

Aus der Abteilung "Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe"
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

**Interleukin 10 produzierende regulatorische B-Zellen haben
einen protektiven Effekt auf die Frühschwangerschaft**

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

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med. (doctor medicinae)

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

Vorgelegt von

Luise Goes geb. Rolle

aus

Bernburg

Magdeburg

2019

Bibliographische Beschreibung

Goes, Luise

Interleukin 10 produzierende regulatorische B-Zellen haben einen protektiven Effekt auf die Frühschwangerschaft

-2019- 78 Bl., 22 Abb., 3 Tab.

Kurzreferat

Schwangerschaft stellt ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Immunzellen dar um die Entwicklung des Fötus als semiallogenes Transplantat zu gewährleisten. Ziel dieser Arbeit war die Rolle Interleukin 10 produzierender regulatorischer B-Zellen in der Frühschwangerschaft des Menschen zu evaluieren um Rückschlüsse auf Schwangerschaftspathologien ziehen zu können. Es konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die Anzahl an CD19⁺CD24^{hi}CD27^{hi}regulatorischen B-Zellen bei normal schwangeren Frauen im 1.Trimester erhöht war und zum 3.Trimester abfiel, im Gegensatz zu Patientinnen, die an einer Fehlgeburt litten, die durchgehend niedrige Anteile an regulatorischen B-Zellen hatten. *In vitro* waren CD19⁺B-Zellen normal schwangerer Frauen in der Lage die TNF α Expression CD4⁺T-Zellen zu reduzieren, womit ein immunsuppressiver Wirkmechanismus der B-Zellen in der Schwangerschaft nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass Serum schwangerer Frauen zu einer Induktion der IL10 Expression CD19⁺B-Zellen führt, sodass lösliche Faktoren wie Hormone möglicherweise die Entwicklung regulatorischer B-Zellen in der Schwangerschaft unterstützen. Insgesamt zeigt sich, dass B-Zellen und ihre regulatorische Unterform am komplexen Zusammenspiel des Immunsystems im Kontext der Schwangerschaft teilhaben und Störungen in diesem System zur Entstehung von Schwangerschaftspathologien beitragen.

Schlüsselwörter: Schwangerschaft, B-Zellen, regulatorische B-Zellen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Schwangerschaft des Menschen	1
1.1.1 Ovulation, Fertilisation und Implantation.....	1
1.1.2 Embryonal- und Fetalperiode	1
1.1.3 Entwicklung, Aufbau und Funktion der Plazenta	2
1.1.4 Der Abort- Eine Komplikation der Schwangerschaft.....	2
1.2 Immunologie der Schwangerschaft	3
1.2.1 Paradoxon der Schwangerschaft	3
1.2.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Schwangerschaft	4
1.2.3 Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Schwangerschaft.....	5
1.2.4 Interleukin 10 und dessen Bedeutung für die Schwangerschaft	7
1.3 B-Zellen und regulatorische B-Zellen	8
1.3.1 Entwicklung und Funktion regulatorischer B-Zellen.....	9
1.3.2 B-Zellen und ihre regulatorische Unterform im Kontext der Schwangerschaft.....	12
1.4 Zielstellung.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Allgemeine Labormaterialien	16
2.1.2 Laborgeräte.....	16
2.1.3 Geräte und Material für die magnetische Zellsortierung	17
2.1.4 Geräte und Material für die Zellkultur	17
2.1.5 Geräte und Material für die Durchflusszytometrie.....	17
2.1.6 Chemische Stoffe, Substanzen und Lösungen.....	17
2.1.7 Biologisch aktive Substanzen.....	18
2.1.8 Antikörper	18
2.1.9 Medien, Lösungen und Pufferlösungen.....	19
2.1.10 Kits.....	20

2.1.11	Material für die Blutentnahme.....	21
2.1.12	Computerprogramme	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Probengewinnung	21
2.2.2	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus menschlichem Blut.....	22
2.2.3	Zellzählung der PBMZ.....	23
2.2.4	Isolierung von CD19 ⁺ B-Zellen und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen mittels MACS [®]	23
2.2.5	Bestimmung des prozentualen Anteiles regulatorischer B-Zellen im Blut schwangerer Frauen	25
2.2.6	<i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der IL10 Produktion von B-Zellen in der Schwangerschaft.....	25
2.2.7	<i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der Zytokinproduktion von T-Helfer Zellen bei Kokultur mit CD19 ⁺ B-Zellen schwangerer Frauen.....	26
2.2.8	<i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der IL10 Expression der CD19 ⁺ B-Zellen bei Stimulation mit Serum schwangerer Frauen	27
2.2.9	Kokultur von CD19 ⁺ B-Zellen mit der Trophoblasten-Zelllinie (SWAN-71)	28
2.2.10	Durchflusszytometrie.....	29
2.2.11	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	31
2.2.12	Statistik	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Untersuchung des prozentualen Anteils regulatorischer B-Zellen während der Schwangerschaft	34
3.1.1	Der prozentuale Anteil der B-Zellen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab.....	34
3.1.2	Der prozentuale Anteil an CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺ regulatorischer B-Zellen ist während der Frühschwangerschaft erhöht	35
3.1.3	Der prozentuale Anteil der CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} regulatorischer B-Zellen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab	36
3.2	Untersuchung regulatorischer B-Zellen <i>in vitro</i>	37

3.2.1	Die Produktion von IL10 in CD19 ⁺ B-Zellen ist in der Schwangerschaft nicht erhöht	37
3.2.2	Einfluss der CD19 ⁺ B-Zellen auf die Zytokinsekretion von CD4 ⁺ T-Zellen während der Frühschwangerschaft	39
3.2.3	Die Kokultur der Trophoblastzelllinie SWAN-71 mit CD19 ⁺ B-Zellen hat keinen Einfluss auf die IL10 Expression der B-Zellen	44
3.2.4	Serum schwangerer Frauen erhöht den Anteil der CD19 ⁺ IL10 ⁺ B-Zellen	45
3.3	Die BAFF-Konzentration im Serum ist während der Schwangerschaft nicht erhöht.	46
4	Diskussion.....	48
4.1	Regulatorische B-Zellen sind in der Frühschwangerschaft des Menschen erhöht	48
4.2	CD19 ⁺ B-Zellen schwangerer Frauen produzieren in der Frühschwangerschaft nicht vermehrt IL10	49
4.3	B-Zellen reduzieren in der Frühschwangerschaft die proinflammatorische Zytokinantwort von T-Helferzellen.....	50
4.4	Lösliche Faktoren im Serum induzieren die IL10 Expression bei B-Zellen in der Frühschwangerschaft	52
4.5	Trophoblastenzellen regulieren die Konversion der CD19 ⁺ Zellen zu regulatorischen B-Zellen	54
4.6	B-Zell aktivierender Faktor (BAFF) beeinflusst nicht den Anteil der regulatorischen B-Zellen in der Schwangerschaft	55
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis	58
	Abbildungsverzeichnis	67
	Tabellenverzeichnis	69
	Danksagung.....	70
	Ehrenerklärung.....	71
	Darstellung des Bildungsweges	72

Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
B10	IL10 produzierende B-Zelle
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor zugehörig zur TNF-Familie (<i>engl. B Cell Activating Factor Belonging to the TNF Family</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. Bovine Serum Albumin</i>)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>engl. Cluster of Differentiation</i>)
CD 40L	Cluster of Differentiation 40 Ligand
CpG	Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorbtiionstest (<i>engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>engl. Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (<i>engl. Fetal Bovine Serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
LH	Luteinisierendes Hormon
Mcpt	Mastzellprotease
min	Minute
ml	Milliliter
MACS	Magnetisch Zellisolierung (<i>engl. Magnetic activated cell sorting</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>engl. phospat buffered saline</i>)
PBMZ	Periphere Blutmonozyten
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
pg	Piktogramm

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>engl. transforming growth factor beta</i>)
TH1	T-Helfer-Zellen Typ 1
TH2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrose Faktor α

1 Einleitung

1.1 Die Schwangerschaft des Menschen

1.1.1 Ovulation, Fertilisation und Implantation

Unter Einfluss der weiblichen Sexualhormone erfolgt bei der geschlechtsreifen Frau während eines Zyklus die Follikelreifung im Ovar. Dabei bilden die ruhenden Oozyten die Primärfollikel. Unter Ausschüttung des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) aus der Hypophyse erfolgt die Reifung der Oozyten zu Sekundärfollikeln, aus deren Pol ein Follikel zum Tertiärfollikel reift. In dem sprungreifen Follikel, auch Graaf Follikel genannt, entwickelt sich die primäre Oozyte mit einem diploiden Chromosomensatz zu der sekundären Oozyte mit einem haploiden Chromosomensatz unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH). Am 14.Tag des Zyklus kommt es nun, ausgelöst durch LH, zur Ovulation und damit Freisetzung der Eizelle. Über den Fimbrientrichter erreicht die Eizelle die Tube, in der es in der Regel bei der Befruchtung zur Vereinigung von Samen- und Eizelle kommt. Nach dem Eisprung entsteht aus der Follikelhöhle das Corpus luteum (Gelbkörper), welches über die Produktion von Progesteron zur Aufrechterhaltung der Frühschwangerschaft beiträgt. Nach Vereinigung der Samen- und Eizelle erfolgt die Fusion zu der Zygote mit einem diploiden Chromosomensatz. Während des Transportes der Zygote durch die Tube bis zum Uterus entwickelt sich diese über Zellteilung zur Blastozyste, bestehend aus Embryoblast, dem späteren Embryonalkörper sowie Trophoblast, aus dem sich die Plazenta entwickelt. Zwischen dem 5. und 6. Tag nach der Befruchtung legt sich die Blastozyste am Endometrium des Uterus an und der Trophoblast differenziert sich zum Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten. Die Implantation erfolgt daraufhin zwischen dem 7.-12. Tag über enzymatische Vorgänge in die Dezidua (Funktionalis der Uterusschleimhaut). Die Implantation ist am 12.Tag nach der Befruchtung abgeschlossen [Stauber und Weyerstahl 2005].

1.1.2 Embryonal- und Fetalperiode

Der Embryoblast wandelt sich während der Implantation über eine zweiblättrige Keimscheibe bestehend aus Endoderm und Ektoderm nach Abschluss der Implantation zu einer dreiblättrigen Keimscheibe bestehend aus Endoderm, Ektoderm und Mesoderm um. In der sich anschließenden Zeit erfolgen die Morphogenese, also die Formgebung des Embryos, sowie die Organogenese (Organbildung). Am Ende der 9.Schwangerschaftswoche (SSW) sind alle Organe vollständig angelegt und man spricht nun vom Fetus [Moore 2013]. Mit der 12.Woche ist das erste Trimester beendet. Im sich anschließenden 2.Trimester (13. SSW bis 26.SSW) und 3.Trimester

(27.SSW bis 38.SSW) findet die Organreifung, sowie die Längen- und Gewichtszunahme des Fetus statt. Durchschnittlich nach 38 Wochen post conceptionem und 267 Tagen wird die Schwangerschaft durch die Geburt des Kindes beendet.

1.1.3 Entwicklung, Aufbau und Funktion der Plazenta

Die äußere Zellschicht der Blastozyste, der sogenannte Trophoblast, differenziert sich in zwei Zellschichten, den Zytotrophoblast und Synzytotrophoblast. Letzterer wächst in die Gebärmutterschleimhaut ein und bildet die Kontaktfläche zur Dezidua basalis. Ab dem 9. Tag bilden sich Lakunen, welche durch enzymatische Prozesse Kontakt zu den Spiralarterien erhalten und mit mütterlichem Blut gefüllt werden. Durch Proliferation des Zytotrophoblasten entstehen am 13. Tag die Chorionzotten, welche sich über Sekundär- und Tertiärzotten zum fetalen Plazentaanteil entwickeln und in den intervillösen Raum hineinragen und damit die Kontakt- und Austauschfläche zum mütterlichen Blut darstellen. Ab dem 21. Tag beginnt in den Zotten die embryonale Blutzirkulation. Ab der 14. SSW hat die Plazenta ihre endgültige Struktur erreicht.

Im Rahmen des Plazentakreislaufes tritt das mütterliche Blut aus der Dezidua basalis über die Spiralarterien in den intervillösen Raum der Plazenta. Zwei Umbilikalarterien bringen sauerstoffarmes und nährstoffarmes Blut vom Fetus in die Plazenta. Über das fein ausgeprägte Kapillarnetz kommt es zum indirekten Kontakt und damit Gas- und Nährstoffaustausch. Über die Vena umbilicalis erfolgt der Abtransport des sauerstoffreichen Blutes in den fetalen Kreislauf. Neben der Austauschfunktion für Blutgase, Nährstoffe und Abbauprodukte hat die Plazenta die Aufgabe der Hormonproduktion. Primär wird durch den Synzytiotrophoblasten das humane Choriongonadotropin (hCG) gebildet, welches die Auflösung des Corpus luteum verhindert. Die im Gelbkörper gebildeten Gestagene und Östrogene erhalten die Dezidua basalis bis eine ausreichende Progesteronsekretion über den Trophoblasten erfolgt. Daneben produziert die Plazenta eine Vielzahl an weiteren Botenstoffen wie Östrogene, humanes Plazentalaktogen sowie humanes Chorionthyreotropin.

Dieses feto-materno-plazentare System besteht aus hochkomplexen Bausteinen, die dem Erhalt der Schwangerschaft und der Entwicklung des Fetus dienen. Als feto-maternale Grenzfläche besteht auch der Raum für immunologische Prozesse, die in den weiteren Abschnitten näher beleuchtet werden [Huppertz und Schleußner 2018].

1.1.4 Der Abort- Eine Komplikation der Schwangerschaft

Der Abort wird als frühzeitige, nicht artifiziiell herbeigeführte Beendigung der Schwangerschaft bei nicht erhaltender Lebensfähigkeit des Fetus definiert. Als lebensfähig wird ein Fetus bei mehr als 500g Geburtsgewicht angesehen [Schneider et

al. 2011]. Dabei unterteilt sich die Definition der Fehlgeburt nach frühen Schwangerschaftsverlust bis zur 12.SSW und späten Schwangerschaftsverlust (> 12.SSW) [Farquharson et al. 2005]. Die frühe Fehlgeburt kann wiederum eingeteilt werden in einen Verlust während der Implantation, wobei ein Anstieg des hCG ausbleibt, sowie in einen präembryogenen Verlust (kein Embryo im Ultraschall nachweisbar) und embryogenen Verlust (keine Herzaktivität bei einem Embryo im Ultraschall) [Farquharson et al. 2005; Silver et al. 2011]. Angaben über Häufigkeit des Auftretens eines Abortes variieren abhängig der Studienlage [Miller et al. 1980; Edmonds et al. 1982; Wilcox et al. 1988]. Ungefähr 13,5% der Schwangerschaften enden nach der Implantation in einer Fehlgeburt. Dieser Wert variiert jedoch stark in Abhängigkeit vom Alter der schwangeren Frau [Nybo Andersen et al. 2000]. Auch steigt der Anteil weiter an, wenn man die Zahl der nicht-symptomatischen Aborte vor der Implantation hinzurechnet. In dieser Zeit weiß die Frau oft nicht, dass sie schwanger ist, sodass ein Abort als Zwischenblutung verkannt wird. Bezieht man diese Daten mit ein, so enden 31-62% aller Schwangerschaften in einer Fehlgeburt [Miller et al. 1980; Edmonds et al. 1982; Wilcox et al. 1988].

Die Ursachen für einen Spontanabort sind vielfältig, wobei am häufigsten chromosomale Veränderungen des Embryos eine Rolle spielen [Philipp et al. 2003; Eiben et al. 1990]. Eine Vielzahl an weiteren Risikofaktoren sind beschrieben worden, darunter Infektionen, uterine Malformation, Thrombophilie, Genussgifte wie Koffein und Alkohol, sowie endokrinologische Veränderungen (Diabetes mellitus, Hypo- und Hyperthyreose) [Hay et al. 1994; Guerra et al. 2006; Chan et al. 2011; Rey et al. 2003; Rasch 2003; Mills et al. 1988; Chen und Hu 2011]. Gerade aber bei wiederholt auftretenden Aborten besteht der Verdacht, dass immunologische Ursachen eine tragende Rolle spielen.

1.2 Immunologie der Schwangerschaft

1.2.1 Paradoxon der Schwangerschaft

Bei der Befruchtung der Eizelle mit dem väterlichen Spermium entsteht ein Embryo, der jeweils zur Hälfte aus DNA-Anteilen des Vaters und der Mutter besteht. Damit stellt er für den mütterlichen Organismus ein semiallogenes Transplantat dar. Daher wurde durch Sir Peter Medawar 1953 die Frage aufgeworfen, warum der Embryo trotz dieser fremden Antigene nicht vom Immunsystem der Mutter abgestoßen wird [Medawar 1953]. Schon 1953 stellte Medawar Hypothesen für die Beantwortung dieser Fragen auf. Insbesondere vermutete er eine Suppression des mütterlichen Immunsystems als Ursache der Akzeptanz des Ungeborenen. Zwar wurden diese Postulate im Laufe des Fortschrittes bei der Erforschung der Immunologie der Schwangerschaft teils revidiert,

doch setzte Medawar mit seiner These den Anstoß für die Entwicklung des Forschungsbereiches der Schwangerschaftsimmunologie. Es hat sich das Bewusstsein entwickeln können, dass Immunzellen in der Schwangerschaft nicht auf den „fremden“ Fetus reagieren, sondern ihr komplexes und sensibles Zusammenspiel einzig dem Erhalt der Schwangerschaft dient.

1.2.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Schwangerschaft

Zu Beginn der Schwangerschaft findet eine Expansion von Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen), dendritischen Zellen und Makrophagen in der mütterlichen Dezidua statt. Über die Durchblutung der Plazenta kommen diese Immunzellen in Kontakt mit fetalen Trophoblasten und werden aktiviert.

NK-Zellen, deren eigentliche Aufgabe in der Abwehr virusinfizierter Zellen sowie fremder Zellen und Tumorzellen besteht, differenzieren sich während der Schwangerschaft zu einem speziellen Subtypen, den uterinen NK-Zellen. Sie machen 70% der Leukozyten der Dezidua aus [Moffett-King 2002]. Über die Produktion von Zytokinen und angiogenese-fördernden Stoffen, welche die Rekrutierung der fetalen Trophoblastzellen zur mütterlichen Dezidua unterstützen, beteiligen diese Zellen sich maßgeblich an der Entwicklung der fetal-mütterlichen Grenzfläche [Cooper et al. 2001; Kalkunte et al. 2009; Koopman et al. 2003; Hanna et al. 2006]. Des Weiteren sind uterine NK-Zellen in der Lage die vaskuläre Umwandlung positiv zu beeinflussen, wodurch die Durchblutung und damit die Versorgung des Fetus mit Sauerstoff und Nährstoffen verbessert wird [Fraser et al. 2012].

Neben NK-Zellen nehmen auch Mastzellen eine bedeutende Rolle bei der Implantation und Entwicklung der Plazenta ein. Sie sind im Uterus schwangerer Frauen nachweisbar [Menzies et al. 2012] und ihr Fehlen führt im Mausmodell zu einer gestörten Implantation der Embryos [Woidacki et al. 2013b]. Zusätzlich zeigen Mastzellen einen positiven Effekt auf die Umwandlung der Spiralarterien durch Sekretion der proapoptotisch wirksamen Chymase Mcpt5 [Meyer et al. 2017]. Andererseits scheint eine starke Erhöhung der Mastzellen bei fortschreitender Schwangerschaft über die Ausschüttung von Histamin die Kontraktibilität des Uterus und damit die Gefahr der Frühgeburt zu erhöhen [Woidacki et al. 2013a].

Eine weitere Komponente des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen und ihre Vorläuferzellen (Monozyten). Sie phagozytieren für den Organismus fremde Stoffe, die sie dann als Antigene wiederum dem adaptiven Immunsystem präsentieren. Während der frühen Schwangerschaft kommt es zur Aktivierung von Monozyten, wahrscheinlich durch sekretierte Zytokine der Trophoblastzellen [Aldo et al. 2014]. Diese Monozyten scheinen wiederum in der Lage zu sein vermehrt Zytokine zu sekretieren, die ein proinflammatorisches Milieu für die Einnistung des Trophoblasten

unterstützten [Sacks et al. 2003]. Makrophagen hingegen scheinen an der Umwandlung der Spiralarterien, der Umwandlung der muskulären Arterien in venenähnliche Gefäße, beteiligt zu sein [Faas et al. 2014]. Makrophagen sind aber auch in der Lage eine Vielzahl an Zytokinen zu produzieren, welche die Implantation der Blastozyste und die Entwicklung der Plazenta unterstützen [Renaud und Graham 2008].

Dendritische Zellen sind spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen, die in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren und ihre Differenzierung zu einem T-Helfer 1 (TH 1) oder T-Helfer 2 (TH 2) Phänotyp zu induzieren. Während der Schwangerschaft scheinen sie vorrangig den TH 2 Phänotyp der CD4⁺T-Zellen zu induzieren [Miyazaki et al. 2003]. Weiterhin konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass das Fehlen von dendritischen Zellen zu einer mangelhaften Implantation der Blastozyste führt [Plaks et al. 2008]. Auch gibt es Hinweise, dass bei trächtigen Mäusen die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und uterinen NK-Zellen bedeutend für die Proliferation der Uteruszellen ist [Blois et al. 2008]. Unreife dendritische Zellen induzieren eine verstärkte Differenzierung in regulatorische T-Zellen, welche einen protektiven Effekt auf den Schwangerschaftserhalt haben [Schumacher et al. 2012].

Es zeigt sich daher, dass die Prozesse der Frühschwangerschaft mit Implantation der Blastozyste, Dezidualisierung und Entwicklung der Plazenta ein sensibles Zusammenspiel der mütterlichen Immunzellen aber auch der Trophoblastenzellen darstellt. So ist es nicht überraschend, dass Störungen in diesem komplexen System zum Schwangerschaftsverlust führen können.

1.2.3 Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Schwangerschaft

Das adaptive Immunsystem reagiert auf Fremdstoffe in Form einer zielgerichteten, antigenspezifischen Immunantwort. Diese kann in zellulärer, T-Zell vermittelter Form oder humoraler, B-Zell vermittelter Form erfolgen.

T-Lymphozyten unterteilen sich an Hand ihres Oberflächenmarkers in CD4⁺T-Helfer-Zellen und zytotoxische CD8⁺T-Zellen. Erstere wirken über die Sekretion von Zytokinen einerseits stimulierend auf weitere Immunzellen andererseits beeinflussen sie die humorale Immunantwort der B-Lymphozyten. Nach ihrem Zytokinprofil können sie sich in T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (TH1) oder Typ 2 (TH2) differenzieren. TH1-T-Zellen aktivieren über die Sekretion von Interferon γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) Makrophagen und NK-Zellen, wogegen TH2-T-Zellen über Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL10) zur B-Zell Aktivierung und Reifung beitragen [Kaufmann 2014]. Innerhalb der CD4⁺Population existieren zusätzlich regulatorische T-Zellen mit immunsuppressiver Funktion.

Es konnte gezeigt werden, dass das adaptive Immunsystem bereits während des Geschlechtsverkehrs auf die bevorstehende Entstehung des Embryos vorbereitet wird. So beinhaltet die Samenflüssigkeit zahlreiche väterliche Antigene, die nicht nur zur Aktivierung antigen-präsentierender Zellen führen, sondern auch direkt die Expansion der mütterlichen regulatorischen T-Zell-Population stimuliert [Zenclussen et al. 2010]. Regulatorische T-Zellen wiederum nehmen eine führende Rolle beim Erhalt der Schwangerschaft ein. Sie sind in der Lage die Zytokinproduktion $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu minimieren, die Antikörperproduktion von B-Zellen zu dämpfen und die Expansion zytotoxischer NK-Zellen zu hemmen [Lim et al. 2005; Mempel et al. 2006; Ghiringhelli et al. 2005]. Studien konnten zeigen, dass regulatorische T-Zellen besonders für die vulnerable Frühphase der Schwangerschaft, insbesondere für die Implantation und Toleranzentwicklung gegenüber dem Fetus, von Bedeutung sind. So führt das Fehlen von regulatorischen T-Zellen vor der Verpaarung im Mausmodell zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokinantwort, einhergehend mit einer Erhöhung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Dadurch konnte eine deutliche Entzündung im Uterus mit einhergehender Fibrose und damit Verminderung der Implantationsrate nachgewiesen werden [Teles et al. 2013]. Während der menschlichen Schwangerschaft ließen sich während des 1. und 2. Trimesters eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen sowohl in der Dezipua als auch im peripheren Blut nachweisen. Im Falle eines Spontanabortes waren diese Anteile deutlich erniedrigt [Sasaki et al. 2004; Somerset et al. 2004]. Zusätzlich lassen sich bei Frauen mit unerklärter Sterilität erniedrigte endometriale Foxp3-Werte, welcher als Stimulator für die Entwicklung regulatorischer T-Zellen gilt, nachweisen [Jasper et al. 2006]. So scheinen die regulatorischen T-Zellen einen weiteren wichtigen Anteil an dem immunologischen Gleichgewicht, der zur Entwicklung eines gesunden Fötus führt, zu haben.

Für eine gesunde Schwangerschaft ist jedoch auch ein ausgeglichenes Zytokinprofil notwendig, welches durch die TH1 und TH2 Zytokinantwort der $CD4^+$ T-Zellen geprägt wird. Schon früh wurde von Wegmann und Kollegen die Hypothese aufgestellt, dass eine erfolgreiche Schwangerschaft an ein TH2 geprägtes antiinflammatorisches Zytokinprofil (IL10, IL-4) gebunden ist und eine proinflammatorische TH1 (IFN- γ , TNF- α) Immunantwort eher schädlich sei [Wegmann et al. 1993]. Dieses starre Postulat hielt sich über lange Zeit aufrecht. Neuere Studien zeigen jedoch eine Kehrtwende. So sind auch IL10 und IL-4 defiziente Mäuse in der Lage erfolgreich Schwangerschaften auszutragen [Svensson et al. 2001]. Eher ist es so zu sehen, dass im Laufe der Schwangerschaft jeweils ein Zytokinprofil überwiegt. So ist die Frühphase der Schwangerschaft geprägt von einem proinflammatorischen Milieu. Die Implantation der

Blastozyste und die damit entstandenen Wundfläche erfordert Zellumbau, Einwanderung von Zellen, Reparatur der Wundfläche und Abtragung abgestorbener Zellen. Durch ein entzündliches Milieu und der damit verbundenen Einwanderung von Immunzellen werden diese Prozesse unterstützt. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft ist ein antiinflammatorisches Zytokinprofil vorherrschend. In dieser Zeit befinden sich Mutter und Kind in einer Art Gleichgewicht. In der letzten Phase der Schwangerschaft wird der Uterus durch ein proinflammatorisches Milieu auf die bevorstehende Geburt des Kindes vorbereitet. Die hier vorherrschende TH1 geprägte Immunantwort unterstützt die Kontraktion des Uterus und die Ausstoßung der Plazenta [Mor und Cardenas 2010]. Letztlich ist für den Schwangerschaftserfolg ein ausgewogenes Verhältnis der einzelnen Zytokine notwendig.

1.2.4 Interleukin 10 und dessen Bedeutung für die Schwangerschaft

IL10 ist ein homodimerisches Zytokin, welches in der Lage ist die Aktivität proinflammatorischer TH1-Zellen zu inhibieren [Fiorentino et al. 1989]. Zahlreiche Zellen des Immunsystems sind in der Lage dieses Interleukin zu sekretieren, darunter CD4⁺T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Monozyten [Moore et al. 1993].

Anfänglich erfolgte die Erforschung der Rolle des IL10 während der Schwangerschaft am Mausmodell. Es konnte in erhöhten Mengen in der Dezidua schwangerer Mäuse nachgewiesen werden [Lin et al. 1993]. Weiterhin führte die Injektion von rekombinanten IL10 bei schwangeren Mäusen, die unter Fehlgeburten litten, zu einer Verringerung der Fehlgeburtsrate [Chaouat et al. 1995]. Interessanterweise ist IL10 nicht zwingend notwendig für eine erfolgreiche Schwangerschaft. So sind IL10 defiziente Mäuse in der Lage, erfolgreich eine Schwangerschaft auszutragen, wenn sie in einer keimarmen Umgebung aufgezogen werden. Sind diese Mäuse während der Schwangerschaft aber Pathogenen ausgesetzt, die eine Infektion auslösen können, so steigt die Rate an Aborten deutlich an im Vergleich zu Wild typ-Mäusen [Murphy et al. 2005]. So scheint es, dass IL10 eine protektive Wirkung auf den Schwangerschaftserhalt bei Exposition mit Pathogenen hat. Die Sekretion von IL10 ist zudem von einem komplexen Kommunikationsnetzwerk mit anderen Zellen abhängig. So konnte Blois und Kollegen zeigen, dass dendritische Zellen kultiviert mit marinen Trophoblasten die Proliferation uteriner NK-Zellen und deren Sekretion von IL10 stimulieren [Blois et al. 2008].

Auch in der menschlichen Schwangerschaft gibt es deutliche Hinweise auf den Einfluss des IL10. So ist die Konzentration dieses Zytokins in Plazentagewebe des 1. und 2. Trimesters nachweislich höher als im 3. Trimester [Hanna et al. 2000]. Dieses Ergebnis unterstützt wiederum die These, dass für die Einleitung der Geburt eine proinflammatorische Umgebung notwendig ist. Weiterhin konnte festgestellt werden,

dass Plazenta und Dezidua im Rahmen einer Fehlgeburt weniger IL10 enthalten als Plazenten von Schwangerschaftsabbrüchen [Plevyak et al. 2002]. Periphere mononukleäre Zellen von Frauen, die wiederholt Fehlgeburten hatten, zeigten nicht nur erhöhte TNF- α -Level sondern auch eine verminderte Expression von IL10 [Hill et al. 1995]. So ist es möglich, dass eine verminderte Produktion von IL10 in Verbindung mit Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine zu einem vorzeitigen Schwangerschaftsverlust beiträgt. Offen ist jedoch, wie IL10 im Detail den Schwangerschaftsverlauf beeinflusst. Ein Teil dieses Puzzles scheint der Einfluss von IL10 auf das MHC Typ 1 Molekül HLA-G zu sein. HLA-G wird durch Trophoblasten exprimiert und wirkt inhibierend auf zytotoxische NK-Zellen [Poehlmann et al. 2006]. IL10 wiederum induziert die HLA-G Expression der Trophoblasten [Moreau et al. 1999] und unterstützt damit möglicherweise den Erhalt der Schwangerschaft.

Zusammenfassend betrachtet scheint Interleukin 10 ein Schlüsselmolekül im sensiblen Zusammenspiel der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort während der Schwangerschaft zu sein. Möglicherweise birgt dies die Grundlage für eine zielgerichtete Therapie bei schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen.

1.3 B-Zellen und regulatorische B-Zellen

B-Lymphozyten sind eine Zellpopulation des adaptiven Immunsystems, welche über die Expression verschiedener Immunglobulin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche in der Lage sind Antigene zu erkennen und spezifische Antikörper zu produzieren. 5-15% der Lymphozyten im Blut stellen B-Lymphozyten dar. Sie entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Während des Differenzierungsprozess der B-Zell-Vorläufer-Zelle erfolgt durch somatische Rekombination ein Rearrangement des Immunglobulin-Gen-Ortes, welches für jede entstehende B-Zelle zufällig stattfindet. Durch die damit entstehende Vielfalt an Immunglobulinrezeptoren sind B-Zellen in der Lage theoretisch mehr als 5×10^{13} verschiedene Antigene zu erkennen. Die unreifen B-Zellen wandern vom Knochenmark zur Milz, wo sie sich weiter differenzieren. Die reifen B-Zellen lassen sich in verschiedene Untergruppen aufteilen: B-1-B-Zellen, B-2-B-Zellen Marginalzonen-B-Zellen, sowie folliculäre B-Zellen. Letztere differenzieren wiederum nach Aktivierung zu Plasmazellen. Ihre Funktion ist komplex. Neben der Produktion antigenspezifischer Antikörper dienen sie der Kostimulation und Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen, haben Einfluss auf die Entwicklung dendritischer Zellen, und sind in der Lage über Zytokinsekretion das Immunsystem auf verschiedenen Ebenen zu beeinflussen [LeBien und Tedder 2008]. Zusätzlich wurde in den vergangenen Jahren ein weiterer Typ der B-Zellen bekannt, die regulatorischen B-Zellen. Sie sind in der Lage über die Produktion von IL10 in vielfältiger Weise auf das Immunsystems einzuwirken und sind Schwerpunkt der derzeitigen Forschung.

1.3.1 Entwicklung und Funktion regulatorischer B-Zellen

Bereits in den 1970er Jahren gab es erste Hinweise auf einen Subtyp der B-Zellen mit immunsuppressiver Funktion. Doch erst 30 Jahre später wurde der Begriff der regulatorischen B-Zelle durch Mizoguchi und Kollegen geprägt. Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass B-Zellen im Mausmodell für chronische Kolitis in der Lage sind antikörperunabhängig immunsuppressiv zu wirken und damit das Krankheitsbild zu verbessern [Mizoguchi et al. 2000].

Regulatorische B-Zellen charakterisieren sich über ihre Eigenschaft IL10 zu produzieren. Zahlreiche Studien in Mausmodellen konnten die Entstehung und Aufgaben von regulatorischen B-Zellen eingehender beleuchten [Fillatreau et al. 2002; Matsushita et al. 2008; Mizoguchi et al. 2000]. Für die Entstehung und Aktivierung IL10 produzierender regulatorischer B-Zellen ist wahrscheinlich eine inflammatorische Umgebung notwendig. So kann bei B-Zellen, isoliert aus der Milz von Wildtypmäusen, kaum IL10 Produktion nachgewiesen werden. Werden diese B-Zellen jedoch in B-Zell defiziente Mäuse transferiert, die an intestinaler Entzündung leiden, so produzieren sie IL10. Bei B-Zell defizienten Mäusen ohne Entzündung steigt der IL10 Gehalt dagegen nicht an [Mizoguchi et al. 2002]. Es besteht die Hypothese, dass abhängig von der Entzündung verschiedene Mechanismen der Aktivierung der B-Zellen existieren. Einerseits können B-Zellen zu regulatorische B-Zellen durch die Bindung eines Selbst-Antigens an den B-Zell-Rezeptor konvertieren oder durch CD40/CD40L Interaktion [Fillatreau et al. 2002; Mauri et al. 2003]. CD40L wird von T-Helferzellen exprimiert und führt über die Bindung an CD40 auf der B-Zell-Oberfläche zu deren Reifung. Ein weiterer Aktivierungsweg für regulatorische B-Zellen liegt in der Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) und CpG über den Toll-like-Rezeptor-Signalweg [Lenert et al. 2005]. LPS befindet sich in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, und wird im Rahmen einer Infektion an Toll-like Rezeptor 4 gebunden, was wiederum eine Signalkaskade mit Aktivierung des Immunsystems auslöst. CpG ist Teil des Genoms von Bakterien als auch DNA- tragender Viren und wird durch den Toll-like Rezeptoren 9, exprimiert von Zellen des angeborenen Immunsystems, gebunden. Dadurch wird eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit proinflammatorischer Zytokinantwort auslöst. Möglich ist auch die Existenz eines angeborenen regulatorischen B-Zell-Typs, der sich aus den mesenterischen Lymphknoten entwickelt [Wei et al. 2005]. (vgl. Abb. 1)

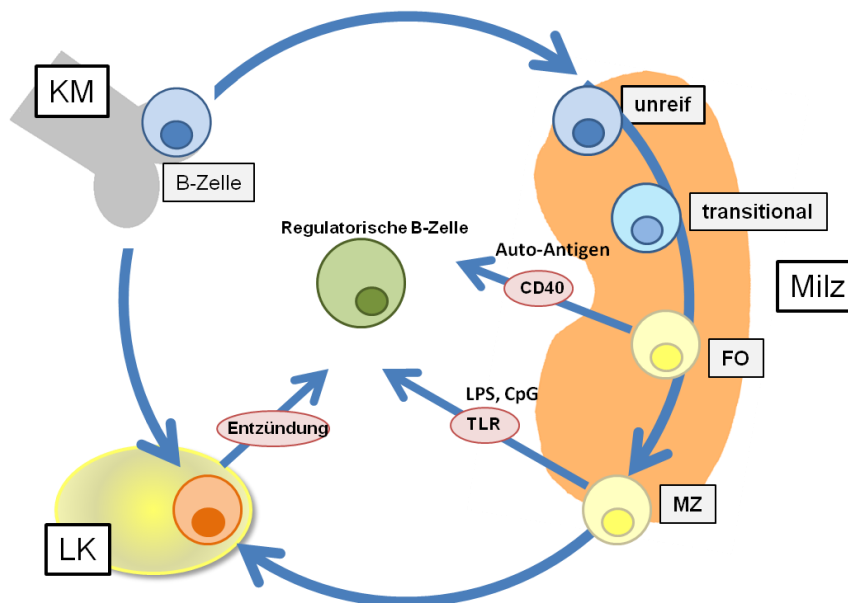


Abbildung 1: Darstellung des möglichen Entwicklungsweges einer regulatorischen B-Zelle. Möglich ist die Entstehung einer regulatorischen B-Zelle über Stimulation von reifen folliculären B-Zellen (FO) über CD40-Stimulationsweg oder Bindung eines Auto-Antigens an den B-Zell-Rezeptor. Weiterhin ist die Entwicklung regulatorischer B-Zellen über Stimulation reifer Marginal-Zonen-B-Zellen (MZ) durch Toll-like-Rezeptor Signalweg (TLR) und Stimulation mit LPS/CpG oder im Rahmen einer Entzündung denkbar. (KM=Knochenmark, LK=Lymphknoten)

Neben ihrer Entstehung wurde auch die Funktion von IL10-produzierenden B-Zellen (B10) im Mausmodell untersucht. B10-Zellen sind in der Lage sowohl die Entstehung von Arthritis im Mausmodell zu verhindern als auch bestehende Symptome der Arthritis zu verbessern, einhergehend mit einer Suppression der TH1 Zytokinantwort [Mauri et al. 2003]. Auch in der Karzinomentstehung scheinen regulatorische B-Zellen eine Rolle zu spielen. B-Zellen werden durch CD40L, welches auf Karzinomzellen exprimiert wird, aktiviert und produzieren IL10. Dadurch wird die IFN γ Sekretion wiederum minimiert, was einen hemmenden Einfluss auf die natürliche Krebszellelimination durch NK- und zytotoxische T-Zellen hat [Inoue et al. 2006]. Diese Beispiele sind nur ein kleiner Auszug aus den multiplen Funktionen regulatorischer B-Zellen in Mäusen. (vgl. Abb.2) Allerdings konnte bisher kein einheitlicher Marker für regulatorische B-Zellen gefunden werden, sodass sie bisher nach ihrer Funktion IL10 zu produzieren definiert werden. Da diese Funktion abhängig von dem vorherrschenden Milieu ist, sind *in vivo* Studien schwierig.

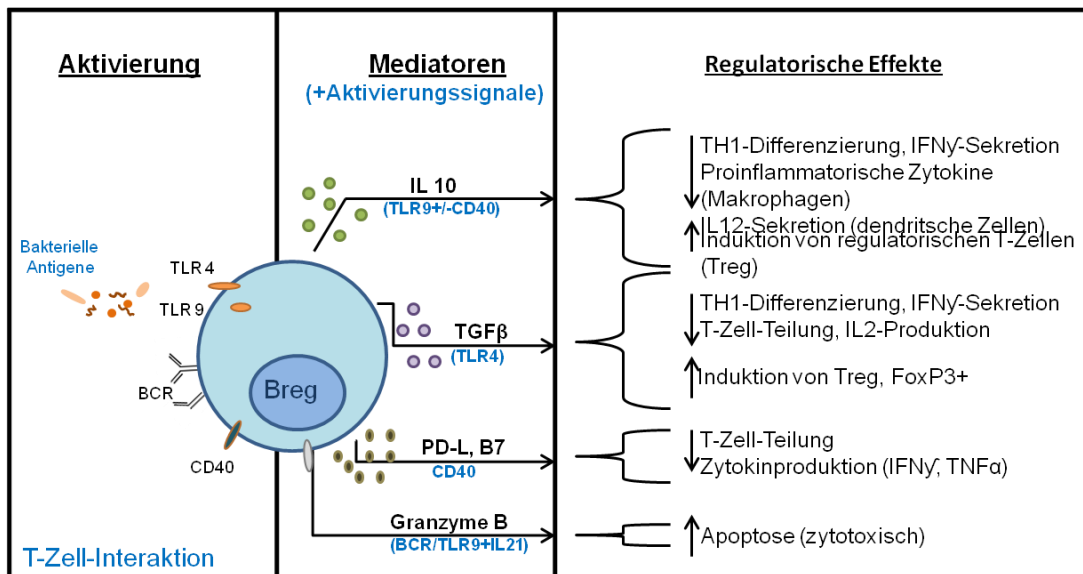


Abbildung 2: Übersicht über Wirkmechanismen regulatorischer B-Zellen im Mausmodell (modifiziert nach Tretter und Kollegen [Tretter und Lorenz 2010])

Dabei stellt sich die Frage in wie weit diese Charakteristiken auch auf menschliche B10 Zellen zu treffen.

IL10 produzierende regulatorische B-Zellen sind im menschlichen Blut nachweisbar, weisen aber keinen einheitlichen Phänotyp auf. Mauri und Kollegen konnten 2009 regulatorische B-Zellen vom CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Phänotyp nachweisen. Regulatorische B-Zellen mit diesem Phänotypen sind in der Lage, die TNFα und IFNγ Sekretion von CD4⁺T-Zellen durch Expression von IL10 zu supprimieren. Regulatorische B-Zellen von Patienten, die an systemischen Lupus erythematodes erkrankten, waren nicht in der Lage diese Zytokindifferenzierung der T-Zellen zu hemmen [Blair et al. 2010]. Die Arbeitsgruppe um Tedder isolierte 2010 regulatorische B-Zellen mit einem weiteren Phänotypen. Diese CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Zellen inhibieren durch die Sekretion von IL10 die TNFα Expression von Monozyten und sind damit in der Lage auch das angeborene Immunsystem zu beeinflussen. Weiterhin konnten sie zeigen, dass sich B10-Vorläuferzellen durch Stimulation *in vitro* zu reifen IL10 sekretierenden regulatorischen B-Zellen differenzieren. Dabei erwies sich eine duale Stimulation mit CD40L und CpG am potentesten [Iwata et al. 2011]. Abweichend davon konnten jedoch weitere Arbeitsgruppen zeigen, dass auch eine B-Zell-Rezeptor-Stimulation gemeinsam mit einer TLR-Stimulation potente Signale für die Reifung von IL10 produzierenden B-Zellen darstellen [Bouaziz et al. 2010], sodass der Weg der Aktivierung der regulatorischen B-Zellen weiterhin offen bleibt. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe um Tedder darlegen, dass der Anteil der B10 und B10-Vorläuferzellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen signifikant erhöht ist,

möglicherweise auf Grund des vorherrschenden inflammatorischen Milieus und damit einhergehender Aktivierung [Iwata et al. 2011].

Insgesamt zeigt sich, dass regulatorische B-Zellen inflammatorische Immunprozesse sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems hemmen.

1.3.2 B-Zellen und ihre regulatorische Unterform im Kontext der Schwangerschaft

Zu Beginn der Erforschung der Immunologie der Schwangerschaft konnte kein erhöhter Anteil der B-Lymphozyten im Blut und in der Plazenta der schwangeren Frau nachgewiesen werden [Birkeland und Kristoffersen 1979], sodass der Fokus der Forschung auf andere Immunzellen gelegt wurde. Lediglich das Interesse an der Existenz protektiver Antikörper führte in diesem Bereich zu weiteren Untersuchungen. In den 1970er Jahren konnten antipaternale Antikörper im Serum schwangerer Frauen nachgewiesen werden [Tongio et al. 1972]. Taylor und Hancock zeigten 1975, dass mütterliche Lymphozyten *in vitro* einen zytotoxischen Effekt auf Trophoblastenzellen haben. Kultivierte man diese Lymphozyten und Trophoblasten mit mütterlichem Serum, so war dieser Effekt reversibel. Die Entfernung von IgG aus dem mütterlichen Serum führte im gleichen Versuchsaufbau wiederum zum Absterben der Trophoblasten [Taylor und Hancock 1975], sodass der Nachweis der Existenz antipaternaler Antikörper, welche den Schwangerschaftserhalt unterstützen, damit erbracht war. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass schwangere Frauen erhöhte Anteile an asymmetrischen Antikörpern aufwiesen. Diese Sonderform der Antikörper sind in der Lage spezifische Antigene mit hoher Affinität zu binden, können aber keine Immunreaktion auslösen und haben damit lediglich protektiven Charakter. Frauen mit wiederholten Aborten zeigten jedoch erniedrigte Level dieser asymmetrischen Antikörper, sodass auch diese Antikörper im Erhalt der Schwangerschaft eine Rolle spielen [Malan Borel et al. 1991; Zenclussen et al. 2001].

Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals einen Einblick in die B-Zell-Entwicklung und deren Adaptation während der Schwangerschaft gewinnen. Sie zeigten im Mausmodell, dass der Anteil der Vorläufer-B-Zellen und unreifen Zellen im Knochenmarkt während der Schwangerschaft abnimmt. Dies konnte schon 1993 von Medina und Kollegen gezeigt werden [Medina und Kincade 1994]. Möglicherweise dient dies als Anpassungsmechanismus zur Reduktion des Auftretens autoreaktiver B-Zellen gegen fetale Strukturen. Dagegen steigt der Anteil reifer B-Zellen signifikant an, insbesondere der Anteil der Marginalzonen-B-Zellen in der Milz, was als Kompensation gegenüber der reduzierten Lymphopoese angesehen werden kann. Interessanterweise zeigen Lymphknoten im Abflussgebiet des Uterus erhöhte Anteile sowohl reifer als auch unreifer B-Lymphozyten [Muzzio et al. 2014a]. Das zeigt, dass die B-Zell-

Entwicklung sich an die Bedingungen der Schwangerschaft adaptiert, einhergehend mit einer Reduktion der Lymphopoese, was möglicherweise die erhöhte Infektanfälligkeit während der Schwangerschaft erklärt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Marginalzonen-B-Lymphozyten in Mäusen mit erhöhter Fehlgeburtsrate im Vergleich zu normal trächtigen Mäusen nicht erhöht sind. Marginalzonen-B-Lymphozyten werden durch Produktion natürlicher Antikörper charakterisiert, welche einen primären Abwehrmechanismus gegenüber pathogenen Keimen darstellt und hauptsächlich aus IgM-Antikörpern bestehen [Schwartz-Albiez et al. 2009]. Korrelierend dazu zeigten Muzzio und Kollegen, dass sowohl der Anteil IgM-Antikörper als auch der Anteil der Marginalzonen-B-Lymphozyten bei trächtigen Mäusen erhöht sind [Muzzio et al. 2016]. Damit besteht trotz vorherrschender B-Zellen-Erniedrigung ein weiterer Schutz gegen eine Infektion des mütterlichen Organismus.

Besonderes Augenmerk bei der Erforschung der B-Zellen in der Schwangerschaft wurde auf die B-1a B-Zellen gelegt. B-1a-Zellen sind eine Untergruppe der B-Zellpopulation. Diese CD5-exprimierenden Zellen werden bereits im Fetus produziert und finden sich vorwiegend in der Peritoneal- und Pleurahöhle. Sie zeichnen sich über die Sekretion natürlicher Antikörper mit geringer Spezifität aus und sind damit wichtig für die frühe, ungezielte Immunantwort [Janeway 2002]. Die Bedeutung dieser Zellen zeigte unsere Arbeitsgruppe erstmals im Rahmen der Präeklampsie, eine Erkrankung der Schwangerschaft einhergehend mit hohen Blutdruckwerten und Proteinurie und damit verbundener Gefahr der Frühgeburt. Der Anteil der B1a-B-Zellen war bei schwangeren Frauen, die an Präeklampsie litten, im dritten Trimester deutlich erhöht im Vergleich zu gesunden Schwangeren [Jensen et al. 2012]. B1a-B-Zellen produzieren Autoantikörper gegen Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor, welche als assoziierender Faktor im Rahmen der Präeklampsie betrachtet werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass B-Zellen auch einen negativen Einfluss auf die Schwangerschaft nehmen können [Jensen et al. 2012; Wallukat et al. 1999]. Interessanterweise sind diese Zellen im Mausmodell aber auch in der Lage während der Schwangerschaft die proinflammatorische Zytokinantwort zu dämpfen, indem sie die Th17 Differenzierung hemmen [Muzzio et al. 2014b]. Paradoxerweise tragen sie damit zum Erhalt eines adäquaten Zytokinmilieus während der Schwangerschaft bei.

Auf Grund der Bedeutung von IL10 in der Schwangerschaft und der zunehmenden Erforschung der IL10 produzierenden regulatorischen B-Zellen und ihre Fähigkeit der Kontrolle inflammatorischer Prozesse, richtete sich das Interesse nun auf diesen Zelltyp und dessen Einfluss auf den Schwangerschaftserhalt. Zwar sind B-Zell defiziente Mäuse in der Lage erfolgreich Schwangerschaften auszutragen [Gustafsson et al. 1994], doch konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals einen Einfluss der B-Zellen

außerhalb der Antikörper-Produktion auf die Schwangerschaft zeigen. So konnte festgestellt werden, dass regulatorische B10 Zellen im Mausmodell bei normal-trächtigen Mäusen erhöht sind im Vergleich zu nicht-trächtigen Mäusen. Weiterhin zeigte sich ein Abfall dieser B10 Zellen bei Mäusen mit Aborten. Auch war die IL10 Expression der regulatorischen B-Zellen dieser Mäuse deutlich erniedrigt. In einem weiteren Schritt wurden den Mäusen mit erhöhter Abortrate B10 Zellen aus normal trächtigen Mäusen injiziert, was zu einer Reduktion der Aborthäufigkeit führte. Injizierte man lediglich die B-Effektor-Zellen, d.h. ohne regulatorische B-Zellen, so hatte dies keinen Einfluss auf die Abortrate der Mäuse. Der B10-Zell-Transfer führte bei diesen Mäusen zu einem Anstieg der regulatorischen T-Zellen, sowie eine Verringerung des Anteiles reifer dendritischer Zellen [Jensen et al. 2013].

B-Zellen scheinen vielfältige Funktionen während der Schwangerschaft einzunehmen (vgl. Abb.3). Insbesondere die Übertragung der Erkenntnisse aus den Mausmodellen auf die menschliche Schwangerschaft ist ein derzeitiger Forschungsschwerpunkt, auf den sich auch diese Arbeit fokussiert.

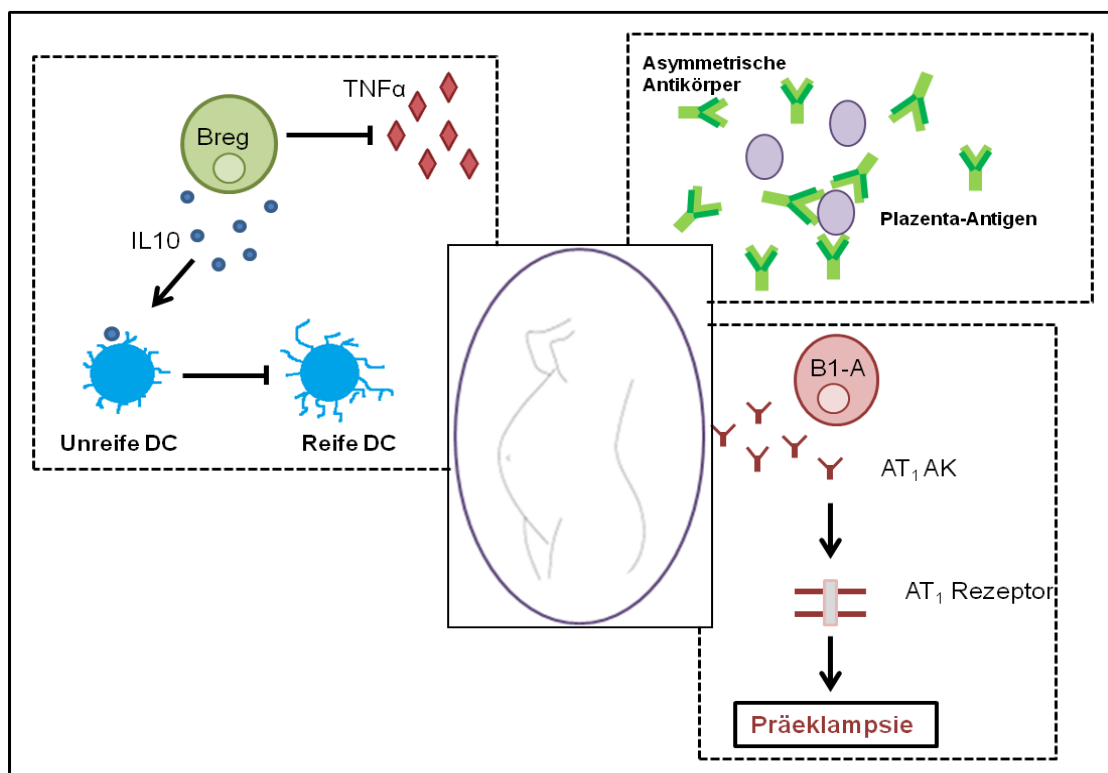


Abbildung 3: Funktion von B-Zellen während der Schwangerschaft. Während der Schwangerschaft kommt es durch stimulierende Faktoren zur Sekretion asymmetrischer Antikörper, welche Plazenta-Antigene abfangen und damit vor einer ungewünschten Immunreaktion schützen. Zusätzlich sind regulatorische B-Zellen in der Lage über die Sekretion von IL10 die proinflammatorische Immunantwort durch Hemmung der TNF α Sekretion zu regulieren, sowie die Reifung dendritischer Zellen zu inhibieren. Zusätzlich produzieren B-Zellen Autoimmunantikörper, die für die Entstehung von Präeklampsie verantwortlich gemacht werden (modifiziert nach Fettke et al.)

1.4 Zielstellung

Der Erfolg einer Schwangerschaft erfordert ein komplexes Zusammenspiel der einzelnen Immunzellen um die Akzeptanz des Fötus zu ermöglichen und gleichzeitig Mutter und Kind vor Infektionen zu schützen. IL10 produzierende regulatorische B-Zellen nehmen möglicherweise in diesem Balanceakt eine tragende Rolle ein. Doch gibt es bislang wenige Erkenntnisse, insbesondere was ihren Einfluss in der menschlichen Schwangerschaft betrifft. Diese Arbeit hatte das Ziel, Grundlagen zum Verständnis der regulatorischen B-Zellen im Kontext der Schwangerschaft zu schaffen. Insbesondere lag der Fokus darauf, ob IL10 produzierende B-Zellen in der menschlichen Schwangerschaft nachweisbar sind und ob Faktoren im mütterlichen Serum zur Differenzierung dieser Zellen beitragen. Ein weiterer Schwerpunkt stellte die Interaktion der B-Zellen mit humanen T-Zellen dar und inwieweit IL10 produzierende regulatorische B-Zellen die Zytokinsekretion der T-Effektor-Zellen beeinflussen. Ferner galt es die Frage zu klären, inwieweit Trophoblastenzellen zur Differenzierung der B-Zellen zu regulatorischen Zellen beitragen. Daraus ließen sich folgende Fragestellungen formulieren:

Ex vivo Versuchskomplex:

1. Ist die Anzahl an regulatorischen B-Zellen während der Schwangerschaft verändert im Vergleich zu Nicht-Schwangeren?
2. Weisen Patientinnen mit Fehlgeburt veränderte Zahlen an regulatorischen B-Zellen auf im Vergleich zu gesunden Schwangeren und Nicht-Schwangeren?

In vitro Versuchskomplex

3. Ist die Expression und Sekretion von IL10 in CD19⁺ B-Zellen während des 1.Trimesters der Schwangerschaft im Vergleich zu Nicht-Schwangeren und zu Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten, erhöht?
4. Sind CD19⁺ B-Zellen schwangerer Frauen in der Lage die proinflammatorische Zytokinproduktion von T-Helfer Zellen zu supprimieren?
5. Beeinflussen Trophoblastenzellen die IL10-Expression der CD19⁺ B-Zellen?
6. Führen lösliche Faktoren im Serum schwangerer Frauen des 1.Trimesters zu einer Stimulation der CD19⁺ B-Zellen?
7. Ist BAFF (B-Zellen aktivierender Faktor) vermehrt im Serum schwangerer Frauen des 1.Trimesters nachweisbar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Labormaterialien

Aluminiumfolie	Roth
Cryo 1°C Freezing Container Mr. Frosty	Nalgene
Cryovial® 2ml	Simport
Eisbox	NeoLab Migge
Filterspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Greiner bio-one
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide
Glasmaterialien	Schott; Brand; Simax
Parafilm	Bemis
pH-Meter	Neolab
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße (0,2ml; 0,5ml; 1,0ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf
Serologische Pipette Glas (5ml; 10ml; 25ml)	Hirschmann
Serologische Pipette Kunststoff (5ml)	Sarstedt
Safe Lock Röhrchen (0,2ml; 0,5ml; 1,5ml)	Eppendorf
Vernichtungsbeutel	NeoLab
Wägepapier	Machery-Nagel

2.1.2 Laborgeräte

Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen
HERA freeze HFU 586 Basic	Kendro
Kühlschrank FKEX 3600	Liebherr
Kühlschrank KTP 1810-20	Liebherr
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik
Magnetrührer mit Heizung RH basic 2	IKA Labortechnik
Microprozessor pH Meter ph211	Hanna instruments
Mini Shaker MS3 basic	IKA Labortechnik
Multifunktionsplattenlesegerät Synergy HAT	BioTek
Präzisionswaage LA620P	Sartorius
Spülmaschine Miele professional G7883	Miele
Ultra-Low Temperature Freezer MDF-U53V	Sanyo Electric
Wasseraufbereitungsanlage Elix 10	Millipore
Zentrifuge 54417R	Eppendorf

Zentrifuge 5810R	Eppendorf
------------------	-----------

2.1.3 Geräte und Material für die magnetische Zellsortierung

LD Columns	Miltenyi Biotec
MS Columns	Miltenyi Biotec
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec
Mini MACS Separator	Miltenyi Biotec
MACS Ständer	Miltenyi Biotec

2.1.4 Geräte und Material für die Zellkultur

Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific
Mikroskop Axiovert 40c	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik
Röhre (15ml; 50ml)	Sarstedt
Puradisc Syringe Filter (0,2µm)	Whatmann
Schüttelwasserbad SWB25	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank NU-437-400E	Integra Bioscience
Serologische Pipette Kunststoff (5ml; 10ml; 25ml)	Greiner bio-one
Transferpipette (3,5ml)	Sarstedt
Zellkulturflasche 75cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten (24 Loch; 96 Loch)	Sarstedt

2.1.5 Geräte und Material für die Durchflusszytometrie

BD FACSCalibur™	Becton Dickinson
FACS Clean	BD Bioscience
FACS Flow™	BD Bioscience
FACS Rinse	BD Bioscience
Rundbodenröhrchen 5ml	BD Falcon

2.1.6 Chemische Stoffe, Substanzen und Lösungen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Ethanol 100 Vol-%	Otto Fischer
Ethanol 96 Vol-%	Otto Fischer
Ethylendiamintetraessigsäuren (EDTA C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Catbiochem
FicollPaques	GE Healthcare
Kaliumchlorid (KCL)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Merck

Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Saponin purum	Riedel-de Haen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween®20	Merck

2.1.7 Biologisch aktive Substanzen

Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Fötale Rinderserum (FBS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Invitrogen
Rekombinantes humanes IL10	BD Bioscience

2.1.8 Antikörper

Durchflusszytometrie

FITC-konjugierter Maus anti-human CD19 (Klon: HIB 19)	BioLegend
PE-konjugierter Ratte anti-human IL10 (Klon: JES3-19F1)	BioLegend
PE-konjugierter Maus anti-human CD38 (Klon: HIT2)	BioLegend
Alexa Fluor 647konjugierter Maus anti-human CD24 (Klon: ML5)	BioLegend
PerCp-konjugierter Maus anti-human CD27 (Klon: O323)	BioLegend
FITC-konjugierter Maus anti-human CD4 (Klon: OKT4)	BioLegend
PE-konjugierter Maus anti-human TNF α (Klon: MAb11)	BioLegend
PE-konjugierter Maus anti-human IFN γ (Klon: 4S.B3)	BioLegend
PE-konjugierter Maus anti-human IL17 (Klon: BL168)	BioLegend

MACS Zellisolierung

Biotin-Antibody Cocktail, human	Miltenyi Biotec
---------------------------------	-----------------

(anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD36, anti-CD43, anti-CD 235a)	
CD4 ⁺ T Cell Biotin Antibody Cocktail, human (anti-CD8, anti-CD14, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123, anti-TCR γ/δ , anti-CD235a)	Miltenyi Biotec
MicroBeads konjugierter monoklonaler Antikörper (Isotyp: Maus IgG1)	Miltenyi Biotec
CD25 MicroBeads, human (monoklonaler anti-CD25 Antikörper, Isotyp: Maus IgG1)	Miltenyi Biotec

Zellkultur

Purified NA/LE Mouse anti-human CD3 1,0mg/ml	BD Bioscience
Purified NA/LE Mouse anti-human CD28 1,0mg/ml	BD Bioscience
rekombinantes IL-2 (E.coli derived)	R&D Systems
ODN 2006 (CpG)	Invitrogen
rekombinantes CD40L(HEK 293)	R&D Systems

Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Capture Antibody

Anti-human IL10	BD Bioscience
-----------------	---------------

Detection Antibody

Biotinylated Anti-human IL10	BD Bioscience
------------------------------	---------------

2.1.9 Medien, Lösungen und Pufferlösungen

Medien

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)	Invitrogen
--	------------

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
---	------------

Kulturmedium für B-Zell-Kultur und T-Zell-Kultur

445ml RPMI-1640

50ml FBS (10%)

5ml Pen/Strep (1%)

Kulturmedium SWAN-71 Zellkultur

445ml DMEM

50ml FBS (10%)

5ml Pen/Strep (1%)

Einfriermedium

90%FBS+ 10% DMSO

Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer

PBS (phosphate buffered saline) (10x):	80g NaCl
	21,9g Na ₂ HPO ₄
	2g KCL
	2g KH ₂ PO ₄
	Aqua dest auf 1L, pH= 7,4

Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie

Permeabilisierungspuffer:	0,1% Saponin in PBS
FACS-Puffer:	1% BSA
	0,1% NaN ₃
	in 1xPBS
Fixierung	1% PFA in PBS

Lösungen für ELISA

Coating-Buffer:	7,13g NaHCO ₃
	1,59g Na ₂ CO ₃
	Aqua dest. auf 1L, pH=9,5
	mit 10N NaOH

Assay Diluent:	PBS mit 10%FBS, pH=7,0
----------------	------------------------

Wash Buffer:	PBS mit 0,05% Tween-20
--------------	------------------------

Substrate Solution:

TMB Substrate Reagent Set	BD Pharmingen
---------------------------	---------------

Stop Solution	2N H ₂ SO ₄
---------------	-----------------------------------

Lösung für MACS[®]Zellisolierung

MACS-Puffer:	0,5% BSA
	2mM EDTA in PBS

2.1.10 Kits

Human B-cell isolation Kit II	Miltenyi Biotec
-------------------------------	-----------------

Human CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory Tcell isolation Kit	Miltenyi Biotec
---	-----------------

Human IL10 ELISA Set	BD Bioscience
Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay	R&D Systems

2.1.11 Material für die Blutentnahme

Kodan Tinktur forte (Hautantiseptikum)	Schürke & Mayr GmbH
Schlinggazetupfer steril	Fuhrmann
BD Vacutainer Safety Lok (blood collection set)	BD Bioscience
BD Vacutainer K ₂ EDTA (1,8mg/ml), 10ml	BD Bioscience
BD Vacutainer SST II Advanced, 8,5ml	BD Bioscience

2.1.12 Computerprogramme

CellQuest Pro	BD Bioscience
FlowJo	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 5.0	Statcon
Excel 2007	Windows
PowerPoint 2007	Windows
Word 2007	Windows

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Für die vorliegende Arbeit wurden humane B- und T-Zellen sowie peripher mononukleäre Zellen (PBMZ) aus venösem Blut isoliert. Die Blutproben stammten von normal schwangeren Frauen im ersten, zweiten und dritten Trimester. Als Vergleich dienten Zellen aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen und Patientinnen, welche einen Spontanabort erlitten. Die Blutentnahme erfolgte nach vorheriger Aufklärung und Einwilligung seitens der Patientinnen. Es wurden bis zu 40ml Blut in einem EDTA beschichteten Röhrchen entnommen. Zusätzlich wurde ein weiteres Röhrchen zur Gewinnung von Serum entnommen.

Die Blutproben der schwangeren Frauen, nicht-schwangeren Frauen und der Patientinnen mit einem Abort wurden von der Universitätsfrauenklinik Magdeburg zur Verfügung gestellt. Die Blutentnahme für wissenschaftliche Untersuchungen wurde von der Ethikkommission der Otto von Guericke-Universität Magdeburg vor der Durchführung der Experimente genehmigt (Studie 28/08).

Tabelle 1: Übersicht über Anzahl, Alter und Schwangerschaftswoche der Probandinnen

Blutproben	Alter	Schwangerschaftswoche
Normal schwangere Frauen (1.Trimester, n=11)	24,12 ± 4,95	10,10 ± 1,34
Normal schwangere Frauen (2.Trimester, n=5)	28,00 ± 8,37	25,40 ± 1,22
Normal schwangere Frauen (3.Trimester, n=5)	30,33 ± 7,15	36,33 ± 3,56
Patientinnen mit Spontanabort (n=5)	28,50 ± 3,42	10,00 ± 2,45
Nicht-schwangere Probanden (n=20)	27,29 ± 4,46	/

2.2.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus menschlichem Blut

Für die Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMZ) wurde das Prinzip der Dichtegradiententrennung angewendet. Hierfür verwendet man FicollPaque, ein hydrophiles Polysaccharid, welches auf Grund seiner spezifischen Dichte eine Trennung der Blutbestandteile herbeiführt. Die Erythrozyten sammeln sich am Boden, da sie durch das Ficoll aggregieren. Darüber liegen die Granulozyten, gefolgt vom Ficoll. Im oberen Teil des Röhrchens sammelt sich die Interphase, bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen. Das Plasma befindet sich als oberste Schicht im Röhrchen (siehe Abb.4).

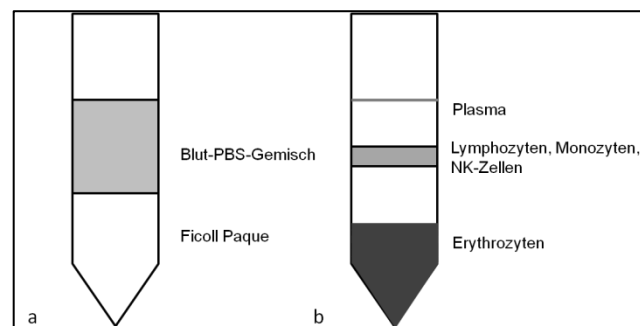


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Dichtegradientenzentrifugation (a) Aufsichtung der Probe auf Ficoll Paque (b) Auftrennung der Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung der PBMZ erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Blutproben wurden zu Beginn für 10min zum Abkühlen auf Eis gestellt, anschließend für 10min bei 2200 rpm und 4°C zentrifugiert um das Blutplasma von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen. Nach Abnahme des Plasmas wurde das Blut in einem 50ml Reaktionsgefäß gesammelt, und mit derselben Menge PBS (steril) verdünnt. Jeweils 4ml des Blut-PBS-Gemisches wurden auf 4ml Ficoll Paque vorsichtig aufgeschichtet. Mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 1800 rpm ohne Bremseinwirkung für 20min erfolgte

die Verteilung der verschiedenen Bestandteile auf unterschiedliche Phasen. Die PBMZ wurden nun vorsichtig aus der Interphase entnommen und mit PBS zweimal gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert und die Zellanzahl konnte ermittelt werden.

2.2.3 Zellzählung der PBMZ

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Hämazytometers, in diesem Fall der Neubauer Zählkammer. Es wurden 10µl Zellsuspension mit 10µl Trypanblau vermischt. Trypanblau dient zur Überprüfung der Zellvitalität. Es ist ein Vertreter der Azofarbstoffe und bindet an intrazelluläre Proteine. Das bedeutet, dass er lediglich in tote Zellen eindringen kann, da deren Membran bereits durchlässig ist, und diese somit blau anfärbt. Auf Grund seiner Größe kann der Farbstoff intakte Zellmembranen nicht überwinden.

Nach Auszählung der Zellen ermittelte sich die Gesamtzahl der Zellen nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen} = Z \times VF \times V \times 10^4$$

Z= Mittelwert der gezählten Zellen aus vier großen Quadraten

VF= Verdünnungsfaktor

V= Volumen, in dem das Zellpellet resuspendiert wurde in ml

10^4 = Kammerfaktor der Zählkammer

2.2.4 Isolierung von CD19⁺ B-Zellen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mittels MACS[®]

Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (engl. MACS) wird zur Isolation von Subpopulationen aus einem Gesamtpool an Zellen eingesetzt. Dabei kann eine Negativselektion von einer Positivselektion unterschieden werden.

Bei der Positivselektion wird die gewünschte Zellart mit einem zellspezifischen biotin-konjugierten Antikörper markiert. An der Biotinbindung binden in einem weiteren Schritt magnetische Partikel, die sogenannten MicroBeads. Die Zellsuspension wird auf eine Trennsäule aufgebracht. Diese Trennsäule enthält ferromagnetische Partikel. Durch das Einbringen in ein magnetisches Feld werden die vorher markierten Zellen in der Säule zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die gewünschten Zellen eluiert.

Eine weitere mögliche Anwendung ist die Negativselektion. Dabei werden alle unerwünschten Zellsubtypen mit Antikörpern und MicroBeads markiert und aus der Zellsuspension herausgefiltert, zurück bleibt die gewünschte, unmarkierte Zellfraktion (vgl. Abb.5).

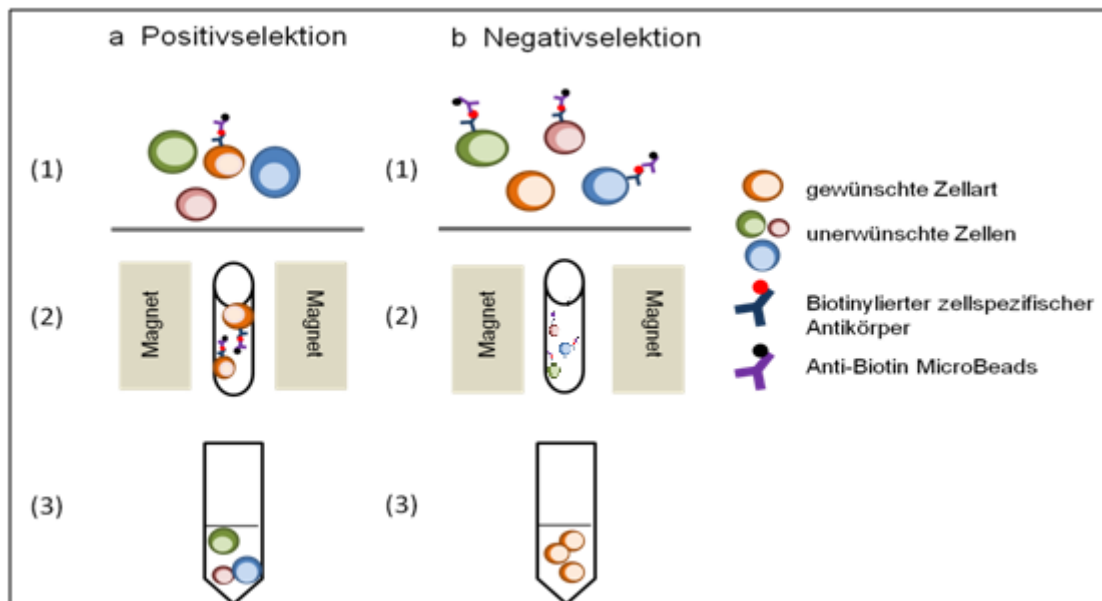


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) a) Darstellung der Positivselektion. (1) Gewünschte Zellart wird mit biotinylierten zellspezifischem Antikörper markiert. Anschließend binden die Anti-Biotin MicroBeads. (2) Einbringen in ein Magnetfeld (3) unerwünschte Zellfraktionen werden in einer Röhre gesammelt, erwünschte Zellen befinden sich auf der Säule und können separat eluiert werden. b) Darstellung einer Negativselektion: (1) unerwünschte Zellfraktionen werden mit biotinylierten zellspezifischen Antikörpern und anti-Biotin MicroBeads markiert. (2) Einbringen in ein Magnetfeld, markierte Zellen verbleiben auf der Säule (3) im Eluat befinden sich die unmarkierten gewünschten Zellen.

2.2.4.1 Isolierung von B-Zellen mittels MACS®

Die Isolierung der B-Zellen erfolgte aus dem Blut schwangerer Frauen im ersten Trimester und aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen.

Nach der Entnahme wurden die PBMZ, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, isoliert und gezählt. Anschließend erfolgte die B-Zell-Isolierung mit Hilfe des humanen B-cell-isolation Kit II von Miltenyi Biotec. Da es sich um eine Negativselektion handelte, wurden die Lymphozyten mit biotin-konjugierten Antikörpern gegen Immunzellen (außer CD19⁺-B-Zellen) inkubiert. Nach der Konjugation mit den MicroBeads verblieben die unerwünschten Zellpopulationen auf der Säule. Die gewünschten CD19⁻ B-Zellen reichert sich in dem Eluent an. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und gezählt.

2.2.4.2 Isolierung von CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen mittels MACS®

Für die Isolierung der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurde Blut nicht-schwangerer Frauen verwendet. Nach dem Gewinn der PBMZ erfolgten die weiteren Schritte mit Hilfe des humanen CD4⁺CD25⁺Regulatory T cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec. Der erste Schritt stellte eine Negativselektion dar. Mit Hilfe eines Antikörper Cocktails wurden alle nicht CD4⁺ Zellen markiert. Gleichzeitig wurden die CD25⁺ T-Zellen mit einem PE-

konjugierten Antikörper markiert. Beim Durchlaufen der Trennsäule befanden sich die CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen im Durchfluss. Die regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe eines zweiten Schrittes, diesmal eine Positivselektion, herausgefiltert. Dafür wurden die Zellen mit spezifischen MicroBeads inkubiert, welche an den PE-konjugierten CD25⁺ T-Zellen banden. Beim Durchlaufen der im Magnetfeld befindlichen Säule verblieben die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Säule. Im Durchfluss fanden sich die unmarkierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Diese wurden für die weiteren Experimente gewaschen und gezählt.

2.2.5 Bestimmung des prozentualen Anteiles regulatorischer B-Zellen im Blut schwangerer Frauen

Zur Beurteilung des Anteils der regulatorischen B-Zellen (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} und CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺) an der Gesamtzahl der PBMZ im Verlauf der Schwangerschaft wurde aus dem Blut schwangerer Frauen des 1., 2. und 3. Trimesters PBMZ isoliert. Weiterhin dienten PBMZ aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen als Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde auch bei Patientinnen, die einen Abort erlitten, der prozentuale Anteil der regulatorischen B-Zellen bestimmt.

Nach erfolgreicher Isolation der PBMZ wurden diese gegen die verschiedenen Oberflächenmarker der regulatorischen B-Zellen gefärbt und der Anteil durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.6 *In vitro* Assay zur Bestimmung der IL10 Produktion von B-Zellen in der Schwangerschaft

PBMZ aus dem Blut von schwangeren Frauen des 1. Trimester wurden, wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben, isoliert. Als Kontrollgruppe dienten PBMZ aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen. 0,5x10⁶ PBMZ der jeweiligen Gruppen wurden in 500µl Kulturmedium kultiviert. Ansatz (1) erhielt am Zeitpunkt null keine Zusätze. Ansatz zwei wurde mit 1µg/ml CD40L und 10µg/ml CpG versetzt. Diese Zusätze dienten der Stimulation der B-Zellen. [Iwata et al. 2011] Die jeweiligen Ansätze wurden als Doppelbestimmung für 48 und 72 Stunden angelegt. Fünf Stunden vor Ende der Kulturdauer wurden allen Ansätzen Brefeldin A und Ionomycin hinzugefügt. Brefeldin A blockiert die Sekretion von IL10 in den Zellkulturüberstand, Ionomycin induziert die Bildung von Zytokinen über die Stimulation der Translation und Transkription der entsprechenden Gene. Mit Hilfe dieser beiden Stoffe wird ein verbesserter Nachweis des intrazellulären Zytokins in der Durchflusszytometrie erreicht. Nach Ende der Kulturzeit wurde die Anzahl der CD19⁺IL10⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der Versuchsaufbau wurde für die Durchführung des ELISA wiederholt. Dafür erfolgte die Isolation von CD19⁺B-Zellen mittels MACS aus dem Blut

schwangerer Frauen im 1. Trimester und Nicht-Schwangeren Frauen, jedoch ohne Zusatz an Brefeldin A und Ionomycin am Ende der Kulturzeit um die Konzentration an IL10 im Überstand der Zellkultur nach 72h zu bestimmen.

2.2.7 *In vitro* Assay zur Bestimmung der Zytokinproduktion von T-Helfer Zellen bei Kokultur mit CD19⁺ B-Zellen schwangerer Frauen

Für die Untersuchung des Einflusses von B-Zellen auf die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen in der Schwangerschaft wurden B-Zellen von schwangeren Frauen im 1. Trimester und von nicht-schwangeren Frauen mit CD4⁺ T-Zellen von nicht schwangeren Frauen kokultiviert.

Es erfolgte die Isolation der B-Zellen aus dem Blut schwangerer Frauen und nicht-schwangerer Frauen. Die B-Zellen wurden mit PBS gewaschen, auf zwei Vertiefungen einer 24er Zellkulturplatte mit jeweils 500µl Kulturmedium aufgeteilt. Ansatz eins (1) verblieb unstimuliert, Ansatz zwei (2) wurde erneut mit CD40L(1µg/ml) und CpG(10µg/ml) stimuliert. Beide Ansätze wurden 48h im Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Isolierung der CD4⁺ -Zellen aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen. Die Zellen wurden gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die B-Zell-Kulturen wurden aus der Kultur in ein Reaktionsgefäß übertragen, zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in 250µl Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Es wurden jeweils 1×10^5 CD4⁺ T-Zellen mit 1×10^5 B-Zellen nach folgendem Schema (vgl. Abb.6) in 250µl Kulturmedium in einer 96er-Lochplatte für 72 Stunden kultiviert. Zusätzlich wurden die CD4⁺ T-Zellen mit humanem anti-CD3 (1µg/ml), anti-CD28 (5µg/ml) und rekombinantem IL2 (10ng/ml) stimuliert. Zudem wurden die CD4⁺ T-Zellen nach dem gleichen Schema mit dem Überstand aus der B-Zellkultur kultiviert.

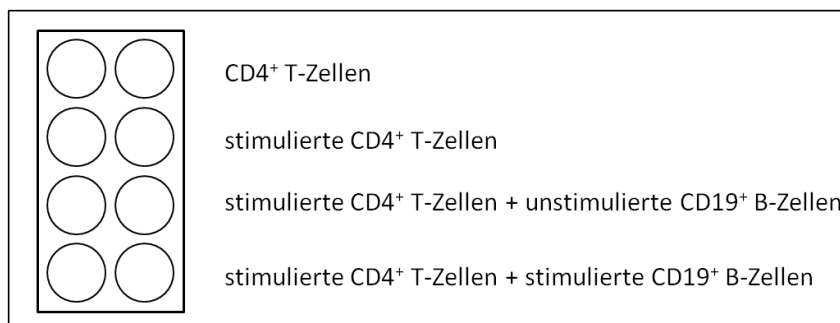


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probenauftragung

Fünf Stunden vor Ende der Kulturzeit wurde jedem Ansatz Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (50ng/ml), Ionomycin (1µg/ml) und Brefeldin A (1xsolution/ml) hinzugefügt. Nach Ablauf der 72 Stunden Kulturzeit wurde jeder Ansatz auf vier Rundbodenröhrchen

aufgeteilt, mit jeweils 1ml FACS-Puffer gewaschen und wie unter Punkt 2.2.10.1 beschrieben für die Messung der Zytokinexpression der CD4⁺T-Zellen vorbereitet.

2.2.8 *In vitro* Assay zur Bestimmung der IL10 Expression der CD19⁺B-Zellen bei Stimulation mit Serum schwangerer Frauen

Zum Nachweis des Einflusses löslicher Faktoren im Serum schwangerer Frauen auf die IL10 Produktion von B-Zellen wurden PBMZ nicht-schwangerer Frauen mit dem Serum schwangerer Frauen kultiviert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil an CD19⁺IL10⁺ Zellen gemessen. Als Kontrollgruppe dienten mit Serum nicht-schwangerer Frauen kultivierte PBMZ. Zum weiteren Vergleich wurden PBMZ mit Serum von Frauen kultiviert, welche eine Fehlgeburt erlitten hatten.

Zur Gewinnung des Serums wurde den Probanden Blut in einem mit Silikatpartikel-versetzten Röhrchen entnommen. Durch diese speziellen Partikel wird eine schnelle Blutgerinnung, die zur Gewinnung des Serums notwendig ist, ausgelöst. Nach der Entnahme wird das Röhrchen bei 2200rpm für 10min zentrifugiert. Dabei trennt sich der zelluläre Anteil vom Serum ab. Anschließend wurde das Serum vorsichtig abgenommen, in Safe-Lock Röhrchen überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Die Isolation der PBMZ erfolgte aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen. Die gewonnenen Zellen wurden in 1ml Kulturmedium resuspendiert, gezählt und mit 20% Serum schwangerer Frauen des 1.Trimesters kultiviert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 20% autologen Serum und ein Ansatz mit Serum von Patientinnen, welche eine Fehlgeburt erlitten hatten. Jeder Ansatz lag als Doppelbestimmung vor. Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen in einem Gesamtvolumen von 500µl Kulturmedium in einer 24er Lochplatte für 48 Stunden kultiviert. Fünf Stunden vor Kulturende wurde zu allen Vertiefungen Brefeldin A und Ionomycin (1µg/ml) hinzugegeben.

Anschließend wurden die Zellen gegen CD19 und IL10 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Zur Gewinnung des Überstandes für die IL10 Konzentrationsbestimmung mittels ELISA wurde das Experiment wiederholt. Dafür wurden CD19⁺B-Zellen isoliert und kultiviert um eine Zytokinproduktion durch andere Zellen auszuschließen. Es wurden pro Ansatz 5×10^5 CD19⁺ B-Zellen in 250µl Medium mit 20% autologen Serum oder 20% Serum von schwangeren Frauen im 1. Trimester oder Serum von Patientinnen mit einer Fehlgeburt in einer 96er Zellkulturplatte kultiviert.

Der Ansatz wurde nach 72 Stunden in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, bei 2200rpm zentrifugiert und der Überstand in ein 0,5ml Reaktionsgefäß abgenommen. Die Zellen und der Überstand wurden jeweils bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.9 Kokultur von CD19⁺ B-Zellen mit der Trophoblasten-Zelllinie (SWAN-71)

Die SWAN-71 Zelllinie stellt eine Trophoblastenzelllinie dar, welche aus primären Trophoblastenzellen einer humanen Plazenta der 7. Schwangerschaftswoche generiert wurde. Primäre Trophoblastenzellen haben den Nachteil, dass diese in der Zellkultur nur eine geringe Teilungsrate aufweisen und damit über eine begrenzte Lebensdauer verfügen. Durch Einbringen eines retroviralen Systems, bestehend unter anderem aus einer humanen Telomerase reverser Transkriptase, in die primären Trophoblastenzellen konnte die Zellteilungsrate deutlich verlängert werden. Wichtig ist dabei, dass Charakteristika der ursprünglichen Zelle erhalten bleiben. So exprimiert die SWAN 71 Zelllinie weiterhin, das für Trophoblasten typische Cytokeratin 7, Vimentin und HLA-G. Auch konnte eine Sekretion des fetalen Fibronectins erhalten werden [Straszewski-Chavez et al. 2009].

Die SWAN 71 Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Gil Mor zur Verfügung gestellt, in dessen Labor die Zellen erstellt wurden. Nach dem vorsichtigen Auftauen wurden die Zellen mit 50ml Kulturmedium gewaschen, bei 1500rpm und Raumtemperatur für 7min zentrifugiert und in 1ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie in eine mit 10ml Kulturmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. Täglich wurde das Wachstum und die Konfluenz der Zellen überprüft. Nachdem eine Konfluenz von 80-90% erreicht wurde, konnten die Zellen für den weiteren Versuch ausplattiert werden. Dafür wurden sie zuerst für 2-3 min mit 10ml Trypsin/EDTA inkubiert. Trypsin führt zu einer Lösung der Adhäsionen der Zellen vom Zellkulturplattenboden, wirkt aber auch zelltoxisch, weshalb die Inkubationszeit nicht überschritten werden darf. Die Reaktion wurde mit 10ml Kulturmedium gestoppt. Das im Kulturmedium enthaltene FBS blockiert die Wirkung des Trypsins. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, bei Raumtemperatur und 1500rpm für 10 min zentrifugiert und in 1ml Medium resuspendiert. Nach der Zellzählung wurden zum Erhalt der Zelllinie 1x10⁶Zellen erneut in eine Zellkulturflasche überführt.

Für den Versuch wurden in 3 Ansätzen einer 24er Zellkulturplatte jeweils 1x10⁵ SWAN 71 Zellen als Doppelbestimmung in 1ml Kulturmedium ausplattiert. Nach 24 Stunden waren die Zellen adhärent und konnten verwendet werden. Aus dem Blut nichtschwangerer Frauen wurden CD19⁺ B-Zellen isoliert. 1x10⁵CD19⁺B-Zellen wurden mit den SWAN-71 Zellen kokultiviert (vgl. Abb.7)

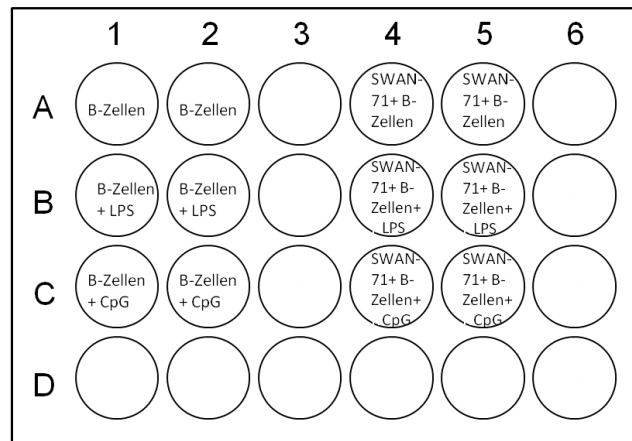


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Probenauftragung auf eine 24-Lochplatte

Fünf Stunden vor Ende der Kultur wurden erneut Brefeldin A und Ionomycin (1µg/ml) hinzugegeben. Nach Ende der Kultivierung konnten die Expression des IL10 in den CD19⁺B-Zellen mittels Durchflusszytometer gemessen werden.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse von Zellen entsprechend ihrer Zellgröße und Zellgranularität. Weiterhin lassen sich zellspezifische Oberflächenmarker, aber auch intrazelluläre Strukturen durch an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe nachweisen. Dabei werden die Zellen einzeln durch den Messbereich eines Lasers geführt. Abhängig von Zellgranularität, Zellgröße und Fluoreszenzfarbstoff sendet die Zelle Streulicht und Fluoreszenzsignale zurück, welche auf unterschiedlichen Dioden detektiert, umgewandelt und dargestellt werden können.

2.2.10.1 Extra- und intrazelluläre Färbung von humanen Lymphozyten

Zur Bestimmung extrazellulärer Oberflächenmarker wurden die Zellen nach Abschluss der Isolation und der beschriebenen Zellkultur auf die erforderliche Anzahl an Rundbodenröhrchen aufgeteilt und mit 1ml FACS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation für 10min bei 1200rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit jeweils 100µl Antikörperverdünnung inkubiert. Zu jeder gefärbten Probe wurde eine ungefärbte Probe mitgeführt, welche in 100µl FACS-Puffer resuspendiert wurde.

Tabelle 2: Verwendete extrazelluläre Antikörper in den entsprechenden Versuchsteilen

Versuchsteil	Eingesetzter AK	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung
3.2.5 Bestimmung des Anteils regulatorischer B-Zellen im Blut schwangerer Frauen	Anti-CD19 Anti-CD24 Anti-CD27 Anti-CD38	FITC Alexa Fluor 647 PerCp PE	1:100
3.2.6 <i>In vitro</i> Assay zur	Anti-CD19	FITC	1:100

Bestimmung der IL10 Produktion von B-Zellen in der Schwangerschaft			
3.2.7 <i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der Zytokinproduktion von CD4 ⁺ T- Zellen nach Kokultur mit CD19 ⁺ B-Zellen schwangerer Frauen	Anti-CD4	FITC	1:10
3.2.8 <i>In Vitro</i> Assay zur Bestimmung der IL10 Sekretion CD19 ⁺ B-Zellen bei Stimulation mit Serum schwangerer Frauen	Anti-CD19	FITC	1:100
3.2.9 Kokultur von CD19 ⁺ B-Zellen mit der Trophoblasten-Zelllinie (SWAN-71)	Anti-CD19	FITC	1:100

Nach 30 Minuten Inkubationszeit im Kühlschrank wurden die Zellen erneut mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und in 100µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die Interleukine 10 und 17 sowie TNF α und IFN γ liegen intrazellulär vor, sodass für ihre Anfärbung das Aufbrechen der Zellmembran notwendig war. Dafür mussten die Zellen zuerst fixiert werden. Das gelang durch die Inkubation mit Fixierungslösung über Nacht bei 4°C. Am Folgetag mussten die Zellen für die Aufnahme des intrazellulären Antikörpers vorbereitet werden, indem sie mit Permeabilisationspuffer gewaschen wurden. Durch das im Puffer enthaltene Saponin wird die Zellmembran porös, sodass die gewünschten Antikörper eindringen können. Nach dem Waschen und einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Proben mit 100µl einer Antikörperverdünnung inkubiert. Die Trägerflüssigkeit für die Antikörper war dabei erneut Permeabilisationspuffer. Auch die ungefärbten Kontrollen wurden mit 100µl Permeabilisationspuffer für 30min bei 4°C inkubiert.

Tabelle 3: Verwendete intrazelluläre Antikörper in den entsprechenden Versuchsteilen

Versuchsteil	Eingesetzter AK	Fluoreszenzmuster	Verdünnung
3.2.6, 3.2.8, 3.2.9	Anti-IL10	PE	1:10
3.2.7	Anti-TNF α Anti-IFN γ Anti-IL17	PE PE PE	1:10

Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Expression der jeweiligen Zytokine gemessen werden konnte.

2.2.11 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA gehört zu der Gruppe der quantitativen Immunoassays. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch ein bindendes Substrat sichtbar und quantifizierbar gemacht wird.

In dieser Arbeit wurde das Prinzip des Sandwich-ELISAs verfolgt. Dabei wird an eine Mikrotiterplatte ein, zum gesuchten Antigen spezifischer, Antikörper (capture antibody) an die feste Phase der Platte gebunden. Dieser Prozess wird Beschichtung genannt. Anschließend wird die Probe, welches das gesuchte Antigen enthält auf dieser Platte inkubiert, sodass das Antigen am gebundenen Antikörper binden kann. Nach dem Abwaschen des nicht-gebundenen Probenmaterials verbleibt der gebundene Antigen-Antikörper-Komplex auf der Mikrotiterplatte. In einem nächsten Schritt bindet an ein weiteres Epitop des gesuchten Antigens ein biotinylierter Antikörper (detection antibody). Hinzu kommt ein Streptavidin gekoppeltes Enzym. Streptavidin bindet an Biotin und bildet damit einen Antikörper-Enzym-Komplex. Durch Zugabe eines Substrates kommt es durch das Enzym zu einem Farbumschlag, dessen Intensität mittels eines Photometers gemessen werden kann (siehe Abb.8).

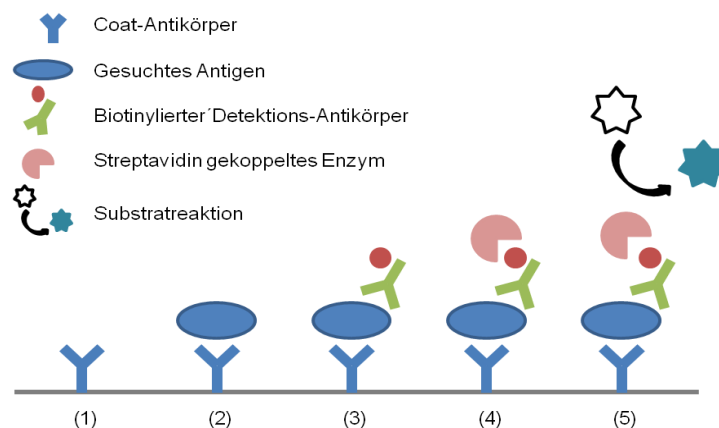


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs (1) an eine 96-Lochplatte gebundener für das gesuchte Antigen spezifischer Coat-Antikörper (2) Zugabe der Probe, Inkubation, Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes (3) biotinylierter antigenspezifischer Detektionsantikörper bindet an das gebundene Antigen, Bildung eines Antikörpers-Antigen-Antikörper-Komplexes (4) Zugabe des Streptavidin gekoppelten Enzymes, Bindung an Biotin (5) enzyspezifische Substratzugabe, Farbumschlag durch Enzymreaktion

2.2.11.1 ELISA zum Nachweis von IL10

Zellüberstände aus Punkt 3.2.1 und 3.2.6 wurden auf ihren IL10-Gehalt mit Hilfe des IL10 ELISA Sets untersucht.

Über Nacht wurde eine 96er Mikrotiterplatte mit einem anti-humanen IL10 monoklonalen Antikörper (detection antibody) bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platte am Folgetag wurde die Platte mit 10%FBS in PBS inkubiert. Dadurch

werden freie Proteinbindungsstellen blockiert, was die Hintergrundaktivität unspezifisch gebundener enzymgekoppelter Antikörpermoleküle minimiert. Im nächsten Schritt konnte die zu untersuchende Probe aufgebracht werden. Es wurden jeweils 100µl der Probe aufgetragen. Als Standard diente rekombinantes IL10 in einer Verdünnungsreihe von 800pg/ml bis 7,8pg/ml. Die Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde die Platte gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen des Detektions-Antikörpers. Dabei handelte es sich um einen biotinylierten humanen anti-IL10 Antikörper. Im gleichen Schritt wurde auch das Enzym-Reagenz, bestehend aus einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Komplex, hinzugefügt. Streptavidin bindet an Biotin und markiert damit den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex mit der Meerrettich-Peroxidase. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurde das überschüssige Enzym abgewaschen. Als letzter Schritt wurde die Substratlösung aufgetragen. Diese bestand aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid. Durch die Reaktion mit der Meerrettichperoxidase kommt es zu einem blauen Farbumschlag. Diese Reaktion wurde nach einer halben Stunde Inkubationszeit mit Schwefelsäure gestoppt. Dann wurde die Intensität der Farbentwicklung unmittelbar mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

Die Berechnung des IL10-Gehaltes der unterschiedlichen Proben erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Konzentration der Probe (pg/ml)} = \frac{\text{optische Dichte der Probe}}{\text{Anstieg der Eichgeraden}}$$

2.2.11.2 ELISA zum Nachweis von BAFF im Serum schwangerer Frauen

BAFF führt zur Aktivierung und Reifung von B-Zellen. Es wird von verschiedenen Zellen, u.a. Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, sekretiert.

Zur quantitativen Bestimmung von BAFF in Serum schwangerer Frauen des 1. Trimesters, sowie nicht-schwangerer Frauen und Patientinnen, die eine Fehlgeburt erlitten hatten, wurde das Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay-Kit verwendet. Die Verdünnung der Serumproben erfolgte, wie empfohlen in einem Verhältnis von 1:2. Alle weiteren Schritte wurden nach der vom Hersteller empfohlenen Gebrauchsanweisung befolgt. Die Intensität des Farbumschlages wurde mittels Photometer bei 450nm bestimmt. Aus den Werten der Standardreihe wurde mittels Excel eine Eichgerade erstellt. Die Konzentration wurde anschließend mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration der Probe (pg/ml)} = \frac{\text{optische Dichte der Probe}}{\text{Anstieg der Eichgeraden}} \times \text{VF}$$

VF- Verdünnungsfaktor

2.2.12 Statistik

Die statistische Analyse und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism 5.0. Auf Grund des geringen Stichprobenumfanges ($n \leq 10$) konnte primär eine Normalverteilung nicht angenommen werden, sodass die Darstellung als Median erfolgte. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei unabhängigen Daten mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Bei abhängigen Daten erfolgte eine Testung mittels Friedmann-Test und Dunns-Post-Test. Es wurde von einem statistischen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen ausgegangen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ betrug.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des prozentualen Anteils regulatorischer B-Zellen während der Schwangerschaft

Die Rolle der regulatorischen B-Zellen in der menschlichen Schwangerschaft ist bislang kaum untersucht. Regulatorische B-Zellen haben das gemeinsame Merkmal der IL10-Produktion. Es besteht jedoch unter den IL10⁺B-Zellen eine hohe Vielfalt bei der Expression der Oberflächenmarker. Zu diesen Phänotypen zählen die CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Zellen. Diese Subpopulation ist in der Lage IL10 zu exprimieren und die proinflammatorische Zytokinsekretion von T-Helfer-Zellen zu supprimieren [Blair et al. 2010]. Eine weitere Subpopulation der regulatorischen B-Zellen wurde mit den CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Zellen gefunden. Diese Population charakterisiert sich über die Fähigkeit der IL10-Sekretion sowie der Reduktion der TNF α -Sekretion von Monozyten [Iwata et al. 2011].

Ziel dieses Teiles der Arbeit war nun den Anteil der oben genannten Zellpopulationen im Blut schwangerer Frauen nachzuweisen.

3.1.1 Der prozentuale Anteil der B-Zellen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab

Für die Bestimmung des Anteils regulatorischer B-Zellen an der Gesamtpopulation der PBMZ wurde aus dem Blut schwangerer Frauen im 1., 2. und 3. Trimester PBMZ isoliert, gegen die Oberflächenmarker CD19, CD24, CD27 und CD38 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Kontrollgruppe dienten PBMZ aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen und Patientinnen mit einer Fehlgeburt.

Die Bestimmung des Anteils der CD19⁺ B-Zellen an der Gesamtpopulation der PBMZ aus dem peripheren Blut ergab keine Veränderung zwischen Nicht-Schwangeren und normal schwangeren Frauen aus dem 1. Trimester der Schwangerschaft. Jedoch konnte ein signifikanter Abfall des Anteils der CD19⁺ B-Zellen im 3. Trimester im Vergleich zur Kontrollgruppe der Nicht-Schwangeren verzeichnet werden. Zwischen der Gruppe der Patientinnen mit Fehlgeburt und Frauen aus dem 1. Trimester der Schwangerschaft ergab sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der CD19⁺B-Zellen. Tendenziell, jedoch ohne Signifikanz, ließ sich ein Abfall der CD19⁺B-Zell Population vom 1. zum 3. Trimester verzeichnen (vgl. Abb.9).

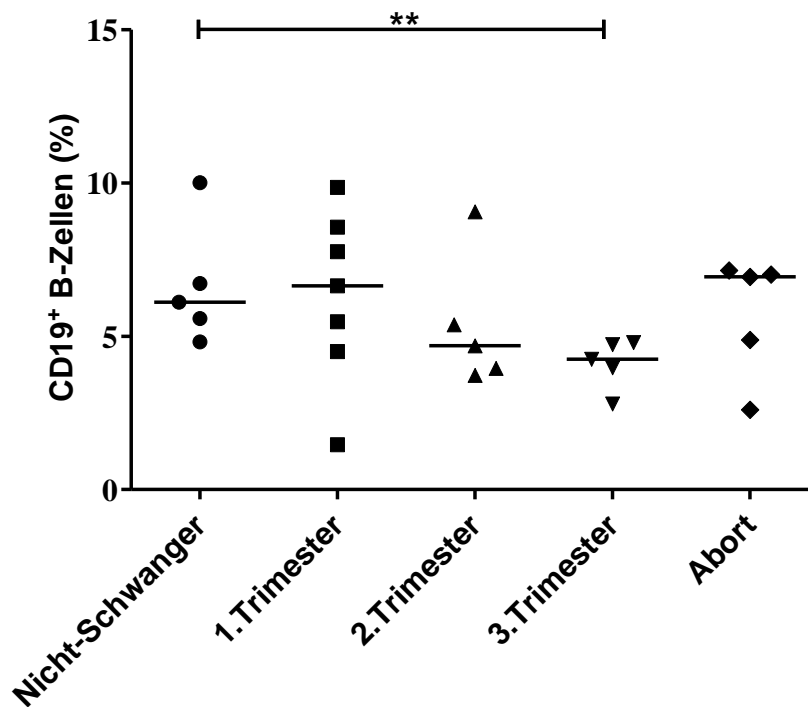


Abbildung 9: Der prozentuale Anteil an CD19⁺ B-Zellen ist im 3. Trimester signifikant reduziert im Vergleich zu Nicht-Schwangeren. Messung des prozentualen Anteils an CD19⁺B-Zellen an der Gesamtpopulation PBMZ im Blut normal schwangerer Frauen vom 1. bis zum 3. Trimester mittels Durchflusszytometrie. Im 3. Trimester zeigte sich ein signifikanter Abfall der CD19⁺B-Zellen im Vergleich zu Nicht-Schwangeren. Darstellung als Median, n=5, Mann-Whitney-U-Test, * p < 0,05.

3.1.2 Der prozentuale Anteil an CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ regulatorischer B-Zellen ist während der Frühschwangerschaft erhöht

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Anteils der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺regulatorischen B-Zellen.

Der prozentuale Anteil der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ regulatorischen B-Zellen war im 1. Trimester im Vergleich zu den nicht-schwangeren Frauen signifikant erhöht. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft fiel der Anteil an CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ regulatorischen B-Zellen ab. So war der Anteil dieser Subpopulation im 3. Trimester signifikant niedriger im Vergleich zum 1. Trimester. In der Gruppe der Patientinnen mit einer Fehlgeburt war der Anteil dieser B-Zell-Subpopulation signifikant erniedrigt gegenüber dem 1. Trimester. Der prozentuale Anteil der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B-Zellen des 3. Trimesters war vergleichbar zu denen von Nicht-Schwangeren (vgl. Abb.10).

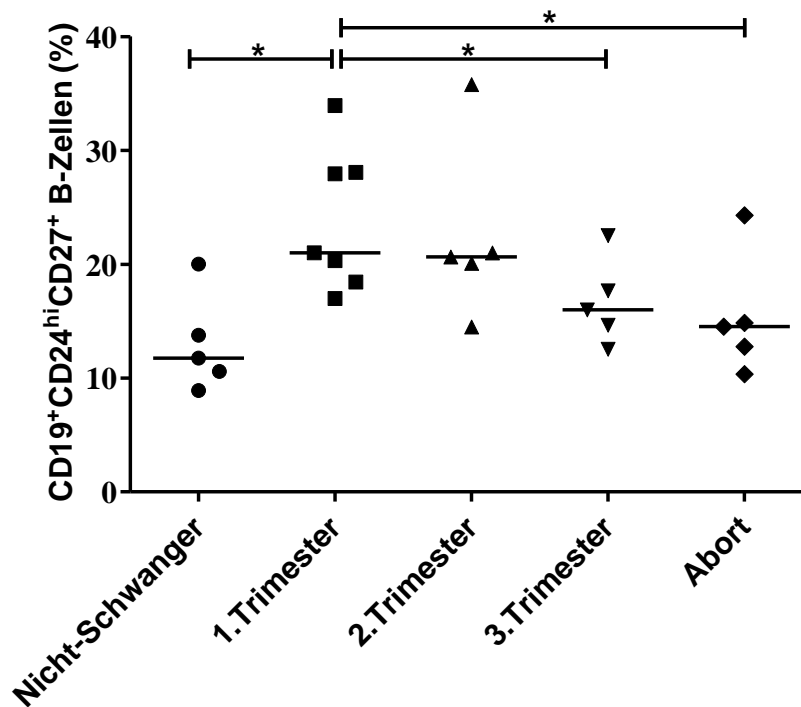


Abbildung 10: Der Anteil an $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ regulatorische B-Zellen ist während des 1.Trimesters erhöht und bei Patientinnen mit Fehlgeburten signifikant erniedrigt. Messung des prozentualen Anteils an $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ regulatorischer B-Zellen im Blut schwangerer Frauen mittels Durchflusszytometrie. Der Anteil an $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ regulatorischer B-Zellen ist im 1.Trimester signifikant erhöht im Vergleich zu Nicht-Schwangeren. Zusätzlich konnte ein signifikanter Abfall der $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ Zellen im Verlauf der Schwangerschaft nachgewiesen werden. Darstellung als Median, n=5, Mann-Whitney-U-Test, * $p < 0,05$.

3.1.3 Der prozentuale Anteil der $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ regulatorischer B-Zellen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab

Da es Diskrepanzen über den Phänotyp der regulatorischen B-Zellen gibt, wurde zusätzlich der Anteil an $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ regulatorischen B-Zellen untersucht. Der prozentuale Anteil der $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ regulatorischen B-Zellen zeigte einen ähnlichen Verlauf, wie die $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ -Population. Während des ersten Trimesters stieg der Anteil dieser regulatorischen B-Zellen im Vergleich zur Gruppe der Nicht-Schwangeren an, jedoch erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz. Zu beobachten war jedoch ein signifikanter Abfall der $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ Population während des 3.Trimesters gegenüber dem 1.Trimester und im Vergleich zu nicht-schwangeren Frauen. Bei Patientinnen mit einer Fehlgeburt lag der prozentuale Anteil der $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ regulatorischen B-Zellen auf dem Niveau von Nicht-Schwangeren Frauen und damit niedriger als im 1.Trimester. Ein statistischer Unterschied konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb.11).

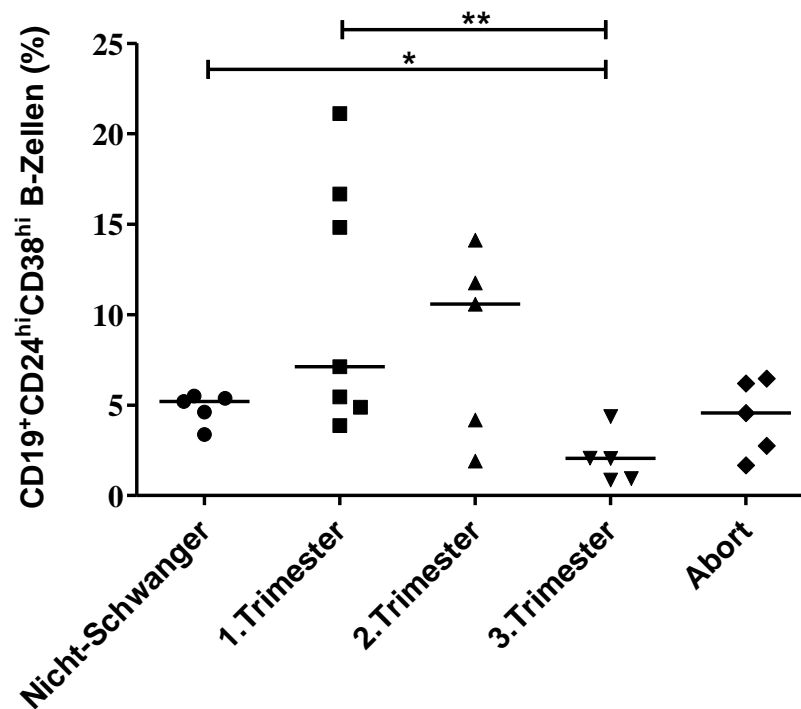


Abbildung 11: Der prozentuale Anteil der CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B-Zellen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab. Messung des prozentualen Anteiles CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}B-Zellen im Blut schwangerer Frauen, Nicht-Schwangerer Frauen und Patientinnen, mit einer Fehlgeburt mittels Durchflusszytometrie. Im 3.Trimester ist die CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Population signifikant niedriger als im 1.Trimester der Schwangerschaft sowie bei nicht-schwangeren Frauen. Darstellung als Median, n=5, Mann-Whitney-U-Test, * p< 0,05; ** p< 0,005.

3.2 Untersuchung regulatorischer B-Zellen *in vitro*

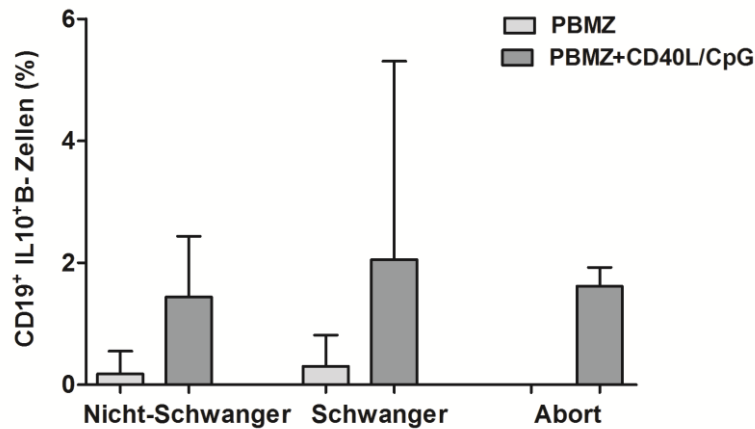
3.2.1 Die Produktion von IL10 in CD19⁺B-Zellen ist in der Schwangerschaft nicht erhöht

Als weiterer Schritt stellte sich nun die Frage, ob sich Expression von IL10 durch B-Lymphozyten in der Schwangerschaft und im Rahmen einer Fehlgeburt ändert. Dafür wurden PBMZ von Frauen im 1.Trimester sowie nicht-schwangeren Probanden und Patientinnen, die eine Fehlgeburt erlitten, für 5 Stunden und 48 Stunden kultiviert und anschließend der Anteil der CD19⁺IL10⁺regulatorischen B-Zellen bestimmt. Es zeigte sich nach 5 Stunden Kulturzeit kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils der CD19⁺IL10⁺ Zellen zwischen den drei Gruppen. (Abb.12a).

Nach 48 Stunden Inkubation war in allen drei Gruppen einer Zunahme der CD19⁺IL10⁺ Zellen unter Stimulation mit CD40L und CpG zu vermerken. Der Anteil der CD19⁺IL10⁺Zellen stieg bei Schwangeren im Vergleich zu Nicht-Schwangeren an. Bei Patientinnen mit einer Fehlgeburt lag der Anteil der IL10 exprimierenden CD19⁺Zellen

auf dem Niveau von Nicht-Schwangeren. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 12b).

a)



b)

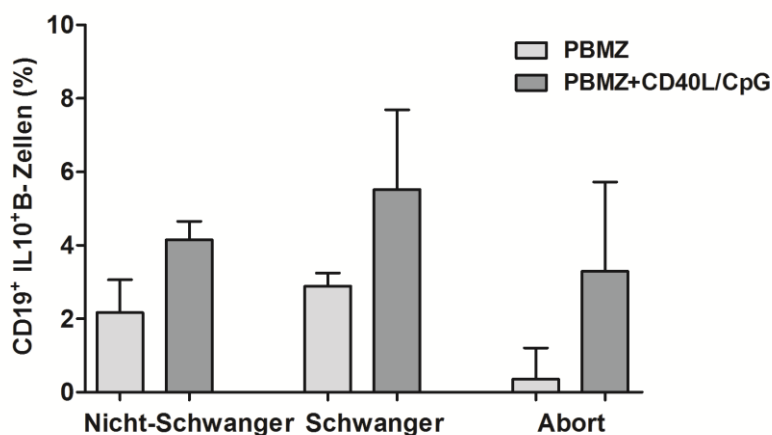


Abbildung 12: Die Expression von IL10 in CD19⁺B-Zellen bleibt bei Schwangeren und Patientinnen mit einer Fehlgeburt unverändert im Vergleich zu Nicht-Schwangeren. (a) Darstellung des prozentualen Anteils der CD19⁺IL10⁺ Zellen Nicht-Schwangerer, Schwangerer im 1.Trimester und Frauen mit Fehlgeburt nach 5h Inkubationszeit. Es konnte kein Unterschied bezüglich der IL10 Expression CD19⁺B-Zellen innerhalb der verschiedenen Gruppen festgestellt werden. (b) Darstellung des prozentualen Anteils der CD19⁺IL10⁺ Zellen Nicht-Schwangerer, Schwangerer im 1.Trimester und Frauen mit Fehlgeburt nach 48 Stunden Inkubationszeit. Es zeigte sich ein Anstieg des Anteils CD19⁺IL10⁺ Zellen in der Schwangerschaft. Bei einer Fehlgeburt lag der Anteil der CD19⁺IL10⁺B-Zellen unter dem der Nicht-Schwangeren. Signifikanzen waren nicht nachweisbar. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4.

Zum quantitativen Nachweis von IL10 wurde aus der Zellkultur CD19⁺B-Zellen von schwangeren Frauen im 1.Trimester und nicht-schwangeren Frauen nach 72 Stunden Überstände gewonnen und auf ihre Konzentration an IL10 mittels ELISA überprüft. Es konnte dabei kein Unterschied bei der IL10 Sekretion der CD19⁺B-Zellen zwischen Nicht-Schwangeren und Schwangeren im 1.Trimester nachgewiesen werden (Abb.13).

Auf Grund des geringen Probenmaterials konnte keine Vergleichsgruppe mit Patientinnen, die eine Fehlgeburt erlitten, erstellt werden.

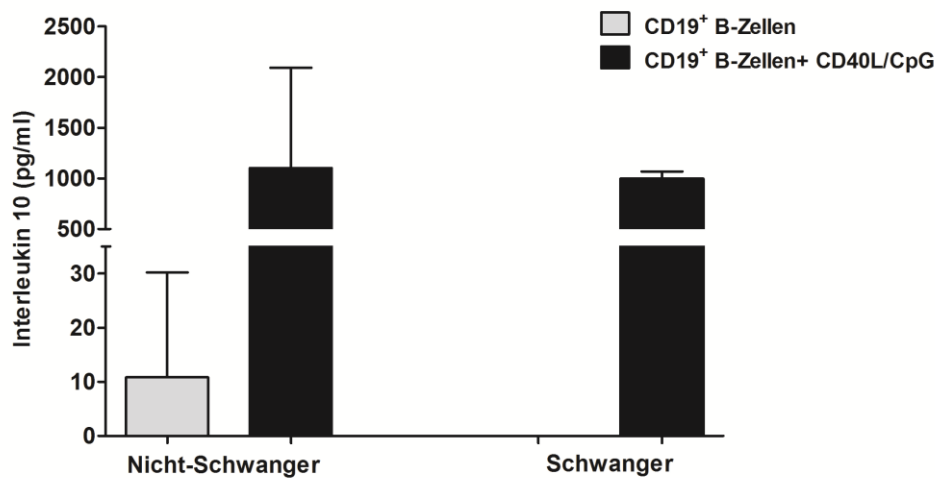


Abbildung 13: CD19⁺B-Zellen sezernieren während der Frühschwangerschaft nicht vermehrt IL10. Mittels ELISA wurde die Konzentration von IL10 in den Überständen nach 72 Stunden Kultur CD19⁺B-Zellen schwangerer und nicht-schwangerer Frauen bestimmt. Es ergab sich kein Anstieg der IL10-Sekretion der CD19⁺B-Zellen im 1. Trimester der Schwangerschaft im Vergleich zu Nicht-Schwangeren. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4.

3.2.2 Einfluss der CD19⁺B-Zellen auf die Zytokinsekretion von CD4⁺ T-Zellen während der Frühschwangerschaft

1993 wurde von Wegmann und Kollegen die Hypothese aufgestellt, dass eine TH2 antiinflammatorisch geprägte Zytokinantwort schwangerschaftserhaltend wirkt, während eine proinflammatorische Th1-Zytokinproduktion eine Fehlgeburt unterstützt [Wegmann et al. 1993]. Auch wenn dieses Paradigma kritisch betrachtet werden muss [Chaouat 2007], so konnte doch gezeigt werden, dass gerade TNF α und IFN γ bei Frauen, die wiederholt Fehlgeburten aufwiesen, signifikant im Serum erhöht sind [Shaarawy und Nagui 1997]. Ebenfalls scheint das Zytokin IL-17 bei der Pathophysiologie von Fehlgeburten eine Rolle zu spielen, da auch hier ein Anstieg im Serum von Frauen mit Aborten nachweisbar war [Wang et al. 2010b]. Daher ist festzustellen, dass für den Schwangerschaftserhalt ein ausgewogenes Verhältnis der einzelnen Zytokine notwendig ist. IL10 ist nachweislich in der Lage, dieses Zytokinverhältnis zu steuern, indem es sowohl die TH1- als auch die TH2 T-Zell-Antwort reguliert [Del Prete et al. 1993].

Schlussfolgernd stellte sich für diese Arbeit die Frage, ob IL10 produzierende B-Zellen schwangerer Frauen einen Einfluss auf die proinflammatorische Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen haben.

3.2.2.1 CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen supprimieren die TNF α - und IFN γ -Expression CD4⁺ T- Zellen

Zur Bestimmung des Einflusses von CD19⁺B-Zellen auf CD4⁺T-Zellen wurden diese aus dem Blut schwangerer und nicht-schwangerer Frauen isoliert und mit T-Zellen nicht-schwangerer Frauen kokultiviert. Nach 72 Stunden erfolgte die Messung des prozentualen Anteils an CD4⁺TNF α ⁺-, CD4⁺IFN γ ⁺- und CD4⁺IL17⁺T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

In der Kokultur von CD4⁺T-Zellen mit CD19⁺B-Zellen konnte gezeigt werden, dass B-Zellen von schwangeren Frauen im 1. Trimester zumindest in vitro in der Lage sind, den Anteil der CD4⁺TNF α ⁺T-Zellen signifikant zu reduzieren. Stammt die B-Zellen aus dem Blut nicht-schwangerer Probanden so war kein Abfall des Anteils der CD4⁺TNF α ⁺T-Zellen zu verzeichnen. Die Suppression der Zytokinexpression in der Gruppe der Schwangeren war dabei unabhängig von der Stimulation der B-Zellen (Abb.14).

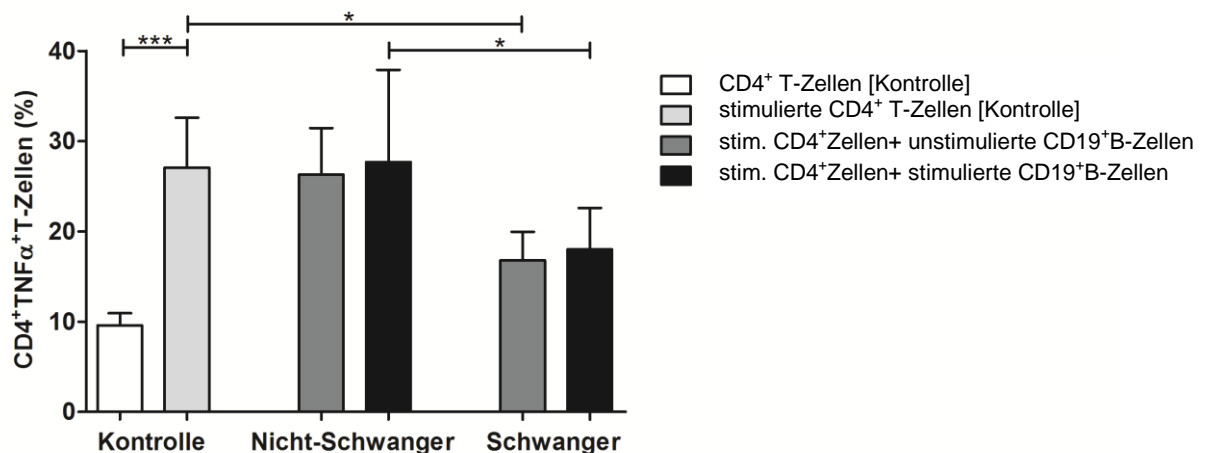


Abbildung 14: Die TNF α -Expression stimulierter CD4⁺T-Zellen ist bei Kokultur mit CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen supprimiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺TNF α ⁺ Zellen an der Gesamt T-Zellpopulation nach Kokultur mit CD19⁺B-Zellen von schwangeren und nicht-schwangeren Frauen bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte CD4⁺T-Zellen. Stimulierte und unstimulierte B-Zellen schwangerer Frauen führten zu einem signifikanten Abfall der TNF α Expression stimulierter T-Zellen im Vergleich zu B-Zellen nicht schwangerer Frauen. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4, Mann-Whitney-U-Test, , * p < 0,05; ** p < 0,005.

Weiterhin wurde im gleichen Experiment auch der Anteil der CD4⁺IFN γ ⁺T-Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich zunächst, dass der Anteil der CD4⁺IFN γ ⁺T-Zellen bei Kokultur mit CD19⁺B-Zellen sowohl in der Gruppe der Schwangeren als auch der Nicht-Schwangeren ansteigt. Dieser Anstieg ist in der Gruppe der Nicht-Schwangeren statistisch signifikant. Auffällig ist jedoch, dass (niedriger ausfällt, wenn die B-Zellen von schwangeren Frauen stammten. Somit kommen wir zu dem Schluss das CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen unabhängig von

ihrer Stimulation zu einer geringeren Induktion der IFN γ -Expression der CD4⁺T-Zellen führen als B-Zellen Nicht-Schwangerer Frauen. (Abb.15)

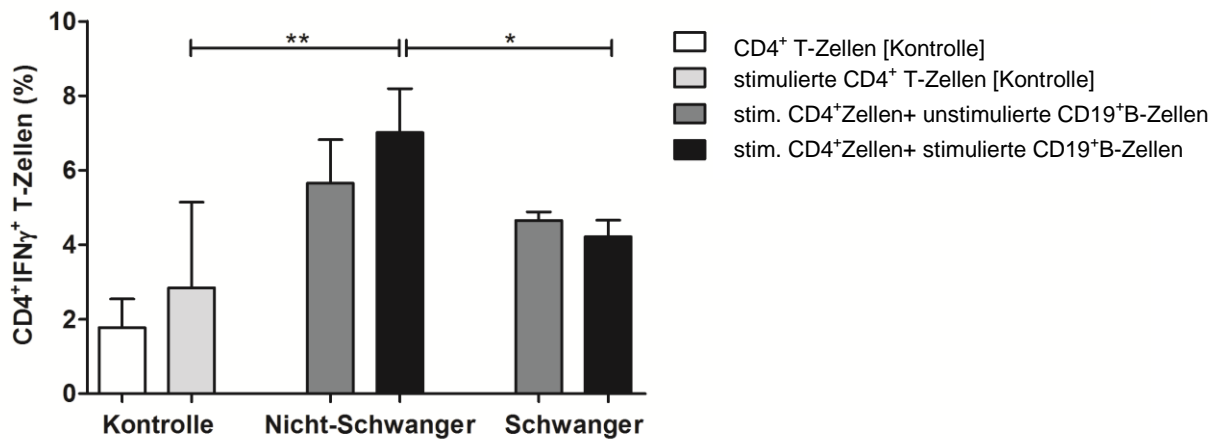


Abbildung 15: Die IFN γ -Expression stimulierter CD4⁺T-Zellen sinkt bei Kokultur mit stimulierten CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺IFN γ ⁺ Zellen an der Gesamt T-Zellpopulation nach Kokultur mit B-Zellen von schwangeren und nicht-schwangeren Frauen bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte CD4⁺T-Zellen. Der Anteil an CD4⁺IFN γ ⁺ stimulierter T-Zellen ist signifikant niedriger bei Kokultur mit B-Zellen von schwangeren Frauen im Vergleich zur Kokultur mit B-Zellen nicht schwangerer Frauen. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4, Mann-Whitney-U-Test, * p < 0,05; ** p < 0,005.

Des Weiteren wurde die IL17-Expression der CD4⁺T-Zellen untersucht. Die Kokultur von B-Zellen mit stimulierten T-Zellen führte sowohl in der Gruppe der Schwangeren als auch bei den Nicht-Schwangeren zu einem Anstieg des Anteils der CD4⁺IL17⁺ T-Zellen. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden. (Abb.16)

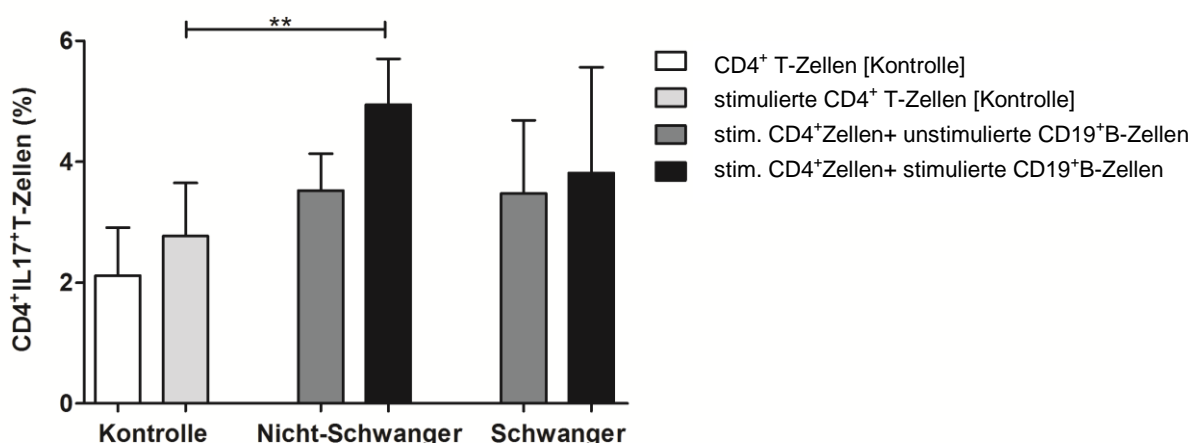


Abbildung 16: IL17-Expression stimulierter CD4⁺T-Zellen bleibt bei Kokultur mit B-Zellen schwangerer Frauen unverändert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der CD4⁺IL17⁺T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte CD4⁺T-Zellen. Die IL17 Expression der CD4⁺T-Zellen nimmt bei Kokultur durch B-Zellen sowohl in der

Gruppe der Schwangeren als auch bei Nicht-Schwangeren zu. Es konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4.

3.2.2.2 Der Überstand von CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen verringert die TNF α Expression der CD4⁺T-Zellen

Im vorhergehenden Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass B-Zellen, isoliert aus dem Blut schwangerer Frauen, fähig sind die TNF α Expression von CD4⁺T-Zellen zu reduzieren. Es stellte sich folglich die Frage, ob der zelluläre Kontakt untereinander für die Suppression der Zytokinexpression notwendig war oder zusätzlich lösliche, von den B-Zellen sekretierte, Faktoren eine Rolle spielten.

Daher wurden im zweiten Teil des Experimentes die CD4⁺T-Zellen allein mit den Überständen der B-Zell-Kultur kultiviert.

Es konnte festgestellt werden, dass der Überstand sowohl stimulierter als auch unstimulierter B-Zellen, welche von schwangeren Frauen isoliert wurden, den prozentualen Anteil der CD4⁺TNF α ⁺T-Zellen signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe bestehend aus ausschließlich stimulierten CD4⁺T-Zellen. Der Überstand von B-Zellen nicht-schwangerer Frauen führte zu einem geringen nicht signifikantem Abfall des Anteils CD4⁺TNF α ⁺T-Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Nicht-Schwangeren und Schwangeren blieb jedoch aus. (Abb.17)

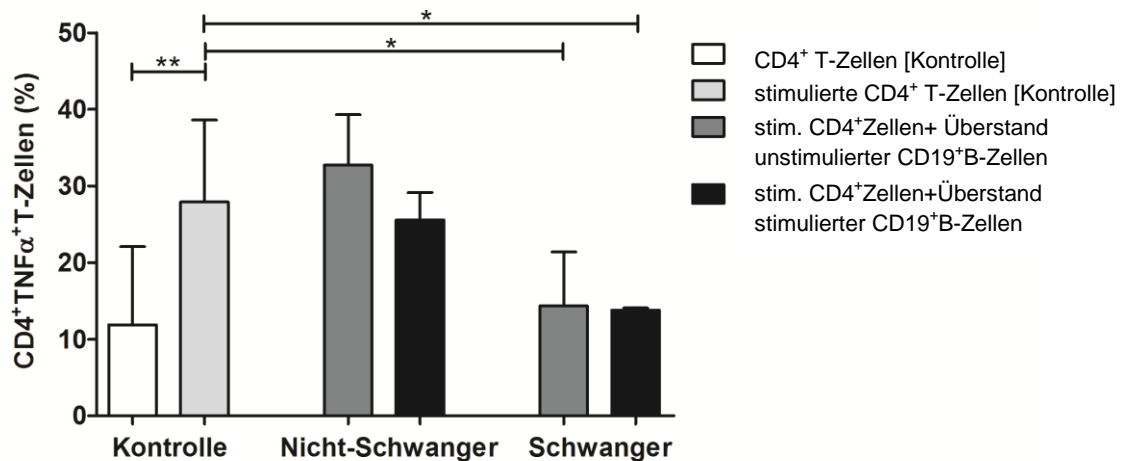


Abbildung 17: Der Überstand sowohl stimulierter als auch unstimulierter B-Zellen schwangerer Frauen supprimiert die TNF α Expression von CD4⁺T-Zellen. Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils an CD4⁺TNF α ⁺T-Zellen an der Gesamtmenge der T-Zellen bei Kokultur mit Überstand aus unstimulierten und stimulierten CD19⁺B-Zell-Kulturen, isoliert von Schwangeren als auch Nicht-Schwangeren. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte CD4⁺T-Zellen. Sichtbar ist eine Reduktion der TNF α -Expression bei Kultur mit dem Überstand von CD19⁺B-Zellen isoliert von Schwangeren im Vergleich zu stimulierten CD4⁺T-Zellen. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4, Mann-Whitney-U-Test, * p< 0,05; ** p< 0,005.

Bei der Betrachtung der IFN γ Expression der T-Zellen bei Kultur mit dem Überstand stimulierter oder unstimulierter CD19⁺B-Zellen von Schwangeren konnte keine signifikante Reduktion verzeichnet werden. (Abb.18)

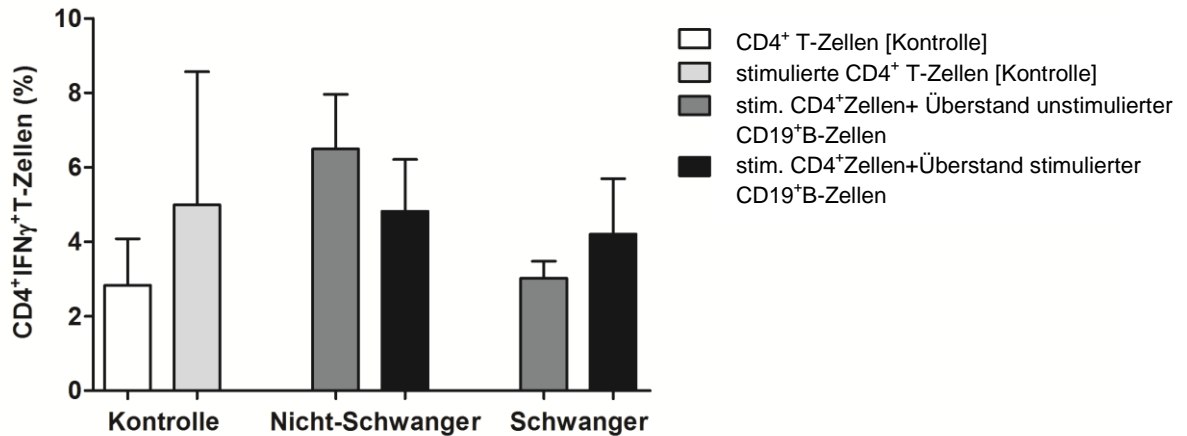


Abbildung 18: Die Kultur der CD4⁺T-Zellen mit dem Überstand kultivierter B-Zellen von schwangeren Frauen führt nicht zu einer Reduktion der IFN γ -Expression der CD4⁺T-Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺IFN γ ⁺T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen nach 72 Stunden Kultur mit dem Überstand der CD19⁺B-Zell-Kultur bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte CD4⁺T-Zellen. Es zeigten sich in beiden Gruppen vergleichbare Level an CD4⁺IFN γ ⁺T-Zellen bei Kultur mit dem Überstand stimulierter B-Zellen. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei der Expression von IL17. Sowohl in der Gruppe der Nicht-Schwangeren als auch der Schwangeren, fanden sich vergleichbare Level an CD4⁺IL17⁺ T-Zellen bei Kultur mit dem Überstand unstimulierter und stimulierter CD19⁺B-Zellen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb.19).

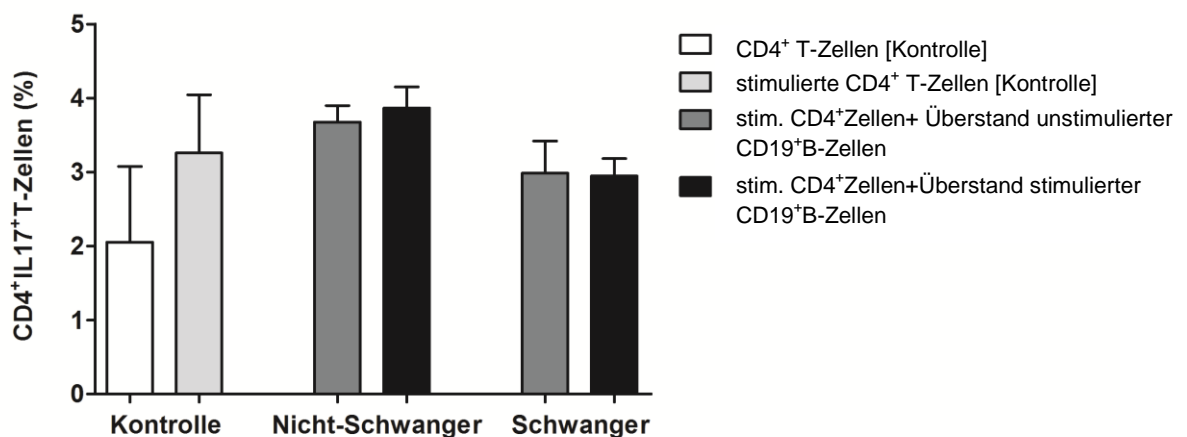


Abbildung 19: Überstand aus der B-Zellkultur, isoliert aus dem Blut schwangerer Frauen, nimmt keinen Einfluss auf die IL17-Expression von CD4⁺T-Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil CD4⁺IL17⁺ T-Zellen an der Gesamtmenge der kultivierten T-Zellen nach 72 Stunden

Kultur mit dem Überstand stimulierter und unstimulierter B-Zellen, isoliert von Schwangeren und Nicht-Schwangeren bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte und stimulierte CD4⁺T-Zellen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4.

3.2.3 Die Kokultur der Trophoblastzelllinie SWAN-71 mit CD19⁺B-Zellen hat keinen Einfluss auf die IL10 Expression der B-Zellen

Ramhorst und Kollegen konnten zeigen, dass Trophoblastzellen in der Lage sind die Differenzierung regulatorischer T-Zellen zu unterstützen [Ramhorst et al. 2012]. Es stellte sich daher die Frage, ob ähnliches auch für regulatorische B-Zellen gilt. Weiterhin ergab sich die Frage, diese Interaktion im Kontext einer Infektion zu betrachten. Aus dem Mausmodell ist bekannt, dass IL10 defiziente Mäuse in einer keimfreien Umgebung in der Lage sind eine normale Schwangerschaft auszutragen [Svensson et al. 2001]. Die Exposition mit LPS, einem Bestandteil von Bakterienmembranen, führt jedoch bei IL10 defizienten Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp zu einer erhöhten Abortrate [Murphy et al. 2005]. Nach Gabe von rekombinanten IL10 wiederum sinkt die Abortrate signifikant ab [Robertson et al. 2007], sodass IL10 eine bedeutende Rolle im Rahmen der Schwangerschaftserhaltung bei Infektionen spielt. Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich daher mit der IL10 Expression von CD19⁺B-Zellen bei Kokultur mit Trophoblastenzellen sowie bei Imitierung einer Infektion.

Dafür wurden CD19⁺B-Zellen nicht schwangerer Frauen mit der Zelllinie SWAN-71 48 Stunden kokultiviert. Zur Imitation einer Infektion wurde der Kokultur entweder LPS oder CpG hinzugefügt. Beide Substanzen sind Bestandteile von Bakterien und imitieren über die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren eine Infektion. Anschließend erfolgte die Messung des prozentualen Anteiles der CD19⁺IL10⁺B-Zellen am Gesamtanteil der isolierten B-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Der Anteil der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen sank bei Kokultur mit SWAN-71 ab im Vergleich zur alleinigen Kultur der B-Zellen im Medium, jedoch blieb ein statistisch signifikanter Unterschied aus, sodass kein Einfluss der SWAN-71 auf den Anteil der CD19⁺IL10⁺B-Zellen fest zustellen war. Die Kultur mit LPS und CpG führte wiederum zu einem Anstieg des Anteils der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen bei Kokultur mit SWAN-71 Zellen. Dabei erreichten die Werte ein ähnlich hohes Niveau bei Kokultur mit SWAN-71 Zellen wie bei CD19⁺Zellen, die ohne SWAN-71-Zellen kultiviert wurden. Zu beachten ist, dass die Stimulation der CD19⁺Zellen, die ohne Trophoblastenzellen kultiviert wurden, mit LPS oder CpG nicht zu einer signifikanten Zunahme des Anteils der CD19⁺IL10⁺B-Zellen führte. (Abb.20)

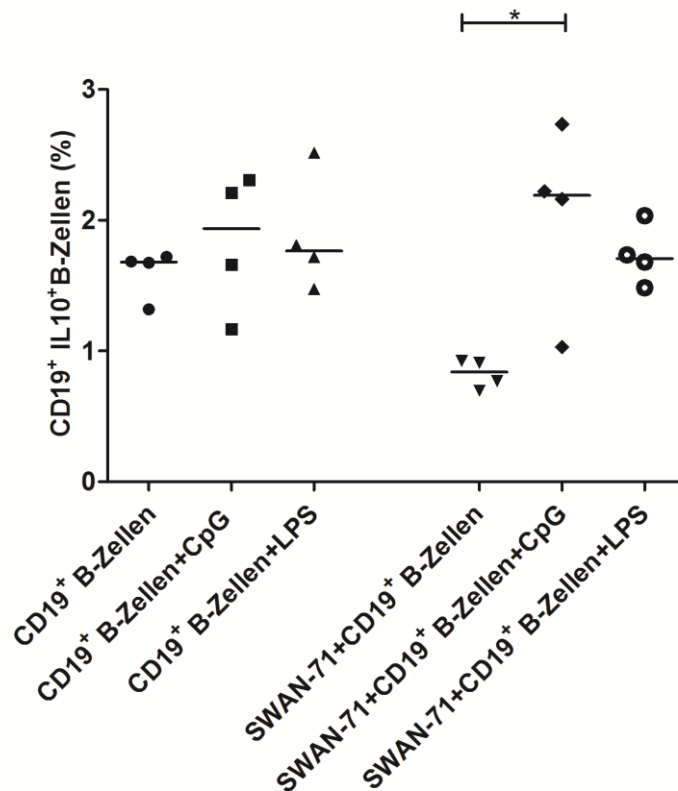


Abbildung 20: Die Kokultur der Trophoblastzelllinie SWAN-71 mit CD19⁺B-Zellen nimmt keinen Einfluss auf die IL10 Expression der B-Zellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen an der Gesamt-B-Zellfraktion von nicht-schwangeren Frauen nach 48stündiger Kokultur mit SWAN-71 Trophoblastenzelllinie bestimmt. Als Kontrolle diente die alleinige Kultur von B-Zellen in Medium. Eine Infektion wurde mit der Zugabe von CpG und LPS imitiert. Die Anzahl der CD19⁺IL10⁺B-Zellen war bei Kokultur mit SWAN-71 Zellen nicht signifikant reduziert. Die Zugabe von CpG führte zu einem signifikanten Anstieg CD19⁺IL10⁺ B-Zellen bei Kokultur mit SWAN-71 Zellen. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4, Friedmann-Test/Dunns Post Test, * p< 0,05.

3.2.4 Serum schwangerer Frauen erhöht den Anteil der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ungefähr 95% der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ regulatorischen B-Zellen auf ihrer Oberfläche den hCG-Rezeptor exprimieren. Weiterhin induzierte die Kultur von CD19⁺B-Zellen mit hCG eine erhöhte IL10-Expression (Daten von A.Morell-Garcia erhoben). Dies unterstützte die These, dass das Schwangerschaftshormon hCG in der Lage ist die Umwandlung von CD19⁺B-Zellen zu regulatorischen IL10⁺ B-Zellen zu unterstützen. Auf dieser Grundlage sollte festgestellt werden, ob lösliche Faktoren im Serum schwangerer Frauen in der Lage sind den Anteil an CD19⁺ B-Zellen zu stimulieren.

Dafür wurden PBMZs von nicht-schwangeren Frauen mit dem Serum von schwangeren Frauen im 1.Trimester für 48 Stunden kultiviert. Als Vergleichsgruppe dienten die Kultur der PBMZs mit autologem Serum, sowie Serum von Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten haben. Als Positivkontrolle wurden PBMZ mit CD40L und CpG

stimuliert. Der prozentuale Anteil der CD19⁺IL10⁺Zellen an den PBMZ wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Der Anteil der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen war bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen signifikant erhöht im Vergleich zur Kultur der Zellen ohne Zusatz. Weiterhin zeigte sich ein Abfall des Anteils der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen bei Kultur mit Serum von Frauen, welche eine Fehlgeburt erlitten hatten, im Vergleich zur Kultur der PBMZ mit Serum von normal schwangeren Frauen, jedoch ohne Signifikanz. In der Positivkontrolle, die Kultur mit CD40L und CpG, war der erwartete Anstieg der IL10-Expression ähnlich hoch wie bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen. (Abb.21)

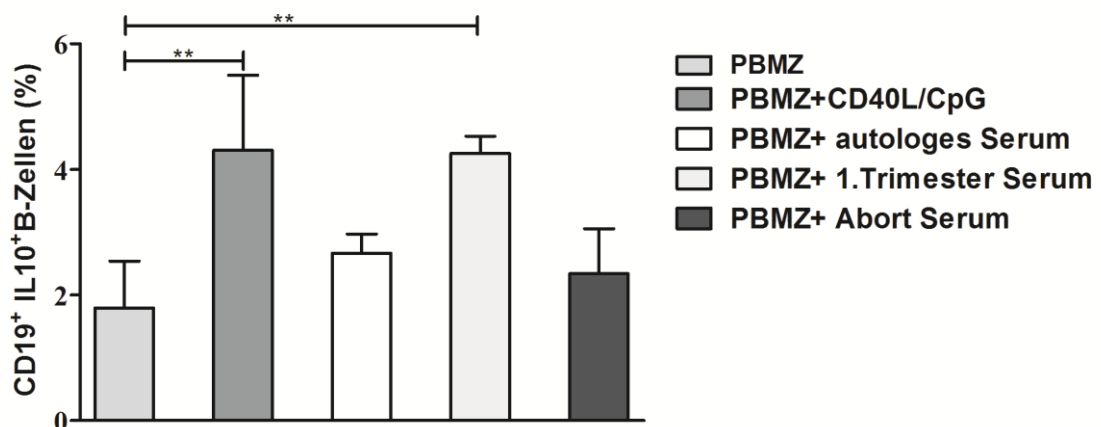


Abbildung 21: Der Anteil der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen ist bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen signifikant erhöht. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der CD19⁺IL10⁺ B-Zellen an der Gesamtfraktion der PBMZ bestimmt, nachdem diese mit Serum von schwangeren Frauen, sowie autologen Serum und mit Serum von Frauen, die einen Abort hatten, kultiviert wurden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL10 Expression der CD19⁺ B-Zellen bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen im Vergleich zur alleinigen Kultur der CD19⁺B-Zellen. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=4, Friedmann-Test/Dunns-Post-Test, * p< 0,05; ** p< 0,005.

3.3 Die BAFF-Konzentration im Serum ist während der Schwangerschaft nicht erhöht

Der B-Zell aktivierende Faktor, engl. Baff, gehört zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren und stellt einen essentiellen Faktor bei der B-Zell-Reifung und für das Überleben von B-Zellen dar [Schiemann et al. 2001]. Weiterhin führt BAFF im *in vitro* Mausmodell zur Induktion von IL10⁺regulatorischen B-Zellen [Yang et al. 2010]. Interessanterweise konnten Guo und Kollegen eine erhöhte Expression des BAFF-Moleküls in Trophoblast- und Deziduaellen von schwangeren Frauen im 1.Trimester nachweisen. Bei Frauen mit wiederholten Fehlgeburten lag das Expressionslevel deutlich niedriger als bei einer normalen Schwangerschaft [Guo et al. 2008].

Daraus ergab sich für diese Arbeit die Frage, ob BAFF möglicherweise eines der Moleküle ist, welches die Erhöhung der regulatorischen B-Zellen in der Frühschwangerschaft auslöst. Daher wurden Serumproben von schwangeren Frauen im 1. Trimester, Patientinnen, die einen Abort erlitten und von Nicht-Schwangeren auf ihren Gehalt an BAFF mittels ELISA überprüft.

Es konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede bei der Konzentration des BAFFs festgestellt werden (Abb. 22)

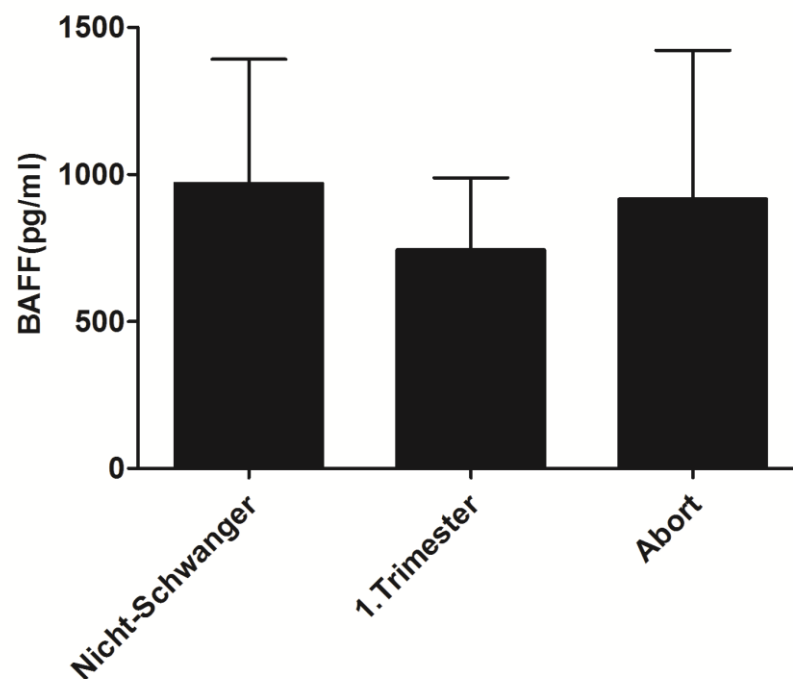


Abbildung 22: Die Konzentration von BAFF ist im Serum schwangerer Frauen nicht erhöht. Mittels ELISA wurde die Konzentration von BAFF im Serum schwangerer Frauen, nicht-schwangerer Frauen und Patientinnen, die eine Fehlgeburt erlitten, bestimmt. Es konnte zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Darstellung als Median mit Maximalwert, n=9.

4 Diskussion

Eine erfolgreiche Schwangerschaft stellt ein einzigartiges und komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl an Komponenten dar. Der semiallogene Embryo, mit mütterlichen und väterlichen Genanteilen ausgestattet, wächst nach der Befruchtung über 38 Wochen zu einem lebensfähigen Neugeborenen heran. Das mütterliche Immunsystem steht in dieser Zeit vor der Herausforderung durch Interaktion verschiedenster Zellen eine Toleranz gegenüber dem Fetus zu entwickeln ohne ein ausreichende Infektabwehr zu vernachlässigen. Eine Vielzahl an Immunzellen wie T-Zellen, Mastzellen oder dendritische Zellen wurden bereits als essentiell für eine erfolgreiche Schwangerschaft identifiziert. B Zellen und insbesondere regulatorische B-Zellen standen jedoch bisher selten im Fokus der Betrachtungen.

4.1 Regulatorische B-Zellen sind in der Frühschwangerschaft des Menschen erhöht

Erste Studien über die Anzahl der B-Zellen im Blut schwangerer Frauen gab es bereits 1994. Bhat und Kollegen konnten zeigen, dass die Anzahl der B-1-B-Zellen während der Schwangerschaft im Vergleich zu Nicht-Schwangeren verringert ist. Die gesamte B-Zell-Population blieb dabei aber stabil [Bhat et al. 1995]. In dieser Studie wurde aber nicht der Verlauf der B-Zell-Population über die verschiedenen Trimester betrachtet. Watanabe und Kollegen kamen 1997 zu einem ähnlichen Schluss. Sie zeigten, dass die absolute Zahl der B-1-B-Zellen in der Schwangerschaft sinkt [Watanabe et al. 1997]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten ergaben, dass der prozentuale Anteil der CD19⁺B-Zellen insbesondere in der Frühschwangerschaft ähnlich dem der Nicht-Schwangeren ist. Jedoch verzeichneten wir einen Abfall der CD19⁺ B-Zellen im 3.Trimester. Die Arbeitsgruppe Mahmoud und Kollegen, die 2001 den Anteil der CD19⁺Zellen bei kuwaitischen Frauen im 3.Trimester untersucht haben, kamen zu einem ähnlichen Schluss [Mahmoud et al. 2001]. Die Ursache in diesem Abfall liegt möglicherweise am hemmenden Einfluss der Schwangerschaftshormone wie Östradiol auf die Lymphopoese [Medina und Kincade 1994] und dient damit der Vorbereitung eines proinflammatorischen Milieus für die anstehende Entbindung.

Unsere Arbeitsgruppe konnte am Mausmodell nachweisen, dass regulatorische B-Zellen bei normal-schwangeren Mäusen erhöht sind. Bei Mäusen, die unter Spontanaborten litten, konnte ein Anstieg der regulatorischen B-Zellen nicht nachgewiesen werden [Jensen et al. 2013]. Auf Grund eines mangelnden einheitlichen Phänotyps unter den regulatorischen B-Zellen beim Menschen, erfolgte die Untersuchung der zwei, in der Literatur am häufigsten erwähnten, Phänotypen, die CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B-Zellen sowie die CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Population. Ihr

einheitliches Charakteristikum ist die Produktion von IL10. Durch diese Arbeit erfolgte der Nachweis, dass der Anteil der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B-Zellen im 1. Trimester erhöht ist und im Laufe der Schwangerschaft absinkt. Interessanterweise ergab sich bei Patientinnen, die eine Fehlgeburt erlitten, kein Anstieg des Anteils der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B-Zellen. Da bisher kein einheitlicher Phänotyp der regulatorischen B-Zellen existiert, betrachteten wir zusätzlich einen weiteren Subtyp der regulatorischen B-Zellen. Die CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Population zeichnet sich auch über eine Produktion von IL10 aus. Sie ist signifikant im 3. Trimester erniedrigt. Die Ergebnisse korrelieren mit der Arbeitsgruppe Lima und Kollegen, welche in einem höheren Stichprobenumfang eine signifikante Reduktion der Anzahl an CD24^{hi}CD38^{hi} regulatorischen B-Zellen bei Frauen im 3. Trimester im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen feststellen konnten [Lima et al. 2016]. Die Anzahl an regulatorischen B-Zellen im peripheren Blut im 1. Trimester der Schwangerschaft wurde in der Publikation nicht untersucht.

Nichtsdestotrotz kann festgestellt werden, dass IL10 produzierende regulatorische B-Zellen im 1. Trimester ansteigen und über den Verlauf der Schwangerschaft abfallen. Da regulatorische B-Zellen über die Sekretion von IL10 immunsuppressive Effekte aufweisen, insbesondere die Hemmung der proinflammatorischen T-Zell-Zytokin Antwort, ist ihr Anstieg möglicherweise bedeutend für den Erhalt der Frühschwangerschaft. So ist die IL10 Sekretion essentiell um den Embryo vor Infektionen und Wachstumsretardierung zu schützen [Robertson et al. 2007]. Der Abfall der regulatorischen B-Zellen im 3. Trimester unterstützt wiederum die Hypothese von Mor und Kollegen, dass für eine erfolgreiche Entbindung ein proinflammatorisches Zytokinmilieu vorherrschend ist [Mor und Cardenas 2010].

4.2 CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen produzieren in der Frühschwangerschaft nicht vermehrt IL10

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass der Anteil der regulatorischen B-Zellen im 1. Trimester der Schwangerschaft erhöht ist. Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die IL10 Expression der B-Zellen in der Frühschwangerschaft ansteigt. Es konnte jedoch keine vermehrte Expression von IL10 durch CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen nach Stimulation *in vitro* festgestellt werden. Auch bei der quantitativen Bestimmung von IL10 sekretiert durch CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen ergab sich in der *in vitro* Kultur kein Unterschied zu der Gruppe der nicht schwangeren Versuchspersonen. Demzufolge scheinen regulatorische B-Zellen in der Schwangerschaft zwar in ihrer Anzahl erhöht zu sein, die Funktionalität im Sinne der IL10 Expression und Sekretion bleibt jedoch primär unverändert. Zu vermuten ist, dass

ein komplexes Zusammenspiel zellulärer und löslicher Komponenten notwendig ist um die IL10 Produktion der regulatorische B-Zellen zu aktivieren. Hier wird im Punkt 4.4 und 4.5 näher darauf eingegangen.

Vorstellbar ist zusätzlich, dass regulatorische B-Zellen nicht nur über die Expression von IL10 wirken. So konnte Bouaziz und Kollegen 2010 zeigen, dass regulatorische B-Zellen nach Stimulation in der Lage sind IL4, IL6, IL12 sowie IFN γ zu synthetisieren [Bouaziz et al. 2010]. Zusätzlich konnten Saze und Kollegen 2012 eine weitere Unterform humaner regulatorischer B-Zellen nachweisen, welche sich über die Expression von CD73 und CD39 charakterisieren und über eine Konversion von Adenosin-Triphosphat zu 5-Adenosinmonophosphat anti-proliferativ auf die T-Zell Entwicklung einwirken und damit eine IL10 unabhängige immunsuppressive Funktion aufweisen [Saze et al. 2013]. Darüber hinaus bewiesen Ray und Kollegen im Mausmodell, dass IL10 defiziente B-Zellen ähnlich wie normale B-Zellen eine Proliferation FoxP3⁺regulatorischer T-Zellen über die Expression glukokortikoid-induzierten TNFR-Liganden induzieren [Ray et al. 2012].

4.3 B-Zellen reduzieren in der Frühschwangerschaft die proinflammatorische Zytokinantwort von T-Helferzellen

Mauri und Kollegen bewiesen 2003 anhand des Mausmodells für chronische Arthritis, dass IL10 produzierende B-Zellen die Th1-Immunantwort von T-Zellen supprimieren und damit das Voranschreiten der Erkrankung vermindern [Mauri et al. 2003]. Damit konnte gezeigt werden, dass B-Zellen auch immunsuppressive Fähigkeiten besitzen. Auch wenn das alte Konzept des Th1-geprägten Zytokinprofils in der frühen Schwangerschaft verlassen wurde, so scheint doch eine Störung dieses Milieus mit einem Überhang an proinflammatorischen Zytokinen dem Schwangerschaftserhalt negativ zu beeinflussen. So konnte Azizieh und Kollegen zeigen, dass bei Frauen mit wiederholten Fehlgeburten der Anteil an TNF α , als proinflammatorisch wirksames Zytokin, im Blut im Vergleich zu gesunden Schwangeren im 1. Trimester erhöht ist [Azizieh und Raghupathy 2015]. Des Weiteren wurde im Mausmodell demonstriert, dass eine übermäßige Aktivität des TNF α -Signalweges zu Schäden im fetalen Hirn sowie Schwangerschaftsverlust führt. Die Anwendung eines TNF α -Antagonisten führte zu einem Rückgang der Abortrate sowie der Rate der Hirnschädigung [Carpentier et al. 2011]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass B-Zellen schwangerer Frauen, unabhängig ihrer Aktivierung, die TNF α Expression CD4⁺T-Zellen inhibieren. B-Zellen nicht schwangerer Frauen führen zu einem Anstieg der TNF α -Expression CD4⁺T-Zellen. Die Kultur der CD4⁺-T-Zellen mit dem Überstand kultivierter CD19⁺-B-Zellen, isoliert aus dem Blut schwangerer Frauen, führt auch zur Reduktion der TNF- α

Expression der CD4⁺T-Zellen. Damit ist zu vermuten, dass sowohl der direkte zelluläre Kontakt als auch lösliche Faktoren für die Reduktion der Zytokinexpression verantwortlich sind. Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe am Mausmodell zeigen ein ähnliches Ergebnis. Wir konnten zeigen, dass B-1a-B-Zellen schwangerer Mäuse die TNF α Sekretion der CD4⁺T-Zellen inhibiert [Muzzio et al. 2014b]. Interessanterweise belegt diese Arbeit, dass B-Zellen schwangerer Frauen bereits *in vivo* aktiviert zu sein scheinen und damit die Zytokinexpression der T-Helfer-Zellen hemmen. Isolierte CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ Zellen gesunder, nicht schwangerer Probanden sind auch in der Lage die Zytokinantwort der CD4⁺T-Zellen zu hemmen [Iwata et al. 2011]. In unserem Zellkulturexperiment induzierte die Verwendung der gesamten CD19⁺Zellpopulation nicht-schwangerer Frauen jedoch keine signifikante Reduktion der Zytokinantwort. Damit scheinen CD19⁺B-Zellen Schwangerer die gleiche Potenz aufzuweisen wie reine CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺regulatorische B-Zellen Nicht-Schwangerer. Zu erklären ist dies möglicherweise mit dem von uns gezeigten erhöhten Anteil der regulatorische B-Zellen am Gesamtanteil der CD19⁺Zellen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass B-Zellen schwangerer Frauen die IFN γ Expression der CD4⁺T-Zellen hemmen, im Gegensatz zu B-Zellen nicht-schwangerer Frauen. Diese Hemmung schien jedoch von einem direkten Zellkontakt abhängig zu sein, da die Kultur mit dem Überstand der B-Zellen zur Suppression der Zytokinantwort nicht ausreichte. IFN γ als proinflammatorisches Zytokin scheint eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Präeklampsie einzunehmen. So zeigten Frauen mit Präeklampsie erhöhte Werte von IFN γ im Plasma als auch in zirkulierenden Lymphozyten, was mit Gefäßveränderungen einhergeht [Murphy et al. 2009]. Da die Arbeitsgruppe Maseda und Kollegen 2013 zeigen konnten, dass IL10 produzierende regulatorische B-Zellen im Mausmodell für Kolitis die IFN γ Produktion der CD4⁺T-Zellen inhibieren können [Maseda et al. 2013], liegt die Vermutung nahe, dass auch im Menschen regulatorische B-Zellen in der Schwangerschaft zum ausgewogenen Verhältnis der IFN γ -Konzentration beitragen.

Muzzio und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit mit B1a-B-Zellen von Mäusen, dass diese in der Lage sind während der normalen Schwangerschaft die Th17-Differenzierung der CD4⁺T-Zellen zu hemmen und damit die IL17 Sekretion zu reduzieren. Proinflammatorisch wirkendes IL17 war nachweislich bei Frauen mit wiederholten Schwangerschaftsverlusten und Frauen, die an Präeklampsie litten erhöht, sodass eine überschießende TH17-Differenzierung als Mediator für Entzündung, Gewebszerstörung und letztendlich Schwangerschaftsgefährdung angesehen werden kann [Wang et al. 2010a; Jianjun et al. 2010; Toldi et al. 2011]. Doch konnten wir mit dieser Arbeit die Ergebnisse aus dem Mausmodell nicht auf die menschliche

Schwangerschaft übertragen. Isolierte CD19⁺B-Zellen schwangerer Frauen waren nicht in der Lage die IL17 Expression der CD4⁺Zellen zu hemmen.

Insgesamt betrachtet ergibt dieser Teil der Arbeit Einblicke in die Regulation des Zytokinhaushaltes während der Schwangerschaft. Betrachtet man die Vielzahl an kontroversen Studien bezüglich der Zytokinexpression, so wird ein ausgewogenes Verhältnis der einzelnen Zytokine zum Schwangerschaftserfolg betragen. Möglicherweise haben hier die regulatorischen B-Zellen dabei die Funktion eine überschießende Immunantwort zu hemmen. Wir konnten zeigen, dass auch in der menschlichen Schwangerschaft B-Zellen die proinflammatorische Zytokinantwort der CD4⁺T-Zellen hemmen können. Interessanterweise nehmen diese regulatorische B-Zellen, wie oben gezeigt, zum 3.Trimester der Schwangerschaft ab. In Vorbereitung auf die nahestehende Entbindung ist dieser Abschnitt der Schwangerschaft von einem proinflammatorischen Milieu geprägt. So ist die Abnahme der Aktivität der regulatorischen B-Zellen als Vorbereitung für die nahende Geburt zu sehen.

4.4 Lösliche Faktoren im Serum induzieren die IL10 Expression bei B-Zellen in der Frühschwangerschaft

Nachdem zu Beginn der Arbeit eine Erhöhung der Anzahl der regulatorischen B-Zellen im 1.Trimester bei unveränderter Funktionalität festgestellt wurde, stellt sich nun die Frage, ob lösliche Faktoren im mütterlichen Serum die Funktionalität der B-Zellen beeinflusst. In der Durchflusszytometrie zeigte sich ein Anstieg des Anteils der CD19⁺IL10⁺Zellen bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen aus dem 1.Trimester. Kultivierte man die Zellen mit Serum von Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten, so blieb die IL10 Expression der B-Zellen vergleichbar mit der Kultur von autologen Serum. Diese Ergebnisse konnten nicht mittels Konzentrationsmessung durch ELISA bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). So bleibt lediglich eine beobachtete Tendenz, die es gilt zu bestätigen. Denkbar wäre auch, dass der Anteil regulatorischer B-Zellen in der Schwangerschaft hochreguliert ist ohne dass die Funktion der B-Zellen, nämlich aktiv IL10 zu sekretieren, beeinflusst wird, und sie erst bei Störung des Zytokinmilieus oder im Rahmen einer Infektion aktiviert werden.

Nichtsdestotrotz stellt sich die Frage, welche löslichen Faktoren im Serum zu einer erhöhten IL10 Produktion führen. Das Hauptaugenmerk unserer Arbeitsgruppe richtete sich dabei auf das Schwangerschaftshormon hCG. HCG wird kurz nach der Implantation durch Synzytiotrophoblastzellen sekretiert und fördert neben der Stimulation des Gelbkörpers zur Produktion von Progesteron die Gefäßbildung im Uterus und die Invasion des Trophoblasten in die Uteruswand [Zygmunt et al. 2002; Zygmunt et al. 2005]. Unsere Arbeitsgruppe konnte auf der Oberfläche von 95%

isolierter CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺regulatorischer B-Zellen eine Expression des LH/CG-Rezeptors nachweisen. Des Weiteren führte die Stimulation der CD19⁺B-Zellen mit rekombinanten hCG zu einem signifikanten Anstieg der IL10 Expression (Daten erhoben durch A. Morell-Garcia) sodass davon ausgegangen werden kann, dass hCG die Generierung regulatorischer B-Zellen positiv beeinflusst. Matsushita und Kollegen konnten anhand der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis bei Mäusen, dem Korrelat zur Multiple Sklerose des Menschen, zeigen, dass die Krankheitsentwicklung B-Zell-abhängig ist. So entwickelten B-Zell-defiziente Mäuse stärkere Symptome der Krankheit und insbesondere der Transfer IL10 produzierender regulatorische B-Zellen führt zu Symptombesserung [Matsushita et al. 2008]. Bei Patientinnen, die unter der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose leiden, ist nun während der Schwangerschaft die Rezidivrate um 80% reduziert [Finkelsztejn et al. 2011]. Damit lässt sich vermuten, dass regulatorische B-Zellen durch weibliche Sexualhormone aktiviert werden und möglicherweise zur Kontrolle der Immunantwort während der Schwangerschaft beitragen. Weitere Hinweise für die Bedeutung der Sexualhormone für die Entwicklung regulatorischer B-Zellen findet man darin, dass B-Zellen Östrogen-Rezeptoren exprimieren und dessen Aktivierung wiederum die weitere Entwicklung, Reifung und das Überleben der B-Zellen beeinflusst [Kincade et al. 2000]. Bodhankar und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit von 2011, erneut am Model für experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), dass Östrogen den Anteil der regulatorischen B-Zellen erhöht. Auch konnten sie nachweisen das Östrogen zur Besserung der Symptome der EAE führt, aber nur in Anwesenheit der B-Zellen [Bodhankar et al. 2011]. Daher mehren sich die Hinweise, dass auch Östrogen in der Schwangerschaft zur Expansion der regulatorischen B-Zellen führt. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass weder Östrogen noch Progesteron oder eine Kombination aus beiden Hormonen Einfluss auf den Phänotyp und die IL10 Sekretion regulatorischer B-Zellen nehmen konnten. Dagegen führte die Kokultur von CD19⁺B-Zellen mit hCG zu einem Anstieg der CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL10⁺B-Zellen [Fettke et al. 2016]. An dieser Stelle fügt sich auch unserer Beobachtung ein, dass der Anteil an B-Zellen bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen im 1. Trimester expandiert im Vergleich zur Kultur mit autologen Serum.

Insgesamt betrachtet scheinen regulatorische B-Zellen sensitiv auf die im mütterlichen Serum enthaltenen Faktoren, wie Sexualhormone, zu reagieren, indem ihre Anzahl vermehrt wird, wobei die Funktion IL10 zu produzieren unverändert fortbesteht. Weiterhin blieben die Fragen nach dem Einfluss der verschiedenen Sexualhormone auf die Funktion der B-Zellen *in vitro* insbesondere auch *in vivo* offen.

4.5 Trophoblastenzellen regulieren die Konversion der CD19⁺ Zellen zu regulatorischen B-Zellen

In der menschlichen Schwangerschaft entwickelt sich der Trophoblast aus den Blastomeren der befruchteten Eizelle und stellt durch Invasion und Bildung der Plazenta die Kontaktstelle für den mütterlichen und fetalen Austausch dar. Trophoblastzellen sekretieren Chemokine, die zur Anlockung anderer Immunzellen an die fetal-mütterliche Grenzfläche führt. Über die Ausschüttung von Zytokinen modulieren diese Zellen aber auch den Differenzierungsprozess verschiedener Immunzellen [Mor et al. 2011]. So rekrutieren Trophoblastzellen beispielsweise regulatorische T-Zellen und induzieren die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen [Ramhorst et al. 2012]. Zusätzlich zeigte sich, dass hCG sekretiert von Trophoblastenzelllinie JEG-3 zu einer Konversion der regulatorischen T-Zellen führt [Poloski et al. 2016]. In dieser Arbeit konnten wir einen ähnlichen Effekt auf regulatorische B-Zellen nicht nachweisen. Wir konnten zeigen, dass Trophoblastenzellen der Zelllinie SWAN 71 tendenziell einen hemmenden Einfluss auf die Konversion regulatorischer B-Zellen haben. Die Zelllinie SWAN-71 sekretiert im Vergleich zu Trophoblastzellen *in vivo* kein hCG. Da bereits gezeigt werden konnte, dass hCG die IL10-Expression CD19⁺B-Zellen stimuliert, erklärt sich damit möglicherweise die fehlende Konversion in regulatorische B-Zellen. Zusätzlich wird die Hypothese, dass hCG die Entwicklung regulatorischer B-Zellen induziert, unterstützt. Korrelierend mit dieser Hypothese zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass JEG-3 Trophoblastenzellen durchaus in der Lage sind sowohl direkt als auch über lösliche Faktoren die Expansion CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL10⁺Zellen wie auch die Sekretion von IL10 zu fördern. Dieser Zellanstieg konnte durch Blockade der hCG Sekretion mittels Antikörper verhindert werden, sodass die Expansion regulatorischer B-Zellen wie vermutet hCG abhängig ist [Fettke et al. 2016].

Möglichweise dienen regulatorische B-Zellen während der Schwangerschaft zusätzlich der Beihilfe zur Abwehr von Krankheitserregern von außen. Grundlage dieser Hypothese bietet unsere Beobachtung, dass durch Zugabe von CpG oder LPS ein Anstieg der IL10 Expression CD19⁺B-Zellen zu verzeichnen war. Schon länger ist bekannt, dass die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren via LPS oder CpG, beides bakterielle Bestandteile, zu einer Differenzierung der IL10 produzierenden regulatorischen B-Zellen führt [Yanaba et al. 2009; Iwata et al. 2011]. Robertson und Kollegen zeigten, dass IL10 defiziente Mäuse bei LPS Exposition höhere Raten an Wachstumsretardierung und Schwangerschaftsverlust aufwiesen einhergehend mit einem Anstieg an TNF und IL6, als Wildtypmäuse. Die Behandlung mit rekombinanten IL10 führte wiederum zu einer geringeren Abortrate unter LPS Exposition bei IL10

defizienten Mäusen. Folglich trägt IL10 durch Suppression inflammatorischer Moleküle zur erhöhten Widerstandsfähigkeit des Fetus gegenüber LPS-induzierten Pathologien bei [Robertson et al. 2007]. IL10 wirkt aber auch positiv auf die direkte Krankheitsabwehr, indem es NK-Zellen, CD8⁺-Memory-T-Zellen und Antikörper produzierenden B-Zellen aktiviert [Burdin et al. 1995; Foulds et al. 2006; Moore et al. 2001]. Damit scheinen regulatorische B-Zellen in der Schwangerschaft eine protektive Funktion im Rahmen der Infektionsabwehr einzunehmen. Möglicherweise haben aber auch die Trophoblastenzellen einen Anteil an der Aktivierung der regulatorischen B-Zellen im Kontext einer Infektion. Tangeras und Kollegen konnten nachweisen, dass menschliche Trophoblastenzellen zahlreiche Toll-like-Rezeptoren exprimieren und damit auch auf Stimuli wie LPS oder CpG reagieren [Tangeras et al. 2014]. Denkbar ist, dass durch diese Stimulation Trophoblastenzellen in der Lage sind regulatorische B-Zellen zu aktivieren.

Insgesamt betrachtet besteht die Möglichkeit, dass regulatorische B-Zellen über die Sekretion von IL10 im Kontext einer Infektion immunregulierend wirksam werden. Möglicherweise werden sie dabei durch Trophoblastenzellen unterstützt. Zu bedenken ist jedoch, dass unser Versuchsaufbau ein sehr artifizielles Konstrukt darstellt, da wir auf Grund der Verfügbarkeit eine Zelllinie verwendet haben, die zwar mit Trophoblasten *in vivo* vergleichbar ist, jedoch nicht alle Funktionen der menschlichen Trophoblasten aufweist. Des Weiteren gilt es auch die Interaktion von B-Zellen schwangerer Frauen mit Trophoblastenzellen zu betrachten. So kann unserer Arbeit nur erste Hinweise liefern. Konkrete Details und Aussagen müssen jedoch noch weiter untersucht werden.

4.6 B-Zell aktivierender Faktor (BAFF) beeinflusst nicht den Anteil der regulatorischen B-Zellen in der Schwangerschaft

Wir konnten zeigen, dass regulatorische B-Zellen in der Schwangerschaft erhöht sind und dass es Faktoren im Serum vorhanden sind, die diese Expansion bewirken. Festzustellen ist jedoch, dass BAFF nicht im Serum von schwangeren Frauen erhöht ist. Sowohl Nicht-Schwangere, Schwangere im 1. Trimester und auch Patientinnen, die einen Abort erlitten wiesen ähnliche Level an BAFF im Serum auf. Festzustellen ist, dass es in der Literatur unterschiedliche Konzentrationen an BAFF im Serum gibt. So bestimmten Kreuzaler und Kollegen 2012 bei gesunden Probanden ein Serumgehalt an BAFF von durchschnittlich 600pg/ml [Kreuzaler et al. 2012]. In unserer Messung lag der Wert bei der Nicht-Schwangeren Gruppe bei durchschnittlich 1000pg/ml. Bienertova-Vasku und Kollegen ermittelten bei Schwangeren zum Zeitpunkt der Geburt Konzentrationen von BAFF von ca. 100ng/ml [Bienertova-Vasku et al. 2015] und lagen

damit deutlich über den Werten unserer Arbeitsgruppe für das 1. Trimester. Bienertova-Vasku diskutieren in ihrem Bericht aber auch, dass sie verglichen mit anderen Messwerten ihrer Arbeitsgruppe keinen Unterschied im BAFF-Level zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren feststellen konnten [Bienertova-Vasku et al. 2015]. Muzzio et al. konnten dagegen im Mausmodell zeigen, dass die Level an BAFF zu Beginn der Schwangerschaft leicht ansteigen (nicht signifikant), jedoch am Tag 14 bis Ende der Schwangerschaft signifikant erniedrigt ist [Muzzio et al. 2014a]. Sie geben einen wichtigen Erklärungspunkt. So spielt BAFF auch eine bedeutende Rolle für die Generierung autoreaktiver B-Zellen. Die erniedrigten BAFF-Level während der Schwangerschaft werden als Schutzmechanismus gegen autoreaktive B-Zellen zum Erhalt der Schwangerschaft interpretiert [Muzzio et al. 2014a; Lesley et al. 2004]. Andererseits gibt es auch Hinweise für die Teilhabe von BAFF am komplexen Zusammenspiel der Zellen in der Schwangerschaft. Munoz-Fernandez und Kollegen konnten zeigen, dass Stromazellen der Dezidua, also die Gebärmutter Schleimhaut in der Schwangerschaft, BAFF exprimieren. Ferner noch sind diese Zellen in der Lage die Anostose von B-Lymphozyten zu hemmen [Muñoz-Fernández et al. 2012]. Auch wenn B-Lymphozyten in der Dezidua des Menschen nicht nachweisbar sind [Dietl et al. 1992], so scheint die Expression dieses Faktors und die damit verbundene Stimulation der B-Zellen möglicherweise Bedeutung zu erlangen im Kontext der Infektion und Entzündung während der Schwangerschaft [Muñoz-Fernández et al. 2012]. Auch Guo und Kollegen konnten zeigen, dass BAFF sowohl in der Dezidua als auch im Trophoblasten der menschlichen Frühschwangerschaft exprimiert wird. Interessanterweise waren die Expressionslevel bei Frauen mit wiederholten Aborten signifikant niedriger. Die Autoren erklären dies mit der Erkenntnis, dass BAFF antiapoptotische Eigenschaften besitzt, sodass dessen Erniedrigung möglicherweise die Entstehung von Aborten begünstigt [Guo et al. 2008]. In dieser Arbeit konnte zwar nicht die direkte Verbindung zwischen einer Erhöhung der Konzentration an BAFF und der Erhöhung der regulatorischen B-Zellen im Blut schwangerer Frauen gezogen werden, doch zeigt sich auf anderen Ebenen ein Einfluss des BAFF auf eine erfolgreiche Schwangerschaft.

5 Zusammenfassung

Schwangerschaft stellt ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Immunsystems dar, um die Entwicklung des Embryos als semiallogenes Transplantat zu ermöglichen. Bisher wurden B-Zellen und ihre regulatorische Unterform kaum im Kontext der Schwangerschaft betrachtet, obwohl bekannt ist, dass sie über die Fähigkeit der IL10 Sekretion antiinflammatorische und damit inhibitorische Effekte auf das Immunsystem aufweisen. Bereits in ersten Studien im Mausmodell konnte eine Bedeutung der regulatorischen B-Zellen auf eine erfolgreiche Schwangerschaft nachgewiesen werden, sodass Ziel dieser Arbeit war den Einfluss regulatorischer B-Zellen in der Schwangerschaft des Menschen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ regulatorischer B-Zellen bei normal schwangeren Frauen des 1.Trimesters erhöht ist. Dies trifft auf Patientinnen, die eine Fehlgeburt erlitten nicht zu. Zusätzlich ließ sich nachweisen, dass der Anteil an $CD19^+$ B-Zellen sowie der Anteil der $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ regulatorischer B-Zellen und der $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ regulatorischen B-Zellen zum 3.Trimester der Schwangerschaft abnimmt. Des Weiteren ergab sich der Nachweis, dass $CD19^+$ B-Zellen normal schwangerer Frauen die $TNF\alpha$ Expression $CD4^+$ T-Zellen inhibieren. Damit sind sie in der Lage während der Schwangerschaft die proinflammatorische Immunantwort der TH-Zellen zu regulieren und damit die Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem ungeborenen Fötus zu unterstützen. Zusätzlich erbrachten wir den Nachweis, dass Serum normal schwangerer Frauen des 1.Trimesters im Gegensatz zu Serum nicht-schwangerer Frauen und Serum von Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten zu einem Anstieg des Anteiles an $CD19^+IL10^+$ B-Zellen an PBMZ führt. Hier liegt die Vermutung nahe, dass Hormone, insbesondere hCG, dabei einen stimulierenden Effekt auf die Entwicklung regulatorischer B-Zellen haben. Bei Imitation einer Infektion an der feto-maternalen Grenzfläche steigt der Anteil an $CD19^+IL10^+$ B-Zellen an, sodass auch ein Einfluss der regulatorischen B-Zellen auf die Infektabwehr besteht. Die Funktionalität der $CD19^+$ B-Zellen bleibt bezüglich der IL10 Expression und Sekretion während der Schwangerschaft unverändert im Vergleich zu B-Zellen nicht Schwangerer, sodass hier die Regulation über die Erhöhung der Anzahl der Zellen stattfindet.

Die gewonnenen Ergebnisse tragen zum tieferen Verständnis des komplexen Zusammenspiels der mütterlichen Immunzellen zur Toleranz des Embryos als semiallogenes Transplantat bei. Sie stoßen neue Fragen an mit dem langfristigen Ziel Frauen mit wiederholten Fehlgeburten und Störung des immunologischen Gleichgewichts eine erfolgreiche Schwangerschaft zu ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Aldo, P. B., Racicot, K., Craviero, V., Guller, S., Romero, R., Mor, G.: Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *American journal of reproductive immunology*. 72. 270–284 (2014)
- [2] Azizieh, F. Y., Raghupathy, R. G.: Tumor Necrosis Factor- α and Pregnancy Complications: A Prospective Study. *Med Princ Pract*. 24. 165–170 (2015)
- [3] Bhat, N. M., Mithal, A., Bieber, M. M., Herzenberg, L. A., Teng, N. N.: Human CD5+ B lymphocytes (B-1 cells) decrease in peripheral blood during pregnancy. *Journal of reproductive immunology*. 28. 53–60 (1995)
- [4] Bienertova-Vasku, J., Zlamal, F., Tomandl, J., Hodicka, Z., Novak, J., Splichal, Z. et al.: The presence of B-cell activating factor (BAFF) in umbilical cord blood in both healthy and pre-eclamptic pregnancies and in human breast milk. *Journal of reproductive immunology* (2015)
- [5] Birkeland S. A., Kristoffersen K: T and B Lymphocytes during Normal Human Pregnancy: a Longitudinal Study. *Scandinavian Journal of Immunology*. 10. 415–419 (1979)
- [6] Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., Mauri, C.: CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32. 129–140 (2010)
- [7] Blois, S. M., Barrientos, G., Garcia, M. G., Orsal, A. S., Tometten, M., Cordo-Russo, R. I. et al.: Interaction between dendritic cells and natural killer cells during pregnancy in mice. *J. Mol. Med*. 86. 837–852 (2008)
- [8] Bodhankar, S., Wang, C., Vandenbark, A. A., Offner, H.: Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells. *Eur. J. Immunol*. 41. 1165–1175 (2011)
- [9] Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., Musette, P.: IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol*. 40. 2686–2691 (2010)
- [10] Burdin, N., van Kooten, C., Galibert, L., Abrams, J. S., Wijdenes, J., Banchereau, J., Rousset, F.: Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Immunol*. 154 (6). 2533–2544 (1995)
- [11] Carpentier, P. A., Dingman, A. L., Palmer, T. D.: Placental TNF- α signaling in illness-induced complications of pregnancy. *Am J Pathol*. 178. 2802–2810 (2011)
- [12] Chan, Y. Y., Jayaprakasan, K., Tan, A., Thornton, J. G., Coomarasamy, A., Raine-Fenning, N. J.: Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 38. 371–382 (2011)
- [13] Chaouat, G.: The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Seminars in immunopathology*. 29. 95–113 (2007)
- [14] Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliott, J. F., Mosmann, T., Wegmann, T. G.: IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- τ . *J. Immunol*. 154 (9). 4261–4268 (1995)
- [15] Chen, L., Hu, R.: Thyroid autoimmunity and miscarriage: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 74. 513–519 (2011)

- [16] Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 22 (11). 633–640 (2001)
- [17] Del Prete, G., Carli, M. de, Almerigogna, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Romagnani, S.: Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150 (2). 353–360 (1993)
- [18] Dietl, J., Ruck, P., Horny, H. P., Handgretinger, R., Marzusch, K., Ruck, M. et al.: The decidua of early human pregnancy: immunohistochemistry and function of immunocompetent cells. *Gynecol Obstet Invest.* 33 (4). 197–204 (1992)
- [19] Edmonds, D. K., Lindsay, K. S., Miller, J. F., Williamson, E., Wood, P. J.: Early embryonic mortality in women. *Fertility and sterility*. 38 (4). 447–453 (1982)
- [20] Eiben, B., Bartels, I., Bahr-Porsch, S., Borgmann, S., Gatz, G., Gellert, G. et al.: Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet.* 47 (4). 656–663 (1990)
- [21] Faas, M. M., Spaans, F., Vos, P. de: Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Frontiers in immunology*. 5. 298 (2014)
- [22] Farquharson, R. G., Jauniaux, E., Exalto, N.: Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Human reproduction (Oxford, England)*. 20. 3008–3011 (2005)
- [23] Fettke, F., Schumacher, A., Canellada, A., Toledo, N., Bekeredjian-Ding, I., Bondt, A. et al.: Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy: Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis. *Frontiers in immunology*. 7. 495 (2016)
- [24] Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., Anderton, S. M.: B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 3. 944–950 (2002)
- [25] Finkelsztejn, A., Brooks, J B B, Paschoal, F M Jr, Fragoso, Y. D.: What can we really tell women with multiple sclerosis regarding pregnancy? A systematic review and meta-analysis of the literature. *BJOG*. 118. 790–797 (2011)
- [26] Fiorentino, D. F., Bond, M. W., Mosmann, T. R.: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 170 (6). 2081–2095 (1989)
- [27] Foulds, K. E., Rotte, M. J., Seder, R. A.: IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 177 (4). 2565–2574 (2006)
- [28] Fraser, R., Whitley, G. S., Johnstone, A. P., Host, A. J., Sebire, N. J., Thilaganathan, B., Cartwright, J. E.: Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J Pathol.* 228. 322–332 (2012)
- [29] Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N. et al.: CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 202. 1075–1085 (2005)
- [30] Guerra, B., Ghi, T., Quarta, S., Morselli-Labate, A. M., Lazzarotto, T., Pilu, G., Rizzo, N.: Pregnancy outcome after early detection of bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 128. 40–45 (2006)
- [31] Guo, W.-j., Qu, X., Yang, M.-x., Zhang, W.-d., Liang, L., Shao, Q.-q., Kong, B.-h.: Expression of BAFF in the trophoblast and decidua of normal early pregnant women and patients with recurrent spontaneous miscarriage. *Chin Med J (Engl)*. 121 (4). 309–315 (2008)

- [32] Gustafsson, E., Mattsson, A., Holmdahl, R., Mattsson, R.: Pregnancy in B-cell-deficient mice: postpartum transfer of immunoglobulins prevents neonatal runting and death. *Biology of Reproduction*. 51 (6). 1173–1180 (1994)
- [33] Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S. et al.: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 12. 1065–1074 (2006)
- [34] Hanna, N., Hanna, I., Hleb, M., Wagner, E., Dougherty, J., Balkundi, D. et al.: Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J. Immunol*. 164 (11). 5721–5728 (2000)
- [35] Hay, P. E., Morgan, D. J., Ison, C. A., Bhide, S. A., Romney, M., McKenzie, P. et al.: A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 101 (12). 1048–1053 (1994)
- [36] Hill, J. A., Polgar, K., Anderson, D. J.: T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA*. 273 (24). 1933–1936 (1995)
- [37] Huppertz, B.; Schleußner, E.: Die Plazenta. Grundlagen und klinische Bedeutung S.89-101(2018)
- [38] Inoue, S., Leitner, W. W., Golding, B., Scott, D.: Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res*. 66. 7741–7747 (2006)
- [39] Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M. et al.: Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 117. 530–541 (2011)
- [40] Janeway, C.A.: Immunologie. 5. Aufl.: Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg [u.a.] S.293-294 (2002)
- [41] Jasper, M. J., Tremellen, K. P., Robertson, S. A.: Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod*. 12. 301–308 (2006)
- [42] Jensen, F., Muzzio, D., Soldati, R., Fest, S., Zenclussen, A. C.: Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biology of Reproduction*. 89. 90 (2013)
- [43] Jensen, F., Wallukat, G., Herse, F., Budner, O., El-Mouseh, T., Costa, S.-D. et al.: CD19+CD5+ cells as indicators of preeclampsia. *Hypertension*. 59. 861–868 (2012)
- [44] Jianjun, Z., Yali, H., Zhiqun, W., Mingming, Z., Xia, Z.: Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 63. 38–45 (2010)
- [45] Kalkunte, S. S., Mselle, T. F., Norris, W. E., Wira, C. R., Sentman, C. L., Sharma, S.: Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J. Immunol*. 182. 4085–4092 (2009)
- [46] Kaufmann, S.H.E.: Basiswissen Immunologie: Imprint: Springer. Berlin, Heidelberg.S.69-70 (2014)
- [47] Kincade, P. W., Medina, K. L., Payne, K. J., Rossi, M. I., Tudor, K. S., Yamashita, Y., Kouro, T.: Early B-lymphocyte precursors and their regulation by sex steroids. *Immunol Rev*. 175. 128–137 (2000)
- [48] Koopman, L. A., Kopcow, H. D., Rybalov, B., Boyson, J. E., Orange, J. S., Schatz, F. et al.: Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*. 198. 1201–1212 (2003)

- [49] Kreuzaler, M., Rauch, M., Salzer, U., Birmelin, J., Rizzi, M., Grimbacher, B. et al.: Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J. Immunol.* 188. 497–503 (2012)
- [50] LeBien, T. W., Tedder, T. F.: B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 112. 1570–1580 (2008)
- [51] Lenert, P., Brummel, R., Field, E. H., Ashman, R. F.: TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J Clin Immunol.* 25. 29–40 (2005)
- [52] Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S. L., Hess, D. M., Schwab, S. R., Shu, H.-B., Cyster, J. G.: Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity.* 20 (4). 441–453 (2004)
- [53] Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H., Kim, C. H.: Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 175 (7). 4180–4183 (2005)
- [54] Lima, J., Martins, C., Leandro, M. J., Nunes, G., Sousa, M.-J., Branco, J. C., Borrego, L.-M.: Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC pregnancy and childbirth.* 16. 139 (2016)
- [55] Lin, H., Mosmann, T. R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S., Wegmann, T. G.: Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.* 151 (9). 4562–4573 (1993)
- [56] Mahmoud, F., Abul, H., Omu, A., Al-Rayes, S., Haines, D., Whaley, K.: Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women. *Gynecol Obstet Invest.* 52 (4). 232–236 (2001)
- [57] Malan Borel, I., Gentile, T., Angelucci, J., Pividori, J., Guala, M. C., Binaghi, R. A., Margni, R. A.: IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *Journal of reproductive immunology.* 20 (2). 129–140 (1991)
- [58] Maseda, D., Candando, K. M., Smith, S. H., Kalampokis, I., Weaver, C. T., Plevy, S. E. et al.: Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN-gamma+CD4⁺ T cell numbers during colitis development in mice. *J. Immunol.* 191. 2780–2795 (2013)
- [59] Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M., Tedder, T. F.: Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* 118. 3420–3430 (2008)
- [60] Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., Londei, M.: Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *Journal of Experimental Medicine.* 197. 489–501 (2003)
- [61] Medawar, P.B.: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates: Cambridge University Press (Symposia of the Society for Experimental Biology, Syndics of the Cambridge University) (1953)
- [62] Medina, K. L., Kincade, P. W.: Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (12). 5382–5386 (1994)
- [63] Mempel, T. R., Pittet, M. J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., Boehmer, H. von, von Andrian, Ulrich H: Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity.* 25. 129–141 (2006)
- [64] Menzies, F. M., Higgins, C. A., Shepherd, M. C., Nibbs, Robert J B, Nelson, S. M.: Mast cells reside in myometrium and cervix, but are dispensable in mice for successful pregnancy and labor. *Immunol Cell Biol.* 90. 321–329 (2012)

- [65] Meyer, N., Woidacki, K., Knöfler, M., Meinhardt, G., Nowak, D., Velicky, P. et al.: Chymase-producing cells of the innate immune system are required for decidual vascular remodeling and fetal growth. *Scientific reports*. 7. 45106 (2017)
- [66] Miller, J. F., Williamson, E., Glue, J., Gordon, Y. B., Grudzinskas, J. G., Sykes, A.: Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet*. 2 (8194). 554–556 (1980)
- [67] Mills, J. L., Simpson, J. L., Driscoll, S. G., Jovanovic-Peterson, L., van Allen, M., Aarons, J. H. et al.: Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N. Engl. J. Med.* 319. 1617–1623 (1988)
- [68] Miyazaki, S., Tsuda, H., Sakai, M., Hori, S., Sasaki, Y., Futatani, T. et al.: Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of leukocyte biology*. 74. 514–522 (2003)
- [69] Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., Bhan, A. K.: Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity*. 16. 219–230 (2002)
- [70] Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F. I., Bhan, A. K.: Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int. Immunol.* 12 (5). 597–605 (2000)
- [71] Moffett-King, A.: Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2. 656–663 (2002)
- [72] Moore, K.: Embryologie. Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik. 6. Aufl.: Urban & Fischer in Elsevier. München. S.111-115 (2013)
- [73] Moore, K. W., de Waal Malefyt, R, Coffman, R. L., O'Garra, A.: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19. 683–765 (2001)
- [74] Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R, Vieira, P., Mosmann, T. R.: Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11. 165–190 (1993)
- [75] Mor, G., Cardenas, I.: The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 63. 425–433 (2010)
- [76] Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., Guller, S.: Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1221. 80–87 (2011).
- [77] Moreau, P., Adrian-Cabestre, F., Menier, C., Guiard, V., Gourand, L., Dausset, J. et al.: IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int. Immunol.* 11 (5). 803–811 (1999)
- [78] Muñoz-Fernández, R., Prados, A., Leno-Durán, E., Blázquez, A., García-Fernández, J.-R., Ortiz-Ferrón, G., Olivares, E.-G.: Human decidual stromal cells secrete C-X-C motif chemokine 13, express B cell-activating factor and rescue B lymphocytes from apoptosis: distinctive characteristics of follicular dendritic cells. *Human reproduction* (Oxford, England). 27. 2775–2784 (2012).
- [79] Murphy, S. P., Fast, L. D., Hanna, N. N., Sharma, S.: Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *J. Immunol.* 175 (6). 4084–4090 (2005)
- [80] Murphy, S. P., Tayade, C., Ashkar, A. A., Hatta, K., Zhang, J., Croy, B. A.: Interferon gamma in successful pregnancies. *Biology of Reproduction*. 80. 848–859 (2009)

- [81] Muzzio, D. O., Soldati, R., Ehrhardt, J., Utpatel, K., Evert, M., Zenclussen, A. C. et al.: B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biology of Reproduction*. 91. 115 (2014a)
- [82] Muzzio, D. O., Soldati, R., Rolle, L., Zygmunt, M., Zenclussen, A. C., Jensen, F.: B-1a B cells regulate T cell differentiation associated with pregnancy disturbances. *Frontiers in immunology*. 5. 6 (2014b)
- [83] Muzzio, D. O., Ziegler, K. B., Ehrhardt, J., Zygmunt, M., Jensen, F.: Marginal zone B cells emerge as a critical component of pregnancy well-being. *Reproduction (Cambridge, England)*. 151. 29–37 (2016)
- [84] Nybo Andersen, A.-M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., Melbye, M.: Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ (Clinical research ed.)*. 320 (7251). 1708–1712 (2000)
- [85] Philipp, T., Philipp, K., Reiner, A., Beer, F., Kalousek, D. K.: Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Human reproduction (Oxford, England)*. 18 (8). 1724–1732 (2003)
- [86] Plaks, V., Birnberg, T., Berkutzki, T., Sela, S., BenYashar, A., Kalchenko, V. et al.: Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J. Clin. Invest.* 118. 3954–3965 (2008)
- [87] Plevyak, M., Hanna, N., Mayer, S., Murphy, S., Pinar, H., Fast, L. et al.: Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 47 (4). 242–250 (2002)
- [88] Poehlmann, T. G., Schaumann, A., Busch, S., Fitzgerald, J. S., Aguerre-Girr, M., Le Bouteiller, P. et al.: Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 56. 275–285 (2006)
- [89] Poloski, E., Oettel, A., Ehrentraut, S., Luley, L., Costa, S. D., Zenclussen, A. C., Schumacher, A.: JEG-3 Trophoblast Cells Producing Human Chorionic Gonadotropin Promote Conversion of Human CD4+FOXP3- T Cells into CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and Foster T Cell Suppressive Activity. *Biology of Reproduction*. 94. 106 (2016)
- [90] Ramhorst, R., Fraccaroli, L., Aldo, P., Alvero, A. B., Cardenas, I., Leirós, C. P., Mor, G.: Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. 67. 17–27 (2012)
- [91] Rasch, V.: Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 82 (2). 182–188 (2003)
- [92] Ray, A., Basu, S., Williams, C. B., Salzman, N. H., Dittel, B. N.: A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J. Immunol.* 188. 3188–3198 (2012)
- [93] Renaud, S. J., Graham, C. H.: The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunological investigations*. 37. 535–564 (2008)
- [94] Rey, E., Kahn, S. R., David, M., Shrier, I.: Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 361. 901–908 (2003)
- [95] Robertson, S. A., Care, A. S., Skinner, R. J.: Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biology of Reproduction*. 76. 738–748 (2007)

- [96] Sacks, G. P., Redman, C W G, Sargent, I. L.: Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 131 (3). 490–497 (2003)
- [97] Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., Saito, S.: Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 10. 347–353 (2004)
- [98] Saze, Z., Schuler, P. J., Hong, C.-S., Cheng, D., Jackson, E. K., Whiteside, T. L.: Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood.* 122. 9–18 (2013)
- [99] Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M. et al.: An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science.* 293. 2111–2114 (2001)
- [100] Schneider, H.; Husslein, P.; Schneider, K.-T.M.: *Die Geburtshilfe.* 4. Auflage: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg (2011)
- [101] Schumacher, A., Wafula, P. O., Teles, A., El-Mousleh, T., Linzke, N., Zenclussen, M. L. et al.: Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. *PLoS One.* 7. e42301 (2012)
- [102] Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R. C., Rodriguez, M., Binder, C. J., Shoenfeld, Y.: Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 158 Suppl 1. 43–50 (2009)
- [103] Shaarawy, M., Nagui, A. R.: Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 76. 205–211 (1997)
- [104] Silver, R. M., Branch, D. W., Goldenberg, R., Iams, J. D., Klebanoff, M. A.: Nomenclature for pregnancy outcomes: time for a change. *Obstetrics and gynecology.* 118. 1402–1408 (2011)
- [105] Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M., Drayson, M. T.: Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology.* 112. 38–43 (2004)
- [106] Stauber, M.; Weyerstahl, T.: *Gynäkologie und Geburtshilfe.* 2., aktualisierte Aufl.: Thieme. Stuttgart. S.456-468 (2005)
- [107] Straszewski-Chavez, S. L., Abrahams, V. M., Alvero, A. B., Aldo, P. B., Ma, Y., Guller, S. et al.: The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta.* 30. 939–948 (2009)
- [108] Svensson, L., Arvola, M., Sällström, M.-A., Holmdahl, R., Mattsson, R.: The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *Journal of reproductive immunology.* 51. 3–7 (2001)
- [109] Tangeras, L. H., Stodle, G. S., Olsen, G. D., Leknes, A.-H., Gundersen, A. S., Skei, B. et al.: Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *Journal of reproductive immunology.* 106. 89–99 (2014)
- [110] Taylor, P. V., Hancock, K. W.: Antigenicity of trophoblast and possible antigen-masking effects during pregnancy. *Immunology.* 28 (5). 973–982 (1975)
- [111] Teles, A., Schumacher, A., Kühnle, M.-C., Linzke, N., Thuere, C., Reichardt, P. et al.: Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Frontiers in immunology.* 4. 158 (2013)

- [112] Toldi, G., Rigo, J., JR, Stenczer, B., Vasarhelyi, B., Molvarec, A.: Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 66. 223–229 (2011)
- [113] Tongio, M. M., Berrebi, A., Mayer, S.: A study of lymphocytotoxic antibodies in multiparous women having had at least four pregnancies. *Tissue Antigens*. 2 (5). 378–388 (1972)
- [114] Tretter, T., Lorenz, H.-M.: Regulatorische B-Zellen und ihre Funktion im Erhalt der peripheren Toleranz. *Z. Rheumatol*. 69. 813–817 (2010)
- [115] Wallukat, G., Homuth, V., Fischer, T., Lindschau, C., Horstkamp, B., Jupner, A. et al.: Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J. Clin. Invest*. 103. 945–952 (1999)
- [116] Wang, W.-J., Hao, C.-F., Yi-Lin, Yin, G.-J., Bao, S.-H., Qiu, L.-H., Lin, Q.-D.: Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Journal of reproductive immunology*. 84. 164–170 (2010a)
- [117] Wang, W.-J., Hao, C.-F., Yi-Lin, Yin, G.-J., Bao, S.-H., Qiu, L.-H., Lin, Q.-D.: Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Journal of reproductive immunology*. 84. 164–170 (2010b)
- [118] Watanabe, M., Iwatani, Y., Kaneda, T., Hidaka, Y., Mitsuda, N., Morimoto, Y., Amino, N.: Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 37 (5). 368–377 (1997)
- [119] Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T. R.: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 14. 353–356 (1993)
- [120] Wei, B., Velazquez, P., Turovskaya, O., Spricher, K., Aranda, R., Kronenberg, M. et al.: Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102. 2010–2015 (2005)
- [121] Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., O'Connor, J. F., Baird, D. D., Schlatterer, J. P., Canfield, R. E. et al.: Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med*. 319. 189–194 (1988)
- [122] Woidacki, K., Jensen, F., Zenclussen, A. C.: Mast cells as novel mediators of reproductive processes. *Frontiers in immunology*. 4. 29 (2013a)
- [123] Woidacki, K., Popovic, M., Metz, M., Schumacher, A., Linzke, N., Teles, A. et al.: Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency. *Cell death & disease*. 4. e462 (2013b)
- [124] Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., Tedder, T. F.: The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol*. 182. 7459–7472 (2009)
- [125] Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K.-H., Xu, H., Zheng, B.-J. et al.: Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J. Immunol*. 184. 3321–3325 (2010)
- [126] Zenclussen, A. C., Gentile, T., Kortebani, G., Mazzolli, A., Marni, R.: Asymmetric antibodies and pregnancy. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 45 (5). 289–294 (2001)
- [127] Zenclussen, M. L., Thuere, C., Ahmad, N., Wafula, P. O., Fest, S., Teles, A. et al.: The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory

T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989). 63. 200–208 (2010)

[128] Zygmunt, M., Herr, F., Keller-Schoenwetter, S., Kunzi-Rapp, K., Munstedt, K., Rao, C. V. et al.: Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 87. 5290–5296 (2002)

[129] Zygmunt, M., McKinnon, T., Herr, F., Lala, P. K., Han, V K M: HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Mol Hum Reprod.* 11. 261–267 (2005).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des möglichen Entwicklungsweges einer regulatorischen B-Zelle.....	10
Abbildung 2: Übersicht über Wirkmechanismen regulatorischer B-Zellen im Mausmodell.....	11
Abbildung 3: Funktion von B-Zellen während der Schwangerschaft.	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Dichtegradientenzentrifugation	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS)	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probenauftragung auf eine 96-Lochplatte.....	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Probenauftragung auf eine 24-Lochplatte.....	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs	31
Abbildung 9: Der prozentuale Anteil an CD19 ⁺ B-Zellen ist im 3.Trimester signifikant reduziert im Vergleich zu Nicht-Schwangeren.....	35
Abbildung 10: Der Anteil an CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺ regulatorische B-Zellen ist während des 1.Trimesters erhöht und bei Patientinnen mit Fehlgeburten signifikant erniedrigt.....	36
Abbildung 11: Der prozentuale Anteil der CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} B-Zellen nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab.....	37
Abbildung 12: Die Expression von IL10 in CD19 ⁺ B-Zellen bleibt bei Schwangeren und Patientinnen mit einer Fehlgeburt unverändert im Vergleich zu Nicht-Schwangeren.....	38
Abbildung 13: CD19 ⁺ B-Zellen sezernieren während der Frühschwangerschaft nicht vermehrt IL10.	39
Abbildung 14: Die TNF α -Expression stimulierter CD4 ⁺ T-Zellen ist bei Kokultur mit CD19 ⁺ B-Zellen schwangerer Frauen supprimiert.....	40
Abbildung 15: Die IFN γ -Expression stimulierter CD4 ⁺ T-Zellen sinkt bei Kokultur mit stimulierten CD19 ⁺ B-Zellen schwangerer Frauen.	41
Abbildung 16: IL17-Expression stimulierter CD4 ⁺ T-Zellen bleibt bei Kokultur mit B-Zellen schwangerer Frauen unverändert.	41
Abbildung 17: Der Überstand sowohl stimulierter als auch unstimulierter B-Zellen schwangerer Frauen supprimiert die TNF α Expression von CD4 ⁺ T-Zellen.	42

Abbildung 18: Die Kultur der CD4 ⁺ T-Zellen mit dem Überstand kultivierter B-Zellen von schwangeren Frauen führt nicht zu einer Reduktion der IFN γ -Expression der CD4 ⁺ T-Zellen.	43
Abbildung 19: Überstand aus der B-Zellkultur, isoliert aus dem Blut schwangerer Frauen, nimmt keinen Einfluss auf die IL17-Expression von CD4 ⁺ T-Zellen.	43
Abbildung 20: Die Kokultur der Trophoblastzelllinie SWAN-71 mit CD19 ⁺ B-Zellen nimmt keinen Einfluss auf die IL10 Expression der B-Zellen.....	45
Abbildung 21: Der Anteil der CD19 ⁺ IL10 ⁺ B-Zellen ist bei Kultur mit Serum von schwangeren Frauen signifikant erhöht.	46
Abbildung 22: Die Konzentration von BAFF ist im Serum schwangerer Frauen nicht erhöht.	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über Anzahl, Alter und Schwangerschaftswoche der Probandinnen	22
Tabelle 2:	Verwendete extrazelluläre Antikörper in den entsprechenden Versuchsteilen	29
Tabelle 3:	Verwendete intrazelluläre Antikörper in den entsprechenden Versuchsteilen	30

Danksagung

Als erstes möchte ich mich von Herzen bei Frau Prof. Ana Claudia Zenclussen bedanken für die Bereitstellung des Themas, mehr noch aber für die ausdauernde Motivation die Arbeit abzuschließen sowie ihre wissenschaftliche Betreuung.

Weiterhin danke ich PD Dr. rer. nat. Anne Schuhmacher für ihre Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt dem Team der experimentellen Gynäkologie für die wissenschaftliche Begleitung aber auch für die vielen schönen gemeinsamen Stunden, sowie Prof. Dr. med. Serban Costa und dem Team der Universitätsfrauenklinik für die Bereitstellung der Proben.

Vor allem möchte ich aber auch meinen Eltern danken, ohne die ich diesen Weg nicht hätte gehen können. Sie haben mir die Flügel verliehen meinen Träumen zu folgen. Im gleichen Atemzug danke ich meinen beiden wundervollen Schwestern sowie meinen Freunden. Ohne euch wäre ich nicht diejenige, die ich heute bin.

Der letzte Dank gilt meinem wundervollen Mann, der mich so liebt wie ich bin, mich in allen Dingen unterstützt, mich antreibt weiter zu machen und mir immer an meiner Seite steht.

Ehrenerklärung

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

IL10 produzierende regulatorische B-Zellen haben einen protektiven Effekt auf die Regulation der Frühschwangerschaft

in der Abteilung für Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätsklinik Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ana Claudia Zenclussen

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 19.08.2019

L.Goes

