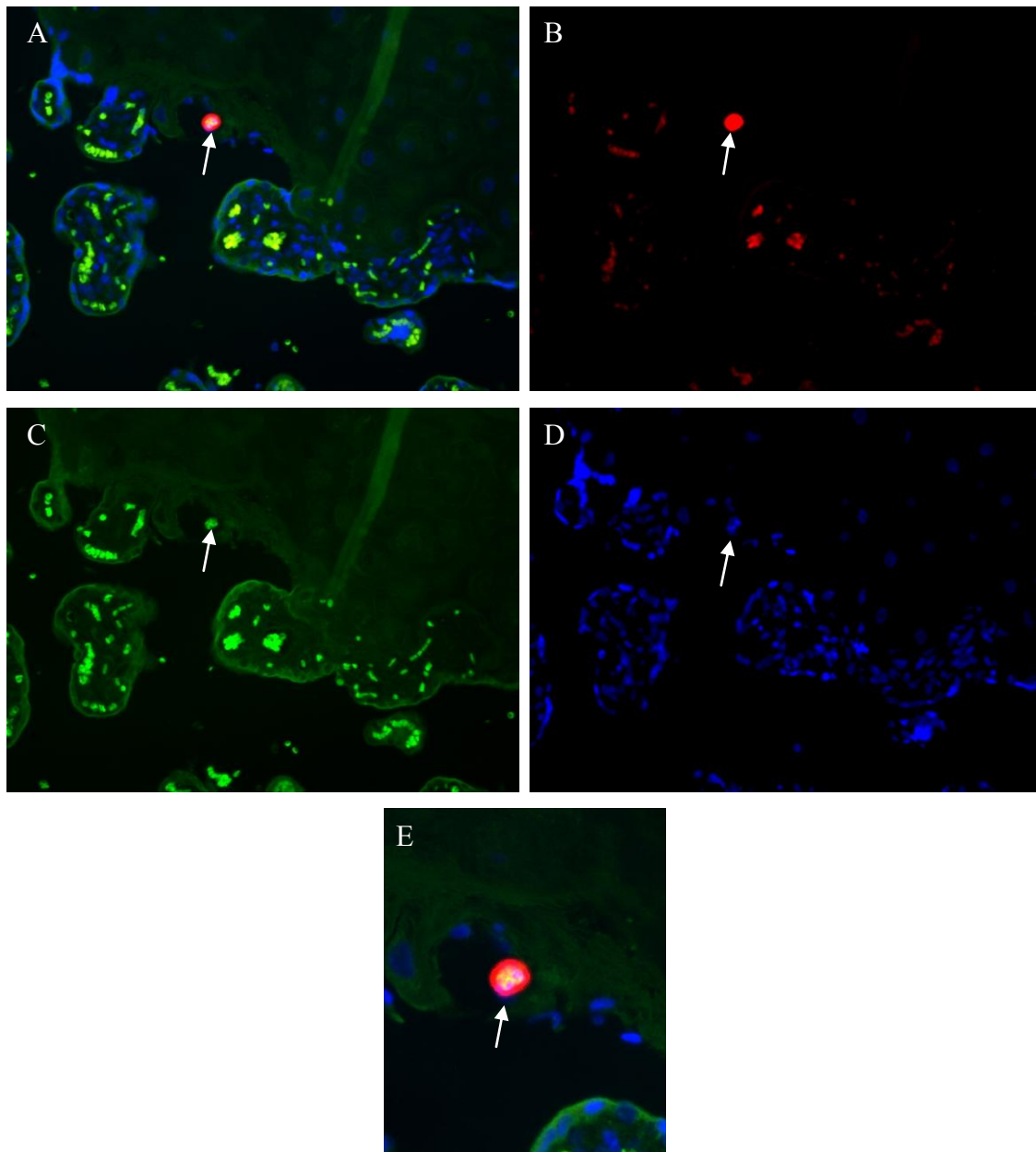


Abb. 4.5: Anheftung einer CCRF-CEM-Zelle an die Dezidua
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 1. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Die JURKAT-Zellen scheinen ebenso die Fähigkeit zu besitzen, sich an den synzytialen Überzug der Dezidua anzuheften (siehe Abb. 4.6).

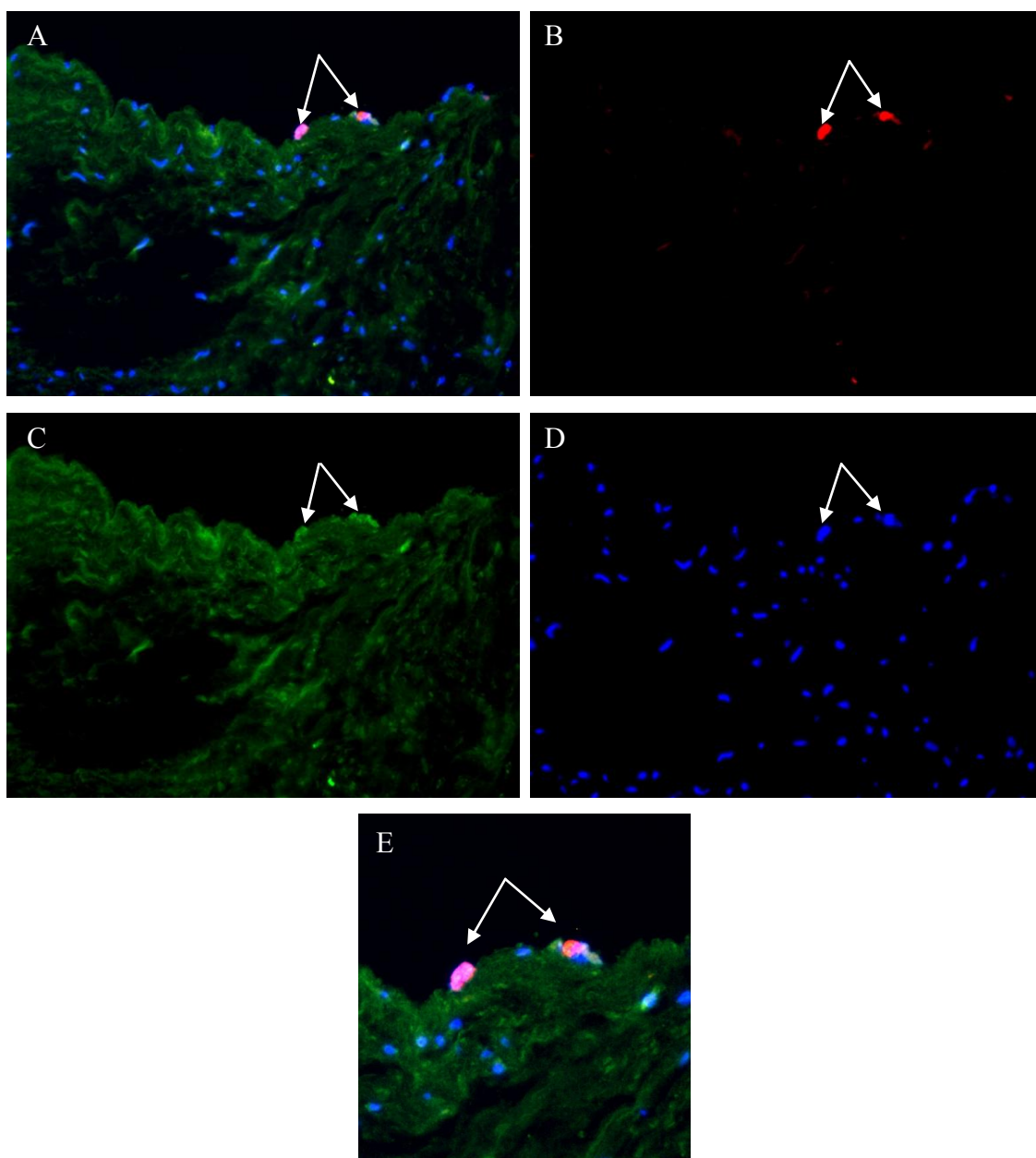


Abb. 4.6: Anheftung einer JURKAT-Zelle an die Dezidua
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 5. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.1.4 Initiale lymphozytäre Infiltration des Villus

4.1.4.1 Flächige initiale lymphozytäre Infiltration des Villus

Abb. 4.7 veranschaulicht, dass CCRF-CEM-Zellen nach erfolgreicher morphologischer Anpassung wahrscheinlich den Villus flächig infiltrieren können. Bei genauerer Betrachtung des Grünkanals fällt auf, dass der ST an der Kontaktstelle zur Zelle eine Eindellung aufweist, was durch die infiltrativen Prozesse der Tumorzelle verursacht sein könnte.

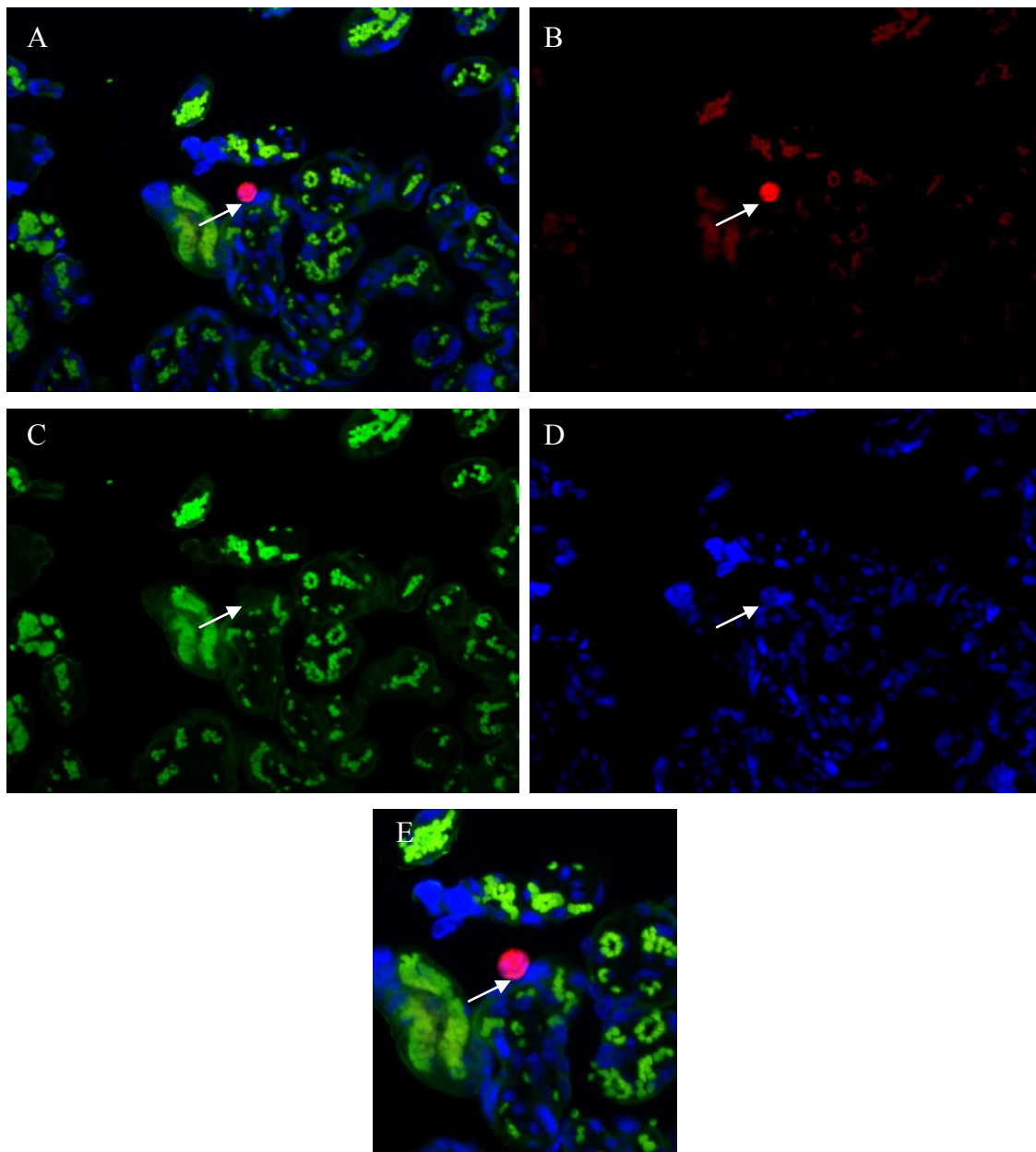


Abb. 4.7: Flächige initiale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 1. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Auch die JURKAT-Zellen scheinen das fetale Gewebe nach erfolgreicher morphologischer Anpassung flächig infiltrieren zu können (siehe Abb. 4.8). Der Grünkanal lässt darauf schließen, dass sich die Zelle bereits im ST vergräbt.

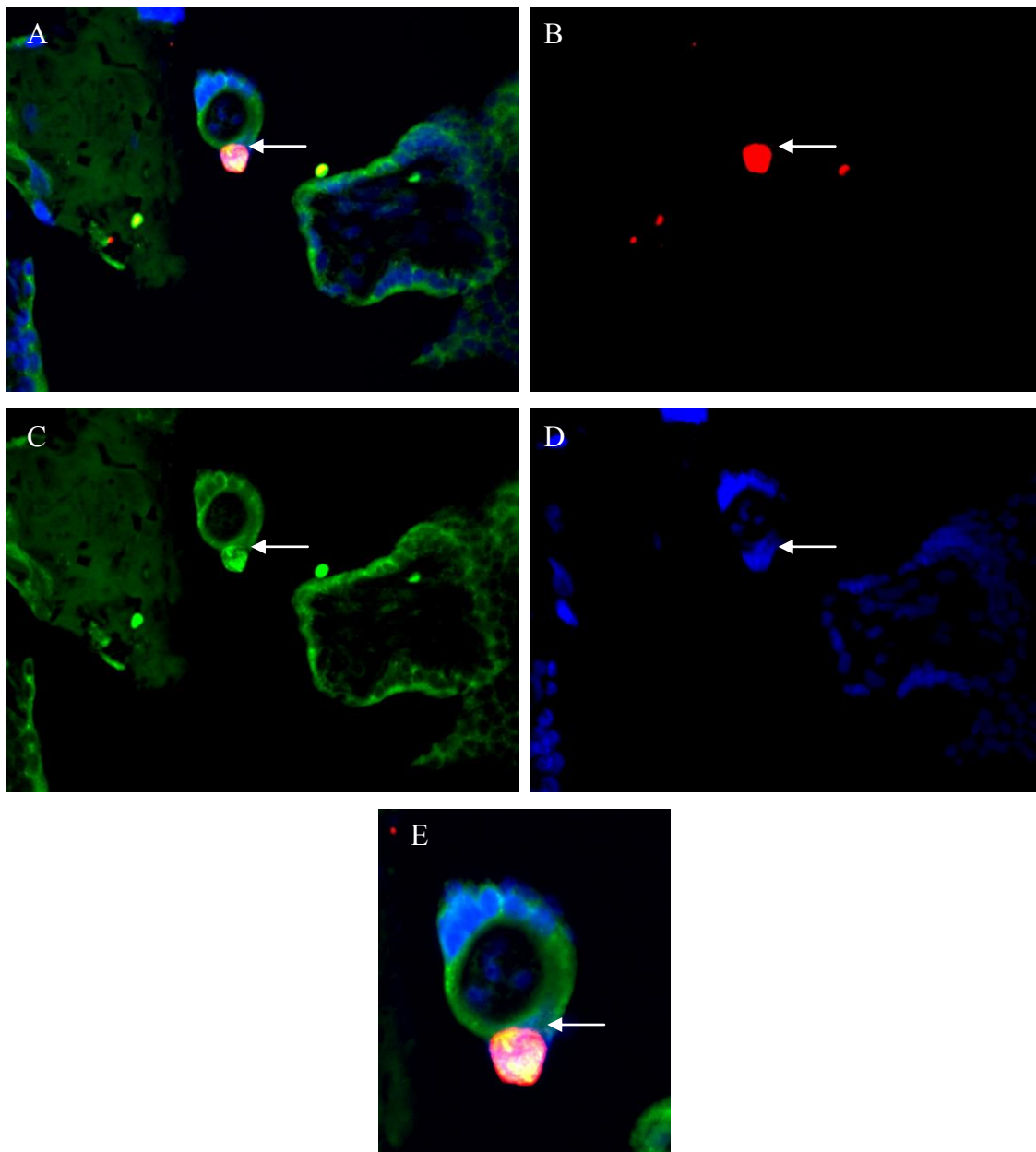


Abb. 4.8: Flächige initiale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 5. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.1.5 Terminale lymphozytäre Infiltration des Villus

Abb. 4.9 lässt darauf schließen, dass CCRF-CEM-Zellen in der Lage sind, den Villus vollkommen zu invadieren. Es ist beeindruckend, wie sich die Zelle im villösen Stroma entlang der ZT morphologisch anpasst.

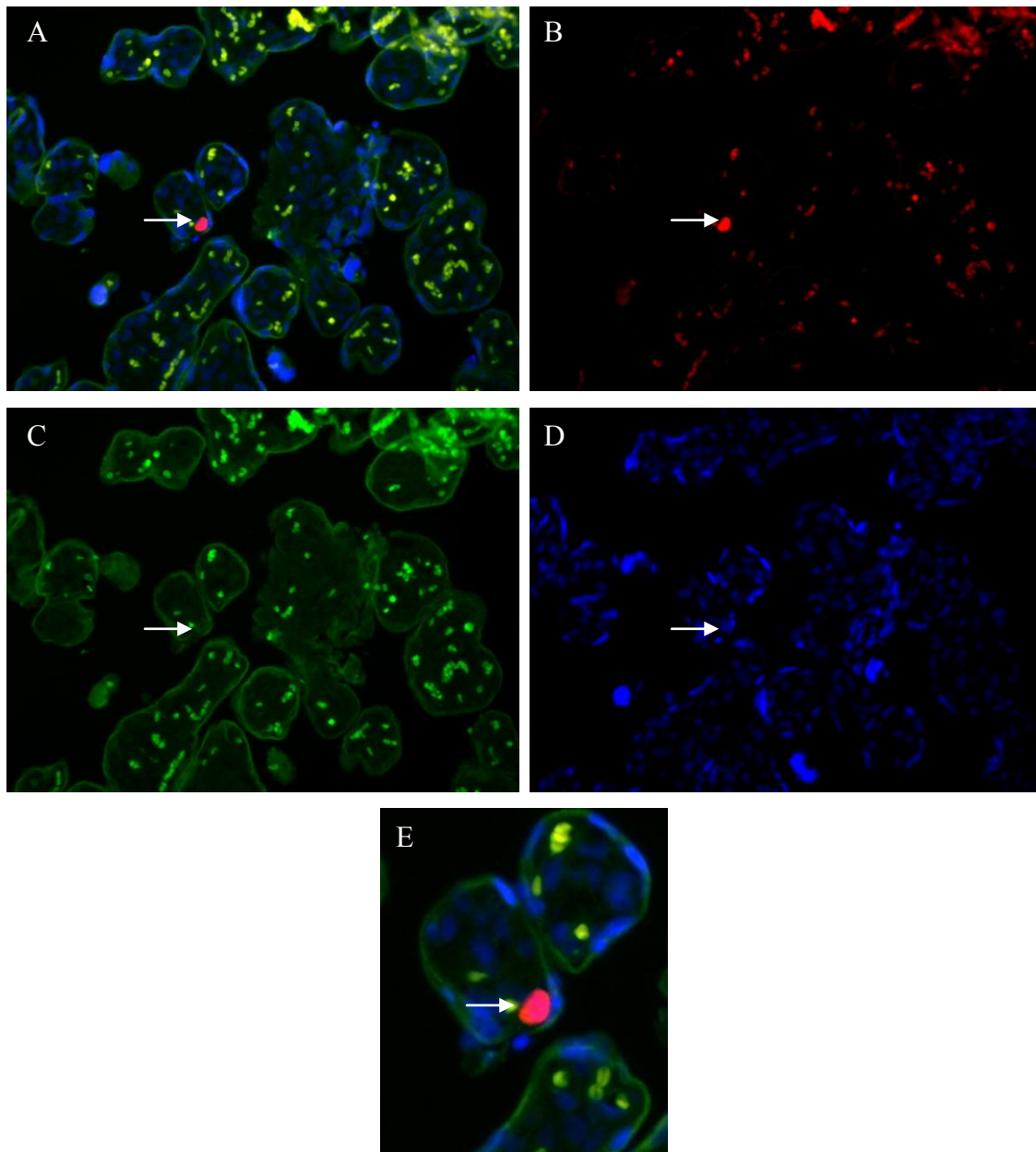


Abb. 4.9: Terminale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCFR-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Auf Abb. 4.10 ist erkennbar, dass die JURKAT-Zelle anscheinend bis in das fetale Zottenstroma invadiert ist. Sie scheint sich direkt basal der ZT-Schicht zu befinden.

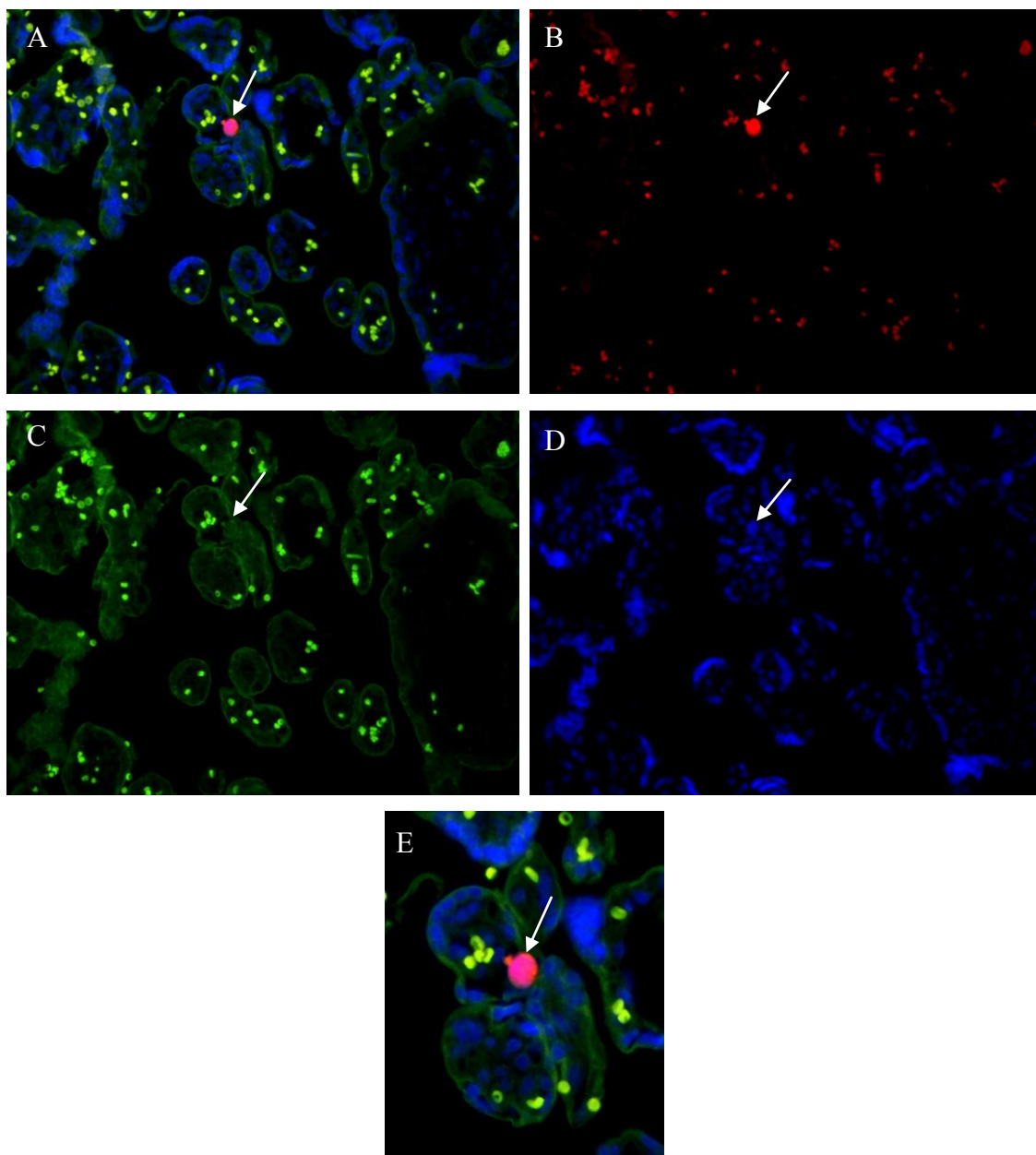


Abb. 4.10: Terminale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.1.6 Phase der vollendeten Transmigration

Es ist äußerst schwierig, zwischen der terminalen Infiltration und der Phase der vollendeten Transmigration zu unterscheiden, da der Verlauf des kindlichen Gefäßsystems nur durch die intravillösen Erythrozyten vermutet werden kann. Dennoch scheint es, als ob die CCRF-CEM-Zelle in Abb. 4.11 innerhalb des fetalen Endothels angekommen sei, da sie sich inmitten des Villus befindet und zirkulär mit Erythrozyten umgeben ist.

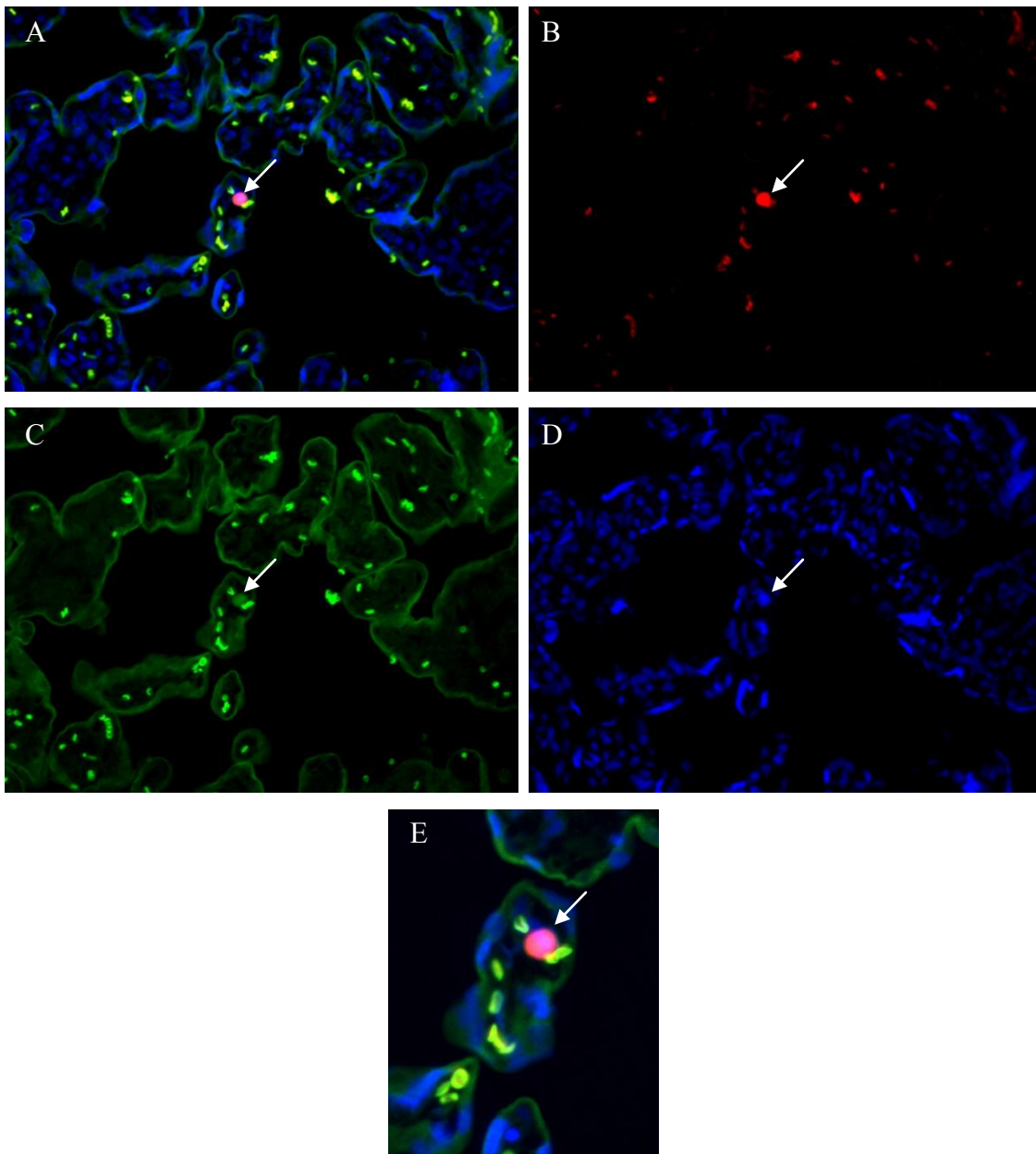


Abb. 4.11: Phase der vollendeten Transmigration einer CCRF-CEM-Zelle
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Auf Abb.4.12 ist erkennbar, dass die JURKAT-Zelle anscheinend durch das Endothel fetaler Zottengefäße invadiert ist. Sie ist umgeben von zahlreichen kindlichen Erythrozyten und hat sich so die Möglichkeit der Ausbreitung und Proliferation im kindlichen Organismus verschafft.

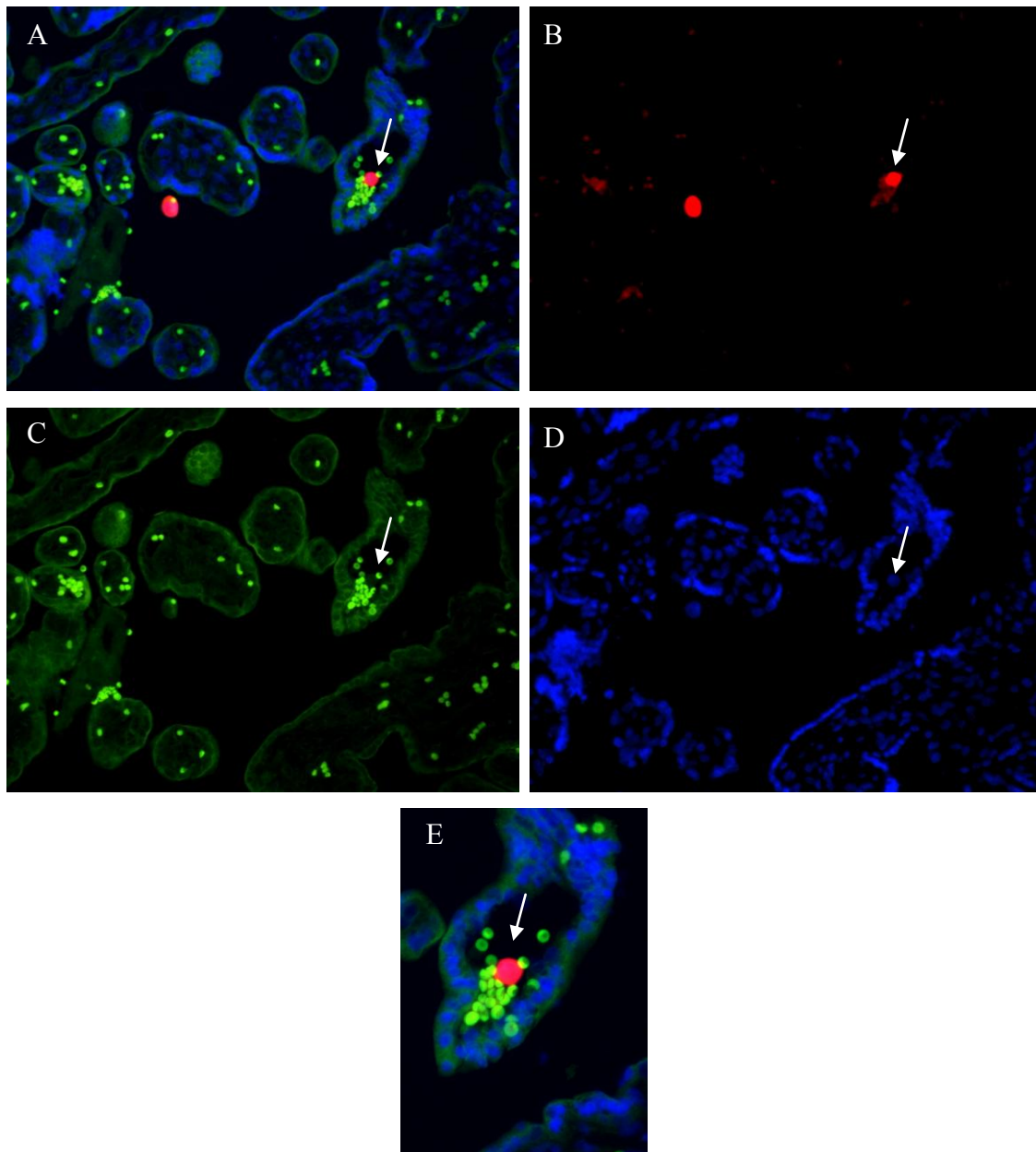


Abb. 4.12: Phase der vollendeten Transmigration einer JURKAT-Zelle
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.2 Kategorisierung der Gefrierschnitte

Es konnten beide Zelllinien mit Hilfe der Gefrierschnitttechnik in Schnitten perfundierter Plazenten nachgewiesen werden. Insgesamt wurden über 430 Bilder mit je 3 Kanälen gemacht. Auch sie vermitteln einen guten Eindruck vom (vermuteten) Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen. Die Darstellung orientiert sich weitestgehend an der Paraffinschnitt-kategorisierung, spiegelt also das vermutete Adhäsions- und Invasionsverhalten der beiden Zelllinien in chronologischer Form wider.

4.2.1 Hängenbleiben der Zellen in Engstellen

Die CCRF-CEM-Zellen scheinen sich gehäuft in villösen Engstellen zu verfangen und infolgedessen eine morphologische Veränderung durchzumachen. Der Lymphozyt in Abb. 4.13 scheint nach dem Steckenbleiben Adhäsionsbrücken (siehe Abb. 4.15 und 4.16) mit dem Synzytium auszubilden, um so den Grundstein für eine erfolgreiche Transmigration zu schaffen.

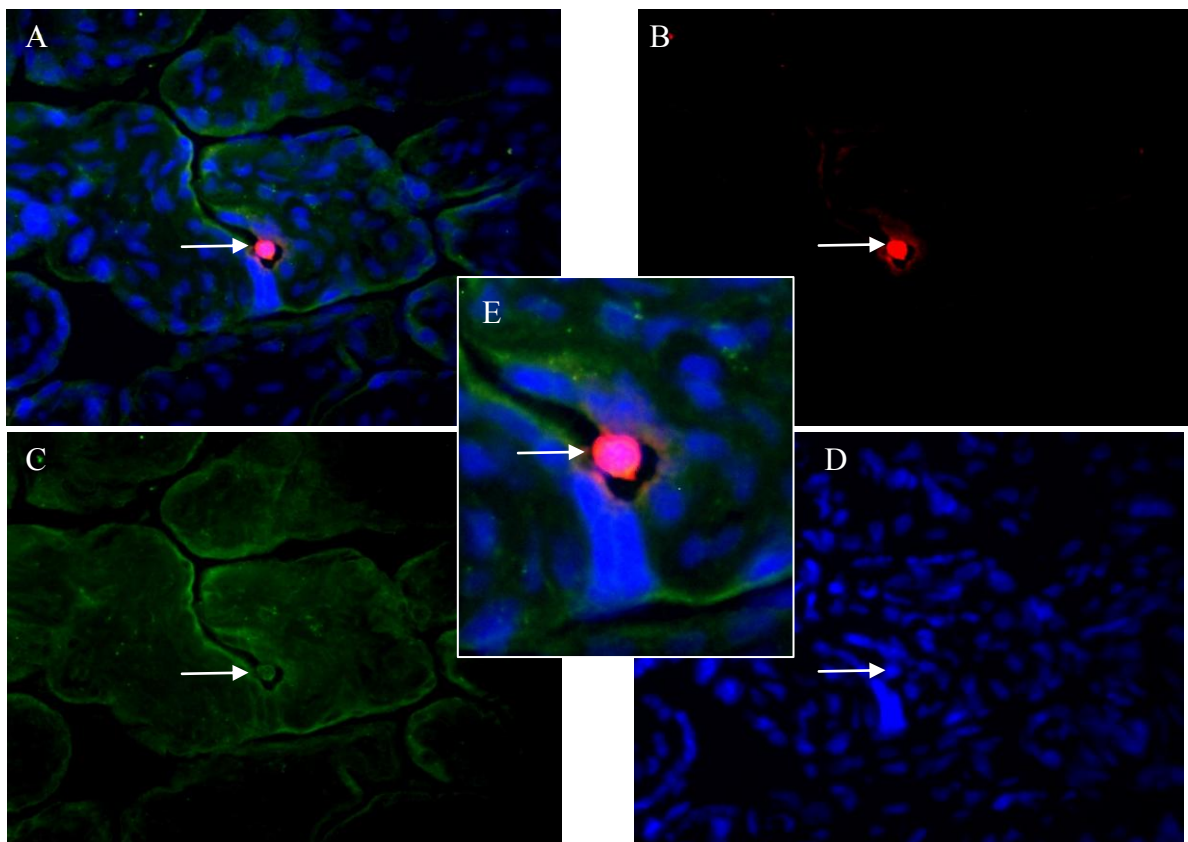


Abb. 4.13: Hängenbleiben einer CCRF-CEM-Zelle in einer villösen Engstelle
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

In Abb. 4.14 sieht es danach aus, als ob die JURKAT-Zelle in einer villösen Engstelle steckenblieb und infolgedessen eine morphologische Veränderung durchmacht. Sie könnte in diesem Stadium bereits erste Infiltrationsprozesse ausüben, um in die Zotte zu gelangen.

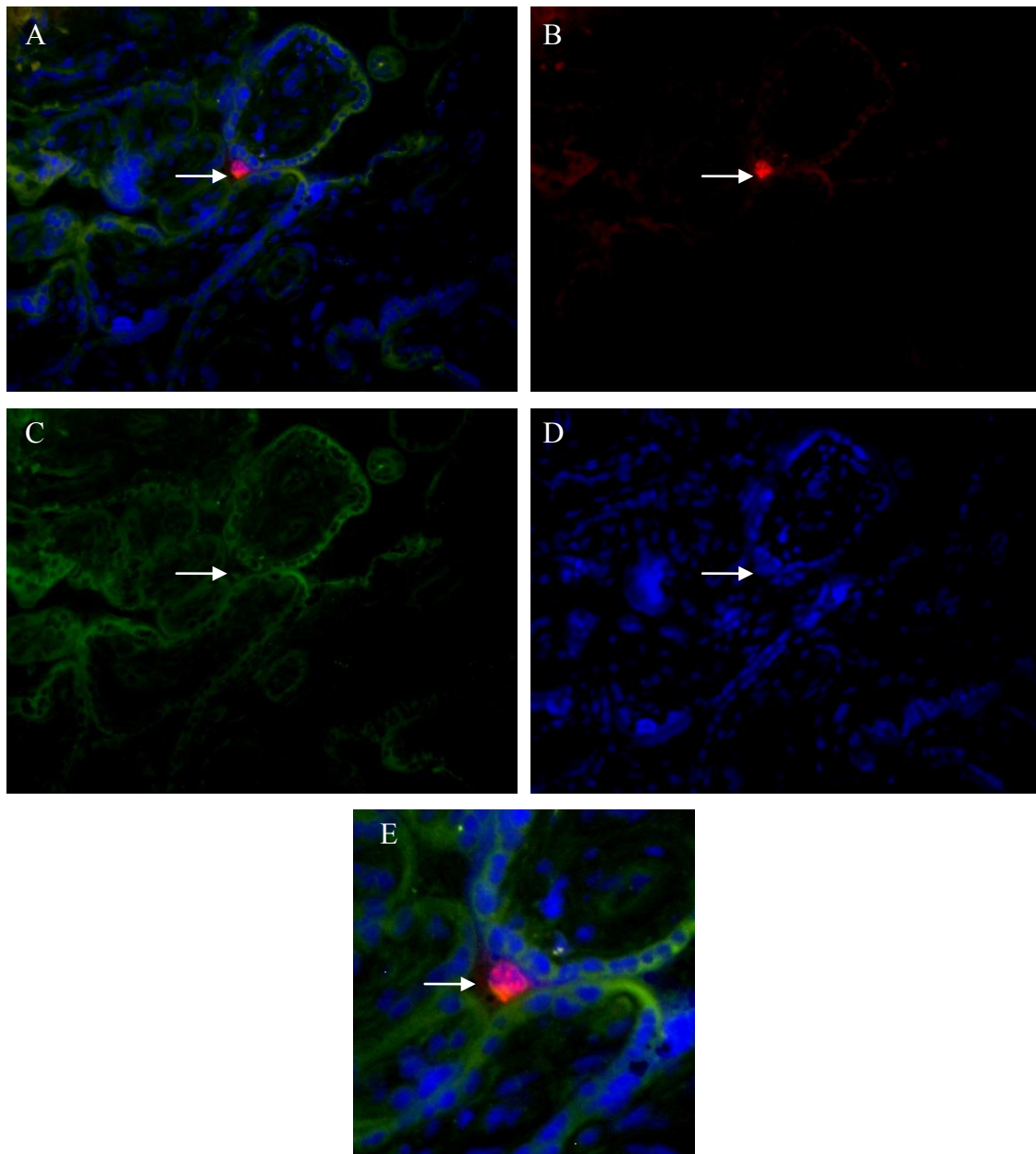


Abb. 4.14: Hängenbleiben einer JURKAT-Zelle in einer villösen Engstelle
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 2. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.2.2 Ausbildung von Adhäsionsbrücken

Es ist beeindruckend, wie sich die CCRF-CEM-Zelle in Abb. 4.15 scheinbar mit Hilfe von Proteinfäden an den Villus lagert. Man beachte den kleinen Spalt zwischen Villus und Lymphozyt. Er lässt darauf schließen, dass der erste Schritt der Transmigration in der Ausbildung von Adhäsionsbrücken besteht.

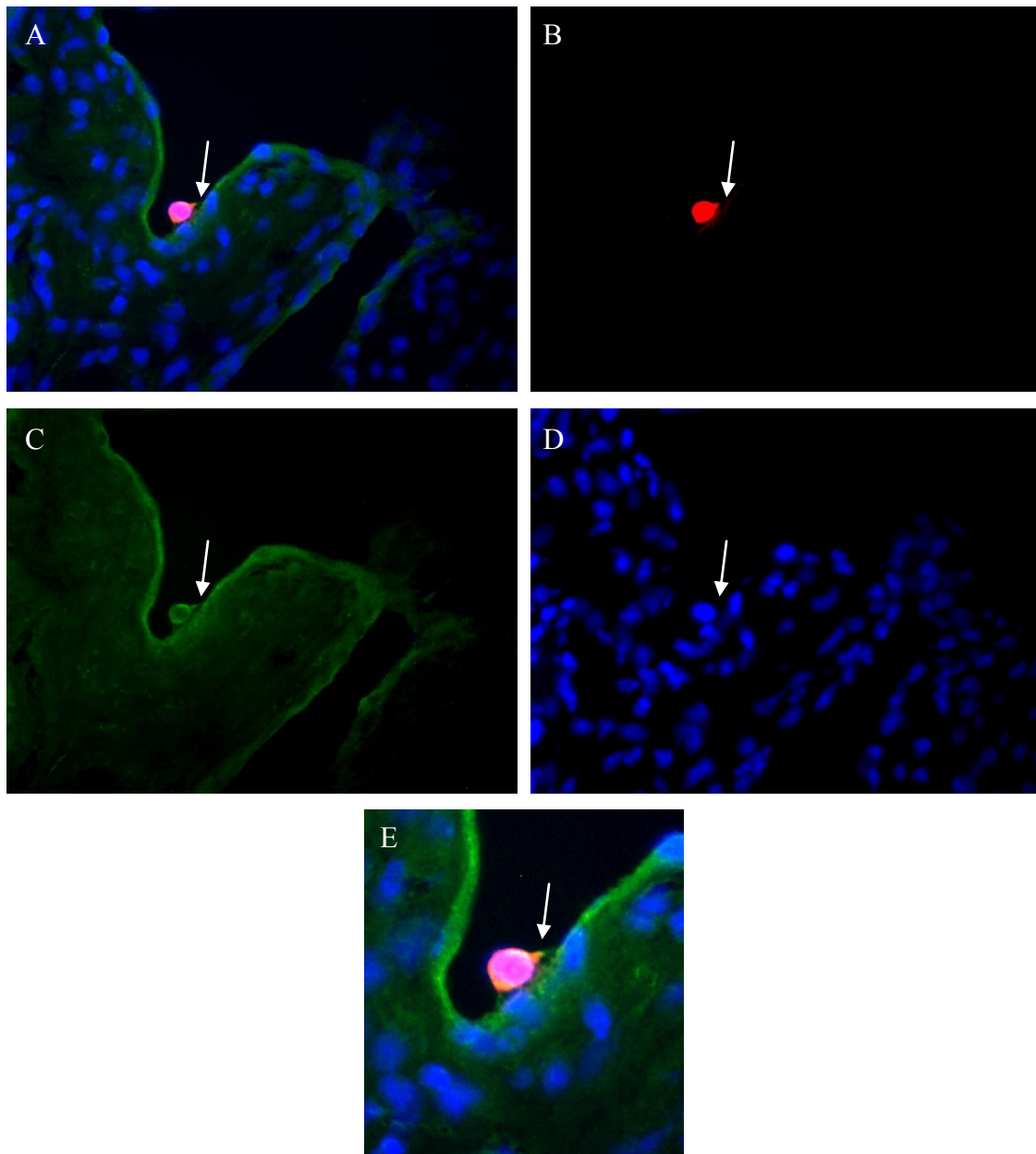


Abb. 4.15: Ausbildung von Adhäsionsbrücken zwischen einer CCRF-CEM-Zelle und einem Villus

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen (CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400; **A:** 3er Kanal; **B:** Rotkanal; **C:** Grünkanal; **D:** DAPI-Blaukanal; **E:** Ausschnittvergrößerung

Die in Abb. 4.16 aufgezeigte JURKAT-Zelle scheint nicht nur durch einzelne Proteinfäden mit dem Villus verbunden zu sein sondern durch eine Proteinmolekülbrücke.

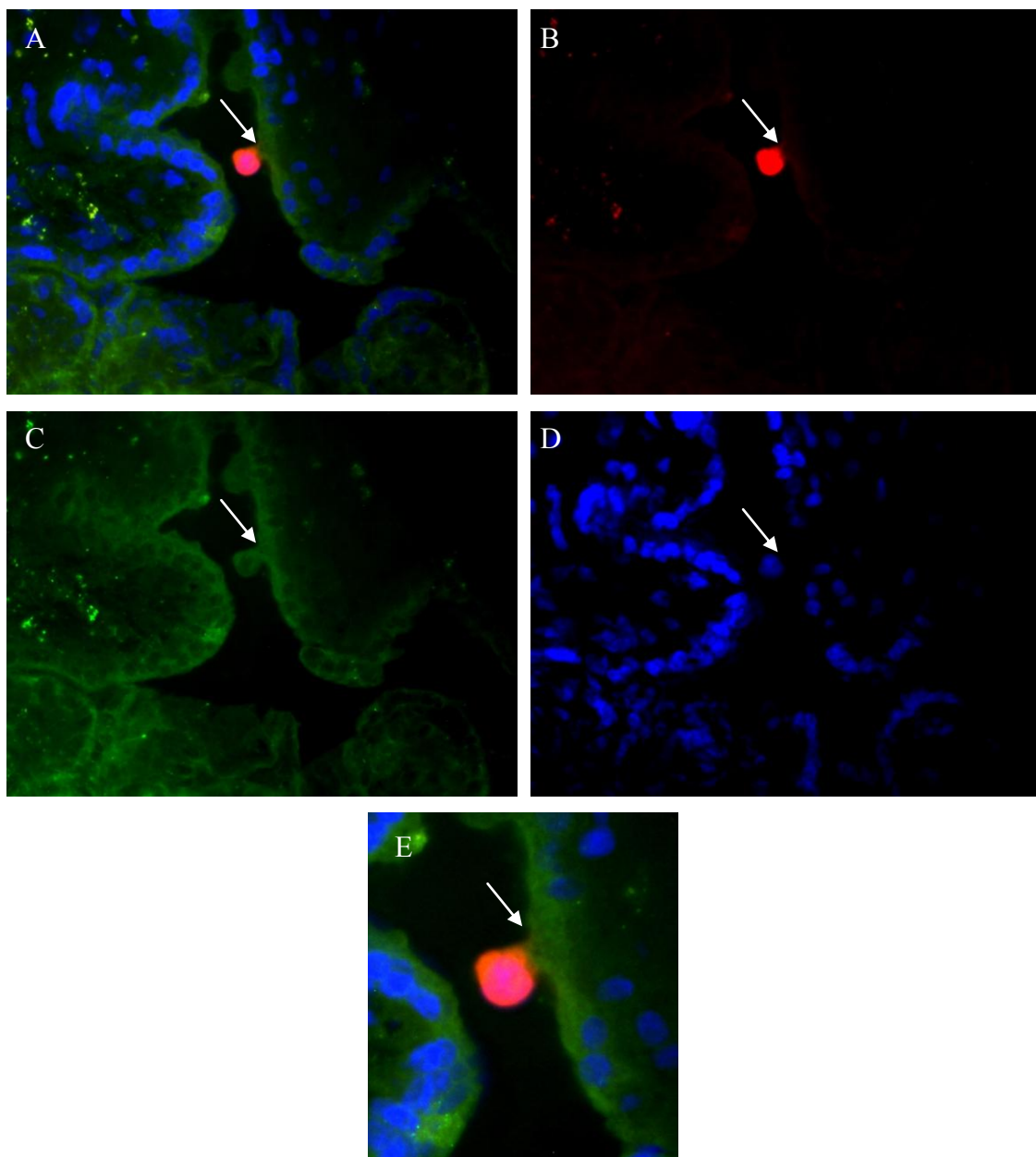


Abb. 4.16: Ausbildung von Adhäsionsbrücken zwischen einer JURKAT-Zelle und einem Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 5. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.2.3 Morphologische Anpassung an den Villus

Auch im Gefrierschnitt lässt sich vermuten, dass die CCRF-CEM-Zellen die Eigenschaft besitzen, sich nach Ausbildung von Adhäsionsbrücken durch Verformung direkt an den ST anzulagern (siehe Abb. 4.17).

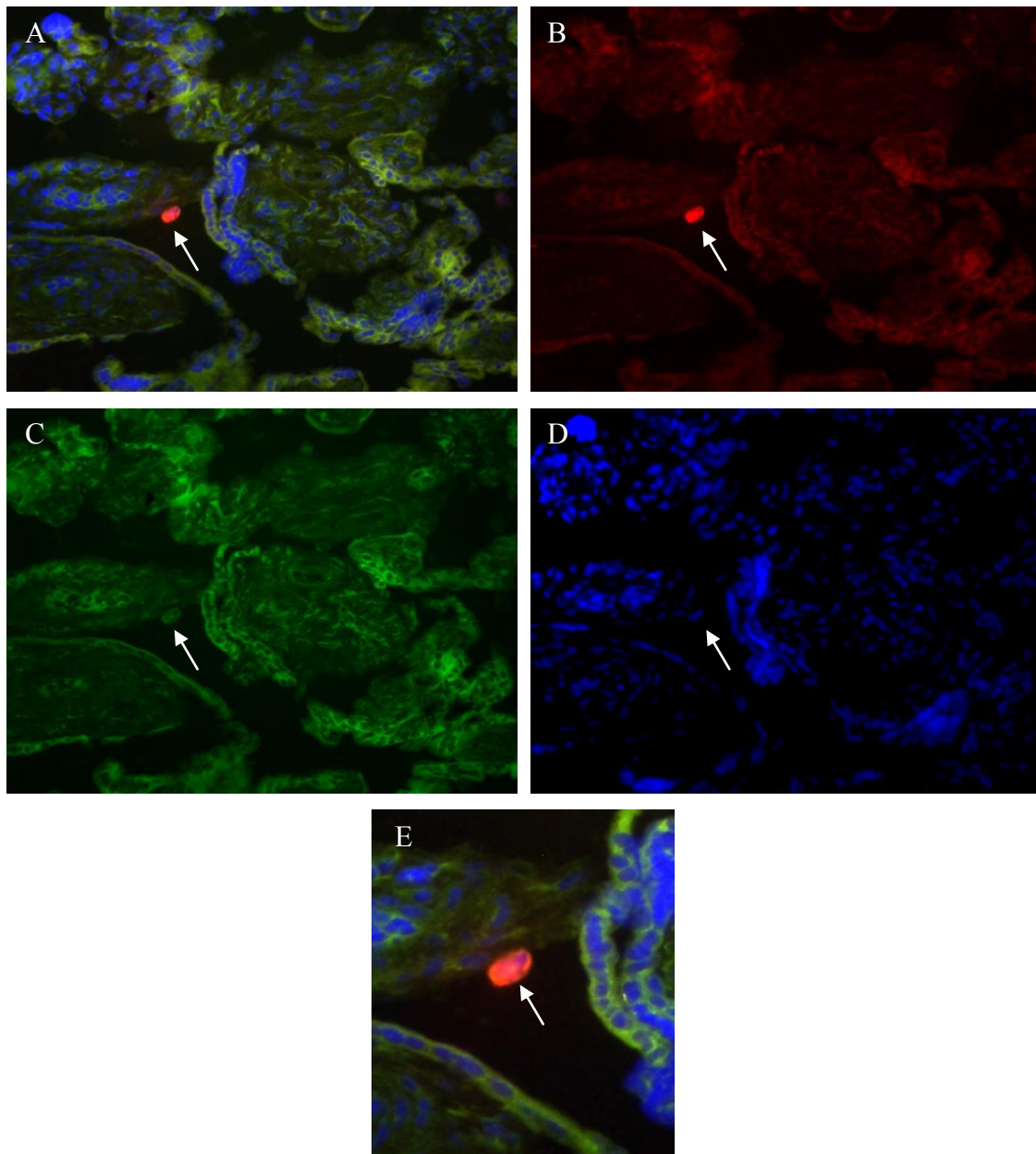


Abb. 4.17: Morphologische Anpassung einer CCRF-CEM-Zelle an einen Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 1. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Die JURKAT-Zelle in Abb. 4.18 zeigt, dass sie anscheinend in der Lage ist, sich nach der Adhäsionsbrückenausbildung äußerlich direkt an den ST anzulagern.

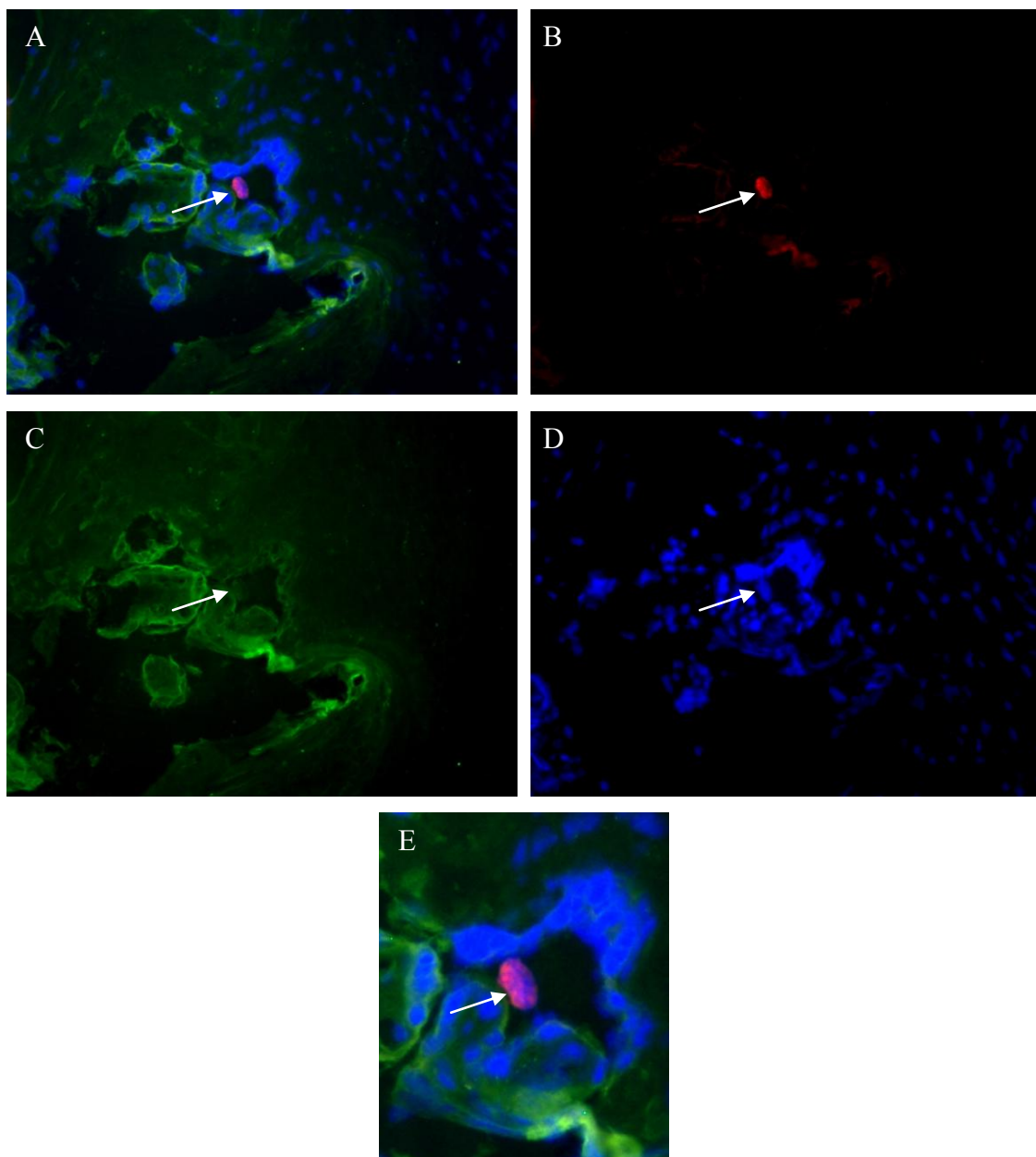


Abb. 4.18: Morphologische Anpassung einer JURKAT-Zelle an einen Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 2. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x200;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.2.4 Initiale lymphozytäre Infiltration des Villus

4.2.4.1 Punktuelle initiale Infiltration des Villus

Abb. 4.19 lässt darauf schließen, dass die CCRF-CEM-Zelle als ersten Schritt der Invasion punktuell mit ihrer Zellmembran und einem kleinen Volumen ihres fluoreszierenden Zytoplasmas durch den ST dringt. Das Gros ihres Zellinhaltes befindet sich noch außerhalb des fetalen Gewebes.

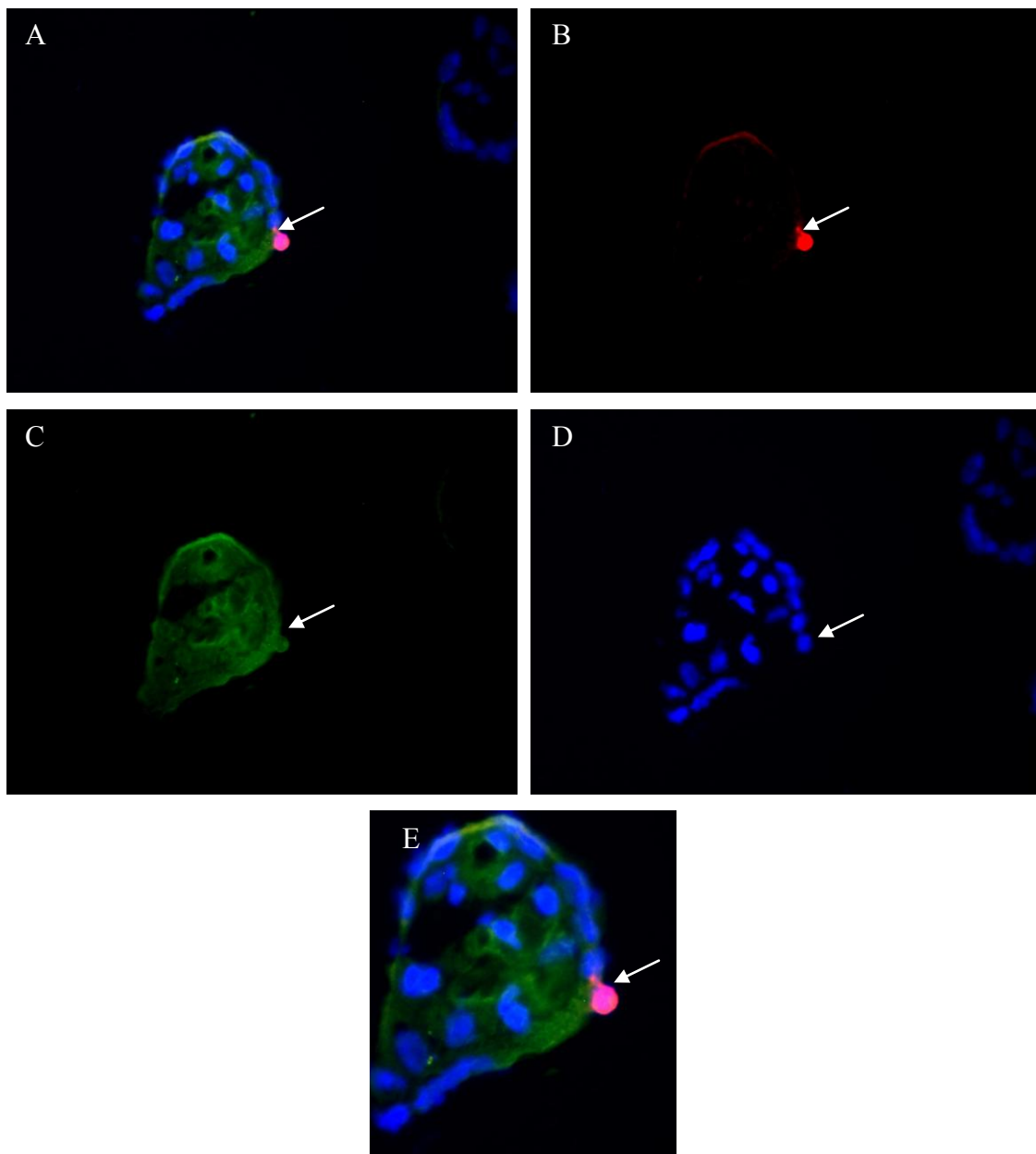


Abb. 4.19: Punktuelle initiale Farbstoffmigration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Die JURKAT-Zelle in Abb. 4.20 scheint ebenfalls als ersten Schritt der Infiltration mit ihrem fluoreszierenden Zytoplasma punktuell in den Villus zu dringen.

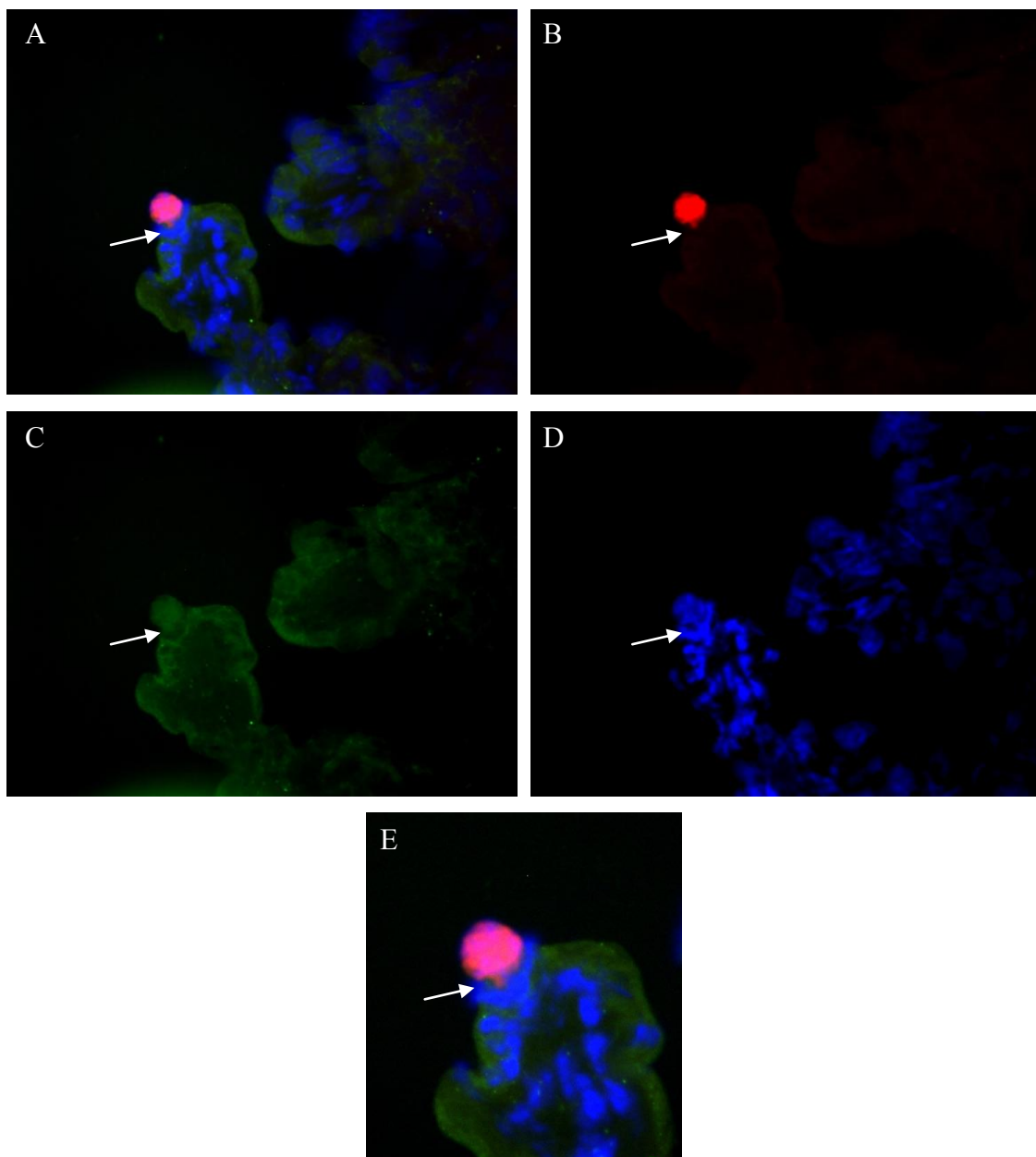


Abb. 4.20: Punktuelle initiale Farbstoffmigration einer JURKAT-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.2.4.2 Flächige initiale lymphozytäre Infiltration des Villus

Die CCRF-CEM-Zelle in Abb. 4.21 scheint sich bereits im fortgeschrittenen Stadium der Infiltration zu befinden. Im Grünfilter ist erkennbar, dass der Lymphozyt in das fetale Gewebe eingebettet ist und somit nicht nur punktuell sondern auch flächig den Villus zu inkorporieren vermag.

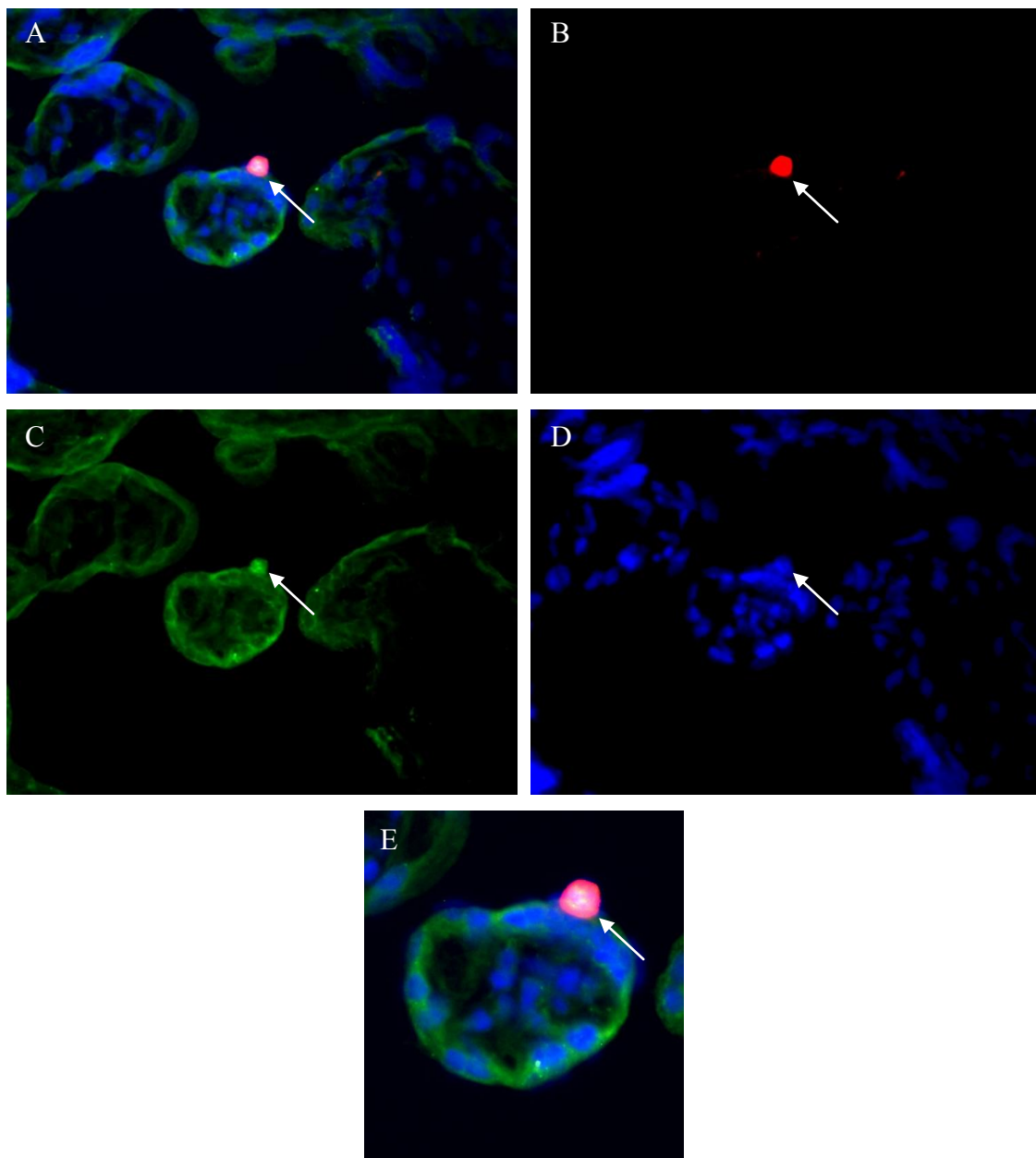


Abb. 4.21: Flächige initiale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Abb. 4.22 lässt die Vermutung zu, dass die JURKAT-Zelle im Begriff ist, den Villus im fortgeschrittenen Initialstadium zu infiltrieren. Im Grünkanal ist erkennbar, dass der Lymphozyt das fetale Gewebe zu verdrängen scheint, um sich einen intravillösen Zugang zu verschaffen.

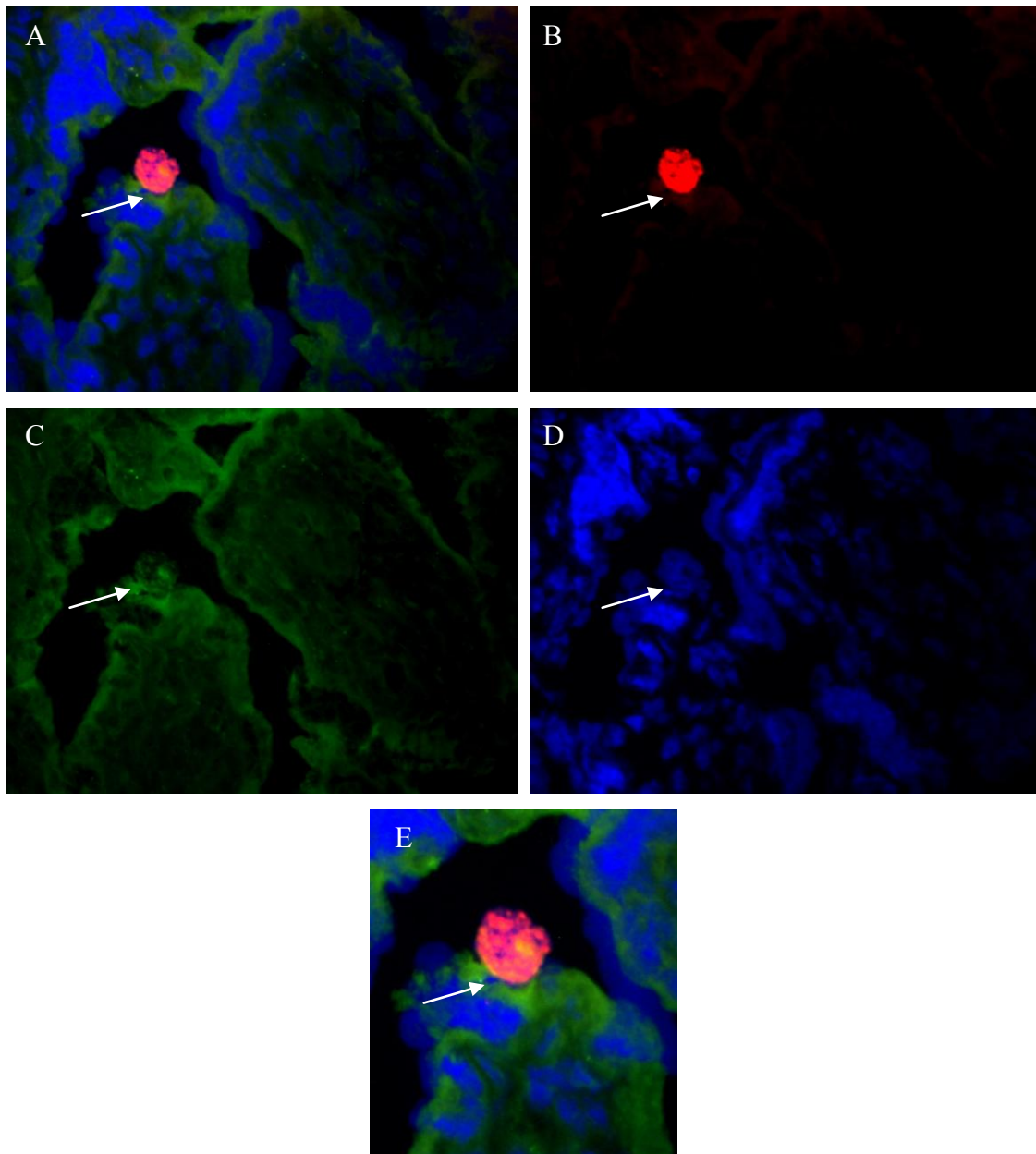


Abb. 4.22: Flächige initiale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

4.2.5 Terminale lymphozytäre Invasion des Villus

Die in Abb. 4.23 gezeigte CCRF-CEM-Zelle scheint das Villusstroma invadiert zu haben. Es sieht danach aus, als ob bei der Transmigration einige Fluoreszenzmoleküle im Synzytium haften geblieben wären (siehe E).

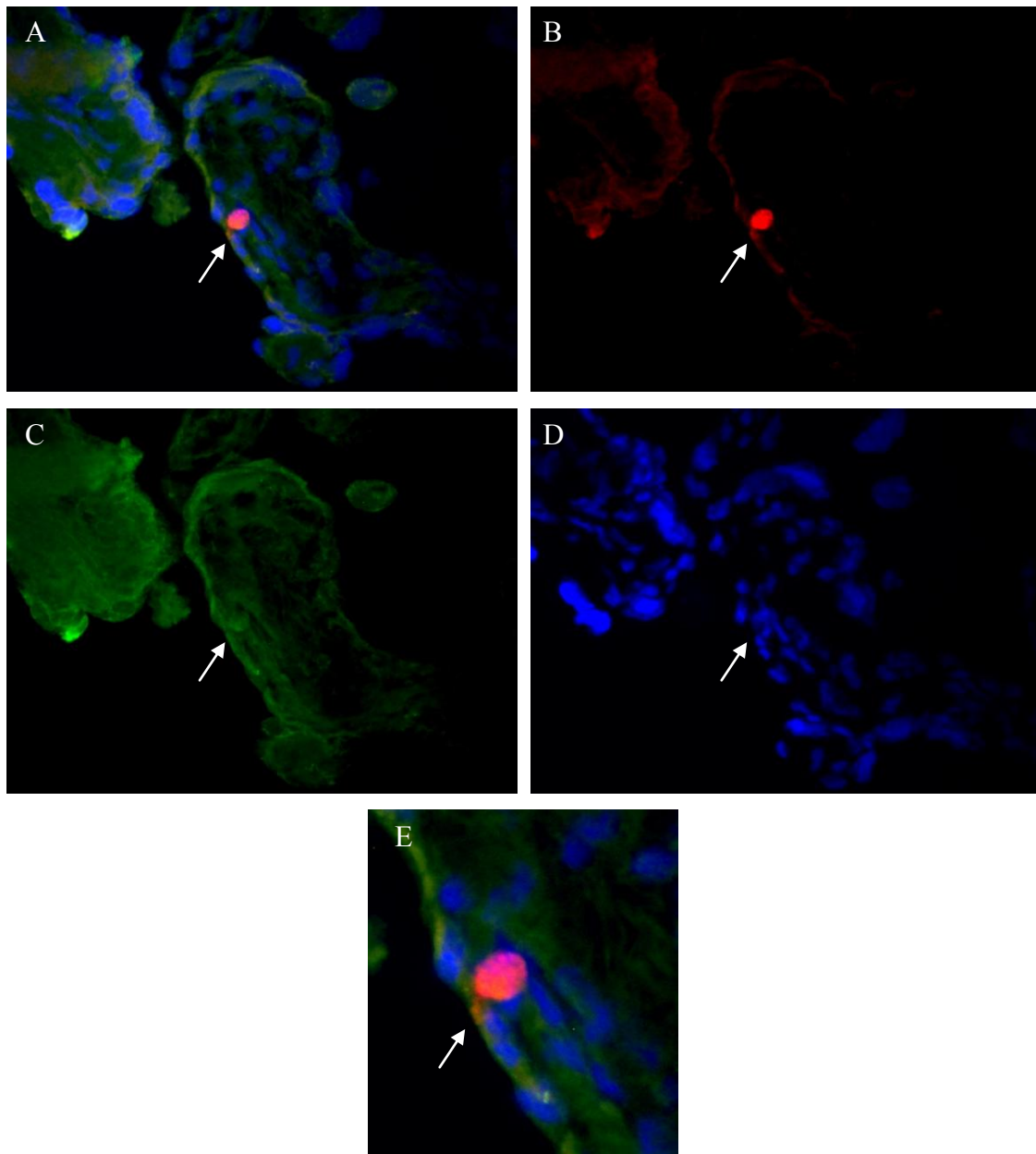


Abb. 4.23: Terminale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

Die JURKAT-Zelle in Abb. 4.24 scheint in das Stroma einer kleinen Terminalzotte invadiert zu sein. Ihr Kern sieht intakt aus, ist aber durch die wahrscheinlich stattgefundene Transmigration noch leicht verformt.

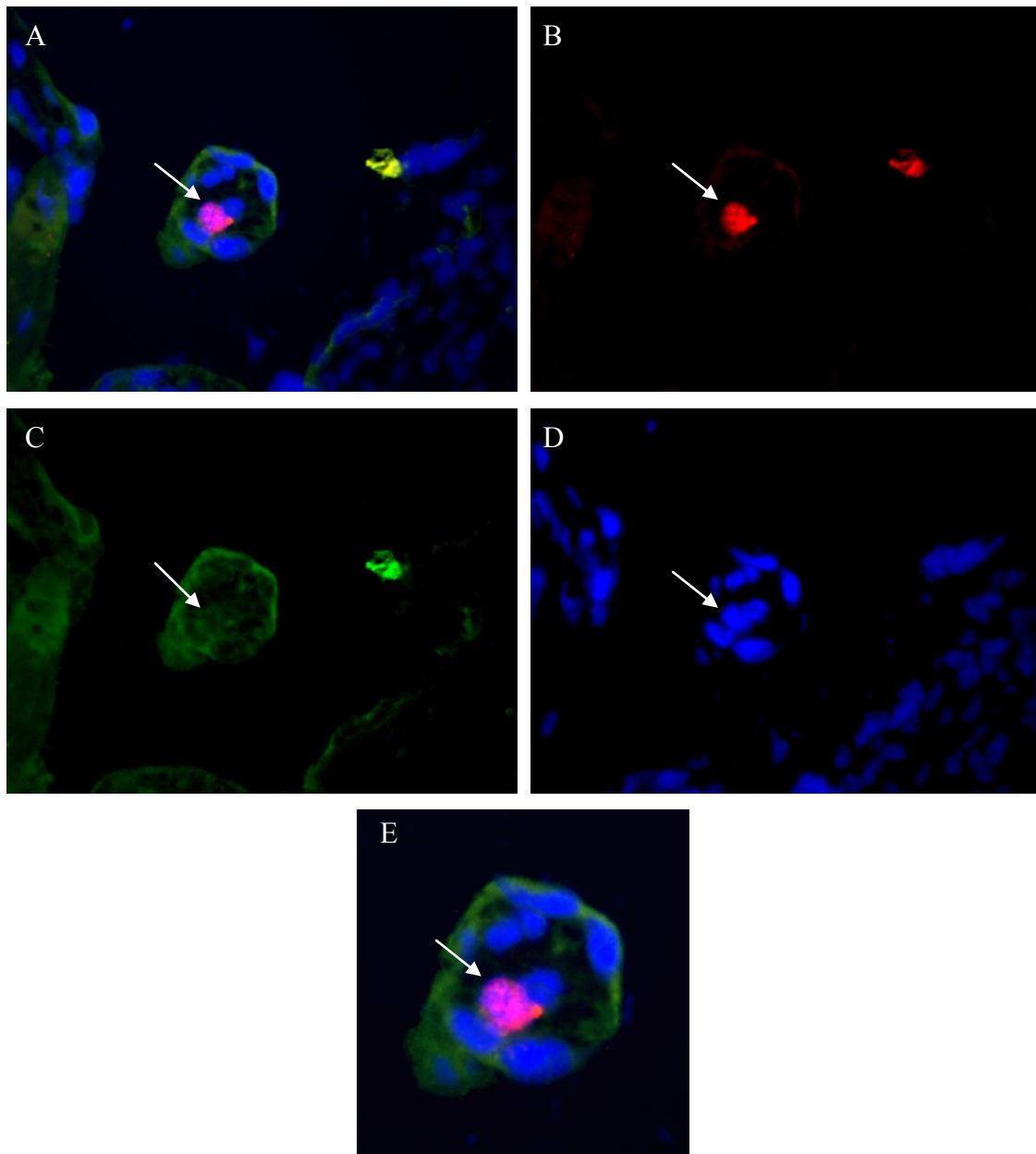


Abb. 4.24: Terminale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen
(CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400;
A: 3er Kanal; B: Rotkanal; C: Grünkanal; D: DAPI-Blaukanal; E: Ausschnittvergrößerung

5 Diskussion

5.1 Auswertung der Fluoreszenzbilder

Die umfangreiche und zügige Auswertung der Gefrier- und Paraffinschnitte ergab das Vorhandensein beider perfundierter Zelllinien an und in kindlichen Plazentastrukturen. Daraus entwickelte sich eine Vorstellung über das mögliche transmigratorische Verhalten der Leukämiezellen. Bezüglich der beiden Konservierungstechniken, der Farbstoffauswahl und der alterierenden Perfusionsparameter zeigten sich gewisse Unterschiede. All jenes soll im Rahmen dieses Kapitels diskutiert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass alle nachfolgenden Erklärungen und Hypothesen auf einer deskriptiven Auswertung der Beobachtungen basieren. Alle in dieser Arbeit dargestellten Lymphozyten (außer Abb. 5.15) besitzen einen scheinbar intakten Zellkern. Dies lässt vermuten, dass die Zellen zur Zeit des Konservierens vital waren und eigenständig Adhäsions- und Invasionsprozesse durchgeführt haben. Des Weiteren werden nur solche Lymphozyten dargestellt, die sich in einem weitestgehend frei gespülten intervillösen Raum befinden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sie eine gewisse Verbindung mit der Zotte eingegangen sein müssen und aufgrund dessen nicht aus der Plazenta gespült wurden.

Anhand der 5 durchgeführten Perfusionen und der Zahl der pro Schnitt detektierten markierten Lymphozyten lässt sich eine im Gewebe verbliebene Lymphozytenanzahl von etwa $\frac{1}{4}$ Million Zellen bei einem Durchschnittskotyledovolumen von ca. 4 cm^3 ermitteln. Dieser Wert bezieht sich auf eine Perfusion und ist sehr grob errechnet, weswegen er nicht als Referenz angenommen werden sollte. Er setzt sich aus den adhärenenten, infiltrierenden und invadierten Zellen zusammen. Da jedoch pro Blickfeld sehr wenige grün-fluoreszierende Lymphozyten mikroskopiert wurden, sind sicherlich bei Weitem nicht alle Zellen in die Berechnung mit eingeflossen und der Fehler kann relativ hoch sein. Somit sind die angegebenen 250.000 Zellen pro Perfusion nur eine Schätzung zur ungefähren Orientierung. In Punkt 6 wird diskutiert, warum es zu einer derart niedrigen Grün-Fluoreszenz gekommen sein könnte.

5.1.1 Adhäsions- und Invasionsverhalten beider Zelllinien

Beide Zelllinien scheinen in villösen Engstellen steckenzubleiben. Diese befinden sich zu Hauf am Zottenbaum. In jeder Perfusion wurden zahlreiche Tumorzellen in jeglichen villösen Strukturen beobachtet, vorrangig jedoch zwischen den stark verzweigten Terminalzotten.

Es ist anzunehmen, dass sich die Zellen in den Engstellen derart verkeilen und infolgedessen auch verformen, dass sie unter dem Perfusionsstrom nicht mehr aus diesen herausgespült werden können. Es ist nicht auszuschließen, dass sie bereits in diesem Stadium die Zotten zu infiltrieren beginnen.

Abgesehen vom Hängenbleiben in Engstellen scheinen die beiden Zelllinien ein ähnliches Adhäsions- und Invasionsverhalten zu besitzen (siehe Abb. 4.1 bis Abb. 4.24 und beiliegende CD). Die Aufnahmen lassen vermuten, dass sie an alle Strukturen des Zottenbaumes, vorzugsweise jedoch an die Terminalzotten, binden und diese infiltrieren. Darüber hinaus wurden (augenscheinlich angeheftete) Lymphozyten auch am synzytialen Überzug auf der maternalen Dezidua mikroskopiert. Hier konnten jedoch keinerlei transmigratorische Prozesse in das mütterliche Gewebe beobachtet werden.

Das Adhäsions- und Invasionsverhalten spielt sich vermutlich über die Leukozytendiapedese, die gezielte Migration von Leukozyten (Pscyrembel 2004), ab. Obwohl die klassische Diapedese mit Endothel in Verbindung steht und nicht mit synzytialem Gewebe (Pscyrembel 2004), scheinen sich die perfundierte Zelllinien weitestgehend so zu verhalten.

Abb. 5.1. zeigt grob schematisch auf, wie die 4 Phasen der Transmigration ablaufen könnten. Die Darstellung entstand in Anlehnung an die Leukozytendiapedese. Im Laufe der Diskussion werden weiterführende Theorien zu den einzelnen Phasen präsentiert, die in Punkt 5.4.1.1.1 in Form eines transmigratorischen Szenarios chronologisch zusammengefasst sind.

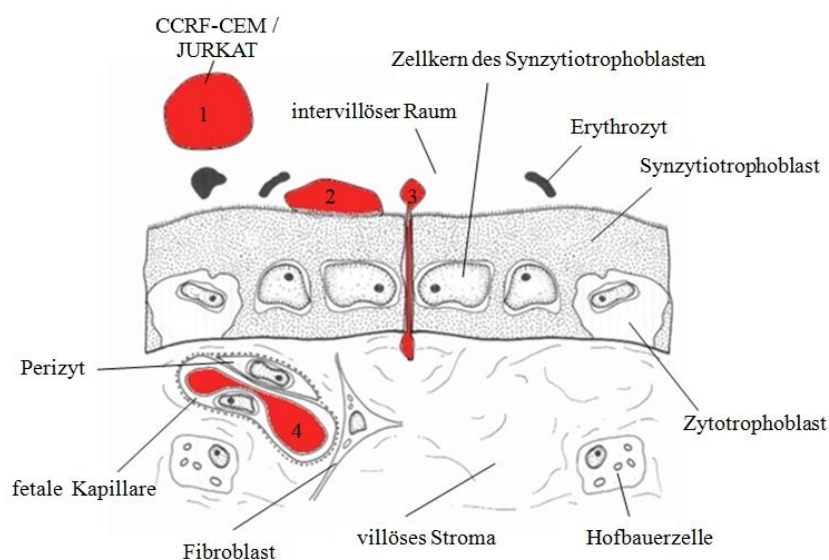


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Transmigrationsvorganges einer ALL-Zelle (mod. n. Redman et al. 1993)

1. *Intervillöse Phase:* Die Zelle (CCRF-CEM/JURKAT) befindet sich im intervillösen Raum;
2. *Adhäsions- und Anpassungsphase:* Die Zelle stellt mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen einen Kontakt mit dem ST her und lagert sich morphologisch an ihn;
3. *Infiltrationsphase:* Die Zelle migriert in den Villus;
4. *Phase der vollendeten Transmigration:* Der Migrationsvorgang ist beendet, die Zelle befindet sich im kindlichen Blutkreislauf.

Folgende vier Aufnahmen (Abb. 5.2 A-D) von verschiedenen Zellen und Zelllinien sollen der Illustration aus Abb. 5.1 einen realistischen Eindruck verleihen und sind wie folgt zu verstehen: Am Anfang der Perfusion befindet sich die Tumorzelle im intervillösen Raum (Abb. 5.2 A). Sie haftet sich im Falle der Transmigration an den ST (Abb. 5.2 B) und beginnt ihn daraufhin zu infiltrieren (Abb. 5.2 C), bis sie ihn letzten Endes durchdrungen hat und sich im fetalen Blutkreislauf befindet (Abb. 5.2 D). Dieser Vorgang ist in Punkt 5.4.1.1.1 als Szenario der Kanal-basierten Transmigration vom Synzytium bis ins fetale Gefäßsystem detailliert beschrieben.

Beide Zelllinien besitzen dem Anschein nach ein ähnliches Transmigrationsverhalten (siehe Punkt 4.1 und 4.2 sowie beiliegende CD).

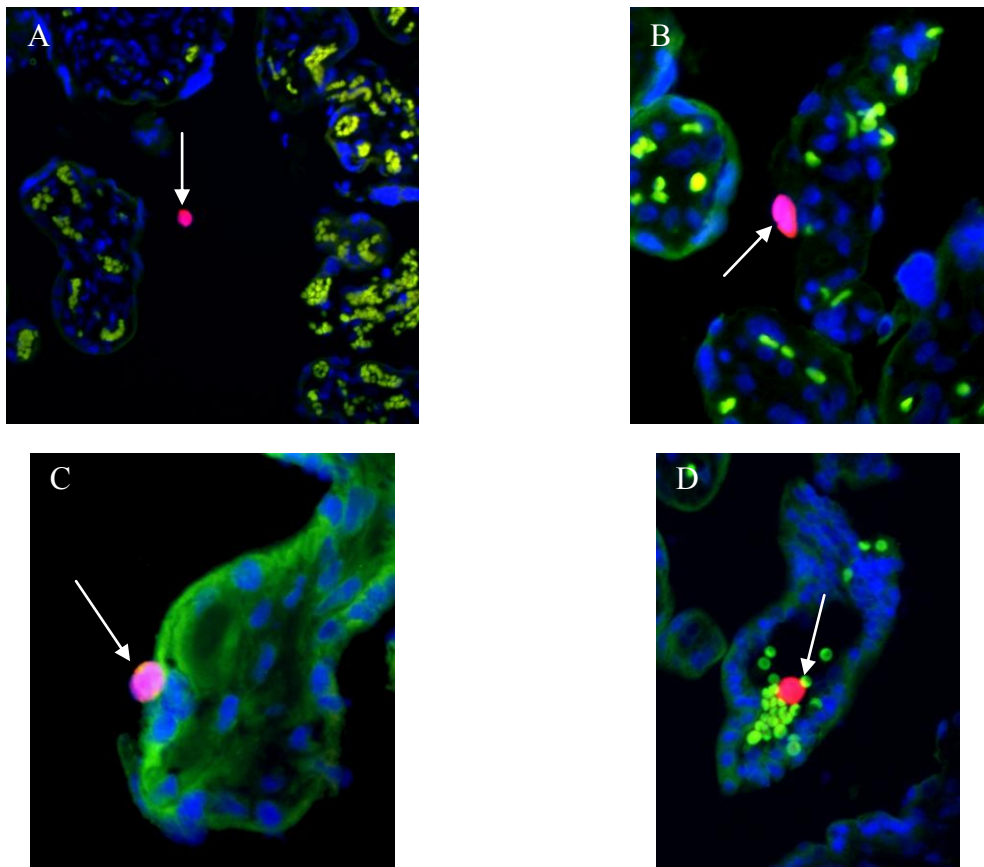


Abb. 5.2: Darstellung des (vermuteten) Transmigrationsvorganges in Bezug auf Abb. 5.1
A: intervillöse Phase; Plazenta, perfundiert mit CCRF-CEM-Zellen (CellTracker orange; 1. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); **B:** Adhäsions- und Anpassungsphase; Plazenta, perfundiert mit CCRF-CEM-Zellen (CellTracker orange; 4. Perfusion; siehe Abb. 4.3); **C:** Infiltrationsphase; Plazenta, perfundiert mit JURKAT-Zellen (CellTracker orange; 3. Perfusion); **D:** Phase der vollendeten Transmigration; Plazenta, perfundiert mit JURKAT-Zellen (CellTracker orange; 3. Perfusion; siehe Abb. 4.12); A/B/D: Paraffinschnitt; Ausschnitt aus einer 200fachen Vergr.; C: Gefrierschnitt; Ausschnitt aus einer 400fachen Vergr.; A-D: 3er Kanal

5.1.2 Adhäsionsbrücken

Anhand der Gefrierschnittpräparate entstand eine erstaunliche Serie von Aufnahmen. Sie lassen einen bemerkenswerten Adhäsionsmechanismus vermuten. Es deutet viel darauf hin, dass beide Zelllinien in der Lage sind, gewisse Adhäsionsbrücken mit dem Villus auszubilden, bevor sie sich morphologisch an ihn legen (siehe 5.4.1.1.1). Es kann kein Zufall sein, dass Derartiges in einer Vielzahl von Bildern beobachtet wurde. Besonders im Grünfilter scheint diese Adhäsionsbrücke eins mit dem fetalen Gewebe zu sein (siehe Abb. 4.15 E, Abb. 4.16 E und Abb. 5.3 A). Zu Beginn der Untersuchung wurde Folgendes festgestellt: der intervillöse Raum ist von zellulärem Material weitestgehend frei gespült, einige fluoreszierende Lymphozyten sind jedoch nach wie vor darin vorzufinden. Sie befinden sich nah am Villus, scheinen aber nicht direkt mit ihm verbunden zu sein. Da es einiges an Erfahrung benötigt, Gefrierschnitte auszuwerten, stellte dieser kleine Spalt zwischen Tumorzelle und Villus anfänglich ein Rätsel dar. Doch bei 400facher Vergrößerung und einer gewissen Routine zeigte sich eine neoplastische Verbindung, im Rahmen dieser Arbeit als Adhäsionsbrücke bezeichnet, zwischen den beiden Strukturen. Sie scheint für einen relativ stabilen Verbund zu sorgen und die Zelle vor dem Ausspülen zu bewahren.

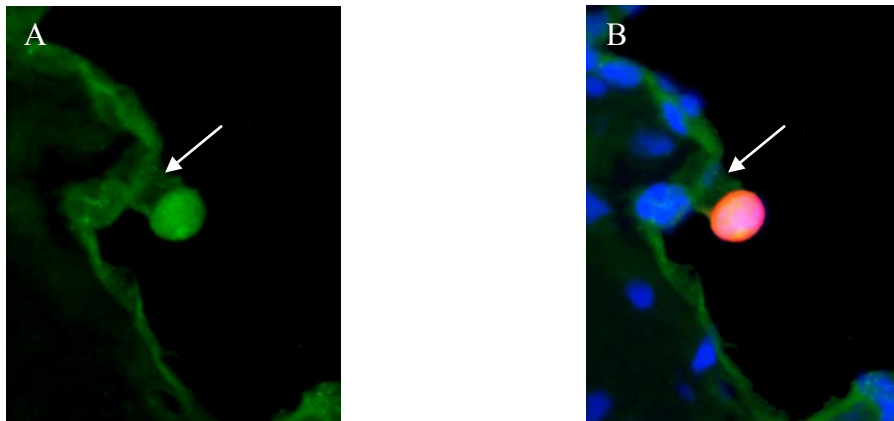


Abb. 5.3: Ausbildung von Adhäsionsbrücken zwischen einer CCRF-CEM-Zelle und einem Villus (Pfeil)

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen (CellTracker orange; 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; **A:** Grünkanal; **B:** 3er Kanal; A/B: Ausschnitt aus einer 400fachen Vergr.

5.1.3 Penetration des Synzytiums durch zytoplasmatische Zellausläufer

Der CellTracker bindet an das Zytoplasma der markierten Leukämiezelllinie und bringt es zum Fluoreszieren. Diese Fluoreszenz kann wiederum gut mikroskopiert werden.

Anhand der Gefrierschnitte kommt daher die Vermutung auf, dass nach der Adhäsions- und Anpassungsphase (siehe 5.1.1) ein Zytoplasmaübertritt des Lymphozyten in den Villus stattfindet, ohne dass er in seiner Gesamtheit dabei Schaden nimmt.

Um jene Passage zu realisieren, ist es denkbar, dass die Zelle zu Beginn der Infiltrationsphase durch „Schwachstellen“ innerhalb des ST migriert (siehe Punkt 5.4). Hierfür sind zweierlei verschiedene Hergänge wahrscheinlich.

Ersterer könnte in dem punktuellen Einschleusen dünner zytoplasmatische Zellausläufer in die Zotte bestehen, wobei kontinuierlich kleine Zellvolumina durch synzytiale Kanäle in das fetale Gewebe gelangen (siehe Abb. 4.19 und Abb. 4.20 sowie Abb. 5.4). Dieser Vorgang wird daher in Punkt 4.2.4 als punktuelle initiale lymphozytäre Infiltration bezeichnet. In den folgenden beiden Gefrierschnittaufnahmen (Abb. 5.4 A/B) erkennt man, dass der ST mit dem fluoreszierenden Zytoplasma einer vermeintlich intakten Tumorzelle durchdrungen zu werden scheint. Das Gros des lymphozytären Zellmaterials, v.a. aber der Zellkern, der durch seine Größe einen gewaltigen Widerstand darstellt, befindet sich (noch) im intervillösen Raum.

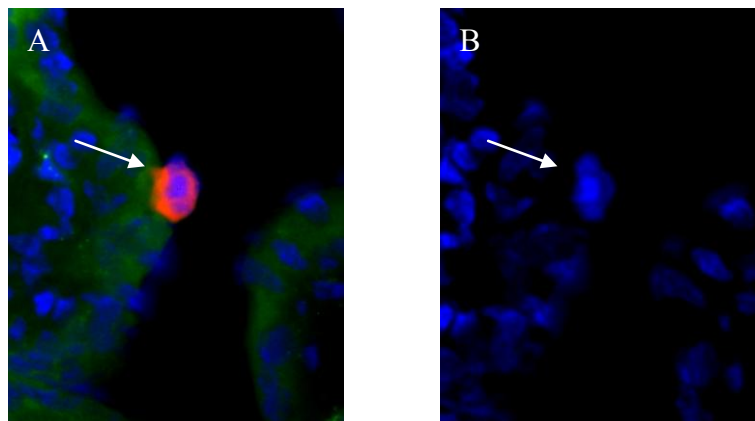


Abb. 5.4: Zytoplasmatische Zellausläufer einer JURKAT-Zelle infiltrieren einen Villus
 Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen (CellTracker orange; 5. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; **A:** zytoplasmatische Zellausläufer (Pfeil); 3er Kanal; **B:** der Zellkern scheint sich noch gänzlich im intervillösen Raum zu befinden (Pfeil); DAPI-Blaukanal; A/B: Ausschnitt aus einer 200fachen Vergr.

Der zweite Hergang könnte in der flächenhaften Infiltration des ST bestehen. Es ist durchaus denkbar, dass die Zelle über großflächige „Schwachstellen“ innerhalb des Synzytiums, wie Diskontinuitäten (siehe Punkt 5.4.1.2), das fetale Gewebe invadiert.

Auf diese Weise wäre es der Tumorzelle gleichzeitig möglich, größere Volumina auf einmal in den Villus einzuschleusen. Dies könnte sich mikroskopisch in einem flächigen Erscheinungsbild darstellen und wird daher im Rahmen dieser Arbeit als flächige initiale lymphozytäre Infiltration bezeichnet (siehe Punkt 4.1.4 und 4.2.4).

Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass erst eine Kombination aus beiden Hypothesen zu einer erfolgreichen villösen Transmigration führt. So könnte der ST an gewissen „Schwachstellen“ (siehe Punkt 5.4) zunächst punktuell mit zytoplasmatischen Zellausläufern durchbrochen werden, indem jene synzytialen Abschnitte nach und nach aufgeweitet und gegebenenfalls verletzt werden. Bei verhältnismäßig kleinem Widerstand würden so immer größere Volumina der Zelle relativ flächig in das kindliche Gewebe migrieren können.

Ein gewisser villöser Übergang des Fluoreszenzmarkers ist auch bei den Paraffinschnitten zu erkennen (siehe Abb. 5.5). Es ist denkbar, dass bereits geringe Anteile des Zytoplasmas den ST durch „Schwachstellen“ passiert haben (wie in diesem Punkt weiter oben hypothetisiert) und sich nun flächig intra- bzw. subsynzytial befinden. In Abb. 5.5 A bis C ist zum besseren Verständnis der Verlauf des ST (einschließlich dessen Vergrößerung links unten im Bild) dargestellt, um einerseits diese starke basale Fluoreszenz und andererseits die leichten Kontinuitätsunterbrechungen im Synzytium zu verdeutlichen. Der scheinbar durchgängige homogene Zellkern des Lymphozyten (Abb. 5.5 C) ist im intervillösen Raum morphologisch dicht an den ST gelagert, zeigt aber (noch) keine Verformungen, die durch infiltrative Prozesse hervorgerufen sein könnten.

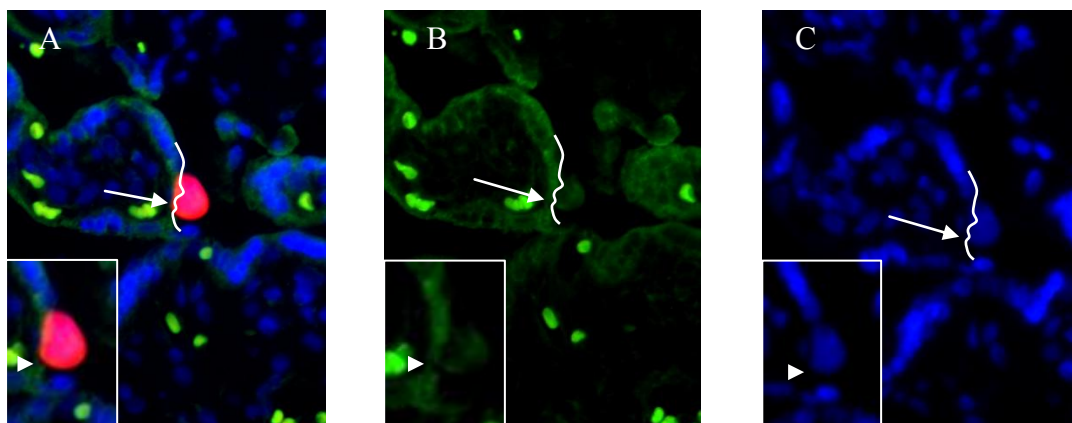


Abb. 5.5: Flächiger Zytoplasmaübertritt von einer JURKAT-Zelle in einen Villus

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen (CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; A: 3er Kanal; B: Grünkanal; C: DAPI-Blaukanal; A-C: Verlauf des Synzytiums (Linie) und Markierung der scheinbaren Infiltrationsstelle (Pfeil); Ausschnitt aus einer 200fachen Vergr. sowie Ausschnittvergrößerung links unten im Bild

Natürlich könnte diese Farbstoffinfiltration auch durch Artefakte verursacht sein oder auf optischen Täuschungen beruhen, wie z.B. die Überstrahlung durch die relativ starke rote Fluoreszenz in die nähere Umgebung der Zelle.

Leider konnte mikroskopisch nicht nachgewiesen werden, wie genau sich die Gestalt des Zellkerns während der synzytialen Passage verändert (zum Vergleich siehe Infiltrationsphase der Abb. 5.1). Es wurden viele Zellen gefunden, die sich vermeintlich im ST „vergraben“ (Abb. 5.2 C) und ihn zu durchdringen versuchen (Abb. 5.6 A). Allerdings scheinen sie sich erst in der initialen Infiltrationsphase zu befinden, da im Blaukanal nur eine geringgradige Verformung des Zellkernes mit wahrscheinlich beginnender synzytialer Invasion sichtbar ist (Abb. 5.6 C). Dafür spricht auch der Grünkanal, der an der vermutlichen Infiltrationsstelle eine kleine Unterbrechung im Synzytium aufweist (Abb. 5.6 B).

Es liegt also nahe, dass der entsprechende Vorgang der intermediären Infiltrationsphase (siehe Punkt 5.4.1.1.1) nicht mikroskopiert bzw. übersehen wurde.

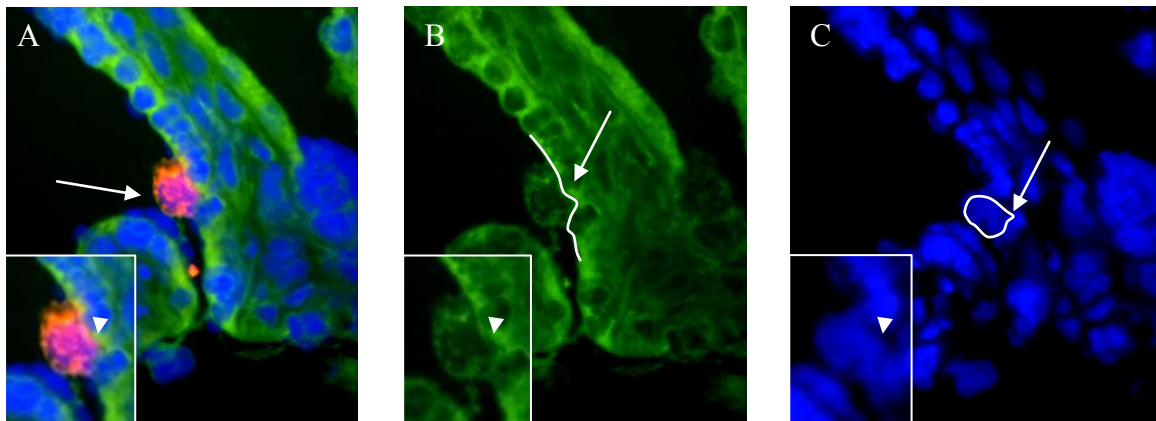


Abb. 5.6: Punktuelle initiale Infiltration einer JURKAT-Zelle in einen Villus
 Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen (CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; **A:** JURKAT-Zelle (Pfeil); 3er Kanal; **B:** Verlauf des Synzytiums (Linie) und Markierung der scheinbaren Infiltrationsstelle (Pfeil); Grünkanal; **C:** Verlauf der in A dargestellten JURKAT-Zelle sowie Markierung der vermeintlichen Infiltrationsstelle (Pfeil); DAPI-Blaukanal; A-C Ausschnitt aus einer 400fachen Vergr. sowie Ausschnittvergrößerung links unten im Bild mit gekennzeichnete scheinbarer Infiltration (Pfeilspitze)

5.2 Gefrierschnitttechnik versus Paraffinschnitttechnik

Beide Konservierungstechniken sind im Folgenden mit ihren Gemeinsamkeiten und Unterschieden tabellarisch festgehalten (Tab. 5.1). Im Anschluss an die Gegenüberstellung werden die wichtigsten dargelegten Fakten bezüglich der unterschiedlichen Mikroskopiereigenschaften zwischen der Gefrierschnitt- und Paraffinschnitttechnik diskutiert.

Tab. 5.1: Gefrierschnitttechnik versus Paraffinschnitttechnik

Gefrierschnitttechnik	Paraffinschnitttechnik
Gemeinsamkeiten	
<ul style="list-style-type: none"> gute Beurteilung der (vermutlichen) Adhäsions- und Anpassungsphase 	<ul style="list-style-type: none"> Fluoreszenz der Lymphozyten bleibt erhalten (v.a. die Rot-Fluoreszenz)
<ul style="list-style-type: none"> gute Beurteilung der (vermutlichen) Infiltrationsphase 	<ul style="list-style-type: none"> Entstehen von Artefakten beim Konservieren und Fixieren
<ul style="list-style-type: none"> gute Beurteilung der in den villösen Engstellen hängen-gebliebenen Zellen (trotz der größeren Schrumpfung auch bei den Gefrierschnitten gut mikroskopierbar) 	<ul style="list-style-type: none"> Lagerung der fertig konservierten Slides im Kühlschrank zur bestmöglichen Fluoreszenzerhaltung
<ul style="list-style-type: none"> Lösungsmittel (Aceton/ Xylol und Ethanol) können die Fluoreszenz mindern 	
Unterschiede	
Dicke der Gewebsschnitte: 7µm, daher <ul style="list-style-type: none"> starke manuelle Nachbearbeitung der Bilder notwendig 	Dicke der Gewebsschnitte: 5µm, daher: <ul style="list-style-type: none"> nur minimale Nachbearbeitung der Bilder erforderlich
Plastischere Darstellung der Strukturen, daher: <ul style="list-style-type: none"> (vermutliche) Adhäsionsbrückenausbildung gut erkennbar (vermutliche) punktuelle initiale Farbstoffinfiltration des Villus gut erkennbar 	präzisere zweidimensionale Darstellung, daher: <ul style="list-style-type: none"> keine Adhäsionsbrückenausbildung erkennbar scheinbar optische Täuschung der initialen villösen Farbstoffinfiltration
relativ kurzes Procedere bis zum Mikroskopieren	aufwendiges Konservieren und Fixieren
keine Eigenfluoreszenz der noch vorhandene Erythrozyten, daher: <ul style="list-style-type: none"> fetales Endothel kaum vom Zottenstroma zu unterscheiden, weshalb Abgrenzung der terminalen Infiltrationsphase von der Phase der vollendeten Transmigration nur schwer möglich (Differenzierung zusätzlich erschwert durch Schrumpfung, s.u.) nur wenig Fluoreszenzüberlagerungen 	starke Eigenfluoreszenz des Paraffins und noch vorhandener Erythrozyten, daher: <ul style="list-style-type: none"> bessere Abgrenzung der terminalen Infiltrationsphase von der Phase der vollendeten Transmigration mehr Fluoreszenzüberlagerung
Gewebe schrumpft beim Konservieren mit flüssigem Stickstoff, daher <ul style="list-style-type: none"> erschwertes Mikroskopieren Zottentypen (einschließlich deren Stroma und Endothel) sowie umliegende Gewebe können kaum auseinander gehalten werden, weshalb u.a. keine Zellen am synzytialen Überzug der dezidualen Gewebe beobachtet werden konnten 	Gewebe schrumpft beim Konservieren mit Xylol (allerdings weniger als bei der Gefrierschnitttechnik), daher: <ul style="list-style-type: none"> bessere Mikroskopierergebnisse Zottentypen können gut voneinander unterschieden werden, Lymphozyten an der Dezidua sind gut mikroskopierbar
Gewebe kann beim Einfrieren durch die schnellen Temperaturunterschiede reißen	Gewebe reißt i.d.R. nicht beim Konservieren

Bei den Gefrierschnitten schrumpft das Gewebe durch das Konservieren in flüssigem Stickstoff. Daraus resultieren die erschwerten Mikroskopierbedingungen. Es musste zumeist mit der 400fachen Vergrößerung gearbeitet werden, um das transmigratorische Verhalten der Lymphozyten beurteilen zu können. Allerdings war es z.T. trotzdem unmöglich, die Zottentypen sowie die terminale Infiltrationsphase von der Phase der vollendeten Transmigration voneinander zu unterscheiden. Bei den Paraffinschnitten sind das plazentare Gewebe mit allen darin enthaltenen Strukturen gut abgrenzbar, die Zottentypen und Transmigrationsphasen sind gut voneinander zu differenzieren. Auch die Dezidua kann vom fetalen Gewebe differenziert werden. Daher reichte für die Analyse hauptsächlich die 200fache Vergrößerung aus.

Die Adhäsions- und Anpassungsphase sowie die flächige initiale Infiltrationsphase können mit beiden Konservierungstechniken gut beobachtet werden.

Dadurch, dass die Gefrierschnitte eine Dicke von $7\mu\text{m}$ besitzen (Vergleich: Paraffinschnitte $5\mu\text{m}$), um beim Mikrotomieren nicht zu zerbrechen, erscheint das Gewebe im Mikroskop oft verschwommen und musste manuell stark nachbearbeitet werden. Dies hat aber den Vorteil, dass die Aufnahmen plastischer wirken. Man kann daher, wie bereits in Punkt 4 beschrieben, zelluläre Besonderheiten beim Transmigrationsvorgang besser ausfindig machen als es bei den Paraffinschnitten der Fall ist. Jene konnten auch mit manueller Nachbearbeitung nicht so plastisch dargestellt werden, dafür erscheinen die plazentaren Strukturen aber präziser. Aufgrund der plastischeren Bildgebung erweisen sich die Gefrierschnitte den Paraffinschnitten bei der vermutlichen Adhäsionsbrückenausbildung sowie der punktuellen initialen Infiltrationsphase überlegen.

Des Weiteren weisen die Gefrierschnittpräparate eine enorme Schrumpfung der Gewebe auf. Es ist denkbar, dass beim Einfriervorgang ein ungleichmäßiges Kontraktionsverhalten zwischen Lymphozyt und fetalem Gewebe besteht und man durch jene optische Täuschung der fälschliche Eindruck einer villösen Infiltration durch die Tumorzelle entsteht. Diese Aussage ist allerdings zu relativieren, denn auch bei den Paraffinschnitten scheint es trotz der wesentlich geringen Schrumpfung durch die Xylokonservierung zu einer lymphozytären Invasion zu kommen (siehe Punkt 4.1.4).

Bei den Paraffinschnitten ist eine gewisse Eigenfluoreszenz der Erythrozyten vorhanden. Sie bewirkt eine gute Abgrenzung zwischen der terminalen Infiltrationsphase und der Phase der vollendeten Transmigration. Bei der Gefrierschnitttechnik ist die Eigenfluoreszenz nur sehr mäßig ausgeprägt, was allerdings die Fluoreszenzüberlagerungen minimiert und die allgemeine Mikroskopie bezüglich des Aufspürens der Tumorzellen erleichtert.

5.3 Mögliche Ursachen für die stark verminderte Grün-Fluoreszenz

Bei der mikroskopischen Auswertung waren vergleichsmäßig sehr wenig grün-fluoreszierende Zellen in den Geweben nachweisbar. Im Nachhinein wird deutlich, dass es bereits während der Vorversuche schwierig war, „grüne Zellen“ ausfindig zu machen. „Rote Lymphozyten“ waren wesentlich präsenter. Diese Tatsache fand seiner Zeit allerdings wenig Beachtung, da eher von Fehlern bei der Injektion in den Kottyledo ausgegangen wurde. Es erfolgte demzufolge eine Weiterverwendung beider CellTracker für die definitiven Perfusionen.

Da beide Farbstoffe funktionell ähnlich sind, erfuhren die beiden Zelllinien beim Anfärben weitestgehend die gleiche Behandlung (siehe 3.8.1). Vor jeder Perfusion wurden einige μl der Zellsuspensionen auf Objektträger gebracht und unter dem Mikroskop auf Fluoreszenz untersucht. Erst nach einem positiven Ergebnis (was stets der Fall war) wurde perfundiert. Folglich nahmen die Zellen die Farbstoffe auf und waren prinzipiell in der Lage zu fluoreszieren.

Vor jeder Perfusion fand neben der Bewertung der Fluoreszenz auch die Bestimmung der Vitalität der beiden Zelllinien mit Hilfe von Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer statt. Diese Untersuchung wurde jeweils nach dem Anfärben mit CellTracker durchgeführt. Die Vitalität bewegte sich nie unter 95%. Es kann also ausgeschlossen werden, dass die Zellen durch vorzeitiges Absterben bzw. Fehler bei der Fluoreszenzmarkierung nicht im Stande waren, transmigratorische Prozesse durchzuführen. Die hier dargestellten Lymphozyten besitzen zudem scheinbar intakte Zellkerne, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass die Zellen die Perfusion überlebten.

Da mit beiden Konservierungstechniken neben den unzähligen rot-fluoreszierenden Zellen auch vereinzelt „grüne“ zu sehen sind, ist bewiesen, dass beide Farbstoffe grundsätzlich dem Procedere von der Perfusion an bis hin zur mikroskopischen Auswertung stand halten. Zudem wurden die beiden Fluoreszenzmarker unter den Zelllinien pro Perfusion vertauscht, was ebenfalls dafür spricht, dass sowohl die CCRF-CEM- als auch die JURKAT-Zellen fähig sind, die Farbstoffe zu inkorporieren und zu speichern.

Aufgrund der erwähnten Aspekte kann angenommen werden, dass die extrem minimierte Grün-Fluoreszenz keinen Anwendungsfehlern beim Anfärben oder Mikroskopieren zuzuschreiben ist.

Relativ unwahrscheinlich, aber ebenso möglich ist, dass die Ursache auf Seiten der CellTracker-Synthese selbst liegen und in einem Produktfehler begründet sein könnte.

Eher scheint es der Fall zu sein, dass der grüne CellTracker nicht so stabil wie der rote ist und bei der mikroskopischen Anregung schneller zerfällt. In Abb. 5.7 ist dies erkennbar. Die dargestellte Zelle wurde bei permanent angeschaltetem Fluoreszenzmikroskop in einem Abstand von 30 Sekunden zweimal hintereinander fotografiert. Dabei fällt auf, dass sie einen erheblichen Fluoreszenzverlust aufweist.

In Abb. 5.7 A lässt sich die Zelle farblich eindeutig vom plazentaren Gewebe abgrenzen, wohingegen dies bei der 2. Aufnahme (Abb. 5.7 B) nicht der Fall ist. Abb. 5.7 C zeigt, dass die dargestellte Struktur einen Zellkern besitzt, es sich also folglich um einen vitalen Lymphozyten zu handeln scheint.

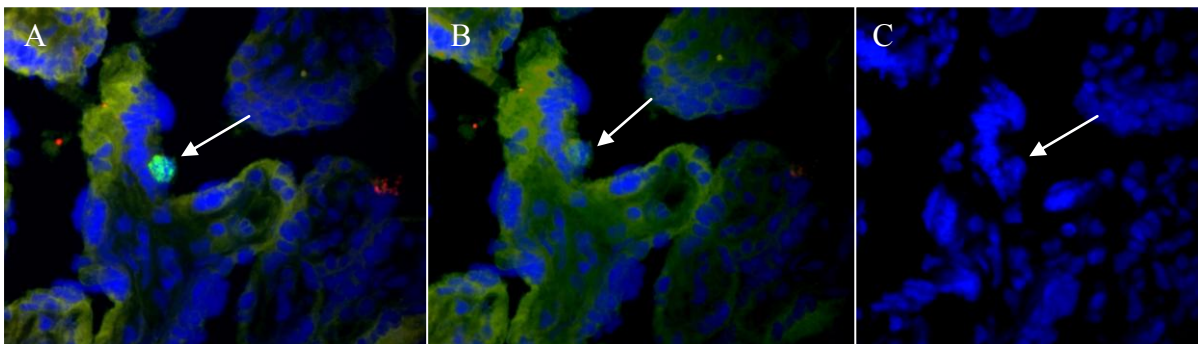


Abb. 5.7: Fluoreszenzzerfall einer CCRF-CEM-Zelle

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen (CellTracker green; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitte; Vergr. x400; **A:** stark fluoreszierende Zelle; 3er Kanal; **B:** dieselbe Zelle, wie in A, allerdings mit starkem Fluoreszenzverlust; 3er Kanal; **C:** Zellkern der in A und C dargestellten Zelle; DAPI-Blaukanal

Darüber hinaus ist es ebenso möglich, dass durch die Eigenfluoreszenz der kindlichen und maternalen Erythrozyten sowie der fetalen Gewebe die Grün-Fluoreszenz abgeschwächt, überlagert oder leichter übersehen wird. Abb. 5.8 macht dies deutlich. Die obere Zelle in Abb. 5.8 A besitzt eindeutig einen Zellkern, scheint also vital zu sein. Es ist erstaunlich, dass in ein und demselben Bild zwei Zellen zu sehen sind, mit aber grundverschiedenen Fluoreszenzeigenschaften. Die JURKAT-Zelle unten im Bild fluoresziert rot, oben die Zelle hingegen nicht. Es scheint unwahrscheinlich, dass beide Zellen JURKAT-Zellen sind und sich der CellTracker bei der obigen Zelle auswusch, bei der unteren hingegen nicht. Eher sieht es danach aus, dass der obige Lymphozyt zur CCRF-CEM-Zelllinie gehört und grün angefärbt wurde, jedoch durch Fluoreszenzüberlagerung innerhalb des Grünkanals und/ oder durch extrem schnelles Zerfallen untergeht. Aufnahmen, wie mit Abb. 5.7 B und 5.8 aufgezeigt, waren Zufallsbefunde beim Mikroskopieren. Sie konnten durch die minimierte bis fehlende Fluoreszenz mit keinem Filter gezielt gesucht werden.

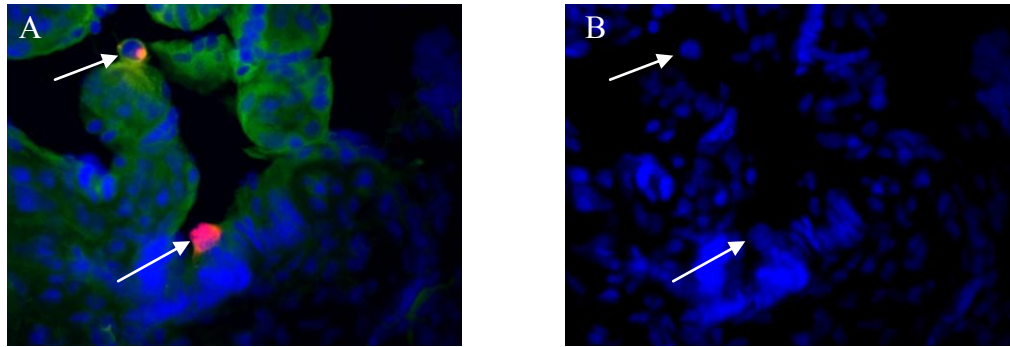


Abb. 5.8: Eventuelle Beeinträchtigung der Grün- Fluoreszenz

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRf-CEM-Zellen (CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400; **A:** rot-fluoreszierende JURKAT-Zelle (unten im Bild) und wahrscheinlich überlagerte grün-fluoreszierende CCRf-CEM-Zelle (oben im Bild); 3er Kanal; **B:** beide vermeintlichen Lymphozyten besitzen einen Zellkern; DAPI-Blaukanal

Es wurden einige wenige grün-leuchtende Tumorzellen mit Zellkern mikroskopiert. Dies könnte auf deren extrem starke Grün-Fluoreszenz zurückzuführen sein (siehe Abb.5.9 sowie Abb. 5.7 A). Diese Vermutung legt nahe, da auch bei den rot angefärbten Zellen Fluoreszenzunterschiede bestehen. Durch manuelle Nachbearbeitung der Aufnahmen scheint die Leuchtintensität der mit CellTracker orange versehenen Zellen allerdings ähnlich (zum Vergleich siehe Abb. 5.2).

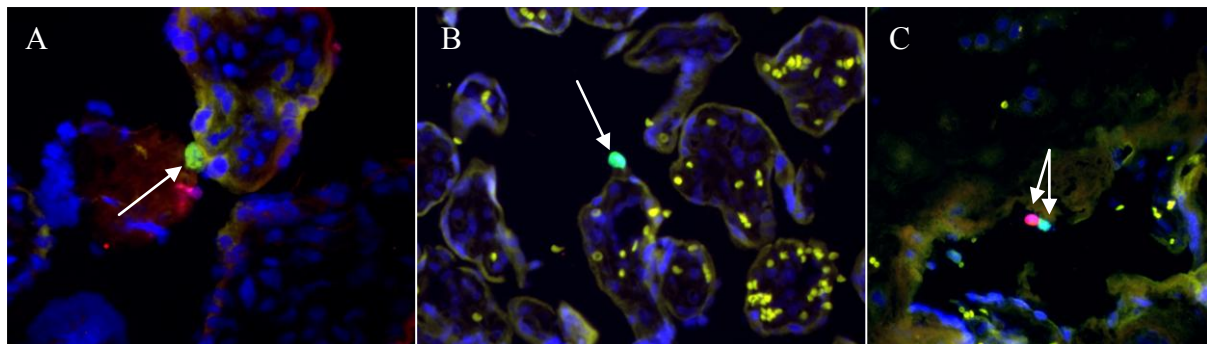


Abb. 5.9: Stark grün-fluoreszierende Zellen

Plazenta mit stark grün-fluoreszierende Zellen; **A:** grün-fluoreszierende CCRf-CEM-Zelle (CellTracker green; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400; **B:** grün-fluoreszierende JURKAT-Zelle (CellTracker green; 4. Perfusion); Gefrierschnitt; **C:** rot-fluoreszierende CCRf-CEM-Zelle (links, CellTracker orange) und grün-fluoreszierende JURKAT-Zelle (rechts, CellTracker green; 4. Perfusion); B/C: Paraffinschnitt; Ausschnitt aus einer 200fachen Vergr; A-C: 3er Kanal

5.4 Theorien zur synzytialen Transmigration

Aus den Präparaten kann nicht genau bestimmt werden, wie die Lymphozyten den ST durchqueren, um in das Innere der Zotte gelangen. Dazu ist erstens die Auflösung des verwendeten Mikroskops zu gering und zweitens wurde mit keinen Markern gearbeitet, um eventuelle Adhäsions- und Invasionsmechanismen biochemisch und immunhistochemisch darzustellen. Dies soll aber das Thema nachfolgender Arbeiten des Plazentalabors werden.

In der Literatur findet sich bis dato kein Nachweis zum Vorgang der (synzytialen) Transmigration. Daher werden im Folgenden einige Hypothesen aufgestellt, wie dieser Prozess stattfinden könnte.

5.4.1 Transmigration durch „Schwachstellen“ innerhalb des Synzytiotrophoblasten

5.4.1.1 *Transmigration durch Kanäle*

Wie bereits in Punkt 1.6.2.1 angerissen, ist die Plazentaschranke für gewisse Substanzen durchlässig. Sie bedienen sich verschiedenster Mechanismen, um in den fetalen Kreislauf zu gelangen. Dazu gehören u.a. die einfache und erleichterte Diffusion, aktive Transportprozesse, und die Pinozytose (Moore und Persaud 2007). Bei der erleichterten Diffusion und den aktiven Transportprozessen werden Kanäle für den Stofftransport genutzt (Hick und Hick 2006). Gerade diese könnten die „Schwachstellen“ bei der lymphozytären Invasion darstellen. Trotz der Tatsache, dass ein enormer Größenunterschied zwischen Kanal und Lymphozyt besteht, könnte er den Hauptangriffspunkt darstellen. Die Durchmesser der meisten Kanäle bewegen sich im kleinen Nanometerbereich (Štulc 1989, Faber und Anderson 2010). Damit sind sie im Vergleich zu den etwa 10 µm großen Lymphozyten winzig (Aust 2007). Es ist dennoch denkbar, dass sich die Tumorzellen an diversen transmembranären synzytialen Kanälen anhaften, sie aufweiten und über sie in die Zotte eindringen. Sie würden so den Weg des geringsten Widerstandes nehmen. Es ist wesentlich Energie sparender einen bereits vorhandenen Kanal zu weiten als einen neuen zu schaffen.

Schon in den 80ern fanden Wissenschaftler, wie Gammal oder Kaufmann und Kollegen, heraus, dass synzytiale Kanäle in Tierplazenten existieren (Gammal 1985, Kertschanska et al. 2000). Gammal beobachtete diesbezüglich, dass kleine Kanäle durch den ST der Makaken ziehen (Gammal 1985, siehe Abb. 5.10). Sie besitzen keinen synzytialen Überzug und sind direkt mit dem intervillösen Raum verbunden. Allerdings scheinen diese Kanäle lediglich im ST zu verlaufen und sich nicht bis zum ZT, geschweige denn der Basalamina, zu ziehen.

Da derartige Forschungen zu jener Zeit noch in ihren Anfängen steckten, konnte entsprechenden Kanälen, wie den von Gammal beschriebenen, noch keine genaue Funktion zugesprochen werden. Es könnte sein, dass sich derartige inner-synzytiale Strukturen auch in der humanen Plazenta befinden und eine erleichterte Passagemöglichkeit für Lymphozyten in den Villus darstellen. Eine Theorie zur Invasion jener Kanäle findet sich in Punkt 5.4.1.1.1.

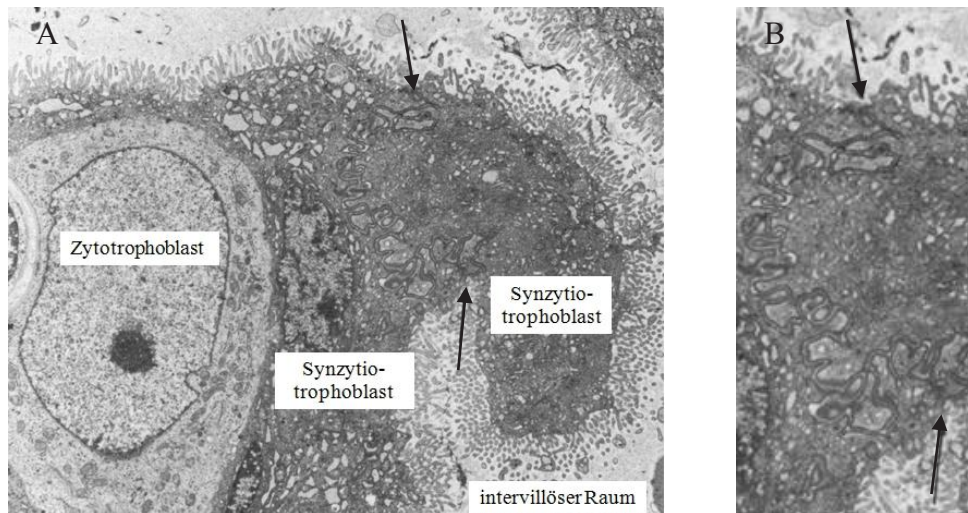


Abb. 5.10: Die mögliche Transmigration durch inner-synzytiale Kanäle (mod. n. Gammal 1985)

A: Die Abbildung zeigt einen gewundenen Kanal, der sich durch den ST eines Makaken zieht (siehe Pfeile); B: Ausschnittvergrößerung

Über die Jahre ist zum einen das Verständnis für transplazentare Transportprozesse immer mehr gewachsen und zum anderen haben sich die bildgebenden Verfahren weiter entwickelt. So wurde in den letzten Jahren das Vorhandensein synzytialer Kanäle verifiziert und mitsamt deren Funktion ermittelt. Einer dieser Kanaltypen wurde von Stumpf und Kollegen beschrieben. Es handelt sich um den Calcium-sensitiven TRPV6-Ionenkanal, der den ST durchzieht (Stumpf et al. 2008 [Abb. 5.11]).

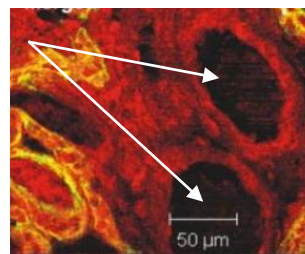


Abb. 5.11: Transmigration durch synzytiale Calciumkanäle (mod. n. Stumpf et al. 2006)

Die Abbildung zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von TRPV6-Kanälen im Synzytium.

Die Aquaporine stellen weitere transzelluläre Kanäle dar. Sie dienen dem Transport von z.B. Wasser, Glycerin und Harnstoff (Damiano et al. 2001). Auch sie könnten neben den gerade dargestellten Kanälen als Eintrittspforte in den Villus dienen.

5.4.1.1.1 Szenario der Kanal-basierten Transmigration - vom Synzytium bis ins fetale Endothel

Folgendes Szenario orientiert sich an der schematischen Darstellung der Transmigrationsphasen aus Abb. 5.1. Die Invasion der Zotte unter Zuhilfenahme transzellulärer Kanäle könnte folgendermaßen ablaufen: Die frei im intervillösen Raum zirkulierende Krebszelle (*intervillöse Phase*) bindet mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen an den ST (*Adhäsionsphase*). Diese verankern den Lymphozyten so fest mit dem Villus, dass er dem mütterlichen Blutstrom weitestgehend standhält und nur schwer von ihm weggespült werden kann. Zwischen Zelle und Synzytium besteht allerdings noch ein kleiner Spalt. Er wird verkleinert, indem sich die beiden Strukturen immer weiter annähern. Sobald sich der Lymphozyt dicht an der Zotte befindet, lagert er sich morphologisch an sie an (*Anpassungsphase*). Daraufhin beginnt die Zelle einen apikalen synzytialen Kanal soweit zu weiten, bis sie in der Lage ist, ihn zu durchdringen (*initiale Infiltrationsphase*). Zu Beginn dieses Vorganges invadiert sie den Kanal, indem sie kontinuierlich ihr Zytoplasma durch den ST schleust. Dies könnte sich mikroskopisch in einer punktuellen Infiltration darstellen (siehe Punkt 4.2.4.1 sowie 5.1.3). Der Zellkern, der einen sehr großen Widerstand bietet, verbleibt vorerst im intervillösen Raum. Da sich die Volumenverteilung durch den infiltrativen lymphozytären Prozess zugunsten der intravillösen Seite verschiebt, wird der intrazelluläre Druck im intervillösen Raum immer größer, so dass letztendlich auch der Zellkern in den Villus mitgezogen wird (*intermediäre Infiltrationsphase*). Am basalen Teil des Synzytiums angelangt, durchquert der Lymphozyt die bis zum 4. Schwangerschaftsmonat intakte ZT-Schicht. Dieser Prozess geschieht parazellulär und bedient sich des endothelialen leukozytären Transmigrationsprinzips. Diesbezüglich werden

- interzelluläre Adhäsionsmoleküle z.B. enzymatisch oder durch Phosphorylierung gelockert und/ oder aufgelöst (Choi et al. 2009) und/oder
- die ZT-Zellen zur Kontraktion gebracht, so dass sich der Interzellularspalt vergrößert (Muller 2009).

Nach dem 4. Monat fällt die Überwindung der ZT weitestgehend weg (siehe 1.6.2.1). Somit muss nach dem ST die Basallamina mitsamt dem Zottenstroma durchquert werden (*terminale Infiltrationsphase*). Dies geschieht enzymatisch (siehe 5.4.2). Das letzte Hindernis stellt das fetale Endothel dar. Es wird wie die ZT-Schicht parazellulär invadiert. Nun ist der Lymphozyt bis in das kindliche Kreislaufsystem vorgedrungen und kann sich ungehindert ausbreiten (*Phase der vollendeten Transmigration*).

5.4.1.2 *Transmigration durch Diskontinuitäten*

Wie bereits in Punkt 1.3 und Abb. 1.1 dargestellt, unterliegen gewisse Abschnitte des ST durch Alterungsprozesse der Apoptose. Die entstehenden Reste werden in Knoten verpackt und an den mütterlichen Kreislauf abgegeben. Nelson beschreibt, dass während dieses Vorganges gewisse Diskontinuitäten im ST entstehen (Nelson 1996).

In der Schwangerschaft kommt es obendrein des Öfteren zu kleinen Beschädigungen des Synzytiums (Rath et al. 2010). Diese synzytialen Diskontinuitäten könnten durch gewisse Reize verursacht werden. Leider ist in der Literatur nicht ersichtlich, ob es sich dabei um pathologische oder physiologische Vorgänge handelt. Denkbar sind die in Punkt 1.6.2.1 erwähnten Faktoren, wie Alkohol und Bakterien. Aber auch weitere Noxen, wie z.B. die gesteigerte Zufuhr von freien Radikalen durch Zigarettenrauchen (Valavanidis et al. 2009), könnten daran beteiligt sein.

Derartige Diskontinuitäten stellen Läsionen dar. Sie werden durch Fibrin verschlossen und anschließend mit Hilfe zytotrophoblastischer Progenitorzellen re-epithelialisiert (Ockleford 2010). Hier ist eine weitere „Schwachstelle“ bei der Invasion von Tumorzellen zu vermuten. Es ist möglich, dass die Anheftung von Lymphozyten und die Ausbildung von Adhäsionsbrücken bevorzugt an fibrinösen Abschnitten des Synzytiums stattfindet.

Da der ST an den Diskontinuitäten unterbrochen ist, könnte sich die lymphozytäre Invasion in einem flächigen Erscheinungsbild äußern (siehe Punkt 4.1.4.1, 4.2.4.2 sowie 5.1.3).

Die Transmigration durch synzytiale Diskontinuitäten könnte wie in 5.4.1.1 dargestellt ablaufen, nur mit dem Unterschied, dass das Synzytium als Barriere wegfällt.

5.4.1.3 *Synzytiale „Schwachstellen“ und assoziierte Zellgruppen*

Die ersten beiden Hypothesen (5.4.1.1 und 5.4.1.2) besagen, dass gewisse „Schwachstellen“ im Synzytium vorliegen, seien es Kanäle oder Diskontinuitäten. Lymphozyten könnten sich dieser bedienen, um energiesparend in das Zotteninnere zu gelangen.

Beim Mikroskopieren fiel des Öfteren auf, dass mehrere Zellen (teilweise gleichzeitig auch beide Zelllinien) gehäuft und dicht gepackt an bestimmte Regionen des Synzytiums andocken (Abb. 5.9 C und 5.12), wohingegen umliegende Zottenbereiche weitestgehend frei von Lymphozyten sind. Es ist naheliegend, dass jene Zellgruppen gehäuft an derartigen „Schwachstellen“ vorzufinden sind und den Villus, von diesen ausgehend, infiltrieren. In Abb. 5.12 scheint der besagte Vorgang stattzufinden, v.a. die linke JURKAT-Zelle lässt darauf schließen, dass die Infiltration kurz bevorsteht.

Andererseits sollte nicht von der Hand gewiesen werden, dass derartige Phänomene auf Artefakte zurückzuführen sein könnten. Es ist möglich, dass sich die Zellen von der Vorbereitung bis hin zur Perfusion nicht voneinander gelöst haben und dementsprechend konglomeriert an gewissen synzytialen Arealen zu beobachten sind, auch wenn sich nur eine Zelle aus diesem Verbund an den Villus geheftet hat. Allerdings ist diese Kritik zu relativieren, da bei der Fluoreszenzmarkierung durch mehrmaliges Zentrifugieren, stetiges Schwenken der Suspensionen als auch mehrmaliges Umpipettieren in verschiedene Behältnisse (siehe 3.8.1) die Gefahr des Bestehenbleibens bzw. Entwickelns der Zellakkumulation minimiert wurde. Auch während der Perfusion befand sich das Perfusat mit den darin befindlichen Zellen in ständiger Bewegung.

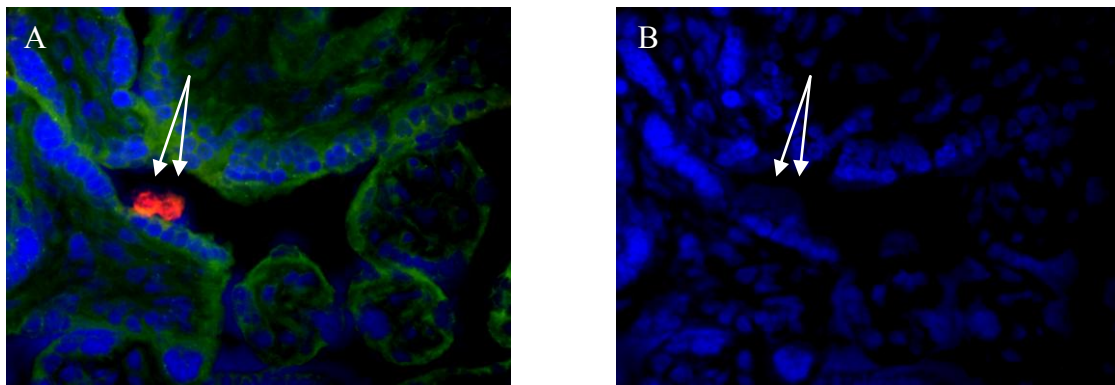


Abb. 5.12: Mögliche synzytiale „Schwachstellen“, an die 2 JURKAT-Zellen gelagert sind
 Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten JURKAT-Zellen (CellTracker orange; 3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Gefrierschnitt; Vergr. x400; **A:** zwei dicht nebeneinander gelagerte JURKAT-Zellen, die anscheinend am Synzytium angeheftet sind (Pfeil); 3erKanal; **B:** Zellkerne der in A dargestellten JURKAT-Zellen; DAPI-Blaukanal

5.4.2 Transmigration durch Enzyme

Die im Folgenden dargelegte Theorie zur synzytialen Transmigration ist durch den bisherigen Wissensstand nicht belegt und daher nur als vage Vermutung zur transplazentaren Metastasierung anzusehen. Es könnte möglich sein, dass die beiden in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien gewisse zytotoxische Mechanismen besitzen. Ihre unentarteten Verwandten, die zytotoxischen T-Zellen, könnten hierbei als „Vorbild“ dienen. Diese setzen zum einen den Fas/FasL-Signalweg ein und zum anderen weisen sie apoptotische Substanzen, wie Perforine und Granzyme (Rassow et al. 2006), im Inneren auf. Besäßen die beiden Zelllinien nur einen dieser Mechanismen bzw. einen ähnlichen, läge es nahe, dass sie so auf rein destruktivem Wege in das fetale Gefäßsystem gelangen.

5.5 Veränderung der Perfusionsparameter und deren Auswirkungen auf das Perfusionsergebnis

Tab. 3.1 zeigt auf, wie die jeweiligen Perfusionsparameter während der einzelnen Versuche modifiziert wurden.

5.5.1 Vor- und Nachspülen

Wie bereits in Punkt 3.7 beschrieben, sind das Vor- und Nachspülen dafür gedacht, mütterliche Erythrozyten und postperfundiv lose Tumorzellen weitestgehend aus dem Kotyledo herauszuspülen. Je weniger dieser Zellen im Gewebe verbleiben, desto bessere Mikroskopierergebnisse werden erzielt, denn

- so wird die Eigenfluoreszenz der Erythrozyten stark vermindert (nur noch fetale Erythrozyten sind im Idealfall vorhanden) und
- es kann sichergestellt werden, dass genau die Bereiche des Kotyledos nach dem Nachspülen herausgeschnitten werden, die auch tatsächlich perfundiert wurden (sie erscheinen wesentlich heller als unperfundierte Abschnitte des Kotyledos [siehe Abb. 5.13]. Das Nachspülen verstärkt diesen Effekt umso mehr, denn bei den hier durchgeführten Vorspülzeiträumen verblieb stets eine Restmenge an mütterlichen Erythrozyten im Gewebe.).

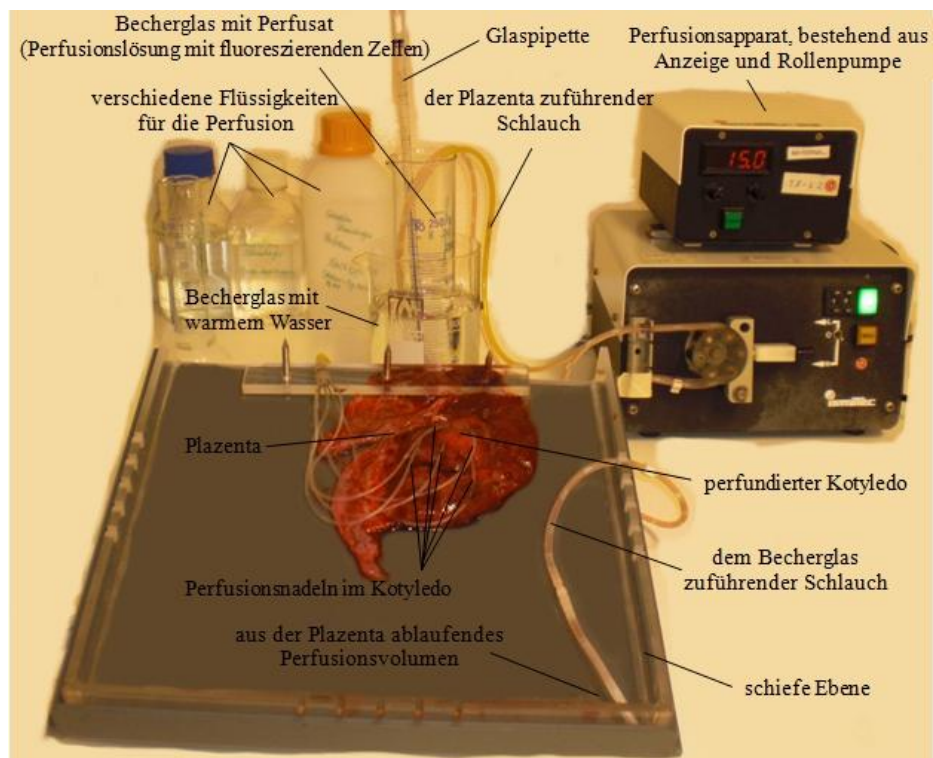


Abb. 5.13: Realer Versuchsaufbau

Da nach dem Vorspülen keine mikroskopische Beurteilung des perfundierten Plazentaareals erfolgte, kann an dieser Stelle keine genaue Aussage über die Abhängigkeit der maternalen Erythrozytenzahl bezüglich Vorspüldauer und -medium getroffen werden. Makroskopisch zeigte sich aber ab einer Stunde ein vom Restgewebe gut abgegrenzter hellerer Kotyledo, unabhängig vom verwendeten Medium.

Hinsichtlich der Nachspüldauer scheint es keinen signifikanten Parameter-bezogenen Unterschied zu geben. Es wurde zwischen 20 min (1. Perfusion), 30 min (2. Perfusion) und 45 min (3. bis 5. Perfusion) variiert, wobei die Anzahl der beobachteten frei schwimmenden Tumorzellen und maternalen Erythrozyten nur unwesentlich schwankt.

Auch scheint das Perfusionsergebnis nicht wesentlich dadurch beeinflusst zu werden, ob NaCl (mit oder ohne beigemischtetes Heparin) oder ein NaCl-PL-Mix (mit oder ohne zugesetztes Heparin) zum Nachspülen verwendet wird. In der 1. Perfusion wurde lediglich mit 0,9%igem Heparin-freiem NaCl nachgespült, in der 2. Perfusion wurde zusätzlich PL verwendet, in den letzten 3 Durchführungen wurde ein NaCl-PL-Gemisch einschließlich Heparin benutzt. Die Auswertung der Gewebsschnitte ergab diesbezüglich keine signifikanten Differenzen.

Bei jeder Perfusion fanden sich trotz Vor- und Nachspülen (und Modifikation innerhalb der Parameter) wenige Areale im intervillösen Raum, die einen Restbestand an maternalen Erythrozyten und augenscheinlich nicht-adhärenenten Lymphozyten aufweisen. Der Großteil dieser noch frei schwimmenden Zellen wurde allerdings aus dem Gewebe entfernt (Abb. 5.14).

Abb. 5.14 C zeigt neben dem vorwiegend leer gespülten intervillösen Raum vier CCRF-CEM-Zellen, die sich scheinbar an die Plazentazotten angeheftet haben. Sie bezeugen ein weiteres Mal, dass die Lymphozyten eine Verbindung mit dem kindlichen Gewebe eingegangen sein müssen, denn wäre dies nicht der Fall, würden sie (wahrscheinlich) nicht in der Lage sein, im intervillösen Raum zu verbleiben. Von den vier Lymphozyten liegen im unteren Teil der Abb. zwei dieser Zellen dicht nebeneinander. Sie bekräftigen die in Punkt 5.4 geäußerte Hypothese zur Transmigration durch synzytiale „Schwachstellen“.

Abb. 5.14 A und B wurden 4 Wochen nach dem Färben mikroskopiert. Nach diesem Zeitraum ist eine nur geringe bzw. gar keine Fluoreszenz mehr nachweisbar. Aus diesem Grund besitzt das Gewebe einen derartigen Gelb-Stich und scheint frei von Lymphozyten zu sein.

Abb. 5.14 C wurde 2 Wochen nach dem Färben angefertigt. Eine abgeschwächte, aber noch gut sichtbare Fluoreszenz ist nachweisbar.

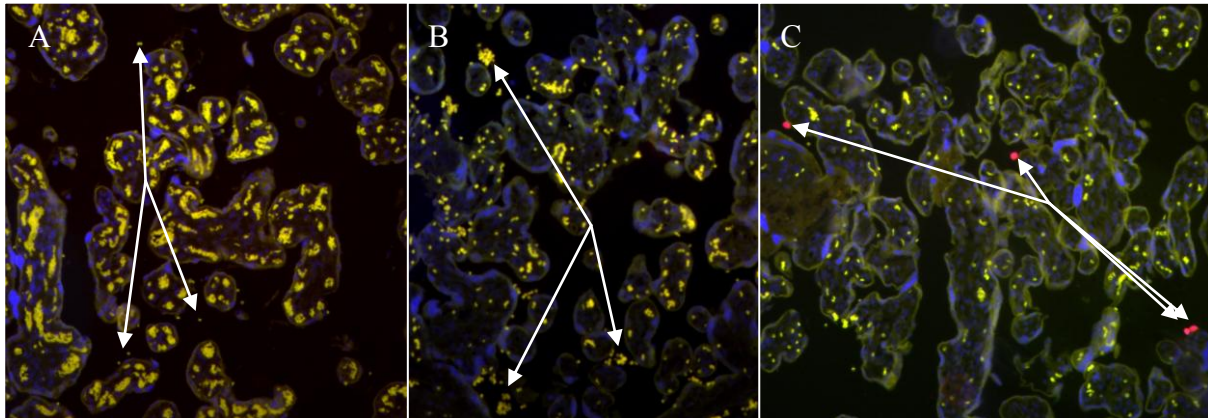


Abb. 5.14: Einfluss des Nachspülens auf das Mikroskopierergebnis

Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM- und JURKAT-Zellen; Paraffinschnitte; Vergr. x100 (siehe Tab. 3.1 und 8.1); **A:** weitestgehend frei gespülter intervillöser Raum, nur ein geringer Restbestand an maternalen Erythrozyten ist noch vorhanden (Pfeile); 1. Perfusion; 3erKanal; **B:** größtenteils frei gespülter intervillöser Raum; maternale Erythrozyten sind peripher noch sichtbar (Pfeile); 3. Perfusion; 3er Kanal; **C:** weitestgehend frei gespülter intervillöser Raum mit 4 am Villus adhäre-renden CCRF-CEM-Zellen (Pfeile), von denen 2 direkt nebeneinander liegen (untere Pfeile: CellTracker orange: 4. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 9.1); 3er Kanal

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass Nachspüldauer und –medium nicht von so großer Relevanz zu sein scheinen, wie ursprünglich angenommen. Trotzdem sollte darauf geachtet werden, dass mindestens so lange vorgespült wird, bis sich der zu perfundierende Kotyledon vom umgebenden Plazentagewebe durch ein deutlich helleres Aussehen farblich abhebt. Nachgespült werden sollte mindestens 20 min. Sicherlich ist es aber empfehlenswert, diesen Vorgang länger durchzuführen, denn so findet theoretisch eine bessere Spülung des intervillösen Raumes statt und auch kleine, verzweigte Zottenareale werden effektiver von jeglichen nicht-adhären Zellen gereinigt.

Aufgrund der verschiedenen Zusammensetzungen von NaCl und PL ist es ratsam, in Nachfolgeversuchen ein NaCl-PL-Gemisch mit zugesetztem Heparin zum Vor- und Nachspülen zu verwenden, wobei das Verhältnis zugunsten der PL ausfallen sollte. So könnte der Plazenta eine kontinuierliche Versorgung mit nutritiven Substanzen mitsamt der Auflösung kleiner Thromben gewährleistet werden.

5.5.2 Zellanzahl

In der 1. Perfusion wurden mit ca. 5 Millionen CCRF-CEM-Zellen und 6 Millionen JURKAT-Zellen etwa halb so viele Zellen verwendet, wie in der 2. und 3. Perfusion. Die CCRF-CEM-Zellkonzentration wurde daraufhin in den letzten beiden Versuchen weitestgehend gleich gehalten, wohingegen die JURKAT-Zellanzahl erneut verdoppelt wurde (siehe Tab. 3.1).

Dementsprechend müssten theoretisch die CCRF-CEM-Zellen, bis auf die erste Perfusion, etwa gleich häufig zu mikroskopieren sein. Die Anzahl der zu beobachtenden JURKAT-Zellen müssten hingegen in der 1., 3., und 5. Perfusion deutlich ansteigen.

Die beiden Farbstoffe wurden so verwendet, dass nach den 5 Perfusionen die CCRF-CEM-Zellen 2 mal mit CellTracker orange (1./4. Perfusion) und 3 mal mit CellTracker green (2., 3. und 5. Perfusion) angefärbt wurden. Die JURKAT-Zellen erhielten demzufolge 2 mal eine Färbung mit CellTracker green (1./4. Perfusion) und 3 mal mit CellTracker orange (2., 3. und 5. Perfusion).

Da einerseits die Farbstoffe zwischen den Zelllinien getauscht wurden und andererseits eine stark verminderte Grün-Fluoreszenz auftrat, kann keine generalisierte Aussage über die Korrelation zwischen der perfundierten Zellkonzentration und der Anzahl der im Mikroskop beobachteten Zellen getroffen werden. Hierfür können lediglich die rot-fluoreszierenden Zellen herangezogen werden. Sie wurden allerdings nicht genau ausgezählt, da im Rahmen dieser Arbeit primär die Interaktion zwischen der schiefen Ebene, den beiden Zelllinien und dem Farbstoff geklärt werden soll. Es scheint aber so, als ob eine direkte Verbindung zwischen der perfundierten Zellkonzentration und der im Mikroskop beobachteten Zellen besteht.

Es war auffällig, dass in der 5. Perfusion im Vergleich zu den restlichen Durchführungen mehr rot-fluoreszierende Zellen zu erkennen waren. Mit 20 Millionen Zellen wurden hier wesentlich mehr Zellen zur Perfusion verwendet als in den vorherigen Versuchen.

Es schien so, als ob in der 4. Perfusion mehr „rote Zellen“ (CCRF-CEM) zu erkennen waren als in den 3 vorherigen Durchführungen, wobei in der 2. Perfusion genauso viele Lymphozyten der gleichen Zelllinie mit dem gleichen Farbstoff verwendet wurden. Auch in der 3. Perfusion wurden etwa gleich viele Zellen perfundiert, allerdings der anderen Zelllinie (JURKAT). Es kann sein, dass entweder beim Ausschneiden des zu konservierenden Gewebes, bei der Fixierung oder beim Färben Fehler unterlaufen sind, die dazu führten, dass in der 2. und 3. Perfusion im Vergleich zum 4. Versuch weniger Zellen zu mikroskopieren waren. Es könnte aber auch damit zusammenhängen, dass beide Zelllinien eine unterschiedlich starke Affinität bezüglich der fetalen Gewebe aufweisen.

Auch die Tatsache, dass sich in der 4. Perfusion mehr grün-fluoreszierende Lymphozyten (JURKAT) erfassen ließen als in all den anderen Versuchen, stützt die obige Vermutung hinsichtlich der Korrelation zwischen perfundierter und mikroskopierter Zellanzahl. In der besagten Perfusion wurden 25 Millionen Zellen mit dem grünen CellTracker angefärbt, in den anderen Versuchen maximal 13 Millionen Zellen.

Folglich war eine wesentlich höhere Chance gegeben, stark fluoreszierende, augenscheinlich intakte Zellen zu mikroskopieren. Bis auf die 4. Perfusionen fanden sich nur vereinzelt „grüne Zellen“, wovon aber der Großteil lediglich aus Zelltrümmern bestand (Abb. 5.15) bzw. keinen Zellkern besaß.

Letzteres könnte natürlich auch darauf zurückzuführen sein, dass lediglich der Zellkern des Lymphozyten in dem Präparat nicht mit angeschnitten wurde.

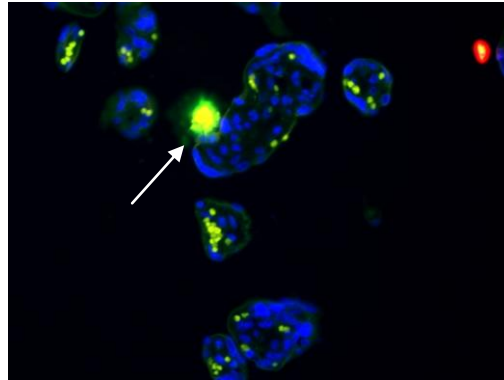


Abb. 5.15: Zelltrümmer einer grün-fluoreszierenden CCRF-CEM-Zelle
Plazenta, perfundiert mit Fluoreszenz-gefärbten CCRF-CEM-Zellen (CellTracker green;
3. Perfusion: siehe Tab. 3.1 und 8.1); Paraffinschnitt; 3er Kanal; Vergr. x200

5.5.3 Flussrate

Während aller Versuche wurde auf der maternalen Plazentaseite ein Fluss von 15 ml/min (1./2. Perfusion) oder 12 ml/min (3. bis 5. Perfusion) angelegt. Diese beiden Werte ergaben sich einerseits aus literarischen Quellen (May et al. 2009, Pollex et al. 2010) und basierten andererseits auf der langjährig guten Erfahrung der Mitarbeiter des Plazentalabors (Frau Dipl. oec. troph. U. Enke und Frau Dr. rer. nat. L. Seyfarth). Da im hiesigen Plazentalabor zumeist mit 12 ml/min perfundiert wird, diente die Flussrate von 15 ml/min als Vergleichsparameter (Miller et al. 1987). Die Analyse zeigt auf, dass die Flussrate anscheinend keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Weder wurden in den Gewebsschnitten häufiger Risse bzw. andersartige Artefakte entdeckt noch waren häufiger Lymphozyten an potentiellen synzytialen „Schwachstellen“ nachzuweisen. Die gewählten Flussraten bewirken keinen signifikanten Unterschied bei der Analyse. Anscheinend wurden die beiden Geschwindigkeiten zu nah beieinander gewählt. Pollex und Kollegen geben eine maternale Flussrate von 13.6 ml/min \pm 3.2ml/min an. In diesem Rahmen bewegen sich beide gewählten Durchflussraten und scheinen somit im „physiologischen Bereich“ zu liegen, so dass sich keine erhebliche Abweichung bei der Auswertung ergibt (Pollex et al. 2010).

5.5.4 Laufzeit der Perfusion

Bis auf die 1. Perfusion betrug die effektive Perfusionslaufzeit stets 2,5 Stunden. Ziel war es, zu ermitteln, ob der Versuchsaufbau mit der schiefen Ebene prinzipiell funktioniert. Aus diesem Grund wurde, abgesehen vom 1. Versuch, nur für einen so komprimierten Zeitraum perfundiert. Trotzdem scheinen schon nach einer derart kurzen Spanne Zellen in die Zotten zu invadieren. Auch bei Heinzelmann und Kollegen aus dem hiesigen Plazentalabor lässt sich vermuten, dass bereits nach deren 3-stündiger Perfusion Lymphozyten in das fetale Gewebe transmigriert sind (Heinzelmann et al. 2009).

Im Vergleich zu den 2,5-stündigen und der einen doppelt so lange dauernden Perfusion ergaben sich bei der Auswertung keine signifikanten Unterschiede. Dies kann damit zusammenhängen, dass bei der anfänglichen 5-stündigen Perfusion nicht so „physiologisch“ gearbeitet wurde wie bei den restlichen Versuchen. Hierzu zählen z.B. das konstante Warmhalten der PL mit den fluoreszierenden Zellen sowie das Abdecken des Kotyledos mit Frischhaltefolie zum Schutz vor Austrocknung. Dies könnte der Grund dafür sein, dass offenbar weniger Zellen zu transmigratorischen Prozessen fähig waren als in den nachfolgenden 4 Perfusionen.

5.5.5 Perfusionsvolumen

Abgesehen von der 1. Perfusion (100 ml) betrug das Perfusionsvolumen jeweils 60 ml. Da es herauszufinden gilt, ob die hier beschriebene Methode funktioniert, wurden maximal viele Zellen in einer möglichst niedrigen Verdünnung perfundiert. Daher wurden die 60 ml ab der 2. Perfusion nicht überschritten. Ein kleineres Volumen ist allerdings auch nicht zu empfehlen, da sich stets ein Grundvolumen von ca. 40 ml in der Plazenta und den Schläuchen befindet. Somit ist das Becherglas während der Perfusion mit etwa 20 ml Perfusat gefüllt, das ständig zirkuliert. Um zu gewährleisten, dass keine Zellen auf den Boden absinken bzw. miteinander verklumpen und so in Gruppen an den Villus haften, wurde das im Becherglas befindliche Volumen alle 20 min mit einer Pipette umgerührt (siehe 3.9.4).

Vergleicht man die 1. Perfusion mit den restlichen 4 Versuchen, ergibt sich bei der Auswertung kein wesentlicher Unterschied. Obwohl die Verdünnung der Zellen in der 1. Perfusion größer war als in den anderen Durchführungen, betrug die Perfusionslaufzeit aber doppelt so lange. Aus diesem Grund kann keine objektive Aussage über die Beziehung zwischen Perfusionsvolumen und dem lymphozytären Verhalten getroffen werden.

5.6 Bezugnahme auf die zentralen Fragestellungen

Bezüglich der Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit im Raum stehen (siehe Punkt 2), ist schlussfolgernd prägnant herauszustellen, dass

- die Zellen während der Perfusion nicht derart in Mitleidenschaft gezogen werden, dass sie vorzeitig zugrunde gehen. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Lymphozyten mit Hilfe der hier beschriebenen Methode im Stande sind, Adhäsions- und Invasionsprozesse durchzuführen.
- die beiden Farbstoffe bei der Auswertung unterschiedlich abschneiden. Der orangene CellTracker erweist sich als gut analysierbar, wohingegen der grüne Farbstoff eher zu schlechteren Ergebnissen führt.
- es Unterschiede bei der Auswertung zwischen den Paraffinschnitten und den Gefrierschnitten gibt. Mit beiden Konservierungstechniken können folgende Phasen der lymphozytären Transmigration gut beobachtet werden: Adhäsions- und Anpassungsphase sowie flächige initiale und terminale Infiltrationsphase. Durch die starke Eigenfluoreszenz bei den Paraffinschnitten ist die terminale Infiltrationsphase von der Phase der vollendeten Transmigration gut abzugrenzen, bei der Gefrierschnitttechnik hingegen nicht. Durch die wesentlich höhere Schrumpfung bei den Gefrierschnitten ist es z.T. unmöglich die Zellentypen voneinander zu unterscheiden; auch die Dezidua kann vom fetalen Gewebe kaum differenziert werden. Bei den Paraffinschnitten ist dies gut möglich. Durch die plastischere Darstellung der Gefrierschnitte gegenüber den Paraffinschnitten sind scheinbare transmigratorische Besonderheiten (Ausbildung von Adhäsionsbrücken und punktuelle initiale Infiltration) besser zu mikroskopieren.
- mit der Perfusion auf der schiefen Ebene sicherlich genaue „Schwachstellen“ in der Plazentaschranke nachweisbar sind, jedoch nicht mit dem hier verwendeten Fluoreszenzmikroskop.

Kurzum ist herauszustellen, dass die hier beschriebene Methode prinzipiell funktioniert. Es existiert eine große Zahl histologischer Fotos zu allen in Punkt 4 (Ergebnisse) beschriebenen Hypothesen. Sie lassen eine Reproduzierbarkeit der Versuche vermuten, und Kritik, basierend auf Fehlinterpretation durch Entstehung von Artefakten und/oder optische Täuschungen, abschwächen. Für weitere Versuche könnte allerdings über gewisse Änderungen innerhalb der Versuchsdurchführung nachgedacht werden, um lymphozytäre Verhaltensweisen sowie maternal-fetale Interaktionen besser zu analysieren.

6 Methodenoptimierung und Aussichten

Um zukünftig therapeutische Ansätze auf diesem Fachgebiet zu entwickeln, müssen weiterführende Forschungen betrieben werden. Mit der hier beschriebenen Methode scheinen sich diesbezügliche Resultate erschließen zu lassen. Daher werden im Folgenden einige Verbesserungsvorschläge und Anregungen für nachfolgende Untersuchungen beschrieben.

Mit dem orangen CellTracker ließen sich gute Ergebnisse erzielen, mit dem grünen taten sich hingegen Schwierigkeiten bei der Analyse auf. Daher ist es ratsam, den grünen Fluoreszenzmarker zukünftig durch anderweitige Farbstoffe ohne schnellen Fluoreszenzzerfall zu ersetzen. Von Vorteil sind sicherlich solche, die nicht über den Grünkanal fluoreszieren, also bestenfalls keine Absorptions- und Emissionsmaxima zwischen 490–575 nm besitzen. So könnte die Eigenfluoreszenz des plazentaren und zellulären Gewebes weitestgehend umgangen werden.

Daneben besteht ebenso die Möglichkeit den Versuchsaufbau derart umzukonstruieren, dass mit ihm eine zweiseitige Perfusion durchgeführt werden kann. So würden auch fetale Erythrozyten aus dem Gewebe gespült werden, was die Eigenfluoreszenz in den Präparaten weiter minimieren würde. Allerdings wird es dann schwierig, die durch das fetale Zottengefäßendothel invadierten Lymphozyten zu mikroskopieren. Der Grund dafür ist der geschlossene Kreislauf: die Tumorzellen werden durch den in der fetalen Umbilikalvene befindlichen Perfusionsschlauch aus den kindlichen Gefäßen herausgespült und erneut dem intervillösen Raum zugeführt. Bei der einseitigen Perfusion sind jene scheinbar invadierten Zellen eher zu mikroskopieren, da kein Sog auf die fetale Plazentaseite ausgeübt wird (Abb. 4.11 E und 4.12 E). Ein weiter großer Nachteil der dualen Perfusion besteht darin, dass der einfache Charakter des Versuchsaufbaus grundlegend verloren geht.

Aus diesen Gründen wird eher zur Wahl eines neuen Fluoreszenzfarbstoffes geraten.

Des Weiteren sollte stets darauf geachtet werden, dass die Versuche so „physiologisch“ wie möglich durchgeführt werden. Beibehalten werden sollten folgende Vorkehrungen:

- schnellst mögliche Versuchsdurchführung nach Entbindung,
- vorsichtiges Transportieren der Plazenta sowie behutsames und großzügiges Ausschneiden des Korylodos zum Schutz vor Traumata,
- oberflächliches Platzieren der Perfusionsnadeln zur weitestgehenden Vermeidung von Traumata,

- Abdecken des zu perfundierenden Kotyledos mit Frischhaltefolie zum Schutz vor Austrocknung,
- Gewährleisten einer konstant warmen Raumtemperatur (etwa 20°C) zum Schutz vor zu starker Auskühlung des Kotyledos und der Zellen,
- kontinuierliches Warmhalten des Perfusats bei Körpertemperatur (etwa 37°C) zum Schutz vor zu starker Auskühlung des Kotyledos und der Zellen.

Darüber hinaus könnten zur „physiologischen“ Perfusion in Folgeversuchen weitere Modifikationen in Betracht gezogen werden. So ist es sicherlich sinnvoll, das mit Wasser gefüllte Becherglas, in dem sich ein weiteres Becherglas mit dem Perfusat befindet, auf einer beheizbaren Wärmeplatte zu positionieren und dessen Temperatur konstant bei 37°C zu halten. Während dieser Versuchsreihe wurde fortwährend das abgekühlte Wasser manuell durch neues körperwarmes Wasser ersetzt. So bestanden einerseits die Gefahr der Dislokation der Perfusionsnadeln und andererseits das unnötige Belasten der Zellen durch den stetigen Temperaturwechsel. Um eine weitestgehend „physiologische“ Versuchsdurchführung zu gewährleisten, ist es sicherlich sinnvoll, den pH-Wert des Perfusats in einem physiologischen Bereich zu halten und es zusätzlich zu oxygenieren (Heinzelmann et al. 2010, Pollex et al. 2010).

In Folgeversuchen könnte zusätzlich mit den hier beschriebenen oder abgewandelten Parametern (weiter) variiert werden. Auf diese Weise ließe sich das transmigratorische Verhalten der Lymphozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Perfusionsparametern detailliert darstellen.

Es ist ebenso sinnvoll, zukünftig eine genaue Quantifizierung der im Gewebe verbliebenen Lymphozyten durchzuführen, wahlweise vergleichend unter Berücksichtigung plazentarer Besonderheiten, wie dem Vorliegen einer IUGR oder Präeklampsie. Hierzu könnte man sich der Durchflusszytometrie bedienen und die Differenz aus der angefärbten präperfundierten Lymphozytenkonzentration mit der postperfundierten Anzahl der zentrifugierten Lymphozyten aus dem Perfusat und der Nachspülsuspension ermitteln.

Unter Zuhilfenahme dieses Verfahrens könnte darüber hinaus auch die Konzentration gewisser Proteine (z.B. Th1/Th2-Zytokine) in Abhängigkeit zur lymphozytären Transmigrationsrate analysiert werden.

Für weiterführende Versuche könnte eine Auswertung der Präparate mit anderen Mikroskopen von Vorteil sein. Viel versprechend scheinen v.a. die folgenden beiden Mikroskope zu sein:

- Das Rasterelektronenmikroskop. Es werden durch seine bis zu 10.000fache Vergrößerung (Goldstein et al. 2003) kleinste Strukturen dargestellt. Auf diese Weise könnte versucht werden, die Kanäle oder synzytialen Läsionen sichtbar zu machen.
- Das LSM. Sein großer Vorteil besteht darin, dass es das Gewebe aus verschiedenen Ebenen aufnehmen kann und somit anstatt eines zweidimensionalen Bildes ein dreidimensionales erzeugt (Carl Zeiss. 2003 [Internetausgabe]). Auf diese Weise könnte eventuell dargestellt werden, ob eine direkte Infiltration des Villus durch die Krebszelle stattfindet oder es sich im zweidimensionalen Bild lediglich um eine optische Täuschung handelt. Auch mit dem LSM könnten durch die 3D-Aufnahme vermutlich synzytiale „Schwachstellen“ dargestellt werden.

Sollte mit Hilfe dieser Mikroskope die hier geäußerte Hypothese hinsichtlich der Adhäsionsbrückenausbildung zwischen Lymphozyt und Synzytium verifiziert werden, könnten die verantwortlichen Moleküle in weiteren Versuchen bestimmt werden. Diesbezüglich ist es sicherlich sinnvoll, die Proteinbrücken auf das Vorhandensein von interzellulären CAMs oder junctionalen CAMs zu testen, da diese auch bei der endothelialen Transmigration der Leukozyten involviert sind (Muller 2009).

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

7.1 Quellenverzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1.1** Vereinfachte Zeichnung einer Plazentazotte mit den verschiedenen Differenzierungsstadien eines Zytotrophoblasten, der synzytialen Fusion sowie der Differenzierung des Synzytiotrophoblasten und dessen Untergang (mod. n. Knerr et al. 2004)
- Abbildung 1.2** Schematische Darstellung der Dezidua graviditatis (mod. n. URL: http://histologi.haidl.se/Kapitel_22_-_Placenta)
- Abbildung 1.3** Schnitt durch die menschliche Plazenta (mod. n. Moore und Persaud 2007)
- Abbildung 1.4** Invasion der extravillösen Zytotrophoblastzellen (aus Rath et al. 2010)
- Abbildung 1.5** Ultrastruktur der Plazentaschranke nach dem 4. Schwangerschaftsmonat (mod. n. Billington 1992)
- Abbildung 1.6** Tryptophanabbau (aus Rassow et al. 2006)
- Abbildung 1.7** Hämatopoese (Klinke und Silbernagl 2003)
- Abbildung 3.1** Vorversuch zur Sicherstellung der Fluoreszenzerhaltung
- Abbildung 3.2** Schematischer Versuchsaufbau

Paraffinschnitte, alle Kanäle einzeln abgebildet (Abbildung 4.1 bis Abbildung 4.12):

- Abbildung 4.1** Hängenbleiben einer CCRF-CEM-Zelle in einer villösen Engstelle
- Abbildung 4.2** Hängenbleiben einer JURKAT-Zelle in einer villösen Engstelle
- Abbildung 4.3** Morphologische Anpassung einer CCRF-CEM-Zelle an einen Villus
- Abbildung 4.4** Morphologische Anpassung einer JURKAT-Zelle an einen Villus
- Abbildung 4.5** Anheftung einer CCRF-CEM-Zelle an die Dezidua
- Abbildung 4.6** Anheftung einer JURKAT-Zelle an die Dezidua
- Abbildung 4.7** Flächige initiale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.8** Flächige initiale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.9** Terminale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.10** Terminale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.11** Phase der vollendeten Transmigration einer CCRF-CEM-Zelle
- Abbildung 4.12** Phase der vollendeten Transmigration einer JURKAT-Zelle

Gefrierschnitte, alle Kanäle einzeln abgebildet (Abbildung 4.13 bis Abbildung 4.24):

- Abbildung 4.13** Hängenbleiben einer CCRF-CEM-Zelle in einer villösen Engstelle
- Abbildung 4.14** Hängenbleiben einer JURKAT-Zelle in einer villösen Engstelle
- Abbildung 4.15** Ausbildung von Adhäsionsbrücken zwischen einer CCRF-CEM-Zelle und einem Villus
- Abbildung 4.16** Ausbildung von Adhäsionsbrücken zwischen einer JURKAT-Zelle und einem Villus
- Abbildung 4.17** Morphologische Anpassung einer CCRF-CEM-Zelle an einen Villus
- Abbildung 4.18** Morphologische Anpassung einer JURKAT-Zelle an einen Villus
- Abbildung 4.19** Punktuelle initiale Farbstoffmigration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.20** Punktuelle initiale Farbstoffmigration einer JURKAT-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.21** Flächige initiale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.22** Flächige initiale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.23** Terminale Infiltration einer CCRF-CEM-Zelle in den Villus
- Abbildung 4.24** Terminale Infiltration einer JURKAT-Zelle in den Villus
- Abbildung 5.1** Schematische Darstellung des Transmigrationsvorganges einer ALL-Zelle (mod. n. Redman et al. 1993)
- Abbildung 5.2** Darstellung des (vermuteten) Transmigrationsvorganges in Bezug auf Abb. 5.1
- Abbildung 5.3** Ausbildung von Adhäsionsbrücken zwischen einer CCRF-CEM-Zelle und einem Villus
- Abbildung 5.4** Zytoplasmatische Zellausläufer einer JURKAT-Zelle infiltrieren einen Villus
- Abbildung 5.5** Flächiger Zytoplasmaübertritt von einer JURKAT-Zelle in einen Villus
- Abbildung 5.6** Punktuelle initiale Infiltration einer JURKAT-Zelle in einen Villus
- Abbildung 5.7** Fluoreszenzzerfall einer CCRF-CEM-Zelle
- Abbildung 5.8** Eventuelle Beeinträchtigung der Grün-Fluoreszenz
- Abbildung 5.9** Stark grün-fluoreszierende Zellen
- Abbildung 5.10** Die mögliche Transmigration durch inner-synzytiale Kanäle (mod. n. Gammal 1985)
- Abbildung 5.11** Transmigration durch synzytiale Calciumkanäle (mod. n. Stumpf et al. 2006)
- Abbildung 5.12** Mögliche synzytiale „Schwachstellen“, an die 2 JURKAT-Zellen gelagert sind
- Abbildung 5.13** Realer Versuchsaufbau
- Abbildung 5.14** Einfluss des Nachspülens auf das Mikroskopierergebnis
- Abbildung 5.15** Zelltrümmer einer grün-fluoreszierenden CCRF-CEM-Zelle
- Abbildung 8.1** Aufklärungs- und Einverständnisbogen zur temporären Forschung an der Plazenta

7.2 Quellenverzeichnis der Diagramme und Tabellen

7.2.1 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 ALL-Subtypen und deren Verteilung
(mod. n. Renz-Polster und Krautzig 2008)

7.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Ausgewählte Zytokine und deren Wirkungen, mod. n. Geis und Dietl 2001

Tabelle 3.1 Übersicht zu den durchgeführten Perfusionen mitsamt der dazugehörigen Perfu-sionsparameter

Tabelle 3.2 Zusammensetzung der PL

Tabelle 3.3.1 Ausgewählte Eigenschaften des grünen CellTrackers, Strukturformeln und Werte von products.invitrogen.com/ivgn/product/C2102?ICID=search-c2102

Tabelle 3.3.2 Ausgewählte Eigenschaften des roten CellTrackers, Strukturformeln und Werte von products.invitrogen.com/ivgn/product/C2927?ICID=search-c2927

Tabelle 3.4 Dehydrierung

Tabelle 3.5 Rehydrierung

Tabelle 3.6 Ausgewählte Eigenschaften von DAPI, Strukturformel und Werte von URL: products.invitrogen.com/ivgn/product/D1306?ICID=search-product_113192834 [Stand 20.08.2011] und URL: <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=279> [Stand 15.10.2011]

Tabelle 3.7.1 Teil 1 - Färbung mit Hämalaun und Eosin

Tabelle 3.7.2 Teil 2 - Dehydrierung

Tabelle 5.1 Gefrierschnitttechnik versus Paraffinschnitttechnik

Tabelle 8.1 Daten zu Mutter und Geburt

Tabelle 8.2 Zusammensetzung des Earle's Puffers (für 2 l Lösung)

7.3 Literaturverzeichnis

Achache H, Revel A. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 12(6):731-746.

Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C. 2001. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*, 7(12):1167-1172.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2005. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med*, 83(2):88–96.

Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J. 2007. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol*, 58(3):268-79.

Aust G. 2007. Blut und lymphatische Organe - Grundlagen. In: Thieme, Hrsg. *Anatomie*. 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Baker AM, Braun JM, Salafia CM, Herring AH, Daniels J, Rankins N, Thorp JM. 2008. Risk Factors for Uteroplacental Vascular Compromise and Inflammation. *Am J Obstet Gynecol.*, 199(3): 256.e1–256.e9.

Billington WD. 1992. The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 6(3):417-38.

Bischof P, Irminger-Finger I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Bio*, 37(1):1-16.

Blaschitz A, Gauster M, Fuchs D, Lang I, Maschke P, Ulrich D, Karpf E, Takikawa O, Schimek MG, Dohr G, Sedlmayr P. 2011. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. *PLoS One*, 6(7):e21774.

Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. 2007. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med*,13(12):1450-1457.

Bourget P, Roulot C, Fernandez H. 1995. Models for placental transfer studies of drugs. *Clin Pharmacokinet*, 28(2):161-80.

- Bracknies K.** 2005. GnRH- und Galanin-Expression in der menschlichen Plazenta im Verlauf der Schwangerschaft und nach Galanin-Stimulation [Dissertation]. Ulm: Medizinisch-Naturwissenschaftliche Hochschule.
- Burrows TD,** King A, Loke YW. 1996. Trophoblast migration during human placental Implantation. *Hum Reprod Update*, 2(4):307–321.
- Carl Zeiss.** 2003. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. (URL: [http://www.zeiss.de/C1256CFB00332E16/0/C02FBE788001CDC3C1256E5C0026D36C/\\$file/45-0029_d.pdf](http://www.zeiss.de/C1256CFB00332E16/0/C02FBE788001CDC3C1256E5C0026D36C/$file/45-0029_d.pdf) [Stand: 01.09.2011]).
- Catlin EA,** Roberts JD Jr, Erana R, Preffer FI, Ferry JA, Kelliher AS, Atkins L, Weinstein HJ. 1999. Transplacental transmission of natural-killer-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 341(2):85-91.
- Chaouat G,** Ledée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. 2004. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol*, 134(2):93-119.
- Chatterjee A,** Chartrand SA, Harrison CJ, Felty-Duckworth A, Bewtra C. 2001. Severe Intrauterine Herpes Simplex Disease with Placentitis in a Newborn of a Mother with Recurrent Genital Infection at Delivery. *J Perinatol*, 21(8):559-564.
- Choi EY,** Santoso S, Chavakis T. 2009. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci.*;14:1596-605.
- Dai X,** Zhu BT. 2010. Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J Histochem Cytochem*, 58(1):17-28.
- Damiano A,** Zotta E, Goldstein J, Reisin I, Ibarra C. 2001. Placenta. Water channel proteins AQP3 and AQP9 are present in syncytiotrophoblast of human term placenta. *22(8-9):776-81.*
- Dimitriadis E,** C.A.White, R.L.Jones and L.A.Salamonsen. 2005. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*, 11(6):613–630.
- Donadi EA,** Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. 2011. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci*, 68(3):369–395.
- Doria A,** Cutolo M, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, Punzi L, Iaccarino L, Petri M. 2012. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients. *Arthritis Res Ther*. 14;14(2):R66.

- Ermisch C.** 2010. Untersuchung der Funktion und Regulation des Progesteron – induzierten Blockierfaktor (PIBF) mittels RNA Interferenz [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Faber JJ,** Anderson DF. 2010. The placenta in the integrated physiology of fetal volume control. *Int J Dev Biol*, 54(2-3):391-6.
- Fichte IH,** Hrsg.1971. Johann Gottlieb Fichtes nachgelassene Werke. Zur Rechtslehre und Sittenlehre II. 1. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter & Co, 280.
- Fisher S,** Genbacev O, Maidji E, Pereira L. 2000. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol.*, 74(15):6808-20.
- Fitzgerald JS.** 2006. Aspects of materno-fetal interactions in the placenta. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Fitzgerald JS,** Poehlmann TG, Suman P, Gupta SK, Schleussner E, Markert UR. 2007. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Trophoblast Invasion. *J Reprod Medicine and Endocrinology* 4(6):322-330.
- Foley GE,** Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE. 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*, 18:522-529.
- Gammal EB.** 1985. Syncytial channels in the villous trophoblast of the macaque. *J Anat*, 141:181-91.
- Geis K,** Dietl J. 2001. Die Rolle der Zytokine an der fetomaternalen Grenzfläche. *Zentralbl Gynakol*, 123(11):609-618.
- Goldstein J,** Newbury DE, Joy DC, Lyman CE, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael JR, Hrsg. 2003. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. 3. Aufl. New York: Springer Science+Media Inc.
- Gorczyński RM,** Hadidi S, Yu G, Clark DA. 2002. The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am J Reprod Immunol*, 48(1):18-26.
- Heinzelmann J,** Enke U, Seyfarth L, Schleussner E, Malek A, Markert UR. 2009. Development of a human model to study homing behavior of immune cells into decidua and placental villi under ex vivo conditions. *Am J Reprod Immunol.*,61(1):19-25.

- Hick C**, Hick A, Hrsg. 2006. Intensivkurs Physiologie. 5. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Hemmings DG**, Kilani R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert LJ. 1998. Permissive Cytomegalovirus Infection of Primary Villous Term and First Trimester Trophoblasts. *J Virol*, 72(6):4970–4979.
- Hofmeister V**. 2004. Expression und immunmodulatorische Funktion von HLA-G und seinen verkürzten Isoformen in Tumorzelllinien [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Holtz R**, Choi JC, Petroff MG, Piskurich JF, Murphy SP. 2003. Class II Transactivator (CIITA) Promoter Methylation Does Not Correlate with Silencing of CIITA Transcription in Trophoblasts. *Biol Reprod*, 69(3):915–924.
- Horn F**, Moc I, Schneider N, Grillhösel C, Berghold S, Lindenmeier G, Hrsg. 2005. Biochemie des Menschen. 3 Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Hudić I**, Fatusić Z, Szekeres-Bartho J, Balić D, Polgar B, Ljuca D, Dizdarević-Hudić L. 2009. Progesterone-induced blocking factor and cytokine profile in women with threatened pre-term delivery. *Am J Reprod Immunol*, 61(5):330-337.
- Hunt JS**, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. 2005. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*, 19(7):681–693.
- Hunt JS**. 2006. Stranger in a strange land. *Immunol Rev*, 213: 36–47.
- Hyder SM**, Stancel GM. 1999. Regulation of Angiogenic Growth Factors in the Female Reproductive Tract by Estrogens and Progestins. *Mol Endocrinol*, 13(6):806-811.
- Invitrogen**. 2008. CellTracker Probes for Long-Term Tracing of Living Cells. (URL: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp02925.pdf> [Stand: 20.08.2011]).
- Jafroodi M**, Zarkesh M, Kariminejad R. 2010. Congenital Leukemia: A Case Report. *Iran J Blood Cancer*, 2(3):0-0.
- James JL**, Stone PR, Chamley LW. 2005. Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. *Reproduction*, 130(1):95-103.
- Johnson FWA**, Matheson BA, Williams H, Laing AG, Jandial V, Davidson-Lamb R, Halliday GJ, Hobson D, Wong SY, Hadley KM, Moffat MAJ, Postlethwaite R. 1985. Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife. *Br Med J*, 290(6468):592-594.

- Jones EM.** 1969. Placental metastases from bronchial carcinoma. *Br Med J*, 2(5655):491-492.
- Jones RL,** Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. 2006. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*, 132(2):217–232.
- Kamath AB,** Wang L, Das H, Li L, Reinhold VN, Bukowski JF. 2003. Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(10):6009-6014.
- Kane N,** Kelly R, Saunders PTK, Critchley HOD. 2009. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by hCG and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology*, 150(6): 2882–2888.
- Kayisli UA,** Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. 2003. Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System. *J Immunol*, 171(5):2305–2313.
- Kertschanska S,** Stulcová B, Kaufmann P, Stulc J. 2000. Distensible transtrophoblastic channels in the rat placenta. *Placenta*. 21(7):670-7.
- Khan S,** Katabuchi H, Araki M, Nishimura R, Okamura H. 2000. Human Villous Macrophage-Conditioned Media Enhance Human Trophoblast Growth and Differentiation In Vitro. *Biol Reprod*, 62(4):1075–1083.
- King A,** Gardner L, Loke YW. Human decidual leukocytes do not proliferate in response to either extravillous trophoblast or allogeneic peripheral blood lymphocytes. *J Reprod Immunol*, 1996;30:67-74.
- Kirsch J.** 2007. Embryologie - Grundlagen. In: Thieme, Hrsg. Anatomie. 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Klinke R,** Silbernagl S, Hrsg. 2003. Physiologie. 4. Aufl. Stuttgart:Georg Thieme Verlag KG.
- Knerr I,** Huppertz B, Weigel C, Dötsch J, Wich C, Schild RL, Beckmann MW, Rascher W. 2004. Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Mol Hum Reprod*, 10(8):581-588.
- Koopman LA,** Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*,198(8):1201-1212.

- Kopcow HD**, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, Strominger JL. 2008. T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(47):18472-18477.
- Kudo Y**, Boyd CAR, Sargent IL, Redman CWG. 2001. Tryptophan degradation by human placental indoleamine2,3-dioxygenase regulates lymphocyte proliferation. *J Physiol*, 535(Pt 1):207-215.
- Kumar GL**, Rudbeck L. 2009. Education Guide – Immunohistochemical Staining Methods. 5. Aufl. DAKO. (URL: http://www.dako.com/de/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf [Stand: 20.08.2011]).
- Kumar GL**, Kiemann JA. 2010. Spacial Stains and H & E. 2. Aufl. DAKO. (URL: http://www.dako.com/de/08066_special_stains_eduguide.pdf [Stand: 16.02.2012]).
- Lessey BA**. 2003. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*, 68(10-13):809–815.
- Lunghi L**, Ferretti ME, Medici S, Biondi S, Vesce F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol*, 5:6.
- Makrigiannakis A**, Karamouti M, Drakakis P, Loutradis D, Antsaklis A. 2008. Fetomaternal Immunotolerance. *Am J Reprod Immunol*, 60(6):482–496.
- Maltaris T**, Dittrich R, Kölbl H, Seufert R, Fischl F. 2008. Faktoren der Implantation und frühen Embryonalentwicklung. *J Gynäkol Endokrinol.*, 2 (1) (Ausgabe für Österreich), 15-18.
- Matzdorff A**, Fritze D, Hrsg. 2009. Hämatologie. In: Thieme, Hrsg. Innere Medizin. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- May K**, Grube M, Malhotra I, Long CA, Singh S, Mandaliya K, Siegmund W, Fusch C, Schneider H, King CL. 2009. Antibody-dependent transplacental transfer of malaria blood-stage antigen using a human ex vivo placental perfusion model. *PLoS One*, 4(11):e7986.
- Miller RK**, Mattison DR, Panigel M, Ceckler T, Bryant R, Thomford P. 1987. Kinetic assessment of manganese using magnetic resonance imaging in the dually perfused human placenta in vitro. *Environ Health Perspect*, 74:81-91.
- Mincheva-Nilsson L**. 2003. Pregnancy and gamma/delta T cells: Taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:120.
- Moffett-King A**. 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, 2(9):656-663.

- Moore KL**, Hrsg. 1996. Grundlagen der medizinischen Embryologie. 2. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- Moore KL**, Persaud TVN, Hrsg. 2007. Embryologie. 5. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Mor G**, Cardenas I. 2010. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol*, 63(6):425–433.
- Morales PJ**, Pace JL, Platt JS, Phillips TA, Morgan K, Fazleabas AT, Hunt JS. 2003. Placental Cell Expression of HLA-G2 Isoforms Is Limited to the Invasive Trophoblast Phenotype. *J Immunol*, 171(11):6215-6224.
- Mußil B**. 2005. Einfluss von löslichem HLA-G1 auf cytotoxisch T-Zellen aus der Decidua. [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Muller WA**. 2009. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res*. 105(3):223-30.
- Myren M**, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE. 2007. The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro*, 21(7):1332-1340.
- Nelson DM**. 1996. Placenta. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous Trophoblast. 17(7):387-91.
- Ockleford CD**. 2010. The allo-epi-endothelial lining of the intervillous space. *Placenta*. 31(12):1035-42.
- Ordi J**, Creus M, Quintó L, Casamitjana R, Cardesa A, Balasch J. 2003. Within-subject between-cycle variability of histological dating, alpha v beta 3 integrin expression, and pinopod formation in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88(5):2119-25.
- Panigel M**, Pascaud M, Brun JL. 1967. Radioangiographic study of circulation in the villi and intervillous space of isolated human placental cotyledon kept viable by perfusion. *J Physiol*, 59(1):277.
- Pollex EK**, Feig DS, Lubetsky A, Yip PM, Koren G. 2010. Insulin glargine safety in pregnancy: a transplacental transfer study. *Diabetes Care*. 33(1):29-33.
- Pollheimer J**, Knöfler M. 2005. Signalling Pathways Regulating the Invasive Differentiation of Human Trophoblasts. *Placenta*, 26A(19):S21-30.

- Pöttgens AJG**, Drewlo S, Kokozidou M, Kaufmann P. 2004. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum Reprod Update*, 10(6):487-496.
- Pschyrembel W**, Hrsg. 2004. Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch. 260 Aufl. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.
- Ramathal CY**, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. 2010. Endometrial Decidualization of Mice and Men. *Semin Reprod Med.*, 28(1):17–26.
- Rassow J**, Hauser K, Netzker R, Deutmann R, Hrsg. 2006. Biochemie. 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Rath W**, Gembruch U, Schmidt S, Hrsg. 2010. Geburtshilfe und Perinatalmedizin Pränataldiagnostik – Erkrankungen – Entbindung. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Rebmann V**, Switala M, Eue I, Grosse-Wilde H. 2010. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod*, 25(7):1691–1698.
- Redman CW**, Sargent IL, Starkey PM, Hrsg. 1993. The Human Placenta. 1 Aufl. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Reipen J**. 2009. Bedeutung des Tryptophan-Stoffwechsels bei der posttraumatischen Entstehung von SIRS und Sepsis [Dissertation]. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Renz-Polster H**, Krautzig S, Hrsg. 2008. Basislehrbuch Innere Medizin. 4. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Riley JK**, Yokoyama WM. 2008. NK Cell Tolerance and the Maternal–Fetal Interface. *Am J Reprod Immunol*, 59(5):371–387.
- Rudloff I**. 2008. Analyse der Rolle von SOCS3 für die Regulation von Proliferation, Migration und Invasion trophoblastärer Zellen [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Rupp N**. 2005. Untersuchungen zur Funktion und zum Repertoire humaner gd T-Zell Subpopulationen [Dissertation]. Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität.
- Sacks G**, Sargent I, Redman C. 1999. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*, 20(3):114-118.

- Sadler TW**, Hrsg. 2003. Medizinische Embryologie. 10. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Saito S**. 2000. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol*, 47(2):87-103.
- Sastry BV**. 1999. Techniques to study human placental transport. *Adv Drug Deliv Rev*, 38(1):17-39.
- Sato Y**, Izumi Y, Minegishi K, Komada M, Yamada S, Kakui K, Tatsumi K, Mikami Y, Fujiwara H, Konishi I. 2011. Prenatal findings in congenital leukemia: a case report. *Fetal Diagn Ther.*, 29(4):325-30.
- Schleußner E**, Seewald HJ, Hrsg. 2002. Plazenta – Physiologie und Klinik. 1. Aufl. Aachen: Shaker Verlag.
- Schmitz S**, Hrsg. 2009. Der Experimentator Zellkultur. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag.
- Schneider H**, Panigel M, Dancis J. 1972. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol*, 114(6):822-828.
- Schneider H**, Miller RK. 2010. Receptor-mediated uptake and transport of macromolecules in the human placenta. *Int J Dev Biol*, 54(2-3):367-75.
- Schneider U**, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19(5):621-6.
- Schumacher A**, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa S-D, Zimmermann G, Nitschke C, Volk H-D, Alexander H, Günter M, Zenclussen AC. 2009. Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *J Immunol*, 182(9): 5488-5497.
- Schumacher GH**, Christ BEA, Hrsg. 1993. Embryonale Entwicklung und Fehlbildung des Menschen. 10 Aufl. Berlin: Ullstein Mosby.
- Sheikh SS**, Amr SS, Lage JM. 2005. Acute placental infection due to *Klebsiella pneumoniae*: Report of a unique case. *Infect Dis in Obstet Gynecol*, 13(1):49–52.
- Sohn C**, Holzgreve W, Hrsg. 2012. Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

- Štulc J.** 1989. Extracellular transport pathways in the haemochorial placenta. *Placenta*, 10(1):113-9.
- Stumpf T,** Zhang Q, Hirnet D, Lewandrowski U, Sickmann A, Wissenbach U, Dörr J, Lohr C, Deitmer JW, Fecher-Trost C. 2008. The human TRPV6 channel protein is associated with cyclophilin B in human placenta. *J Biol Chem*, 283(26):18086-98.
- Strakova Z,** Livak M, Krezalek M, Ihnatovych I. 2008. Multipotent properties of myofibroblast cells derived from human placenta. *Cell Tissue Res*, 332(3):479–488.
- Svensson L,** Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R, Mattsson R. 2001. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol*, 51(1):3-7.
- Szekeres-Bartho J,** Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. 2001. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol*, 1(6):1037-1048.
- Szekeres-Bartho J.** 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Intern Rev Immunol*, 21(6):471–495.
- Tanase D.** 2009. Perforinexpression bei humanen peripheren mononukleären Zellen nach anti-CD3 Stimulation – Zusammenhang mit Zellgröße und Zytotoxizität [Dissertation]. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität.
- Tang Z,** Abrahams VM, Mor G, Guller S. 2011. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*, 1221:103–108.
- Terness P,** Kallikourdis M, Betz AG, Rabinovich GA, Saito S, Clark DA. 2007. Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells. *Am J Reprod Immunol*, 58(3):238-254.
- Than NG,** Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagy A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z, Wildman DE. 2009. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(24):9731-9736.
- Thaxton JE,** Sharma S. 2010. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 63(6):482-491.

- Thirkill TL**, Hendren SR, Soghomonians A, Mariano NF, Barakat AI, Douglas GC. 2004. Regulation of trophoblast beta1-integrin expression by contact with endothelial cells. *Cell Commun Signal*, 2(1):4.
- Tolar J**, Coad JE, Neglia JP. 2002. Transplacental transfer of small-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med*, 346(19):1501-2.
- Troen P**, Gordon EE. 1958. Perfusion studies of the human placenta. I. Effect of estradiol and human chorionic gonadotropin on citric acid metabolism. *J Clin Invest*, 37(11):1516-1523.
- Trück M**. 2009. Analyse der Funktion von Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Uckan D**, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barness E, Good RA. 1997. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod*, 3(8):655-62.
- Vähäkangas K**, Myllynen P. 2006. Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents. *Mutat Res*, 608(2):129-135.
- Valavanidis A**, Vlachogianni T, Fiotakis K. 2009. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles 6(2):445-62.
- van der Linden MH**, Valsecchi MG, De Lorenzo P, Möricke A, Janka G, Leblanc TM, Felice M, Biondi A, Campbell M, Hann I, Rubnitz JE, Stary J, Szczepanski T, Vora A, Ferster A, Hovi L, Silverman LB, Pieters R. 2009. Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. *Blood*, 114(18):3764-8.
- Wegmann TG**, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 14(7):353-356.
- Welsch U**, Hrsg. 2006. Repetitorium Histologie. 1. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Wen L**, Chen L-H, Li H-Y, Chang S-P, Liao C-Y, Tsui K-H, Sung Y-J, Chao K-C. 1996. Roles of Estrogen and Progesterone in Endometrial Hemodynamics and Vascular Endothelial Growth Factor Production. *J Chin Med Assoc*, 72(4):188-193.
- Zhou Y**, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. 1997. Human Cytotrophoblasts Adopt a Vascular Phenotype as They Differentiate. A Strategy for Successful Endovascular Invasion? *J. Clin. Invest*, 99(9): 2139–2151.

8 Anhang

8.1 Perfusionsrelevantes

Tab. 8.1: Daten zu Mutter und Geburt

Perfusionsversuch	Datum	Alter der Mutter (Jahre)	Geburtsvorgang	Schwangerschaftswoche + Tage
1	28. 1. 2011	31	spontan	40 + 3
2	4. 3. 2011	25	sectio	34 + 5
3	7. 3. 2011	34	sectio	39 + 2
4	14. 3. 2011	40	sectio	39 + 2
5	16. 3. 2011	26	sectio	37 + 1
Durchschnitt		31,2 \approx 31	sectio	37,8 + 2,6 \approx 38

Tab. 8.2: Zusammensetzung des Earle's Puffers (für 2 l Lösung)

Substanz	Konzentration (g)
NaCl	13
KCl	0,8
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	0,28
NaHCO ₃	4,4
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,4
CaCl ₂ + 2 H ₂ O	0,4

KLINIKUM DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe



Sehr geehrte Frau

Die Schwangerschaft ist eine besondere Zeit im Leben der zukünftiger Eltern - spannend und voller Erwartungen. Sicher haben auch Sie die faszinierende Entwicklung Ihres Kindes vom winzigen Pünktchen im ersten Ultraschallbild bis hin zum "richtigen kleinen Menschen" mit Staunen verfolgt.

In den letzten Wochen und Monaten hat die Plazenta, auch Mutterkuchen genannt, Ihr Kind mit allem versorgt, was es für seine Entwicklung und das Wachstum braucht: Sauerstoff und Nährstoffe, die sich das Baby über die Nabelschnur ständig aus dem mütterlichen Blut holt. Außerdem hält die Plazenta viele Schadstoffe und Krankheitserreger zurück und übernimmt Schlackestoffe aus dem kindlichen Organismus. Darüber hinaus produziert sie Hormone, die für die Schwangerschaft wichtig sind.

Kurz nach der Geburt löst sich die Plazenta normalerweise von selbst von der Gebärmutter und wird zusammen mit den Resten der Nabelschnur ausgestoßen. Sie wird sorgfältig untersucht und auf ihre Vollständigkeit geprüft. Doch was passiert danach? Auch wenn die Plazenta ihre eigentliche Aufgabe damit erfüllt hat kann sie uns bei der Klärung offener Fragen helfen, denn noch nicht alle Geheimnisse dieses sehr komplexen Organs konnten bis heute geklärt werden.

Mit Ihrem Einverständnis möchten wir ihre Plazenta nach der Geburt für wissenschaftliche Untersuchungen verwenden. In unseren Untersuchungen stehen dabei insbesondere immunologische und ernährungsphysiologische Aspekte im Mittelpunkt. Fragen, wie zum Beispiel: Wie werden bestimmte Nährstoffe, die für die Entwicklung des Kindes von besonderer Bedeutung sind, über die Plazenta transportiert? Können auf diesem Weg auch Stoffe, die Allergien auslösen zum Baby im Mutterleib gelangen? Welche Substanzen und Wirkstoffe im mütterlichen Blut werden von der Plazenta zurückgehalten und welche gelangen ungehindert in den kindlichen Kreislauf?

Für die Beantwortung dieser Fragestellungen sind wir auf die Unterstützung durch die Patienten der Universitätsfrauenklinik Jena angewiesen.

Sollten Sie damit einverstanden sein, uns Ihre Plazenta für Forschungszwecke zu überlassen, bitten wir Sie, die angefügte Erklärung zu unterschreiben. Möchten Sie das aber nicht, entstehen Ihnen daraus keine Nachteile. Es steht Ihnen auch jederzeit frei, Ihr Einverständnis zurückzuziehen oder die Studie nicht zu beenden.

Sollten Sie weitere Fragen haben, stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Für Ihre Hilfe bedanken wir uns im Voraus.

Ihr Team des Plazentalabors

KLINIKUM DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe



Einverständniserklärung*

Mit der Untersuchung meiner Plazenta, zu Forschungszwecken bin ich einverstanden.

Jena, den.....

.....

Unterschrift

Verlief die Schwangerschaft problemlos?

ja

nein

Leiden Sie an Diabetes?

Haben Sie während der Schwangerschaft
Medikamente eingenommen?

➤ Wenn ja, welche? _____

Leiden Sie an Allergien?

➤ Wenn ja, auf welche Stoffe reagieren Sie allergisch?

* Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig und es steht Ihnen jederzeit frei, Ihr Einverständnis zurückzuziehen oder die Studie ohne Angabe von Gründen nicht zu beenden.

Abb. 8.1: Aufklärungs- und Einverständniserklärung zur temporären Forschung an der Plazenta

8.2 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. Udo Markert für das Überlassen des Themas und die gute wissenschaftliche Betreuung.

Dipl. biol. Maja Weber gilt mein besonderer Dank. Sie arbeitete mich in die Labormethoden ein, machte mich mit der Handhabung vom Fluoreszenzmikroskop vertraut und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Sie zögerte nie, mich bei Laborprobleme zu unterstützen. Tausend Dank, Maja.

Ich danke den Müttern, die ihr Einverständnis zu den Plazentaversuchen gaben. Mein Dankeschön geht in diesem Zusammenhang auch an die Schwestern, Hebammen und Ärzte/ -innen des Kreißsaales der Universitätsfrauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Für die die uneingeschränkte Unterstützung und positive Atmosphäre bedanke ich mich beim gesamten Team des Plazentalabors, ganz besonders bei:

- Frau Dipl. oec. troph. Uta Enke und Frau Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth, die mir rund um die Plazentaperfusion das nötige Hintergrundwissen und Verständnis vermittelten,
- Dr. rer. nat. Sebastian Hölters für die Hilfe bei mathematisch-physikalischen Vorstellungsproblemen,
- Dr. med. Justine Fitzgerald für die ausdauernden Erklärungen bei Fragen aller Art.

Bei Dr. Sonnemann und seinen MTAs möchte ich mich rechtherzlich für die Bemühungen und die Bereitstellung der beiden Zelllinien bedanken.

Für die Überlassung des Fluoreszenzmikroskops gilt mein Dank auch dem gynäkologischen Molekularbiologielabor der Universitätsfrauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. M. Dürst. Aus diesem Labor war eine wissenschaftliche Mitarbeiterin mit ihrer stets freundlichen und optimistischen Art für mich da und ließ mich im dunklen Labor nicht verzweifeln - danke Claudia (Dr. rer. nat. Claudia Backsch).

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, Freunden sowie Krankenschwestern und -pflegern von der HTC 140, die stets für mich da waren und mich neu motivierten, wenn es im Labor nicht so lief, wie ich es mir vorstellte. Ihr seid die Besten!

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sebastian Schamberger
Geburtsdatum	22.10.1986
Geburtsort	Neuhaus am Rennweg
Wohnhaft in	Zwätzengasse 18, 07743 Jena

Schulausbildung

1993 – 1997	Grundschule „Gerhart Hauptmann“, Schleusingen
1997 – 2006	Hennebergisches Gymnasium „Georg Ernst“, Schleusingen

Studium

10/2007	Aufnahme des Zahnmedizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
8/2008	Vorphysikum
3/2010	Physikum
12/2012	Staatsexamen
1/2013	Approbation als Zahnarzt

Publikation

Schamberger S, Weber M, Backsch C, Sonnemann J, Markert UR. 2013. Establishment of a one-sided ex vivo human placenta perfusion model to assess adhesion and invasion behavior of T cell leukemia cell lines. Leuk Lymphoma [Epub ahead of print].

Auslandsaufenthalte

8/2003 – 7/2004	USA - im Rahmen eines Schüleraustauschprogramms
-----------------	---

Praktische Erfahrungen

10/2006 – 7/2007	Zivildienst im Internat für geistig beeinträchtigte Jugendliche, Henfstädt
2/2009 – 1/2013	studentische Hilfskraft am Universitätsklinikum Jena
seit 2/2013	Weiterbildungsassistent für Kieferorthopädie, Jena

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mir folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil. Udo R. Markert

Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth

Dipl. oec. troph. Uta Enke

Dipl. biol. Maja Weber

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 5. Juli 2013

8.5 Verwendete Geräte und Materialien

Autoklav

KSG-112 KSG-Olching

Bechergläser (400/1000ml) Merck, JENAer Glas

Brutschrank

HERAcell 150i Heraeus Instruments

Deckglas Menzel-Gläser

Eppendorf Reaktionsgefäße
(0,5/1,5/2ml) Sarstedt

Becherglas (100/250ml) Dagra

Einbetttschälchen

Cryomold Sakura

Mikroskop (Auflicht)

Axiovert 25 Zeiss

Mikroskop (Fluoreszenz)

Axioplan 2 Zeiss

Objektträger Menzel-Gläser Superfrost Plus

Perfusionspumpe mit
dazugehörigen Schläuchen Ismatec SA

Pipetten Brand, Greiner

Pipettierhilfe

Pipettus Akku Hirschmann Laborgeräte

Schüttler

Polymax 1040 Heidolph

Trockenschrank

HS-308 Dental- und Laborbau GmbH

Reaktionsgefäße (15/50ml) Greiner

Waage

440-47N Kern

Wasserbaderwärmer

Typ 1003	GFL
Zellkulturflaschen (25/75cm ²)	Greiner
Zählkammer nach Neubauer	Optik Labor

Zentrifugen

Multifuge 1S Centrifuge	Heraeus
Universal 30F	Hettich

8.6 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Zelllinien

Aceton	J. T. Baker
Amoxicillin	Sigma
BSA	MP Biomedicals
CaCl ₂	Merck
CCRF-CEM	Leibniz-Institut DSMZ (ACC 240)
CellTracker (CellTracker™ Green BODIPY®/ CellTracker™ Orange CMTMR)	Invitrogen
CFSE	Invitrogen
Dextran	Serva
D-Glucose	Merck
DMSO	MP Biomedicals
Ethanol	Roth
Formaldehyd 5%	Fischar
FKS	Bio Whittaker
Glycerin	Roth
Heparin	Ratiopharm
Histofluid	Marienfeld
Histoplast-S (Paraffin)	Serva

JURKAT	Leibniz-Institut DMSZ (ACC 282)
KCl	Merck
MgSO ₄	Merk
NaCl	Roth
NaHCO ₃	Roth
Na ₂ HPO ₄	Roth
NaOH	Roth
NCTC 135	SigmaAldrich
Pen/Strep	PAA
PBS Pulver	Biochrom AG
PBS Tabletten	MP
RPMI 1640	PAA
Tissue-Tek (Einbettmedium)	Sakura
Trypanblaulösung	Sigma
Trypsin EDTA	Bio Whittaker
Vectashield Mounting Medium with DAPI/ Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI	Vector
Xylol	BDH Prolabo