

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

Humanes Choriongonadotropin induziert Regulatorische T-Zellen und erhöht
die T-Zellsuppressivität

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 Eileen Poloski
aus Havelberg
Magdeburg 2017

Bibliographische Beschreibung:

Poloski, Eileen:

Humanes Choriongonadotropin induziert Regulatorische T-Zellen und erhöht die T-Zellsuppressivität.
- 2017. - 74 Bl., 19 Abb., 6 Tab.

Kurzreferat

Das Schwangerschaftshormon humanes Choriongonadotropin (hCG) beeinflusst erwiesenermaßen sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem und trägt auf diesem Weg auch zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft bei. Es wurde gezeigt, dass hCG eine Migration von humanen regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) zur fetomaternalen Grenzfläche unterstützt und im Mausmodell die Anzahl und die immunsuppressive Funktion der T_{reg} erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob hCG und hCG-produzierende humane Trophoblastenzellen eine Induktion von T_{reg} aus humanen $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen bewirken und die suppressive Kapazität der T-Zellen fördern. Dafür wurden $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen aus dem Blut von Schwangeren isoliert und zusammen mit hCG-produzierenden Trophoblastenzellen (JEG-3, HTR-8) und nicht-hCG-produzierenden Zelllinien (SWAN-71, HaCat) kultiviert. Um die Wirkung eindeutig dem hCG zuordnen zu können, wurden die Versuche auch unter Hinzugabe eines anti-hCG-Antikörpers durchgeführt. Des Weiteren erfolgten analoge Versuche mit rekombinantem oder urin-aufgereinigtem hCG. Nach erfolgter Kultur wurde die Anzahl an $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} ermittelt und die suppressive Kapazität der Gesamt-T-Zellen bestimmt. Sowohl hCG-produzierende JEG-3-Zellen als auch rekombinantes und urin-aufgereinigtes hCG führten zu einer Induktion von $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} aus $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen. Eine Blockade des hCG verminderte die Induktion. Weiterhin wurde die suppressive Kapazität der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen durch hCG-produzierende JEG-3-Zellen antigenunabhängig erhöht. Die vorliegende Arbeit vermittelt demnach weitere Ansätze, wie das weibliche Immunsystem zum Schutz des Feten moduliert wird.

Schlüsselwörter: fetale Toleranz, humanes Choriongonadotropin, regulatorische T-Zellen, Schwangerschaft, Trophoblastenzellen

Inhalt

Inhalt	1
1. Abkürzungsverzeichnis.....	4
2. Einleitung	6
2.1. Die Schwangerschaft	6
2.1.1. Von der Ovulation bis zur Implantation	6
2.1.2. Embryonal- und Fetalperiode	7
2.1.3. Die Plazenta.....	7
2.1.3.1. Entwicklung der Plazenta.....	7
2.1.3.2. Architektur und Funktion der Plazenta	8
2.2. Der Abort	9
2.2.1. Definition.....	9
2.2.2. Epidemiologie.....	9
2.2.3. Abortformen	9
2.2.3.1. Habituelter Abort	10
2.2.4. Ursachen	10
2.3. Schwangerschaftsimmunologie.....	11
2.3.1. Paradoxon der Schwangerschaft	11
2.3.2. Fetale Adaptationsmechanismen	11
2.3.3. Maternale Adaptationsmechanismen	13
2.3.3.1. Zelluläre Mechanismen.....	13
2.3.3.2. Molekulare Mechanismen	13
2.4. CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Regulatorische T-Zellen.....	15
2.4.1. Phänotyp	15
2.4.2. Subtypen	16
2.4.3. T _{reg} -Zell-Generierung.....	17
2.4.3.1. Generierung der T _{reg} im Thymus (nT _{reg})	17
2.4.4. Allgemeine Funktionen von T _{reg}	17
2.4.5. Funktionen von T _{reg} in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft....	18
2.5. Humanes Choriongonadotropin (hCG).....	19
2.5.1. Struktur und Vorkommen	19
2.5.2. Funktionen	20
2.5.3. hCG als Immunregulator	21
2.6. Zielstellung.....	21
3. Material und Methoden.....	23

3.1.	Material	23
3.1.1.	Allgemeine Laborgeräte	23
3.1.2.	Software	23
3.1.3.	Zellkultur	23
3.1.4.	Magnetische Zellisolierung	24
3.1.5.	Durchflusszytometrie	24
3.1.6.	Chemikalien.....	24
3.1.7.	Kulturmedien	24
3.1.8.	Puffer.....	24
3.1.9.	Enzyme und Proteine	25
3.1.10.	Antikörper	25
3.1.11.	Kits.....	25
3.1.12.	Immortalisierte Zellen und Zelllinien	26
3.1.13.	Zellkulturmedien	26
3.2.	Methoden.....	27
3.2.1.	Zellkultur	27
3.2.1.1.	Auftauen der Zelllinien.....	27
3.2.1.2.	Kultivierung und Passagierung der Zelllinien	27
3.2.2.	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMZ) aus dem Blut von schwangeren Frauen	27
3.2.2.1.	Probengewinnung (Blutentnahme).....	27
3.2.2.2.	Isolation der PBMZ.....	28
3.2.2.3.	Isolation von CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen mittels Magnetischer Zellsortierung	28
3.2.3.	Kokultur von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen mit verschiedenen Zelllinien.....	29
3.2.4.	Stimulation der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ Zellen mit hCG und Blockierung mit einem anti-hCG-AK....	29
3.2.4.1.	Bestimmung der Neutralisationsfähigkeit des hCG-Antikörpers	29
3.2.4.2.	Kokultur der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen bei gleichzeitiger Blockierung des hCG	30
3.2.5.	Kultur der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen mit rekombinantem (rhCG) oder Urin-aufgereinigtem (uhCG) hCG.....	30
3.2.6.	Kokultur von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen oder rhCG und anschließender gemischter Leukozyten-Reaktion	30
3.2.6.1.	Bestimmung der Proliferationsrate der autologen und allologenen Zellen mittels CFDA-SE-Markierung.....	32
3.2.6.2.	Markierung der autologen und allologenen T-Zellen mit CFDA-SE.....	32
3.2.7.	Durchflusszytometrie	32
3.2.7.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	32
3.2.7.2.	Extra-und intrazelluläre Färbung	34
3.2.7.3.	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	35

3.2.8.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	36
3.2.8.1.	ELISA zum Nachweis der β -hCG-Sekretion der Zelllinien	37
3.2.8.2.	ELISA zum Nachweis der Progesteronproduktion von Maus-Leydig-Tumorzellen	37
3.2.8.3.	ELISA zum Nachweis von IL-10 und TGF- β	37
3.2.9.	Statistische Auswertung der Daten.....	37
4.	Ergebnisse	39
4.1.1.	hCG-Bestimmung im Überstand verschiedener Zelllinien	39
4.1.2.	hCG-produzierende JEG-3-Trophoblastenzellen bewirken eine Konversion von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen zu CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T _{reg} -Zellen.....	40
4.1.3.	Die Kultur von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen mit Trophoblastenzellen und Keratinozyten beeinflusst die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen	42
4.1.4.	Bestimmung der Neutralisationsfähigkeit des hCG-Antikörpers	43
4.1.5.	Die Blockierung von hCG verhindert die JEG-3-Zellen-induzierte Konversion von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen zu CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T _{reg} -Zellen.....	43
4.2.	Die Zugabe von rhCG und uhCG bewirkt eine Konversion von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen zu CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ T _{reg} -Zellen, hat aber keinen Einfluss auf die Produktion von IL-10 und TGF- β	45
4.3.	Die Kultur mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen steigert die suppressive Kapazität der CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen.	47
5.	Diskussion.....	50
5.1.	hCG induziert die de-novo Synthese von T _{reg} aus CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen	51
5.2.	Die Behandlung von CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen mit hCG erhöht die Fähigkeit zur Immunsuppression.....	53
5.3.	Die hCG-vermittelte immunsuppressive Wirkung von T _{reg} wird weder durch die Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 noch durch die Zytokine TGF- β und IL-10 vermittelt	54
6.	Zusammenfassung und Ausblick	57
7.	Zusammenfassung.....	58
	Literaturverzeichnis.....	60

1. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ART	technisch assistierte Reproduktionsverfahren (<i>engl. assistent reproductive techniques</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. bovine serum albumin</i>)
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>engl. cluster of differentiation</i>)
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CSFE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4
DFZ	Durchflusszytometrie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Festphasenzymimmunoassay (<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>)
FoxP3	Forkheadbox Protein 3
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>engl. forward scatter</i>)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>engl. horse raddish peroxidase</i>)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVF	In-vitro-Fertilisation

LH	luteinisierendes Hormon
LAG-3	Lymphozyten-Aktivierungsge 3
MACS	Magnetische Zellisolierung (<i>engl. magnetic activated cell sorting</i>)
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl. major histocompatibility complex</i>)
MLTC	Maus-Leydig-Tumorzelle
MZ	Mastzellen
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
Nrp-1	Neuropilin-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PD-1	Programmed death-1
rhCG	rekombinantes hCG
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
S.E.M.	Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>engl. side scatter</i>)
Th	T-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
Tr1-Zellen	Typ-1 regulatorische T-Zellen
uhCG	urin-aufgereinigtes hCG
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

2. Einleitung

2.1. Die Schwangerschaft

2.1.1. Von der Ovulation bis zur Implantation

Im Verlauf des Ovarialzyklus der Frau wachsen im Ovar unter dem Einfluss des follikelstimulierenden Hormons 5-15 so genannte Primordialfollikel heran. Einer dieser Follikel reift zum Graf-Follikel. Während des Reifungsprozesses finden permanent Zelldifferenzierungsvorgänge statt, die für die Reifung der Eizelle und die Vorbereitung der Endometriumschleimhaut essenziell sind. Etwa 14 Tage vor Beginn der nächsten Regelblutung kommt es zu einem steilen Östrogenanstieg, welcher die Hypophyse zur Freisetzung von luteinisierendem Hormon (LH) anregt. LH löst dann die Ovulation aus. Die Oozyte hat zu diesem Zeitpunkt die erste Reifeteilung abgeschlossen. Aus der Wand des geplatzten Follikels bildet sich im Ovar unter dem Einfluss von LH der Gelbkörper (*Corpus luteum*). In der Ampulle findet in der Regel die Verschmelzung der männlichen und weiblichen Keimzellen statt und die Eizelle beendet die zweite Reifeteilung. Durch die Befruchtung ist nun ein diploider, also vollständiger, Chromosomensatz entstanden. Die Eizelle erreicht circa am dritten Tag nach der Befruchtung im 12- bis 16-Zellenstadium als Morula die Gebärmutterhöhle. Durch die Ausbildung einer Höhle wird sie zur Blastozyste, welche sich aus einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten und einer inneren Zellschicht, dem Embryoblasten, zusammensetzt. Aus ihm entwickelt sich der eigentliche Embryo. Zwischen dem 5. und 6. Tag heftet sich die Blastozyste der Endometriumschleimhaut an und dringt im Verlauf der 2. Woche in diese ein. Dieser Vorgang wird als Implantation bezeichnet (Abbildung 1). Der Trophoblast beginnt das Schwangerschaftshormon humanes Choriongonadotropin (hCG) zu bilden, welches die Umwandlung des Gelbkörpers in ein *Corpus luteum gravidatis* bewirkt. Hierdurch wird ein Abfall des Progesteronspiegels verhindert. Die hCG-Produktion darf als erste wesentliche Differenzierungsleistung des Embryos betrachtet werden. Ein Defekt in diesem Mechanismus führt zum Abort (Sadler et al. 2003, S. 25 ff).

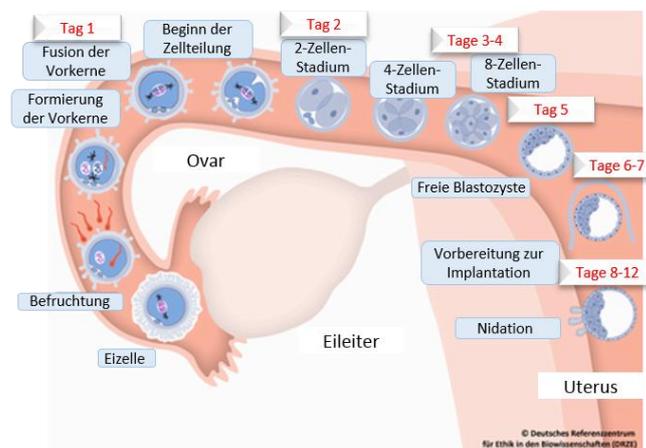


Abbildung 1: Die Oozyte von der Befruchtung bis zur Implantation. (Quelle: (DRZE))

2.1.2. Embryonal- und Fetalperiode

Innerhalb der Embryonalperiode differenziert sich der Embryoblast über die zweiblättrige zur dreiblättrigen Keimscheibe, bestehend aus dem Ektoderm, dem Mesoderm und dem Entoderm, aus denen sich die Organe des Embryos entwickeln. Nach Abschluss der achten Entwicklungswoche ist die Organogenese weitestgehend abgeschlossen. Ab der neunten Schwangerschaftswoche beginnt die Fetalperiode, die vornehmlich von Wachstum und Reifung des Feten bestimmt wird (Sadler et al. 2003). Eine Schwangerschaft wird in Drittel (Trimena, Einzahl Trimenon), also 3 Abschnitte von etwa 3 Monaten Dauer (je ca. 13 Wochen) eingeteilt. Durchschnittlich 38 Wochen *post conceptionem* beendet die Geburt die Schwangerschaft.

2.1.3. Die Plazenta

2.1.3.1. Entwicklung der Plazenta

Die Plazenta geht aus den Zellen des Trophoblasten hervor und entsteht mit dem Zeitpunkt der Einnistung der Blastozyste in das Endometrium. Der Trophoblast differenziert sich dabei in eine innere und eine äußere Zellschicht. Die innere Zellschicht, der Zytotrophoblast, grenzt an die Fruchthöhle und dient als Proliferationsreservoir für die äußere Zellschicht, den Synzytiotrophoblasten. Dieser wächst mit seinem äußeren Anteil (extravillöser Trophoblast) durch Sezernierung von Proteasen invasiv in die Gebärmutterschleimhaut, die während der Schwangerschaft als Dezidua bezeichnet wird, bis in die Muskulatur ein. Der innere Teil bildet durch Gewebeeinschmelzungen Hohlräume (*Lakunen*), die ein Reservoir mütterlichen Blutes darstellen. In die Trabekel zwischen den Lakunen wachsen ausgehend vom Zytotrophoblasten Zellen zottenartig ein. In ihnen bilden sich fetale Blutgefäße, die sich mit den Nabelschnurgefäßen verbinden (Abbildung 2). Die fetoplazentare Zirkulation ist somit angelegt. Die Zotten durchlaufen während der Schwangerschaft verschiedene Stadien, die an die sich verändernden Bedürfnisse des Fetus angepasst sind. So ist die Diffusionsstrecke für Nährstoffe und Sauerstoff am Anfang der Schwangerschaft durch Fibrosierungsprozesse innerhalb des Zottenbaums und die Kaliberstärke des Zytotrophoblasten sehr groß. Dennoch ist ein Austausch – wenn auch in geringem Maße – anzunehmen. Im Verlauf nimmt der Bindegewebsanteil der Zotten proportional zu den steigenden Anforderungen des Feten ab und weicht einem zunehmenden Wachstum der kapillaren Gefäße, die sich letztlich so stark an den Rand der Zotten drängen, dass die Diffusionsstrecke am Ende nur noch 4-5 µm beträgt. Der permanente Austausch zwischen fetalem und mütterlichem Blut ist somit zu allen Zeitpunkten gewährleistet und von großer Bedeutung für das Überleben des Fetus (Kiechle 2011, S 167 ff).

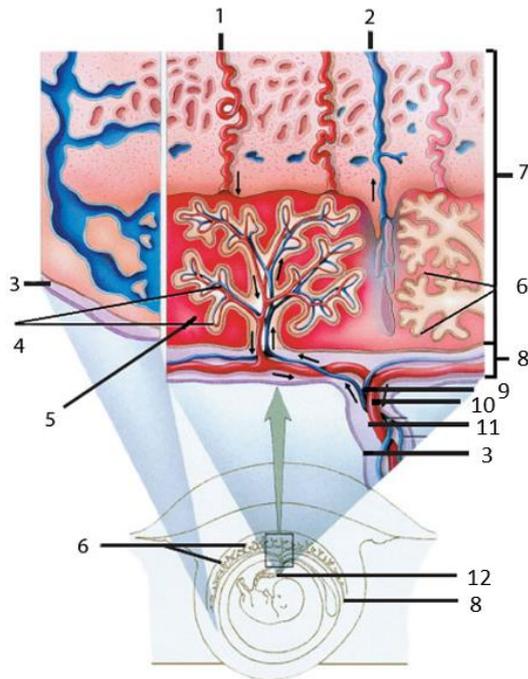


Abbildung 2: Querschnitt durch eine Primärzotte.

1. Mütterliche endometriale Arteriole
 2. Mütterliche endometriale Venule
 3. Amnion
 4. Fetale Blutgefäße
 5. Zottenzwischenraum mit mütterlichem Blut
 6. Chorionzotten
 7. Endometrium
 8. Chorion
 9. Nabelschnurvene
 10. Nabelschnurarterie
 11. Schleimhautbindegewebe
 12. Nabelschnur
- (Quelle: (harunyahya.de))

2.1.3.2. Architektur und Funktion der Plazenta

Innerhalb der ersten Monate der Schwangerschaft durchläuft die Plazenta auch hinsichtlich ihrer makroskopischen Architektur diverse Differenzierungsprozesse. Verallgemeinernd lässt sich zusammenfassen, dass die Zotten des abembryonalen Pols obliterieren und mit der gegenüberliegenden Endometriumschleimhaut (*Dezidua parietalis*) verschmelzen. Hieraus entwickeln sich im Folgenden die Eihäute¹. Hingegen breiten sich die Zotten des embryonalen Pols weiter aus und bilden zusammen mit der anliegenden *Dezidua basalis* die kompakte Basalplatte. Diese ist Grundlage für die Bildung der eigentlichen Plazenta. Etwa ab dem vierten Monat lässt sich diese in einen mütterlichen und einen fetalen Anteil untergliedern (Tabelle 1) in deren Übergangsbereich der fetomaternaler Austausch stattfindet (Sadler et al. 2003, S. 104 ff).

Tabelle 1: Austauschfunktionen der Plazenta (Quelle: *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*, S. 445)

Vorgang	Substanz
Aktive Austauschmechanismen	
<ul style="list-style-type: none"> aktiver energieverbrauchender Transport (z.T. enzymatisch) 	anorganische Ionen, Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine, Hormone
<ul style="list-style-type: none"> Pinozytose 	Proteine, Lipide, Immunglobuline (IgG)
Passive Austauschmechanismen	
<ul style="list-style-type: none"> einfache Diffusion (entlang eines Konzentrations- oder Druckgefälles) 	O ₂ , CO ₂ , Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Wasser, Medikamente
<ul style="list-style-type: none"> erleichterte Diffusion (Bindung an Trägermoleküle) 	Glukose, Laktat
<ul style="list-style-type: none"> Diapedese (Durchtritt über Lücken in der Gefäßwand) 	Erythrozyten, Leukozyten, Medikamente mit Molekulargewicht über 600, Viren, Bakterien, Protozoen

¹ Die Eihäute gehen aus der Verschmelzung von Amnion, Chorion und *Dezidua parietalis* hervor.

Die Funktionen der Plazenta sind demnach vielfältig. Neben dem Austausch von Atemgasen, Energie- und Nährstoffen seien im Kontext dieser Arbeit insbesondere die Bildung von Hormonen und die immunologischen Aufgaben hervorgehoben. So werden vom Synzytiotrophoblasten Östrogene produziert, die vor allem der Vorbereitung des Uterus auf die Geburt – beispielsweise der Energieträgerbereitstellung im Myometrium oder der Zervixreifung – dienen. Auch die Bildung von Progesteron, häufig als Schwangerschaftsschutzhormon bezeichnet, da es unerlässlich zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ist, wird in Teilen von der Plazenta geleistet. Nicht zuletzt sei auch die Sekretion von hCG erwähnt, welches aufgrund seiner zentralen Bedeutung für die vorliegende Arbeit in einem gesonderten Abschnitt ausführlich besprochen wird. Die immunologische Funktion der Plazenta dient vor allem der Unterstützung der Immuntoleranz des mütterlichen Organismus gegenüber dem Fetus. Eine detaillierte Beschreibung der sowohl passiven als auch aktiven Toleranzmechanismen finden sich im Kapitel 2.3 *Schwangerschaftsimmunologie* (Kiechle 2011, S. 173 ff).

2.2. Der Abort

2.2.1. Definition

Ein Abort (Synonym: Fehlgeburt) ist der „Abgang einer Frucht vor dem Erreichen der Lebensfähigkeit; die Grenze der Lebensfähigkeit [...] wird [...] bei 22-24 Schwangerschaftswochen oder 500 g Geburtsgewicht angesetzt; jenseits dieser Grenze spricht man entweder von Frühgeburt (wenn das Kind lebt) oder Totgeburt.“ (Vgl. Reuter 2007, S. 5)

2.2.2. Epidemiologie

Die Inzidenz von Spontanaborten liegt zwischen 10 % und 70 %. Die starke Schwankung liegt dabei vor allem in der Nichterkennung der Schwangerschaft zu einem sehr frühen Zeitpunkt, respektive vor dem zweiten Trimenon, begründet. So wird diesbezüglich sogar eine Dunkelziffer von bis zu 50 – 70 % angenommen (Kiechle 2011, S. 183).

2.2.3. Abortformen

Pathophysiologisch und klinisch lassen sich vier verschiedene Abortformen unterscheiden: beim *Abortus imminens* (drohender Abort) ist die Schwangerschaft noch intakt. Die klinischen Symptome wie vaginale Blutungen und eventuell ziehende Unterbauchschmerzen, welche reaktiven Kontraktionen der Uterusmuskulatur entsprechen, sind in der Regel vorübergehend, sodass in den meisten Fällen nicht mit einem Verlust der Frucht zu rechnen ist. Ist eine Fehlgeburt unaufhaltsam, so spricht man je nach zeitlichem Stadium von *Abortus incipiens* (beginnender Abort), *Abortus incompletus* (unvollständiger Abort; Frucht in Teilen bereits abgegangen), beziehungsweise *Abortus completus* (vollständiger Abort). Wird die Frucht erst Tage oder Wochen nach ihrem Absterben ausgestoßen, wird dies als *Missed Abortion* (verhaltener Abort) bezeichnet. Eine spezielle Form ist das sogenannte Windei, eine Fehlanlage des Keims, bei der lediglich eine Fruchthöhle ohne Embryo entsteht. Verläuft eine

Frühgeburt infektionsbedingt als septischer Abort, so stellt dies eine lebensbedrohliche Komplikation für die Frau dar.

2.2.3.1. Habituelle Abort

Erleidet eine Frau zwei oder mehr Fehlgeburten in Folge, wird dies als habituelle Abort bezeichnet. Die Häufigkeit beträgt 0,5-1 auf 100 Schwangerschaften. Pathogenetisch spielen unter anderem chromosomale Aberrationen eine Rolle. In vielen Fällen ist jedoch trotz intensiver Diagnostik keine Pathologie sichtbar; hier werden insbesondere Störungen immunologischer Toleranzmechanismen als Ursache vermutet (Vgl. Tabelle 2). In diesem Zusammenhang sei hier auf das Antiphospholipidantikörpersyndrom als Autoimmunerkrankung als häufige Ursache verwiesen, welches klinisch durch thrombembolische Ereignisse, Wachstumsretardierung des Feten mit anschließendem intrauterinem Fruchttod zumeist im zweiten Trimenon einhergeht (Kiechle 2011, S. 189 f).

2.2.4. Ursachen

Die Ursachen für einen Abort sind vielseitig und können sowohl fetaler als auch maternaler Genese sein. Häufigster Grund für einen Spontanabort ist hierbei eine genetische Anomalie des Feten, allen voran der Formenkreis der Chromosomenanomalien. Von mütterlicher Seite können unter anderem Gelbkörperinsuffizienzen und der damit einhergehende Progesteronmangel aber auch Infektionen sowie Fehlbildungen der Gebärmutter zu einem Abort führen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Abortursachen findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Wichtige Abortursachen (Quelle: modifiziert nach (Kiechle 2011, S. 184)

Mütterliche, fetale und exogene Abortursachen
• genetische Anomalien des Embryos/Feten
• Gelbkörperinsuffizienz
• Infektionen (lokal-aszendierend oder systemisch-hämatogen)
• Uterusanomalie (Fehlbildungen, Myome, intrauterine Synechien)
• immunologisch bedingt
• Zervixinsuffizienz
• mütterliche Erkrankungen (Bsp. Stoffwechselerkrankungen)
• exogene Noxen

Eine Abortform, die sich nicht als ausschließlich fetal respektive maternal klassifizieren lässt, ist der immunologisch bedingte Abort. In diesem Fall bedingen genetische Konstellationen zwischen mütterlichem und väterlichem Gewebetyp eine fehlerhafte Ausbildung der für die Implantation und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft nötigen immunologischen Toleranz. Es kommt also zur Abstoßung des Feten aufgrund der väterlichen Antigene, die der mütterliche Organismus als fremd

erkennt. Mit den expliziten Mechanismen der Immuntoleranz zwischen Mutter und Fetus beschäftigt sich das Themengebiet der Schwangerschaftsimmunologie (Kiechle 2011, S.184).

2.3. Schwangerschaftsimmunologie

2.3.1. Paradoxon der Schwangerschaft

Aus immunologischer Sicht stellt die Schwangerschaft eine Herausforderung dar, gilt es doch in dieser Zeit ein empfindliches Gleichgewicht zwischen verschiedenen Organismen aufrechtzuerhalten. Der mütterliche Organismus fungiert nicht nur als Träger, sondern auch als „aktiver Versorger“ einer wachsenden Frucht, die er zu 50 % als fremd identifizieren und abstoßen müsste. Über die Jahre entwickelten sich zahlreiche Theorien bezüglich der hierfür relevanten Mechanismen, wobei zunächst eine physische Trennung in Form von unüberwindbaren Barrieren zwischen Fetus und Mutter postuliert wurde. Eine weit verbreitete Theorie konstatierte die absolute Undurchlässigkeit der Plazenta und somit eine vollständige Trennung von mütterlichem und fetalem Blutstrom (Medawar et al. 1953). Es wurden dementsprechend eher passive Mechanismen, die eine örtliche Trennung von maternalen und fetalen Antigenen ermöglichen, angenommen. Allerdings stellten sich diese Theorien sämtlich als unzureichend heraus. Ein Übergang von fetalen Zellen in den mütterlichen Organismus konnte ebenso belegt werden, wie das Vorhandensein maternalen Zellen im Fetus (Adams 2006). Dieses Phänomen des Mikrochimerismus tritt laut neueren Studien bereits in der Frühschwangerschaft auf (Khosrotehrani et al. 2005; Zenclussen et al. 2010). Nach und nach wurden weitere aktive Adaptationsmechanismen konstatiert, sodass bis heute eine Vielzahl von Prozessen differenziert werden konnten, die dem Wort Adaptation auch Rechnung tragen, denn die Entwicklung eines semiallogenen Organismus innerhalb eines Anderen ist keineswegs eine rein passive Leistung sondern vielmehr eine aufwendige Kaskade hoch spezialisierter aktiver Regulationsmechanismen.

2.3.2. Fetale Adaptationsmechanismen

Die fetalen Überlebensstrategien sind bisher wenig verstanden. Es wurden verschiedene Mechanismen auf molekularer sowie zellulärer Ebene beschrieben. Zunächst seien in diesem Rahmen die Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA) genannt. HLA sind Glykoproteine, die in der Zellmembran verankert sind. Sie gehören zur Klasse der Immunglobuline und dienen dem Immunsystem zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden. Die Gene, die diese HLA kodieren, werden als Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl. major histocompatibility complex; MHC*) bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass klassische HLA der Klasse I und II kaum beziehungsweise gar nicht vom Trophoblasten exprimiert werden, wodurch eine Aktivierung von pro-inflammatorischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen² reduziert ist (Hunt et al. 1987). Im Gegensatz hierzu findet eine Hochregulation nicht-klassischer HLA statt, wodurch wiederum ein anti-inflammatorisches Milieu gefördert wird (Rouas-Freiss et al. 1997).

² CD = Cluster of differentiation; s.A. Kapitel 2.4

Weiterhin wurde belegt, dass Trophoblasten Faktoren sezernieren, die eine Rekrutierung von Monozyten bewirken und in diesen die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen induzieren, welche insbesondere für die Implantation der Blastozyste von Bedeutung sind (Fest et al. 2007).

Des Weiteren seien an dieser Stelle die Immunregulation über das Fas-Fas-Liganden-System (Makrigiannakis et al. 2001) sowie über eine Aktivierung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (Munn et al. 1998; Mellor und Munn 2001) erwähnt, wobei für beide gezeigt wurde, dass sie zwar ein fetalfreundliches Milieu fördern, eine Schwangerschaft jedoch auch im Falle eines Defektes in diesen Systemen erfolgreich verläuft (Rogers et al. 1998; Baban et al. 2004).

Schon seit vielen Jahren ist die Bedeutung der T-Helferzellen (Th) für die erfolgreiche Schwangerschaft bekannt. Das Th1/Th2-Paradigma beschreibt dabei, dass die Balance zwischen Typ1- (Th1-) Zytokinen und Typ2- (Th2-) Zytokinen für den Schwangerschaftsverlauf entscheidend ist. Th2-Zellen produzieren die Zytokine Interleukin (IL)-4, IL-10 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β), die zur Ausbildung eines schwangerschaftsfördernden Milieus beitragen (Piccinni et al. 1998; Dealtry et al. 2000; White et al. 2004; Gorivodsky et al. 1999; Dunker und Krieglstein 2002). Dementgegen wurden Th1-Zytokine wie IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) als schwangerschaftsbeeinträchtigend (Lin et al. 1993; Raghupathy et al. 1999; Saito 2000) beschrieben. Es wurde daher geschlossen, dass eine Polarisierung in Richtung des Th2-Profiles notwendig für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft ist. Allerdings konnten Studien belegen, dass Th2-zytokindefiziente Mäuse normal schwanger werden können (Svensson et al. 2001; Fallon et al. 2002). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass das Zytokinprofil aus dem Schwangerschaftsverlauf resultiert und nicht umgekehrt. Das Th1/Th2-Paradigma wurde um die Th17-Zellen, welche eine hohe Expression an IL-17 aufweisen, erweitert. IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien spielt (Harrington et al. 2005; Park et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass Frauen mit habituellen Aborten eine erhöhte Zahl an Th17-Zellen im Blut und der Dezidua gegenüber Normalschwangeren aufweisen (Nakashima et al. 2010; Wang et al. 2010). Dementgegen wurde belegt, dass Th17-Zellen auch IL-10 produzieren, welches wiederum die Proliferation und Zytokinproduktion von Th1-Zellen hemmen und somit zur Fetoprotektion beitragen kann (Del Prete et al. 1993). Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen zur Rolle der Th17-Zellen in der Schwangerschaft notwendig. In Zusammenhang mit dem Th1/Th2-Paradigma sind auch die $\gamma\delta$ T-Zellen zu nennen. Sie sind eine Untergruppe der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die sich in vermehrter Zahl in der Dezidua und im Blut von Schwangeren finden. Sie sezernieren hauptsächlich die Zytokine IL-10 und TGF- β , in geringerem Maße auch TNF- α , IFN- γ , IL-2 und IL-4. Es wurde gezeigt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen die Trophoblastenproliferation- und invasion fördern und die Apoptose von Trophoblastenzellen unterdrücken, was insbesondere für die Plazentation von Bedeutung ist (Fan et al. 2011).

Auf zellulärer Ebene sind im Besonderen die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) hervorzuheben, da gezeigt werden konnte, dass sie nicht nur im Rahmen mütterlicher Adaptationsprozesse von Bedeutung sind. Zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung ist die Anzahl an T_{reg} im Organismus derart hoch wie in

fetalen Geweben (Mold et al. 2008), wobei sie zudem in der Lage sind, mütterliche Antigene zu erkennen und auf diese zu reagieren (Burt 2013). Eine ausführliche Beschreibung dieser Subform von Immunzellen und ihrer Bedeutung findet sich im Kapitel 2.4 *CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatorische T-Zellen*. Wie diese Prozesse im Genauen reguliert werden, zu welchem Zeitpunkt das fetale Immunsystem seinen Wandel zur „normalen“ Immunantwort vollzieht und welche weiteren Mechanismen zum Tragen kommen, bleibt Gegenstand intensiver Forschung.

2.3.3. Maternale Adaptationsmechanismen

2.3.3.1. Zelluläre Mechanismen

Die Akteure des zellulären Immunsystems sind neben den Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) Granulozyten, Mastzellen (MZ), Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) und T-Zellen. Zu den APZ zählen im Genaueren Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen (DZ). Die Wirkung der APZ besteht darin Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und mittels HLA der Klasse II auf der Zelloberfläche zu präsentieren. In dieser Form können die Antigene von den T- und B-Zellen erkannt und eliminiert werden. In der Tat sind es diese Zellen, die zu Beginn der Schwangerschaft als erstes mit den väterlichen Antigenen in Kontakt treten, wenn die Seminalflüssigkeit in die Scheide gelangt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits diese erste Präsentation väterlicher Antigene eine wichtige Voraussetzung für die Vorbereitung des mütterlichen Immunsystems sowohl auf die Implantation als auch für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft darstellt (Robertson und Sharkey 2001). So geht beispielsweise die Präsentation väterlicher Antigene durch unreife DZ mit einer Erhöhung von T_{reg} einher, die spezifisch ebendiese schützen (Zenclussen et al. 2010; Wakkach et al. 2003). Auch MZ und uterine NK-Zellen scheinen maßgeblich am Schwangerschaftserfolg beteiligt zu sein. Neben der Interaktion mit T_{reg} sind sie vor allem für strukturelle Umbauprozesse des schwangeren Uterus von Bedeutung (Croy et al. 2006; Varayoud et al. 2004). So beeinflussen sie die Angiogenese und Ausbildung von Spiralarterien³ (Linzke et al. 2014; Woidacki et al. 2015). Den uterinen NK-Zellen wird des Weiteren ein begünstigender Einfluss auf die Trophoblasteninvasion zugeschrieben (Xiong et al. 2013; Parham 2004; Moffett und Colucci 2015).

2.3.3.2. Molekulare Mechanismen

Neben den zellulären Mechanismen gibt es auch eine Reihe von Molekülen, die ein schwangerschaftsfreundliches Milieu fördern. So unter anderem die Zytokine, spezifische Proteine, die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge an bestimmten Zielzellen regulieren. In der Immunologie werden sie auch als Mediatoren bezeichnet, da sie eine Kommunikation zwischen den verschiedenen Immunzellen ermöglichen. Einige seien in diesem Zusammenhang exemplarisch hervorgehoben: TGF- β gilt als essenzielles Molekül im Besonderen für die Implantation der Blastozyste (Robertson 2005). Es wird vor allem von APZ und T_{reg} produziert und ist zusammen mit IL-10 eines der wichtigsten

³ Spiralarterien sind Arteriolen im Uterus, die während einer Schwangerschaft die Versorgung des Embryos sichern.

antiinflammatorischen Zytokine zur Entwicklung von Immuntoleranz. Sowohl IL-10 als auch TGF- β wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Selbstverständlich spielen für die Toleranzentwicklung noch zahlreiche andere Moleküle eine Rolle, sowie diverse Interaktionen zwischen diesen und den zellulären Mechanismen des adaptiven Immunsystems. Das Polypeptid *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES), welches vom Endometrium im Implantationsbereich aber auch von endometrialen T-Zellen und dem Trophoblasten gebildet wird, kann die mütterliche Immunabwehr gegen väterliche Antigene unterdrücken (Perez Leiros und Ramhorst 2013) und führt zu einer Vermehrung von T_{reg}. Auch das *Vasoaktive intestinale Peptid* (VIP), welches sich in der Frühschwangerschaft an der feto-maternalen Grenzfläche anreichert (Hill et al. 1996), führt zu einer Erhöhung an T_{reg} und bedingt einen tolerogenen Phänotyp von Makrophagen (Fraccaroli et al. 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es insbesondere eine wichtige Rolle bei der Embryogenese spielt, da eine Blockierung des Moleküls in der zweiten Schwangerschaftshälfte im Mausexperiment zu einer Wachstumsretardierung und Mikrozephalie führte (Hill et al. 1996). Ein weiterer wichtiger Akteur ist das Galectin-1. Es gehört zur Gruppe der kohlenhydratbindenden Proteine und reagiert mit Glykoproteinen, die von anderen Zellen auf ihrer Oberfläche exprimiert werden, beispielsweise mit von T-Zellen exprimiertem CD45. Es löst auf diesem Weg die Apoptose aus und trägt somit zur Immunregulation bei (Perillo et al. 1995). Neuere Studien haben gezeigt, dass Galectin-1 nicht nur von der Plazenta (Jeschke et al. 2010), sondern auch von uterinen NK-Zellen (Kopcow et al. 2008), tolerogenen DZ (Joachim et al. 2003) und uterinen MZ (Woidacki et al. 2013) exprimiert wird. Dabei scheint besonders das von MZ sezernierte Galectin-1 ein normales Wachstum und eine adäquate Entwicklung des Feten zu gewährleisten, indem es die Ausbildung von Spiralarterien und damit den Vorgang der Plazentation begünstigt (Woidacki et al. 2013). Ein weiteres Molekül, das die Schwangerschaft auf verschiedenen Ebenen beeinflusst ist das Enzym Hämoxigenase-1 (HO-1). Ein Fehlen des Enzyms führt zu einer Akkumulation von freiem Häm, ein Eisenkomplexmolekül, welches sich zum Beispiel im Hämoglobin, dem roten Blutfarbstoff, findet. Es ist ungebunden toxisch und führt zu Schäden im Implantations- und Plazentationsvorgang (Zenclussen et al. 2011). Außerdem ist HO-1 für die Auslösung der Ovulation mitverantwortlich (Zenclussen et al. 2012) und begünstigt weiterhin die Ausbildung eines tolerogenen Phänotyps von DZ, welches wiederum zu einer Vermehrung von T_{reg} führt (Schumacher et al. 2012). Nicht zuletzt sei hier auch auf die Bedeutung von Hormonen, wie zum Beispiel Estradiol und Progesteron, verwiesen. Estradiol stimuliert zum einen die Expansion von T_{reg} (Polanczyk et al. 2004), zum anderen vermindert es die Produktion von IL-17 durch T-Zellen (Wang et al. 2009). Progesteron verringert die Th-1-Antwort (Piccinni et al. 1995) und wirkt synergistisch mit Galectin-1 (Blois et al. 2007). Die Kombination aus Estrogen und Progesteron führt zu einer Rekrutierung vom MZ zum Uterus (Jensen et al. 2010), welche, wie bereits erwähnt, bedeutsam für die Implantation und Plazentation sind (Woidacki et al. 2013). Das wohl bedeutendste Schwangerschaftshormon ist das hCG, welches aufgrund seiner zentralen Rolle in der vorliegenden

Arbeit in einem separaten Kapitel erläutert wird. Eine ausführliche Auflistung aller bis heute untersuchten Forschungsansätze würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

2.4. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatorische T-Zellen

Das menschliche Immunsystem lässt sich funktionell in ein angeborenes (unspezifisches) und ein adaptives (spezifisches) Immunsystem untergliedern. Die Terminologie gibt bereits Aufschluss darüber, dass Zweites der Anpassung der Immunabwehr an sich verändernde Umweltbedingungen (beispielsweise in Form eines veränderten Keimspektrums) dient. Die Zellen des adaptiven Immunsystems vermögen Antigene spezifisch zu erkennen und gezielt sowohl mit zellulären Abwehrmechanismen als auch mittels der Produktion von Antikörpern zu reagieren. Neben den APZ gelten zwei Zelltypen als wesentlich: B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (Borghans et al. 1999). T-Zellen im Allgemeinen entstehen im Knochenmark und wandern in ihrer Blastenform zum Thymus, dem Ort der Ausreifung. Allen T-Zellen ist gemein, dass sie auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor zur Erkennung spezifischer Antigene besitzen. Dabei müssen diese zuvor an körpereigene HLA-Moleküle gebunden sein und derart präsentiert werden. Je nach Art der exprimierten Oberflächenmoleküle werden T-Zellen zunächst in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untergliedert, wobei die Art des so genannten Cluster of differentiation (CD) maßgeblich die Funktion der T-Zelle bestimmt. Grob kann gesagt werden, dass das CD8-Protein die zytotoxischen T-Zellen markiert, während solche mit einem CD4-Protein auf der Oberfläche als T-Helferzellen bezeichnet werden.

T_{reg} sind eine Untergruppe der Th-Zellen (Sakaguchi et al. 1995), welche die Funktion besitzen die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken. Sie sind dementsprechend essenziell sowohl für die Entwicklung der Selbsttoleranz, als auch für die Allotoleranz, welche neben der Prävention von Autoimmunerkrankungen und Abstoßung von Organtransplantaten (Sakaguchi et al. 1995; Kingsley et al. 2002) auch für die Immuntoleranz innerhalb der Schwangerschaft von Bedeutung ist (Mold et al. 2008; Zenclussen et al. 2005).

2.4.1. Phänotyp

T_{reg} werden anhand einer Kombination von Oberflächenmarkern und einem Transkriptionsfaktor definiert, da bis zum heutigen Tage kein Marker identifiziert wurde, der nicht auch auf anderen Immunzellen exprimiert wird. So werden zur Charakterisierung und Isolierung von T_{reg} unter anderem der Marker CD25, welcher der α -Kette des IL-2-Rezeptors entspricht, sowie die Marker Neuropilin-1 (Nrp-1), zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4 (CTLA-4) und Programmed death-1 (PD-1) innerhalb der CD-4-T-Zell-Population verwendet (Abbildung 3). Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Nachweis einer geringen Expression

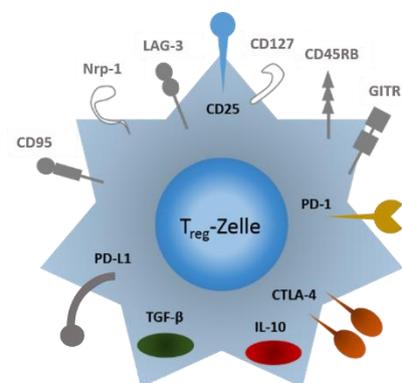


Abbildung 3: Der Phänotyp einer CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg.

Die farblich hervorgehobenen Moleküle wurden in dieser Arbeit näher betrachtet.

des IL-7-Rezeptors (CD127). Als der geeignetste Marker zur Identifikation von T_{reg} wurde bisher der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Forkheadbox Protein 3 (FoxP3) beschrieben, wobei auch dieser im Menschen nicht vollkommen spezifisch ist, da beispielsweise humane Effektor-T-Zellen nach Aktivierung eine transiente FoxP3-Expression zeigen (Wang et al. 2007). Eine der neuesten Methoden zur Analyse von T_{reg}, die derzeit als spezifisch gilt, bietet die Bestimmung von T_{reg}-spezifischen DNA-Methylierungsmustern im FoxP3-Gen (Wieczorek et al. 2009).

2.4.2. Subtypen

Abhängig vom Ort ihrer Entstehung lassen sich T_{reg} in natürliche CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen und induzierte T_{reg} untergliedern. Während natürliche T_{reg} im Thymus gebildet werden, entstehen induzierte T_{reg} durch Antigenstimulation in der Peripherie aus sogenannten naiven T-Zellen (Jonuleit und Schmitt 2003). Zu ihnen zählen Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen), welche IL-10 sezernieren (Weiner 2001) und T-Helferzellen 3 (Th3), welche sich durch die Produktion von TGF-β auszeichnen. Sowohl Tr1- als auch Th3-Zellen konnten im Uterus nachgewiesen werden (Robertson 2000). Während die Notwendigkeit der Tr1-Zellen in der Schwangerschaft fragwürdig (White et al. 2004) und die der Th3-Zellen noch weitestgehend unerforscht ist, ist die Bedeutung der natürlich vorkommenden T_{reg} bewiesen.

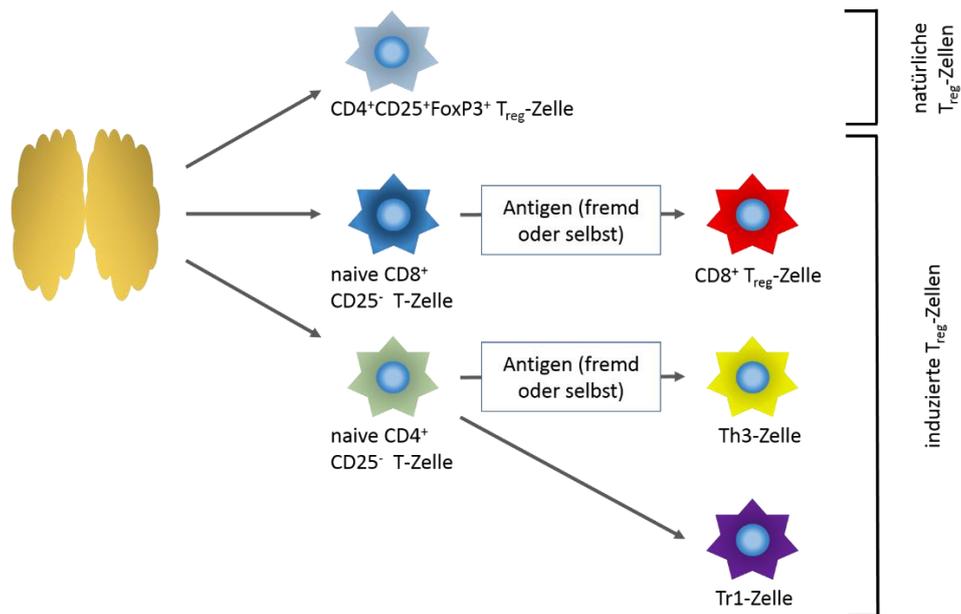


Abbildung 4: Subtypen von Treg. Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe (Mills 2004)

2.4.3. T_{reg}-Zell-Generierung

2.4.3.1. Generierung der T_{reg} im Thymus (nT_{reg})

Der Entstehung von T-Zellen im Allgemeinen liegt ein Selektionsprozess von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark im Thymus zugrunde, wodurch diese vor dem Durchtritt in die Blutbahn einer Aviditätsprüfung unterzogen werden. Thymale Stromazellen exprimieren hierfür den MHC/Selbstantigen-Komplex, mit welchem der T-Zell-Rezeptor der T-Zelle interagiert (Itoh et al. 1999; Fontenot et al. 2005). Reagiert eine T-Zelle mit einer moderaten Avidität, ist ihr der Durchtritt in die Blutbahn durch die Blut-Thymus-Schranke gestattet (positive Selektion). Fällt die Avidität zu hoch oder zu gering aus, wird sie durch Apoptose eliminiert (negative Selektion) (Boehmer et al. 1989). Besonders die Eliminierung von Zellen mit zu hoher Avidität trägt zur Prävention von Autoimmunkrankheiten bei und wird daher auch als zentrale Toleranz bezeichnet. Neben der zentralen ist die periphere Toleranz von Bedeutung, die unter anderem dafür Sorge trägt, dass autoreaktive T-Zellen, die der thymalen Selektion entgangen sind, dennoch unterdrückt werden. Dies ist die Aufgabe der T_{reg}. Natürliche T_{reg} entstehen im Thymus durch eine veränderte Negativselektion: so geht man davon aus, dass ihre Affinität zum MHC/Selbstantigen-Komplex etwas schwächer ist als bei der Negativselektion, sich aber an der Grenze zur Positivselektion befindet.

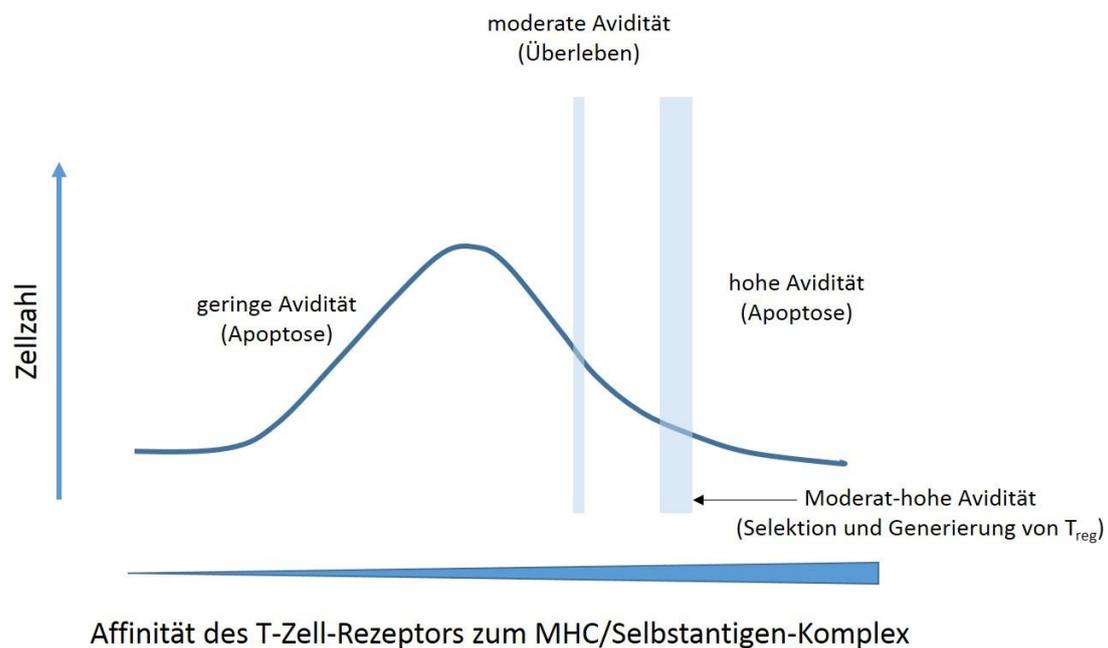


Abbildung 5: T_{reg} entstehen im Thymus durch eine veränderte Negativselektion; die Affinität zum MHC/Selbstantigen-Komplex befindet sich an der Grenze zur Positivselektion (Abbildung entnommen und modifiziert aus Literaturangabe (Guerin et al. 2009))

2.4.4. Allgemeine Funktionen von T_{reg}

T_{reg} sind in der Lage, die Aktivität des Immunsystems zu supprimieren. Sie üben diese Funktion zum einen über direkte Zell-Zell-Interaktionen mit anderen Immunzellen und zum anderen über die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen aus. Sie wirken inhibierend auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

(Piccirillo und Shevach 2001), B-Zellen (Lim et al. 2005), NK-Zellen (Ghiringhelli et al. 2005), DZ und Makrophagen (Cederbom et al. 2000; Misra et al. 2004; Taams et al. 2005) entweder durch Hemmung der Proliferation oder durch Unterdrückung ihrer Funktion (Zytokinsekretion, Antikörperproduktion). Für die Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen ist besonders CTLA-4 von Bedeutung (Karman et al. 2012; Wing et al. 2011; Boehmer 2005). Sein Ligand ist das Oberflächenmolekül CD80/CD86, welches beispielsweise auf aktivierten T-Zellen und APZ exprimiert wird. Daneben scheinen

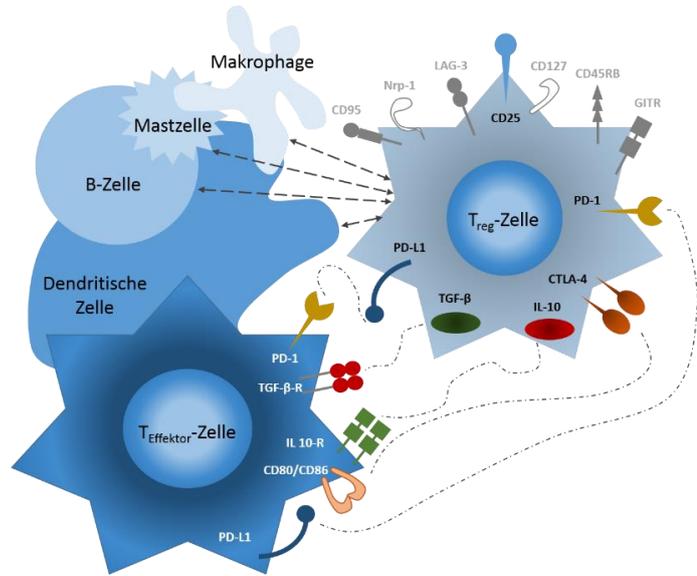


Abbildung 6: *T_{reg} supprimieren andere Immunzellen durch direkte Zell-Zell-Interaktionen oder durch Zytokine, hier exemplarisch für eine T-Effektor-Zelle.*

aber auch andere Moleküle, wie das Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3) (Huang et al. 2004) und, wie oben bereits erwähnt, PD-1 (Francisco et al. 2010) eine tragende Rolle innezuhaben. Die indirekte Immunsuppression vollführt sich über die Sezernierung von Zytokinen. Neben IL-9, welches zur Rekrutierung immunsuppressiver MZ beiträgt (Lu et al. 2006; Eller et al. 2011) sind besonders IL-10 (Hara et al. 2001) und TGF-β (Wahl et al. 2004) von Bedeutung. Beide Moleküle sind in der Lage, die Proliferation und Funktion von T-Effektor-Zellen zu hemmen (Miyara und Sakaguchi 2007; Boehmer 2005).

2.4.5. Funktionen von T_{reg} in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft

Bereits zu Beginn der humanen Schwangerschaft findet eine Expansion von T_{reg} sowohl im gesamten weiblichen Organismus als auch an der fetal-mütterlichen Grenzfläche statt (Somerset et al. 2004). In den wissenschaftlichen Studien der letzten Jahre kristallisierte sich die Theorie heraus, dass T_{reg} besonders für die Etablierung der Schwangerschaft von großer Bedeutung sind in dem Sinne, dass ein implantationsförderndes Mikro-Milieu im Uterus geschaffen wird. Dies konnte im Maus-Modell bereits eindrücklich gezeigt werden (Teles et al. 2013) und ist in ähnlicher Art und Weise für den menschlichen Organismus anzunehmen. So wiesen Frauen mit unerklärter Infertilität sehr geringe Mengen an FoxP3-mRNA im Endometrium im Vergleich zu fertilen Frauen auf (Jasper et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass die späte Follikelphase des Menstruationszyklus mit einer Expansion von T_{reg} einhergeht (Arruvito et al. 2007), gefolgt von einem rapiden Abfall in der Lutealphase. Dieser Prozess unterliegt einer hormonellen Steuerung (Weinberg et al. 2011; Schumacher et al. 2014). Die Ausübung der Toleranz beschränkt sich dabei nicht nur auf eine allgemeine lokale Suppression des Immunsystems, sondern wirkt auch antigenspezifisch. Bereits im Vaginallumen findet eine Präsentation väterlicher Antigene statt. Dies geschieht über direkte und indirekte Signalwege (Moldenhauer et al. 2009; Zenclussen et al.

2010). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Seminalflüssigkeit als auch Spermatozyten T_{reg} induzieren und deren Expansion sowie deren immunregulatorische Aktivität forcieren (Teles et al. 2013; Robertson et al. 2009; Liu et al. 2013; Guerin et al. 2011; Balandya et al. 2012). Hierfür könnte unter anderem auch das in hoher Konzentration im Samen vorkommende TGF- β von Bedeutung sein (Clark et al. 2008). Es wird somit eine sofortige Akzeptanz väterlicher Antigene gewährleistet, was unerlässlich für die Implantationsphase ist. Im weiteren Verlauf werden von der Plazenta und dem Feten weiterhin kontinuierlich fetale beziehungsweise väterliche Antigene in das mütterliche Immunsystem entlassen, was wiederum für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft von Bedeutung ist. Die antigenspezifischen T_{reg} sind weiterhin in der Lage im mütterlichen Organismus auch nach der Geburt zu persistieren um bei folgenden Schwangerschaften erneut zu akkumulieren (Rowe et al. 2012).

Generell ist in den ersten beiden Trimestern der Schwangerschaft ein rapider Anstieg an T_{reg} zu verzeichnen, wohingegen deren Zahl im dritten Trimester wieder kontinuierlich sinkt (Mjosberg et al. 2009; Heikkinen et al. 2004; Somerset et al. 2004). Zum Zeitpunkt der Geburt findet ein weiterer Abfall statt, sodass ein Zusammenhang zwischen der Verringerung der T_{reg} -Anzahl und der Geburtsinduktion vermutet werden darf (Galazka et al. 2009). Auch im Falle einer Frühgeburt finden sich erniedrigte T_{reg} -Levels. So sind Defizite in Funktion und Anzahl besonders für die Pathologie des immunologischen Abortes von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass eine reduzierte Anzahl an T_{reg} mit dem Auftreten spontaner, sowie habitueller Aborte einhergeht (Sasaki et al. 2004; Arruvito et al. 2009). Auch bei Endometriosepatientinnen und in Fällen von Extrauterin gravidität wurde eine Beeinträchtigung der Funktion von T_{reg} nachgewiesen (Basta et al. 2010; Sundara et al. 2012; Schumacher et al. 2009).

Man geht davon aus, dass T_{reg} zum einen durch Migration zur fetal-mütterlichen Grenzfläche gelangen und zum anderen durch *de-novo*-Synthese aus naiven T-Zellen vor Ort entstehen (induzierte T_{reg} , iT_{reg}). Auch die Expansion eines bereits vorhandenen T_{reg} -Zellpools scheint von Bedeutung. Neben der bereits erwähnten Aktivierung durch väterliche Antigene scheinen auch hormonelle Einflüsse die Kinetik der T_{reg} in der Schwangerschaft maßgeblich zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Östrogene als auch Zytokine die T_{reg} -Zell-Expansion und die *de-novo*-Synthese auslösen (Tai et al. 2008; Chen et al. 2003).

2.5. Humanes Choriongonadotropin (hCG)

2.5.1. Struktur und Vorkommen

HCG wird spezifisch von Primaten gebildet (Boorstein et al. 1982; Policastro et al. 1983; Morgan et al. 1975; Tepper und Roberts 1984; Crawford et al. 1986). Es ist ein Glykoprotein bestehend aus 237 Aminosäuren und liegt als Heterodimer vor (Lapthorn et al. 1994). Die α -Untereinheit setzt sich aus 92 Aminosäuren zusammen (UniProt) und findet sich so auch im LH, follikelstimulierenden Hormon und thyreoidstimulierenden Hormon. Die β -Untereinheit ist spezifisch für das hCG und besteht aus 145 Aminosäuren (UniProt). Wie bereits erwähnt, ist hCG eines der ersten Signale des Embryos an die

Mutter und wird von diesem bereits kurz nach der Befruchtung gebildet (Jurisicova et al. 1999; Bonduelle et al. 1988; Lopata und Hay 1989). Ist die Implantation der Blastozyste abgeschlossen, wird es in großen Mengen vom Synzytiotrophoblasten gebildet (Hoshina et al. 1985). Da sich das hCG bereits zu diesem frühen Zeitpunkt sowohl im Blut als auch im Urin der Schwangeren nachweisen lässt, wird es zur Diagnostik einer bestehenden Schwangerschaft genutzt (Jaffe et al. 1969), wobei sich die hCG-Menge alle 31 Stunden verdoppelt (Pittaway et al. 1985) bis sie zwischen der neunten und zwölften Schwangerschaftswoche ihren Höhepunkt erreicht. Im Anschluss ist ein kontinuierlicher Abfall an hCG zu verzeichnen; das Level einer Nullipara wird jedoch bis zur Geburt nicht wieder erreicht (Abbildung 7) (Aspillaga et al. 1983; Braunstein et al. 1976).

Die Funktion des hCG wird über die Bindung an den LH/CG-Rezeptor vermittelt. Dieser findet sich sowohl auf Epithelzellen, als auch auf Stromazellen, Myometrium und glatten Muskelzellen von Gefäßen (Aspillaga et al. 1983). Auch eine Bindung und Funktionsausübung über den Mannoserezeptor wurde beschrieben. Dies ist besonders für die Interaktion mit uterinen NK-Zellen von Bedeutung (Kane et al. 2009).

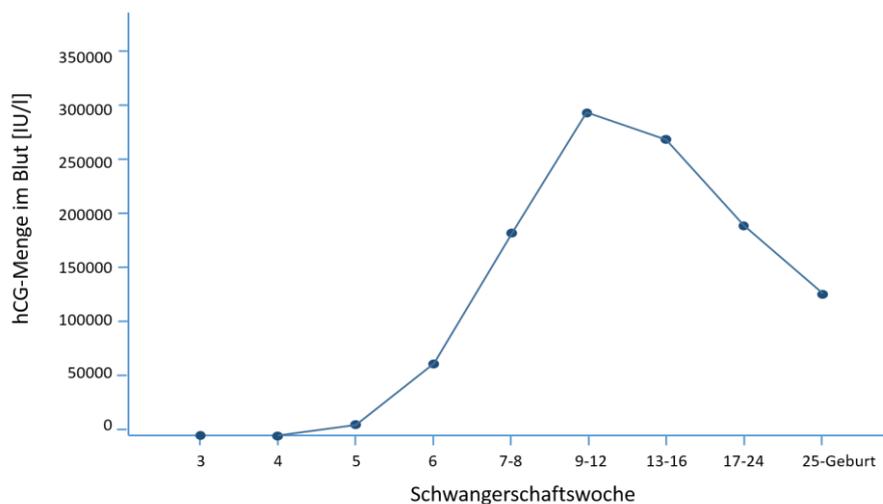


Abbildung 7: hCG-Menge im Blut in der Schwangerschaft. Die Menge an hCG steigt bis zur 10.-11. Schwangerschaftswoche stark an und fällt ab der 12. Schwangerschaftswoche kontinuierlich auf ein niedriges Level ab, welches bis zur Geburt erhalten bleibt. (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Anne Leber 2011)

2.5.2. Funktionen

Die Hauptfunktion des hCG besteht darin die Progesteronproduktion des Gelbkörpers zu stimulieren (Key et al. 2004). Des Weiteren unterstützt es die Implantationsphase durch die Anregung der Trophoblasteninvasion ins Endometrium (Kornyei et al. 1993; Fluhr et al. 2008; Kayisli et al. 2003) und der Angiogenese (Tsampalas et al. 2010), wodurch eine adäquate Ernährung des Embryos gewährleistet wird (Berndt et al. 2006; Zygmunt et al. 2002).

2.5.3. hCG als Immunregulator

HCG sorgt für ein implantationsförderliches Milieu des Endometriums indem es die Immuntoleranz an der feto-maternalen Grenzfläche unterstützt. Dies geschieht sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene. Es greift in die Apoptose von Immunzellen durch Interferenz mit dem Fas/Fas-Ligandensystem (Kayisli et al. 2003) und dem Komplementsystem innerhalb der Dezidua ein. Es vermag das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen in Richtung einer Th2-Antwort zu verschieben (Khan et al. 2001) sowie die Anzahl an antiinflammatorischen Immunzellen zu erhöhen beziehungsweise deren Funktion zu beeinflussen. Es erhöht die Anzahl an uterinen NK-Zellen innerhalb des Uterus (Bansal et al. 2012) und vermindert die Induktion einer Proliferation von zytotoxischen T-Zellen durch DZ (Wan et al. 2008). Des Weiteren zeigten Schumacher und Kollegen, dass auf T_{reg} der Rezeptor für das Schwangerschaftshormon hCG exprimiert wird und es wurde postuliert, dass eine Migration von T_{reg} zur fetal-mütterlichen Grenzfläche entlang des Konzentrationsgradienten des hCG erfolgt (Schumacher et al. 2013).

2.6. Zielstellung

Die Entstehung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Unabdingbar ist in diesem Zusammenhang neben der Erforschung der Onto- und Spermatogenese sowie der embryologischen Grundlagen auch die Frage nach den immunologischen Strategien eines Organismus, die es ermöglichen einen körperfremden Organismus in einem anderen entstehen und reifen zu lassen.

Die Bedeutung von T_{reg} für eine erfolgreiche Schwangerschaft wurde mittlerweile in vielen Studien bestätigt. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl eine Rekrutierung von T_{reg} aus der Peripherie hin zur feto-maternalen Grenzfläche (Tilburgs et al. 2008) als auch eine lokale Vermehrung durch Expansion oder Konversion (Mjösberg et al. 2010; Dimova et al. 2011) stattfindet. So finden sich in der Dezidua signifikant höhere Mengen an T_{reg} als im Blut der Schwangeren (Tilburgs et al. 2006; Mjösberg et al. 2010; Dimova et al. 2011). Es liegt daher nahe zu vermuten, dass lokale, an der Grenzfläche vorhandene Faktoren dazu beitragen, dass hier eine Anreicherung von T_{reg} erfolgt. Mehrere Studien suggerieren, dass vom Trophoblasten sezernierte Faktoren, wie beispielsweise Galectin-1 (Ramhorst et al. 2012b), VIP (Fraccaroli et al. 2015) und TGF- β (Ramhorst et al. 2012a) einen positiven Effekt auf die Anzahl an T_{reg} haben (Du et al. 2014). Einer der wichtigsten vom Trophoblasten sezernierten Stoffe ist das Schwangerschaftshormon hCG. Es konnte gezeigt werden, dass hCG über einen LH/CG-Rezeptor direkt mit T_{reg} interagiert. Patientinnen, welche einen Spontanabort erlitten, zeigten sowohl eine erniedrigte Menge an T_{reg} als auch eine verringerte Produktion von hCG durch die Trophoblastenzellen (Schumacher et al. 2009). Im Mausmodell konnte des Weiteren bereits gezeigt werden, dass hCG sowohl eine Zunahme der T_{reg} -Anzahl sowie eine Aktivitätssteigerung ebenjener bewirkt. Außerdem führte ein Transfer von hCG-behandelten T_{reg} zu einer Verringerung der Abortrate (Schumacher et al. 2013). Die Untersuchung im Mausmodell ist deshalb möglich, weil die Tiere, obwohl

sie selbst kein hCG produzieren, den LH/CG-Rezeptor exprimieren. Eine analoge Studie für den Menschen lag noch nicht vor. Dennoch bedient man sich in der Reproduktionsmedizin bereits der Injektion von hCG unmittelbar nach einem Embryotransfer, da es Evidenzen dafür gibt, dass sich Implantations- und Schwangerschaftsraten bei In-vitro-Fertilisationen und intrazytoplasmatischen Spermieninjektionen signifikant erhöhen (Zarei et al. 2014; Aaleysin et al. 2015). Ob dieser Effekt auch der Wechselwirkung zwischen hCG und T_{reg} geschuldet ist, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nach Wissen des Autors nicht untersucht worden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob hCG in der humanen Schwangerschaft neben der bereits beschriebenen Fähigkeit eine Migration von T_{reg} zur feto-maternalen Grenzfläche zu induzieren auch die Entstehung und die suppressive Kapazität der T_{reg} zu beeinflussen vermag. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Induziert hCG die Konversion von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen in $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen?
2. Bewirkt hCG eine Modulation der Oberflächenmarker CTLA-4 und PD-1 auf $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen?
3. Moduliert hCG die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β in $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen?
4. Beeinflusst hCG die suppressive Aktivität von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Allgemeine Laborgeräte

Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Glasmaterialien	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank Liebherr FKEX 3600	Rexel Deutschland, Hannover, Deutschland
Kühlschrank Liebherr KTP 1810-20	Unielektro, Eschborn, Deutschland
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Magnetrührer RH Basic 2 IKAM	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Parafilm M	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen (Typ A-C)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionswaage LA 620	Sartorius, Berlin, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reinigungs- und Desinfektionsautomat	Omnilab-Laborzentrum, Bremen, Deutschland
Trockenschrank	Novodirect Labortechnik, Kehl, Deutschland
Ultra-Tiefkühlschrank MDF-U53V	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

3.1.2. Software

Cell Quest Pro 4.bf4b	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
Microsoft Excel 2012	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2012	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2012	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
SPSS Inc.,	IBM, Chicago, USA

3.1.3. Zellkultur

CO ₂ -Inkubator HERACELL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
CO ₂ -Inkubator NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axio Observer A1	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland

Probenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schüttelwasserbad SWB 25	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank NU-437-400E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.1.4. Magnetische Zellisolierung

MACS TM Ständer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
OctoMACS TM Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QuadroMACS TM Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Säulen (MS, LD)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

3.1.5. Durchflusszytometrie

BD FACS Calibur TM 4CA	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS (Rinse, Clean)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Omnifix® - 1 ml Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Polystyren-Rundbodenröhrchen	BD Falcon, Erembodegem, Belgien

3.1.6. Chemikalien

Di-Methyl-Sulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ficoll-Paque TM	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Hepes	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.7. Kulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.8. Puffer

PBS (10x)	80 g NaCl 21,9 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
-----------	---

	2 g KH_2PO_4
	2 g KCl
	mit Aqua _{dest} auf 1l auffüllen
FACS-Puffer	1 % BSA
	0,1 % NaN_3
	in PBS
MACS-Puffer	0,5 % BSA
	2 mM EDTA
	in PBS (pH 7,4), steril filtern
Waschpuffer für ELISA	0,05 % Tween in PBS

3.1.9. Enzyme und Proteine

Rekombinantes hCG (Ovitrelle)	Merck Serono Europe Limited, London, GB
Urin-aufgereinigtes hCG (Pregnyl)	Organon, Oss, Niederlande
Humanes rekombinantes IL-2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland

3.1.10. Antikörper

Alexa Fluor 647 anti-Human FoxP3 (Klon 259D/C7)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Aufgereinigter NA/LE Maus anti-Human CD3 (Klon: HIT3a)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Aufgereinigter NA/LE Maus anti-Human CD28 (Klon: CD28.2)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-hCG Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
IgG-Kontrollantikörper	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat anti-Human PD-1 (Klon: MIH4)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Phycoerythrin anti-Human CD25 (Klon: M-A251)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Phycoerythrin-Cyanin-5 anti-Human CD152 (CTLA-4) (Klon: BNI3)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

3.1.11. Kits

CD4 ⁺ T-Zell-Isolations-Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zell-Isolations-Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit (Stock 10mM)	Molecular Probes, Leiden, Netherlands
OptEIA™ Human IL-10 ELISA-Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

TGF beta1 ELISA Ready-Set-Go	Affymetrix eBiosciences, Frankfurt, Deutschland
hCG ELISA-Kit	DRG Instruments, Marburg, Deutschland
Progesteron ELISA-Kit	DRG Instruments, Marburg, Deutschland

3.1.12. Immortalisierte Zellen und Zelllinien

HaCat (Keratinozytenzelllinie)	freundlicherweise bereit gestellt von: Martina Seifert, Institut für Immunologie, Berlin, Deutschland
HTR-8 (immortalisierte extravillöse Zytotrophoblastenzellen)	freundlicherweise bereit gestellt von: Prof. Gil Mor Abteilung für Geburtshilfe, Gynäkologie & Reproduktionsmedizin, New Haven, USA
JEG-3 (Choriokarzinomzelllinie)	CLS-Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland
SWAN-71 (immortalisierte extravillöse Zytotrophoblastenzellen)	freundlicherweise bereit gestellt von: Prof. Gil Mor Abteilung für Geburtshilfe, Gynäkologie & Reproduktionsmedizin, New Haven, USA
Maus-Leydig-Tumorzelllinie	ATCC, Manassas, VA 20108 USA

3.1.13. Zellkulturmedien

JEG-3 und HaCat:

DMEM mit	10 % FBS 100 nM Penicillin/Streptomycin
HTR-8:	
RPMI mit	10 % FBS 0,1 mM MEM 1 mM Natriumpyruvat 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin
SWAN-71:	
DMEM mit	10 % FBS 0,1 mM MEM 1 mM Natriumpyruvat 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin
Maus-Leydig-Tumorzellen:	
RPMI mit	10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Auftauen der Zelllinien

Für die verschiedenen Versuchskomplexe wurden JEG-3-, HaCat-, SWAN-71- und HTR-8-Zellen verwendet. Um die Zelllinien zu kultivieren, wurden sie aus flüssigem Stickstoff entnommen und kurz auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte der Auftauprozess durch Erwärmung im Wasserbad bei 37 °C. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 15 ml vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und bei 1500 rpm für 6 Minuten zur Entfernung des DMSO-haltigen Überstandes zentrifugiert. Der Zusatz von DMSO ist während des Einfrierprozesses notwendig, da es die Bildung von Eiskristallen verhindert, wirkt sich jedoch nach dem Auftauen toxisch auf die Zellen aus, sodass es schnellstmöglich entfernt werden muss. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet in 15 ml des entsprechenden Zellkulturmediums resuspendiert und die Zellen ausplattiert.

3.2.1.2. Kultivierung und Passagierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen in 15 ml Kulturmedium kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei Erreichen einer Zelldichte von über 90 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die sich in den Kulturflaschen befindlichen Zellen zunächst vom Medium befreit und mit 10 ml PBS gewaschen. Da es sich um adhärenente Zellen handelt, wurden die Zellen anschließend trypsinisiert. Trypsin ist eine Endopeptidase und in der Lage extrazelluläre Proteine zu spalten. Es bewirkt so die Lösung von an der Zellkulturplatte adhärenenten Zellen. Nach einer 3-minütigen Inkubation wurde die Reaktion mit 10 ml des entsprechenden Zellmediums abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 6 Minuten bei Raumtemperatur (RT) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden vor der Zentrifugation 10 µl aus der Suspension entnommen und mit Trypanblau gefärbt. Die Zellen wurden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl aus 4 Quadranten} \cdot \text{Volumen [ml]} \cdot \text{Verdünnungsfärber} \cdot 10^4 [\text{Kammerfaktor}]}{4}$$

Nach der Berechnung der Gesamtzellanzahl wurde die entsprechende Zellzahl für die Versuche ausplattiert bzw. 1/10 der ursprünglichen Zellanzahl für weitere Versuche subkultiviert.

3.2.2. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMZ) aus dem Blut von schwangeren Frauen

3.2.2.1. Probengewinnung (Blutentnahme)

Es wurden Blutproben von Normalschwangeren (n = 20; Alter: 30,78 ± 5,56; Schwangerschaftswoche: 29,60 ± 3,32) entnommen. Die Entnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen aus einer peripheren Vene. Die Gewinnung der Blutproben fand in enger Zusammenarbeit mit der Universitätsfrauenklinik der

Otto-von-Guericke Universität Magdeburg statt. Die Genehmigung hierfür erfolgte durch die Ethikkommission der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (Studie 28/08). Alle Frauen wurden umfangreich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

3.2.2.2. Isolation der PBMZ

Zur Isolation der PBMZ wurden 30-40 ml Blut in EDTA-Röhrchen von gesunden schwangeren Probandinnen verwendet. Die Blutproben wurden zunächst für 10 Minuten auf Eis gestellt. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der Blutröhrchen für 10 Minuten bei 2200 rpm und 20 °C, sodass eine Trennung von zellulären Blutbestandteilen und Plasma resultierte. Ab diesem Zeitpunkt wurde die gesamte Isolation unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Mit einer Pasteurpipette erfolgte die Entfernung des Plasmas. Der zelluläre Blutanteil wurde mit 2 ml PBS vermischt. Das entstandene Blut-PBS-Gemisch wurde auf vier 15 ml Reaktionsgefäße, gefüllt mit jeweils 4 ml Ficoll-Paque™-Lösung, vorsichtig aufgeschichtet. Ficoll ist ein hydrophiles Polysaccharid, welches die PBMZ anhand ihrer Dichte von den restlichen Blutbestandteilen isoliert. Es erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation der Proben für 20 Minuten bei 1800 rpm und 4 °C unter fehlender Bremsenwirkung. Im Anschluss wurde die Interphase mit den PBMZ mittels Pasteurpipette vorsichtig entnommen und auf 15 ml PBS aufgefüllt. Die PBMZ wurden insgesamt zweimal in PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die PBMZ in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und gezählt.

3.2.2.3. Isolation von CD4⁺CD25⁻T-Zellen mittels Magnetischer Zellsortierung

Die Magnetische Zellsortierung (engl.: magnetic activated cell sorting, MACS) ermöglicht die Isolation einer definierten Zielzellpopulation aus einer Gesamtpopulation. Hierbei binden zunächst Antikörper (AK) gegen spezielle Oberflächenmoleküle der Zelle, die dann in einem zweiten Schritt mit paramagnetischen Mikropartikeln beladen werden. Die AK können im Sinne einer Negativselektion gegen Zellen der zu depletierenden Zellpopulationen gerichtet sein. Dementsprechend werden für den Fall der Isolation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zunächst alle nicht CD4⁺ Zellen mit einem AK markiert. Hierzu wird der Gesamtzellpopulation ein Gemisch aus verschiedenen Biotin-konjugierten AK hinzugefügt, das sich gegen diverse Oberflächenmoleküle richtet. Diese sind anti-CD8a (zytotoxische T-Zellen), -CD11b (Monozyten), -CD45R (Makrophagen), -CD49b (NK-Zellen) und -Ter-119 (Erythrozyten). Diese Oberflächenmoleküle werden von CD4⁺ Zellen nicht exprimiert, sodass sie weiterhin unmarkiert vorliegen. Im Anschluss werden die AK-beladenen Zellen mit den Mikropartikeln beladen und in eine Säule mit magnetischen Eisenkugeln überführt. Diese befindet sich in einem starken Magnetfeld, sodass alle magnetisch markierten Zellen in der Säule verbleiben, während die unmarkierten Zellen (hier: CD4⁺ Zellen) als

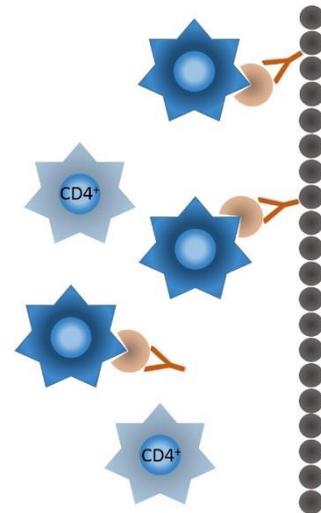


Abbildung 8: Magnetische Zellsortierung. Die nicht CD4⁺ Zellen werden mit einem Biotin-konjugierten AK (↗) markiert. An diesen binden die paramagnetischen Mikropartikel (Y), sodass die beladenen Zellen im Magnetfeld zurückgehalten werden.

Effluent aufgefangen werden können (Abbildung 8). Neben der Markierung der zu depletierenden Zellpopulation findet im gleichen Schritt eine Markierung der anzureichernden Zellpopulation statt (Positivselektion). Im Zuge der Gewinnung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden hierfür zunächst alle CD25⁺ Zellen mittels AK markiert und diese nach erfolgter Depletion der CD4⁻ Zellen mit Mikropartikeln beladen. Analog zur Negativselektion wurde die Zellsuspension in ein Magnetfeld eingebracht, wodurch die CD4⁺CD25⁺ Zellen in der Säule verblieben und die CD4⁺CD25⁻ Zellen als Effluent aufgefangen wurden. Nach der Isolation wurden die Zellen auf die Expression der Marker CD4, CD25 und FoxP3 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Reinheit an CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ T-Zellen betrug > 98 %. Demnach wurden CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen für die verschiedenen Kokultivierungsexperimente verwendet.

3.2.3. Kokultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit verschiedenen Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die hier verwendeten Zelllinien die Konversion von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen in T_{reg} begünstigen, wurden JEG-3-, HTR-8-, SWAN-71- und HaCat-Zellen mit CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen kokultiviert. Hierfür wurden 5x10⁴ Zellen jeder Zelllinie pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte in 1 ml entsprechendem Kulturmedium ausplattiert. Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden allein kultiviert, um eine vollständige Anheftung an die Kulturplatte zu gewährleisten. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und 1x10⁵ CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen gelöst in 500 µl RPMI-Medium hinzugegeben. Zusätzlich wurde das RPMI-Medium mit 5 µg/ml anti-CD28 und 1 µg/ml anti-CD3 zur T-Zellstimulierung und mit 10 ng/ml IL-2 versetzt. Das IL-2 dient hierbei als Überlebensfaktor für die T-Zellen (insbesondere für die T_{reg}). Die Kokultur erfolgte für 72 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kontrollen wurden CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen und alle Zelllinien in alleiniger Kultur mitgeführt. Außerdem erfolgte eine Isotypenkontrolle: dabei wurde der Kultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen ein AK des gleichen Subtyps (IgG) wie die AKs zur Färbung der Zellmarker (siehe 3.2.7.2), der jedoch nichts bindet, hinzugefügt. So kann Nebeneffekten, wie zum Beispiel eine durch Zugabe von AKs getriggerte Verstärkung der Autofloreszenz der Zellen, vorgebeugt werden. Anschließend wurde das Zellkulturmedium mit den T-Zellen abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm (4 °C) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und zur Bestimmung der Menge an IL-10 und TGF-β mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bei -80 °C aufbewahrt. Die Expression verschiedener extra- und intrazellulärer Marker der T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde jede Kokultur 6 Mal (das heißt mit Blutproben von 6 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.4. Stimulation der CD4⁺FoxP3⁻ Zellen mit hCG und Blockierung mit einem anti-hCG-AK

3.2.4.1. Bestimmung der Neutralisationsfähigkeit des hCG-Antikörpers

Um die Wirksamkeit des im folgenden Versuchsteil verwendeten anti-hCG-AKs zu testen, wurde der blockierende Effekt des AK auf die hCG-induzierte Progesteronproduktion einer Leydig-Zell-Tumorlinie aus der Maus (MLTC-1-Zellen) untersucht. Bei dieser Untersuchung macht man sich zu

Nutze, dass das von JEG-3-Zellen gebildete hCG die Produktion und Sekretion von Progesteron in MLTC-1-Zellen induziert. Die Menge an sekretiertem Progesteron kann anschließend im Zellkulturüberstand mittels ELISA nachgewiesen werden. Für den Wirksamkeitstest wurden zunächst 5×10^4 JEG-3-Zellen auf einer 24-Lochplatte in 1 ml entsprechendem Medium ausplattiert. Nach vollständiger Adhärenz der JEG-3-Zellen an den Plattenboden wurden die Zellen in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:500; 1:100; 1:50, 1:25) des anti-hCG-AK (200 µg/ml) behandelt. Unbehandelte JEG-3-Zellen dienen als Kontrolle. Nach 24 Stunden wurden 500 µl des Zellkulturüberstandes der JEG-3-Zellen auf MLTC-1-Zellen übertragen und die MLTC-1-Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Überstände der MLTC-1-Kulturen auf ihren Gehalt an Progesteron mittels ELISA überprüft.

3.2.4.2. Kokultur der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen bei gleichzeitiger Blockierung des hCG

Wie im oberen Versuchsteil beschrieben (siehe 3.2.3) wurden CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen kokultiviert. In einigen Ansätzen wurde der Kokultur ein neutralisierender anti-hCG-AK (siehe 3.2.4.1) in der Verdünnung 1:50 hinzugesetzt. Ansätze ohne AK-Zusatz, Ansätze mit Zusatz eines Immunglobulin (Ig)G-Kontroll-AK (Verdünnung 1:50) sowie allein kultivierte CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen dienen als Kontrollen. Nach 72 Stunden Kultur wurden die T-Zellen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie vermessen und die Zellkulturüberstände auf ihren Zytokingehalt mittels ELISA überprüft. Dieser Versuchsteil wurde 3 Mal (Blutproben von drei verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.5. Kultur der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit rekombinantem (rhCG) oder Urin-aufgereinigtem (uhCG) hCG

In diesem Versuchsteil wurden CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an hCG unterschiedlicher Herkunft kultiviert. Zum einen wurde rekombinantes hCG (Ovitrelle) in den Konzentrationen 50 mIU/ml, 100 mIU/ml und 500 mIU/ml der Kultur hinzugefügt. Zum anderen wurde hCG, welches aus dem Urin schwangerer Frauen aufgereinigt wurde (Pregnyl), in den Konzentrationen 100 IU/ml, 250 IU/ml und 500 IU/ml eingesetzt. Die Kultur der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen in Anwesenheit des hCG wurde für 72 Stunden in RPMI-Medium mit den Zusätzen anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 durchgeführt. Als Kontrolle dienen CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen, die in Abwesenheit von hCG kultiviert wurden. Außerdem wurde eine Isotypenkontrolle durchgeführt. Anschließend wurde die Menge an IL-10 und TGF-β im Zellkulturüberstand sowie die Expression verschiedener extra- und intrazellulärer Marker bestimmt. Der Versuchsteil wurde 7 Mal (Blutproben von 7 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung wiederholt.

3.2.6. Kokultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen oder rhCG und anschließender gemischter Leukozyten-Reaktion

In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, inwieweit die Kokultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen oder rhCG einen Einfluss auf die Funktionalität der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen hat. Als

Kontrolle diente die Kultur mit SWAN-71-Zellen. Die Fähigkeit der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen die Proliferation von autologen oder allologenen T-Zellen zu beeinflussen, wurde nach erfolgter Kokultur in einer gemischten Leukozyten-Reaktion getestet. Autologe T-Zellen stammten aus demselben Spender wie die zuvor mit JEG-3-, rhCG oder SWAN-71-Zellen kokultivierten $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen, allologene T-Zellen dagegen stammten von einer anderen Person. Ziel der Verwendung von autologen bzw. allologenen T-Zellen ist die Analyse eines möglichen Einflusses von Antigenen auf die Funktionalität der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen. Autologe ($T_{autolog}$ -Zelle) sowie allologene ($T_{allolog}$ -Zelle) T-Zellen wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben aus dem peripheren Blut mittels MACS-Technik gewonnen. Es handelt sich hierbei ebenfalls um $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen. Abbildung 9 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Versuchsablaufes exemplarisch für die Kokultur mit JEG-3-Zellen.

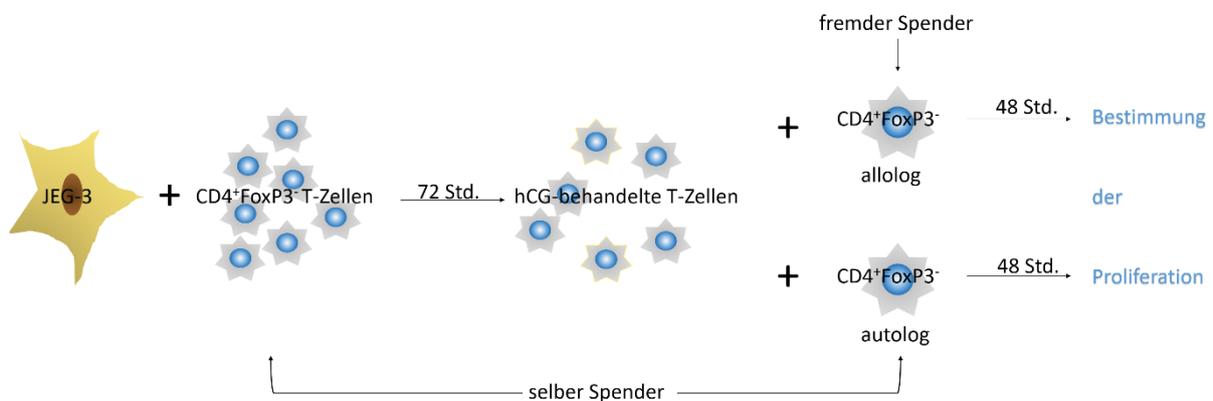


Abbildung 9: Kokultur von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit JEG-3-Zellen und anschließender gemischter Leukozyten-Reaktion. $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen wurden mit JEG-3-Zellen für 72 Stunden kultiviert. Die hCG-behandelten Zellen wurden dann mit allologenen und autologen $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen für 48 Stunden kokultiviert und die Proliferation der $T_{allolog/autolog}$ gemessen.

Für den Versuch wurden zunächst 5×10^5 $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit $2,5 \times 10^5$ JEG-3-Zellen, $2,5 \times 10^5$ SWAN-71-Zellen oder 100 mIU/ml rhCG für 72 Stunden in einer 6-Lochplatte in 1 ml RPMI-Medium mit den Zusätzen anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen aus den Kokulturen von den JEG-3-Zellen bzw. den SWAN-71-Zellen separiert, die Zellzahl bestimmt und 1×10^5 $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit 1×10^5 autologen oder allologenen T-Zellen für weitere 48 Stunden kokultiviert. $T_{autolog/allolog}$ -Zellen, die alleine kultiviert wurden dienten als Kontrolle. Zudem erfolgte eine Isotypenkontrolle. Analog wurde mit den rhCG-behandelten $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen verfahren. Die T-Zellkokultur wurde in einer 96-Lochplatte in 250 μ l RPMI-Medium mit den Zusätzen anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 durchgeführt. Nach Beendigung der T-Zell-Kokultur wurde die Proliferation der autologen und allologenen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die autologen und allologenen T-Zellen wurden dafür direkt nach ihrer Isolierung mit dem Farbstoff CFDA-SE (siehe 3.2.6.2) markiert. Der Versuchsteil wurde 3 Mal (Blutproben von 3 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung wiederholt.

3.2.6.1. Bestimmung der Proliferationsrate der autologen und allogenen Zellen mittels

CFDA-SE-Markierung

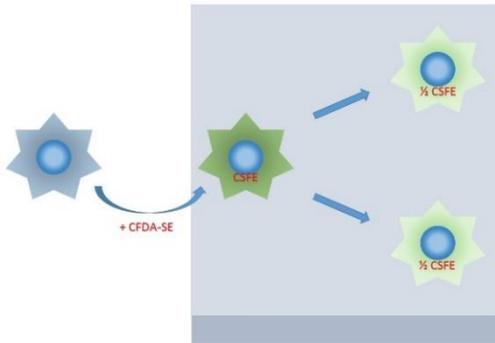


Abbildung 10: Bestimmung der Zellproliferation mit CFDA-SE. CFDA-SE wird in die Zelle aufgenommen und zum fluoreszierenden CSFE umgewandelt. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff äquivalent an die Tochterzellen weitergegeben.

Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDA-SE) ist ein primär nicht fluoreszierender Farbstoff zur Quantifizierung der Proliferationsrate einer Zellpopulation. Durch seine Acetatgruppen ist es zellpermeabel; dringt somit ins Zellzytoplasma ein und wird dort von ortständigen Esterasen deacetyliert. Dies bewirkt eine Umwandlung des Moleküls in die fluoreszierende Esterverbindung Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CSFE), welche über seine Succinimidylgruppe kovalente

Bindungen mit intrazellulären Molekülen eingeht und auf diesem Wege im Inneren der Zelle verbleibt. Kommt es zur Zellteilung wird der Farbstoff in äquivalenter Konzentration, also zu jeweils 50 %, an die Tochterzellen weitergegeben. So kann im Rahmen einer durchflusszytometrischen Bestimmung der intrazellulären CSFE-Konzentration ermittelt werden, in welchen Maß die untersuchte Population über die Zeit proliferiert ist (Abbildung 10). (Parish 1999; Lyons und Parish 1994)

3.2.6.2. Markierung der autologen und allogenen T-Zellen mit CFDA-SE

Nach ihrer Isolierung aus dem peripheren Blut von autologen und allogenen Spendern wurden die T-Zellen zweimalig in 10 ml PBS gewaschen. Zwischen den Waschschrritten erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm bei 4 °C für 10 Minuten. Die CFDA-SE-Färbung (1 µM CFDA-SE per 1×10^6 Zellen) wurde für 1 Minute 30 Sekunden bei RT durchgeführt. Anschließend wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 10 ml FBS-haltigem RPMI-Medium abgestoppt. Im Folgenden wurden die gefärbten T-Zellen noch zweimal mit 10 ml FBS-haltigem RPMI-Medium gewaschen, um nicht in die Zelle eingedrungene CFDA-SE-Moleküle zu entfernen. Zwischen den Waschschrritten wurden die T-Zellen bei 1200 rpm (4 °C) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der CFDA-SE Markierung wurden die T-Zellen gezählt und anschließend für die T-Zellkultur verwendet.

3.2.7. Durchflusszytometrie

3.2.7.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beruht auf der fluoreszenzabhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen. Als physikalisches Prinzip wird hierbei zum einen die Tatsache genutzt, dass Licht abhängig von Größe und Gestalt einer Zelle unterschiedlich stark gestreut wird. Des Weiteren kommt der Markierung diverser zellspezifischer Oberflächenmarker mit Fluoreszenzfarbstoffen eine Bedeutung zu. Die Kombination beider Verfahren erlaubt eine äußerst präzise Detektion von Zellpopulationen. Zur Quantifizierung der Zellpopulation wird das in Suspension befindliche Zellgemisch über einen Hüllstrom Zelle für Zelle am Fokus eines rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahls

vorbeigeführt. Um diese Trennung in Einzelzellen, die sogenannte „hydrodynamische Fokussierung“ zu ermöglichen, wird die Suspension über eine Stahlkapillare mit Überdruck in eine Messküvette eingebracht. Hier werden die Zellen stark beschleunigt und getrennt voneinander einem Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge zugeführt. Befindet sich eine Zelle im Fokus des Laserstrahls, wirft sie das Licht zum einen in einem engen Winkel zum Laserlicht (0° - 10°) zurück. Dieses wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter; FSC) quantifiziert und hängt maßgeblich von Größe und Form der Zelle ab. Des Weiteren bewirkt die Zelle eine Streuung im rechten Winkel, was als Seitwärtsstreuung (side scatter; SSC) detektiert wird und vor Allem durch intrazelluläre Kompartimente und somit durch Granularität und Binnenstruktur der Zelle hervorgerufen wird. Durch die Ermittlung dieser beiden Größen lassen sich bereits Zellsubpopulationen voneinander unterscheiden. Zur genaueren Differenzierung der Subpopulationen können die zu quantifizierenden Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker beziehungsweise intrazellulärer Marker über AK an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Diese werden ebenfalls im rechten Winkel zum Laserstrahl detektiert, da hier die Lichtstreuung am geringsten ist. Verwendet man Farbstoffe mit verschiedenen Emissionsspektren, so können mehrere Merkmale der Zelle in einem Messvorgang für die Detektion genutzt werden. Hierfür werden Farbteilerspiegel und Bandpassfilter verwendet, die eine optische Trennung der Emissionsspektren ermöglichen. Die Lichtsignale werden sodann mittels eines Photomultipliers in elektrische Signale umgewandelt. Die Detektoren werden mit zunehmendem spektralem Abstand vom Anregungslicht, beginnend mit FL1, aufsteigend nummeriert, wobei der FL1-Detektor grünes, der FL2-Detektor oranges und der FL3-Detektor rotes Licht erkennt. Um eine klare Trennung der einzelnen Merkmale zu gewährleisten, sollten demnach Farbstoffe verwendet werden, deren Emissionsspektren sich in möglichst geringem Maße überlappen. Die gewonnenen Informationen werden vom Gerät automatisch digitalisiert. Hierfür werden elektrische Signale, die einen zuvor definierten Schwellenwert (Threshold) überschreiten, zeitlich den entsprechenden Zellen zugeordnet. Ein Analog-Digitalwandler ordnet die Intensität der gemessenen Eigenschaften sodann einer Klasse zu und speichert die Information in Form einer Listendatei. Dementsprechend wird jeder Zelle eine Liste von unabhängigen Werten beigeordnet, die während der Messung erfasst wurden. So können Zellen, die beispielsweise anhand ihrer Größe und verschiedener Oberflächenmarker quantifiziert wurden, jederzeit nach verschiedenen Kriterien ausgewertet und korreliert werden (Abbildung 11). Die Messgeschwindigkeit des hier verwendeten Geräts beträgt für gewöhnlich 100-500 Zellen pro Sekunde (Ormerod und Novo 2008; Robinson 1993; Basiji et al. 2007).

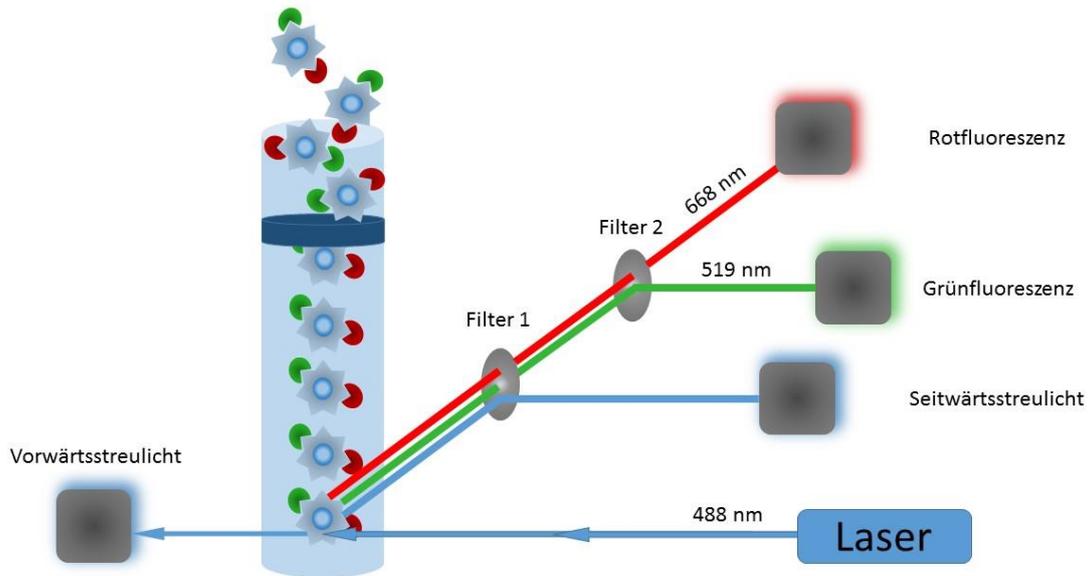


Abbildung 11: Durchflusszytometrie. Die Zellen brechen das Licht eines Argonlasers abhängig von ihrer Größe und Granularität; es wird vorwärts und seitwärts gestreut. Eine weitere Klassifizierung gelingt durch Markierung spezifischer Oberflächenmarker mit fluoreszierenden Farbstoffen (Abbildung entnommen und modifiziert aus (eawag aquantic research)).

3.2.7.2. Extra- und intrazelluläre Färbung

Im Anschluss an die Kokulturrexperimente wurden die CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen gegen die extrazellulären Marker CD25, CTLA-4 und PD-1 sowie gegen den intrazellulären Marker FoxP3 gefärbt. Nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer zu den T-Zellen wurden diese zu gleichen Teilen auf 2 Rundbodenröhrchen (1 Färberöhrchen und 1 Negativöhrchen ohne AK-Zugabe) aufgeteilt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm bei 4 °C für 10 Minuten, um Mediumrückstände zu entfernen. Hierfür wurde der Überstand nach der Zentrifugation abgesaugt. Die verwendeten AK waren mit verschiedenen Farbstoffen, sogenannten Fluorochromen beladen. Diese Fluorochrome sowie deren Exzitations- und Emissionsmaxima und die jeweilige Verdünnung der verwendeten AK sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Fluorochrome wurden derart ausgewählt, dass ihre Emissionsspektren sich so wenig wie möglich überlappen um Signale in Randbereichen der Spektren nicht doppelt zu detektieren. Insgesamt wurde je Probe 100 µl AK-Lösung (Färberöhrchen) oder 100 µl FACS-Puffer (Negativöhrchen) hinzugegeben. Die AK wurden in FACS-Puffer verdünnt. Nach Zugabe der AK-Lösungen wurden die Proben gemixt und für 30 Minuten bei 4 °C zur Inkubation dunkel gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ungebundenen AK in einem Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 Minuten (4 °C) entfernt. Der Überstand wurde abgesaugt und alle Proben in 100 µl Fixierungslösung aufgenommen. Die Fixierungslösung bestand aus 1 % PFA gelöst in PBS. Die Fixierung der Zellen diente der Konservierung aller zellulären Bestandteile und ist notwendig, um die Zellen für die Permeabilisierung der Zellmembran und somit für die Färbung des intrazellulären Markers FoxP3 am nächsten Tag vorzubereiten. Zur Fixierung wurden die Proben

über Nacht bei 4 °C dunkel gelagert. Am folgenden Tag wurde die Fixierungslösung unter Verwendung von Permeabilisationspuffer entfernt. Hierzu wurden je Probe 1 ml 0,1 % Saponin gelöst in PBS hinzugefügt und die Proben bei 1500 rpm für 10 Minuten (4 °C) zentrifugiert. Saponine sind Glykoside von Steroiden. Sie besitzen Detergenzeigenschaften und beeinflussen die Membranpermeabilität. Somit wurde die Durchgängigkeit der Zellmembran für größere Moleküle ermöglicht. Dies ist notwendig, da sich der Marker FoxP3 intrazellulär befindet und der anti-FoxP3-AK in das Innere der Zelle gelangen muss. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und der anti-FoxP3-AK gelöst in 100 µl Permeabilisationspuffer hinzugegeben. Die Negativkontrollen erhielten 100 µl Permeabilisationspuffer ohne AK-Zugabe. Die Proben wurden gemischt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die nicht-gebundenen AK durch Zugabe von 1 ml Permeabilisationspuffer und einen weiteren Zentrifugationsschritt (1500 rpm, 4 °C, 10 Minuten) entfernt. Das Zellpellet wurde abschließend in 100 µl FACS-Puffer gelöst und die Zellen mittels Durchflusszytometer vermessen.

Tabelle 3: *Exzitations- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome* (Quelle: (BD Biosciences))

Oberflächen- marker	Farbstoff	Fluoreszenz- Emissionsfarbe	Ex _{max} in nm	Em _{max} in nm	Kanal
PD-1	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	grün	494	519	FL1
CD25	Phycoerythrin (PE)	gelb	496, 564	578	FL2
CTLA-4	Phycoerythrin-Cyanin-5 (PE-Cy5)	rot	496, 564	667	FL3
FoxP3	Alexa Fluor 647 (AF)	rot	650	668	FL4

3.2.7.3. Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Rohdaten der vermessenen Zellen werden hinsichtlich ihrer Granularität (SSC) und Größe (FSC) in einem Koordinatensystem (DotPlot-Darstellung) linear abgebildet (Abbildung 12). Die verwendete Software (CellQuest Pro) ermöglicht das Setzen sogenannter „Regionen“ in der FSC/SSC-Darstellung der gemessenen Probe. Damit kann die gesuchte Zielpopulation, in diesem Fall die T-Zellen, von anderen Zellpopulationen oder totem Zellmaterial getrennt und einzeln ausgewertet werden. Die Software wertet nur die in der Region befindlichen Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenz aus. So kann bestimmt werden, wie viele Zellen der Zellpopulation einen bestimmten Oberflächenmarker exprimieren. Für jede Bestimmung wurde eine Isotypenkontrolle der Probe angefertigt um eventuelle unspezifische Färbungen (Autofluoreszenz) auszuschließen.

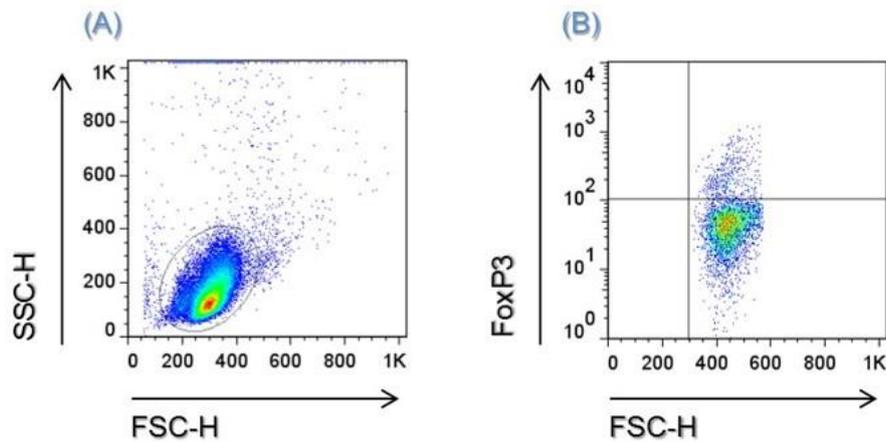


Abbildung 12: Dot Plot. (A) Die Zellen werden hinsichtlich Granularität (SSC) und Größe (FSC) abgebildet. Durch das Setzen einer Region wird die Zielpopulation (hier T-Zellen) ausgewählt. (B) In dieser werden die Zellen anhand der markierten Oberflächenmoleküle gemessen. Im rechten oberen Quadranten finden sich demnach FoxP3⁺ T-Zellen.

3.2.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ELISA ist ein auf AK basiertes Nachweisverfahren zur Detektion von Proteinen, Viren und niedermolekularen Verbindungen. Im Zuge dieser Arbeit wurde als Methode der Festphasen-ELISA verwendet (Abbildung 13). Hierbei werden Mikrotiterplatten zunächst mit einem monoklonalen Erst-AK (Capture Antibody) beschichtet (1), welcher dort adsorptiv bindet. Wird die Probe hinzugefügt, bindet das zu detektierende Antigen an den Erst-AK (2). Im Sinne der sogenannten „Sandwich-Methode“ wird in einem weiteren Schritt ein weiteres Enzymkonjugat bestehend aus einem Detektionsantikörper (Zweit-AK) (3), der an das Reporterenzym Meerrettich-Peroxidase (HRP; horse raddish peroxidase) gebunden ist (4), hinzugegeben. Der Zweit-AK bindet an ein weiteres Epitop des zu detektierenden Moleküls, sodass dieses wie ein Sandwich in AK gehüllt ist. HRP ist in der Lage das Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) umzusetzen (5). Dies führt zu einer Blaufärbung der Probe.

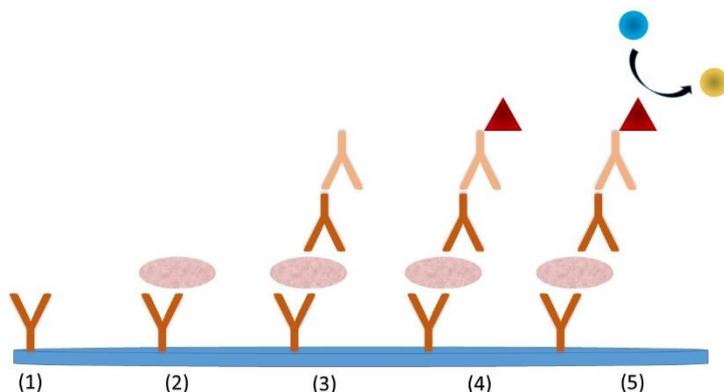


Abbildung 13: Festphasen-ELISA. (1) Capture-Antikörper gebunden an der Loch-Platte; (2) Zugabe der Probe; (3) Bindung des Detektionsantikörpers; (4) Bindung der HRP, welche (5) TMB umsetzt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb. (Abbildung entnommen und modifiziert nach (Jeffrey M. Vinocur 2006))

Die Substratumsetzung wird nach einer definierten Zeit durch Hinzugabe von Schwefelsäure beendet, was zu einem Farbumschlag des TMB von blau zu gelb führt. Die Farbintensität wird mittels eines Photometers quantifiziert. Die optische Extinktion bei 450 nm und damit die Konzentration des nachzuweisenden Stoffes werden dabei mit einer Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration (Standardreihe) verglichen.

3.2.8.1. ELISA zum Nachweis der β -hCG-Sekretion der Zelllinien

Es wurden 5×10^4 JEG-3-, HaCat-, SWAN-71- und HTR-8-Zellen in 1 ml des entsprechenden Zellkulturmediums ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert. Der Zellüberstand wurde entnommen und der Gehalt an hCG mittels eines β -hCG ELISA Kits bestimmt. Zunächst wurde eine 96-Lochplatte mit dem Erst-AK – 1:250 verdünnt in Beschichtungspuffer – beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand durch Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Papier verworfen und 300 μ l Waschpuffer in jede Vertiefung der Platte gegeben. Auf diese Art wurden die Vertiefungen durch wiederholtes Befüllen und gründliches Ausklopfen dreimal gewaschen. Für die Standardreihe wurde eine im Kit befindliche Stock-Lösung mit einer β -hCG Konzentration von 200 mIU/ml seriell verdünnt. Von den Verdünnungen der Standardreihe sowie von jeder Probe wurden 25 μ l in die Vertiefungen gegeben. Die Proben und Standardverdünnungen wurden als Doppelbestimmungen angelegt. Im Anschluss wurde das Enzym-Konjugat hinzugefügt, die Platte für 10 Sekunden geschüttelt und anschließend bei RT für eine Stunde inkubiert. Der Überstand wurde durch Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Papier verworfen und die Proben 5 Mal mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Daraufhin wurden je 100 μ l der Substratlösung hinzugegeben. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15 Minuten, welcher durch die Zugabe von 50 μ l Stop-Lösung unterbrochen wurde. Die Stop-Lösung enthält 1 M Schwefelsäure und führt dazu, dass kein Substrat mehr umgesetzt wird. Die Farbintensität in der Probe konnte anschließend bei 450 nm mit einem Photometer ermittelt werden.

3.2.8.2. ELISA zum Nachweis der Progesteronproduktion von Maus-Leydig-Tumorzellen

Um die Wirksamkeit des in dieser Arbeit verwendeten anti-hCG-AK zu testen, wurde überprüft, inwieweit der AK die hCG-induzierte Progesteronproduktion in Maus-Leydig-Tumorzellen beeinflusst. Der Gehalt an Progesteron im Zellkulturüberstand der MLTC-1-Zellen wurde mittels eines Progesteron-ELISA Kits entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Durchführung des ELISAs beruht auf dem unter 3.2.8 erläuterten Prinzip.

3.2.8.3. ELISA zum Nachweis von IL-10 und TGF- β

Im Anschluss an die Kokultorexperimente wurden die Zytokine IL-10 und TGF- β mit Hilfe des OptEIA™ Human IL-10 ELISA Set bzw. Human/Maus TGF beta1 ELISA Ready-Set-Go entsprechend den Herstellervorgaben ermittelt. Die Durchführung des ELISAs beruht auf dem unter 3.2.8 erläuterten Prinzip.

3.2.9. Statistische Auswertung der Daten

Alle Konversionsassays wurden 3 bis 7 Mal in Doppelbestimmung, die Suppressionsassays 3 Mal in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.0. Für alle Versuche wurde ermittelt, ob die Daten normalverteilt sind. War dies der Fall, wurden die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte (S.E.M.) dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde der nicht-

parametrische Friedman-Test gefolgt von Dunn's posttest angewendet. Die Ergebnisse wurden als Mediane und Interquartilsabstand dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1.1. hCG-Bestimmung im Überstand verschiedener Zelllinien

Zunächst wurde der Reinheitsgrad an $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Zellen nach der MACS-Isolation bestimmt. Innerhalb der $CD4$ -Zellpopulation wiesen dabei lediglich 0,025 % der Zellen sowohl den Marker $CD25$ als auch $FoxP3$ auf (Abbildung 14 A-D). Demnach wurde mit > 98 % reinen $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen gearbeitet.

Des Weiteren wurden die verschiedenen Zelllinien auf die Produktion von hCG untersucht. Dafür wurde die Menge an hCG im Überstand von HaCat-, SWAN-71-, HTR-8- und JEG-3-Zellen nach 24-stündiger Kultur bestimmt. Es wurde gezeigt, dass JEG-3-Zellen hohe Mengen an hCG sezernieren, während HTR-8-Zellen eine eher geringe hCG-Produktion aufweisen. HaCat und SWAN-71 gehören zu den nicht-hCG-produzierenden Zellen (Abbildung 14 E).

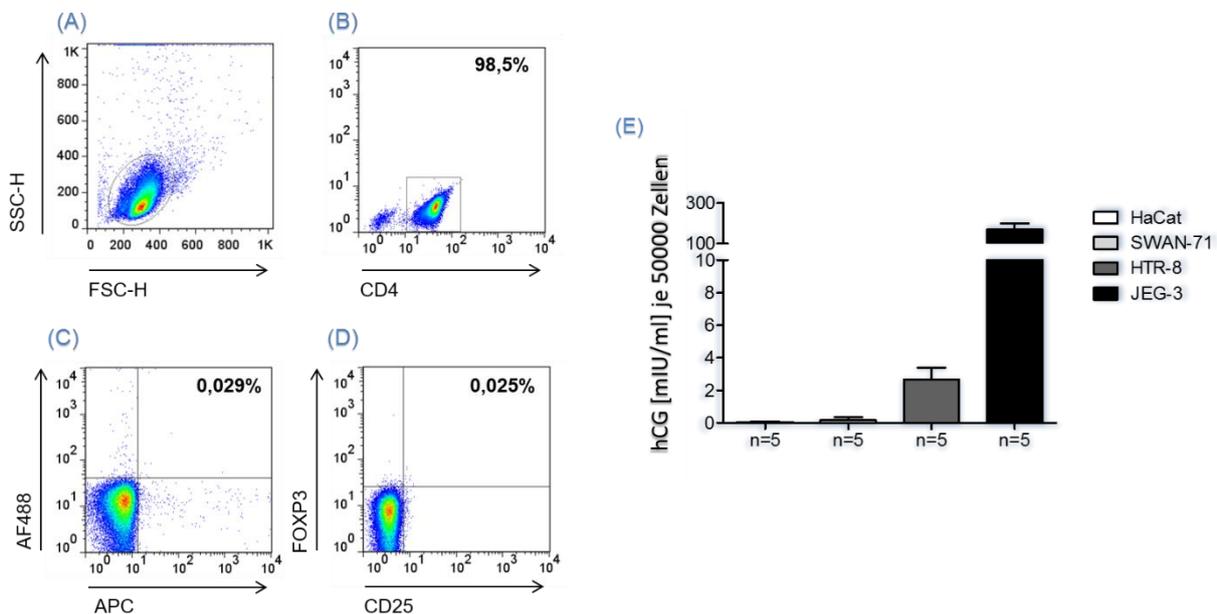


Abbildung 14: Reinheit der $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Zellen und hCG-Produktion verschiedener Zelllinien

A-D) Nach magnetischer Isolation der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen von PBMZs schwangerer Frauen wurde die Zahl an noch vorhandenen $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. 98,5% aller Lymphozyten (A) waren positiv für $CD4$ gefärbt (B). In der gesamten $CD4$ -Zellpopulation waren nur 0,025% der Zellen positiv für $CD25$ und $FoxP3$ (D). Die Isotypenkontrolle ist in Abbildung (C) dargestellt.

E) HaCat-, SWAN-71-, HTR-8- und JEG-3-Zellen wurden für 24 Stunden in Kultur genommen und anschließend die Menge an hCG im Überstand mittels ELISA bestimmt. Der Versuch wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

4.1.2. hCG-produzierende JEG-3-Trophoblastenzellen bewirken eine Konversion von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen zu CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen

Ausgehend von der Vermutung, dass hCG auf lokaler Ebene eine Konversion von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen zu T_{reg} bewirkt, wurden CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit verschiedenen Zelllinien kultiviert. Zum einen wurden hCG-produzierende HTR-8- und JEG-3-Zellen verwendet, zum anderen nicht-hCG-produzierende HaCat- und SWAN-71-Zellen. Da das intrazelluläre FoxP3 noch immer als der am weitesten verwendete und spezifischste Marker für T_{reg} gilt, wurde die Anzahl an CD4⁺FoxP3⁺ Zellen nach 72-stündiger Kultur bestimmt. Eine Darstellung der entsprechenden Dot Plots findet sich in Abbildung 15. Zusätzlich wurde die Anzahl an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen ermittelt, welche zusätzlich die Oberflächenmarker CTLA-4 und PD-1 exprimierten, da für beide bereits nachgewiesen wurde, dass T_{reg} ihre Suppressivität während der Schwangerschaft unter anderem über diese Moleküle ausüben (Friedline et al. 2009; Jin et al. 2009; Li et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen nach der Kultur mit den hCG-produzierenden JEG-3-Zellen signifikant anstieg. Im Gegensatz dazu fand sich kein Anstieg nach Kultur mit den nicht-hCG-produzierenden HaCat-Zellen. Interessanterweise führten die HTR-8- und SWAN-71-Trophoblastenzellen, obwohl sie nur wenig beziehungsweise kein hCG produzieren, ebenfalls zu einer Zunahme an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen (Abbildung 15 A und B). Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. Es lässt sich jedoch vermuten, dass neben hCG noch andere Faktoren zu einer Konversion in T_{reg} beitragen.

Weiterhin fand sich nach Kultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit allen Zelllinien weder ein Anstieg an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen, welche zusätzlich CTLA-4 exprimierten, noch eine Zunahme an PD-1-exprimierenden CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen (Abbildung 15 C und D).

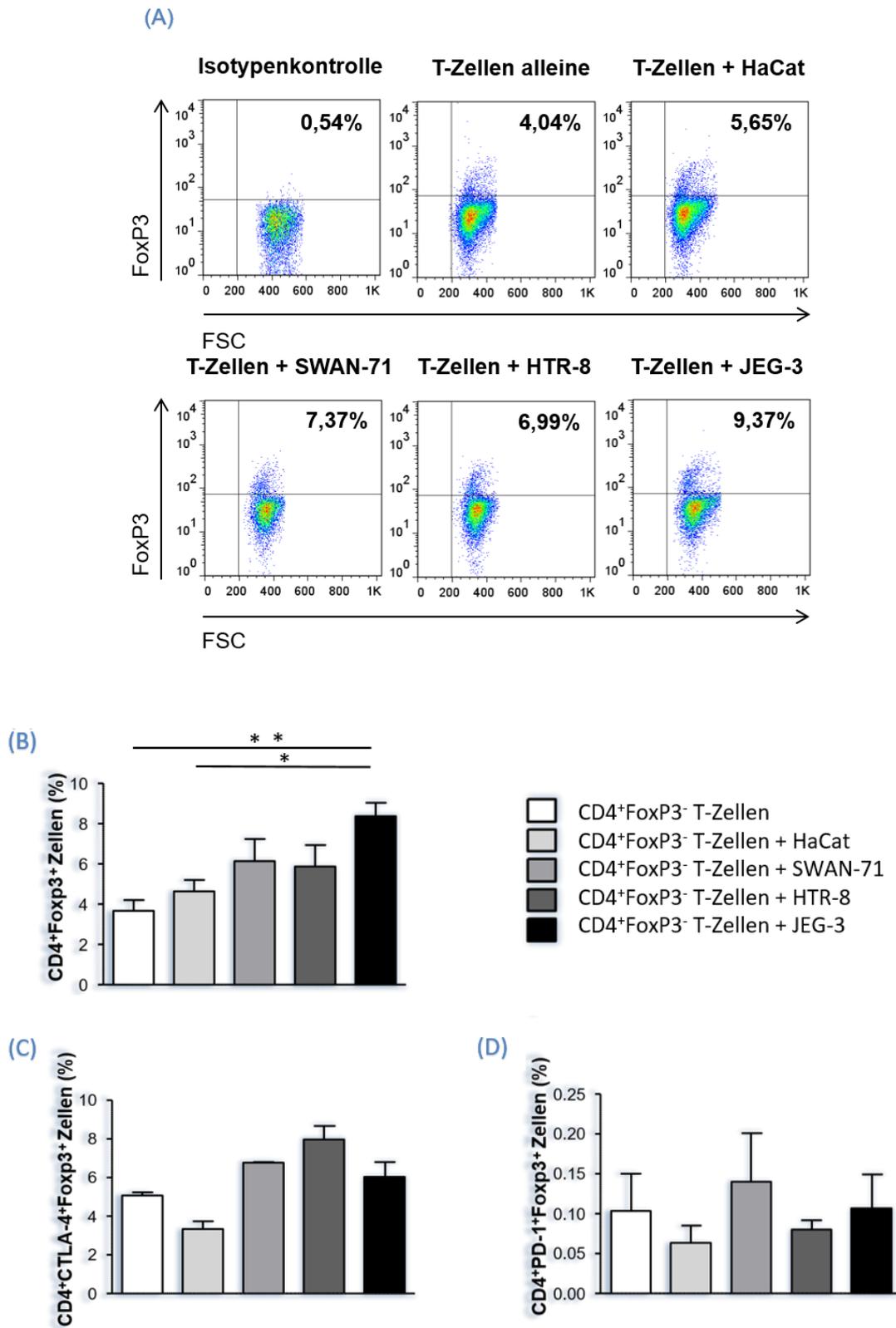


Abbildung 15: hCG-produzierende Trophoblastenzellen induzieren CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen

CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen wurden mit hCG-produzierenden (JEG-3, HTR-8) oder nicht hCG-produzierenden (SWAN-71, HaCat) Zelllinien kultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Anzahl an (B) CD4⁺FoxP3⁺ Zellen, (C) CTLA-4-exprimierenden und (D) PD-1-exprimierenden CD4⁺FoxP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Repräsentative Dot Plots sind exemplarisch für die Bestimmung von CD4⁺FoxP3⁺ Zellen dargestellt (A). Die Versuche wurden 6 Mal (Blut von 6 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit S.E.M. dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

4.1.3. Die Kultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit Trophoblastenzellen und Keratinozyten beeinflusst die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen

Nachdem gezeigt wurde, dass hCG die Entstehung von CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen induziert, war es von Interesse die Produktion von IL-10 und TGF- β durch CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen unter dem Einfluss des hCG zu betrachten. Beide Zytokine sind erwiesenermaßen Mediatoren zur Ausübung der protektiven T_{reg}-Funktion (Weiner 2001; Groux et al. 1997).

Für die Kultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit den nicht-hCG-produzierenden HaCat-Zellen wurde ein signifikanter Anstieg an IL-10 ermittelt. Bei der Kultur mit HTR-8-, JEG-3- und SWAN-71-Zellen zeigte sich zwar ein Anstieg der IL-10 Sekretion, dieser war jedoch nicht signifikant. Die alleinige Kultur der Zelllinien zeigte, dass SWAN-71- und HTR-8-Zellen nur geringe Mengen an IL-10 produzierten, während in den Überständen der HaCat- und JEG-3-Zellen kein IL-10 nachgewiesen werden konnte. Bei der Kultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit allen Trophoblastenzelllinien (SWAN-71, HTR-8, JEG-3) wurde ein Anstieg an TGF- β im Überstand gesehen. Die alleinige Kultur der Zelllinien zeigte jedoch, dass alle TGF- β produzieren, sodass sich die Zunahme an TGF- β im Überstand wahrscheinlich aus der Summe der TGF- β -Produktion der Zelllinien und der T-Zellen ergab. Auch die Kultur mit HaCat-Zellen zeigte keinen Anstieg an TGF- β . (Tabelle 4).

Tabelle 4: CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen wurden zusammen mit hCG- und nicht-hCG-produzierenden Zelllinien kultiviert und die Menge an IL-10 and TGF- β in den Zellüberständen ermittelt. Die Versuche wurden 4 Mal (Blut von 4 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit S.E.M. dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. ***p<0,001. CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen alleine dienten als Kontrolle. n.d. – nicht-detektierbar.

	IL-10 [pg/ml] pro 10.000 Zellen	TGF- β [pg/ml] pro 10.000 Zellen
CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen alleine	2,23 \pm 0,55	57,16 \pm 6,32
CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen + HaCat-Zellen	134 \pm 14,53***	48,86 \pm 1,40
CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen + SWAN-71-Zellen	12,21 \pm 3,10	95,51 \pm 4,08
CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen + HTR-8-Zellen	15,33 \pm 3,91	92,41 \pm 11,28
CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen + JEG-3-Zellen	26,08 \pm 8,87	94,71 \pm 1,08
HaCat-Zellen alleine	n.d.	45,01
SWAN-71-Zellen alleine	4,26	18,88
HTR-8-Zellen alleine	0,28	57,38
JEG-3-Zellen alleine	n.d.	45,48

4.1.4. Bestimmung der Neutralisationsfähigkeit des hCG-Antikörpers

Um die Wirksamkeit des im folgenden Versuchsteil verwendeten anti-hCG-AK zu testen, wurde zunächst untersucht, ob die hCG-induzierte Progesteronproduktion von MLTC-1-Zellen durch den anti-hCG-AK blockiert wird. Dafür wurden JEG-3-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen des anti-hCG-AK behandelt, der Zellüberstand auf MLTC-1-Zellkulturen übertragen und nach 24 Stunden die Menge an Progesteron im Überstand bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass eine Blockierung des durch JEG-3-Zellen gebildeten hCGs durch den AK zu einer signifikanten Reduktion der Progesteronmenge im Überstand der MLTC-1-Zellkultur führte. Dieser Effekt war eindeutig dosisabhängig (Abbildung 16).

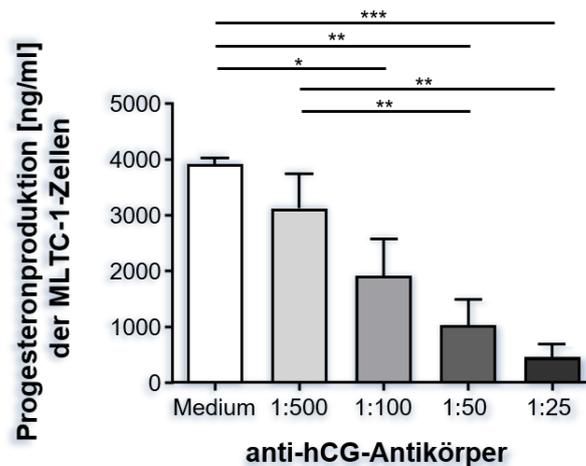


Abbildung 16: Bestimmung der Neutralisationsfähigkeit des hCG-Antikörpers.

JEG-3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen des anti-hCG-AK behandelt und der Zellüberstand auf MLTC-1-Zellkulturen übertragen. Nach 24 Stunden wurde die Menge an Progesteron im Überstand bestimmt. Die Versuche wurden 3 Mal in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit S.E.M. dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$.

4.1.5. Die Blockierung von hCG verhindert die JEG-3-Zellen-induzierte Konversion von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen zu CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen.

Neben hCG sezernieren Trophoblastenzellen noch eine Reihe anderer Faktoren, sodass im Folgenden untersucht wurde, welchen Anteil insbesondere das hCG an der Induktion von T_{reg} durch JEG-3-Zellen hat. Dafür wurde das im Überstand von JEG-3-Zellen vorhandene hCG mittels AK geblockt und erneut die Anzahl an konvertierten T_{reg} ermittelt.

Wie bereits zuvor führte die Kokultur von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen zu einem Anstieg an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen. Interessanterweise bewirkte die Zugabe des hCG-blockierenden AK, dass kein Anstieg an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen detektiert wurde (Abbildung 17).

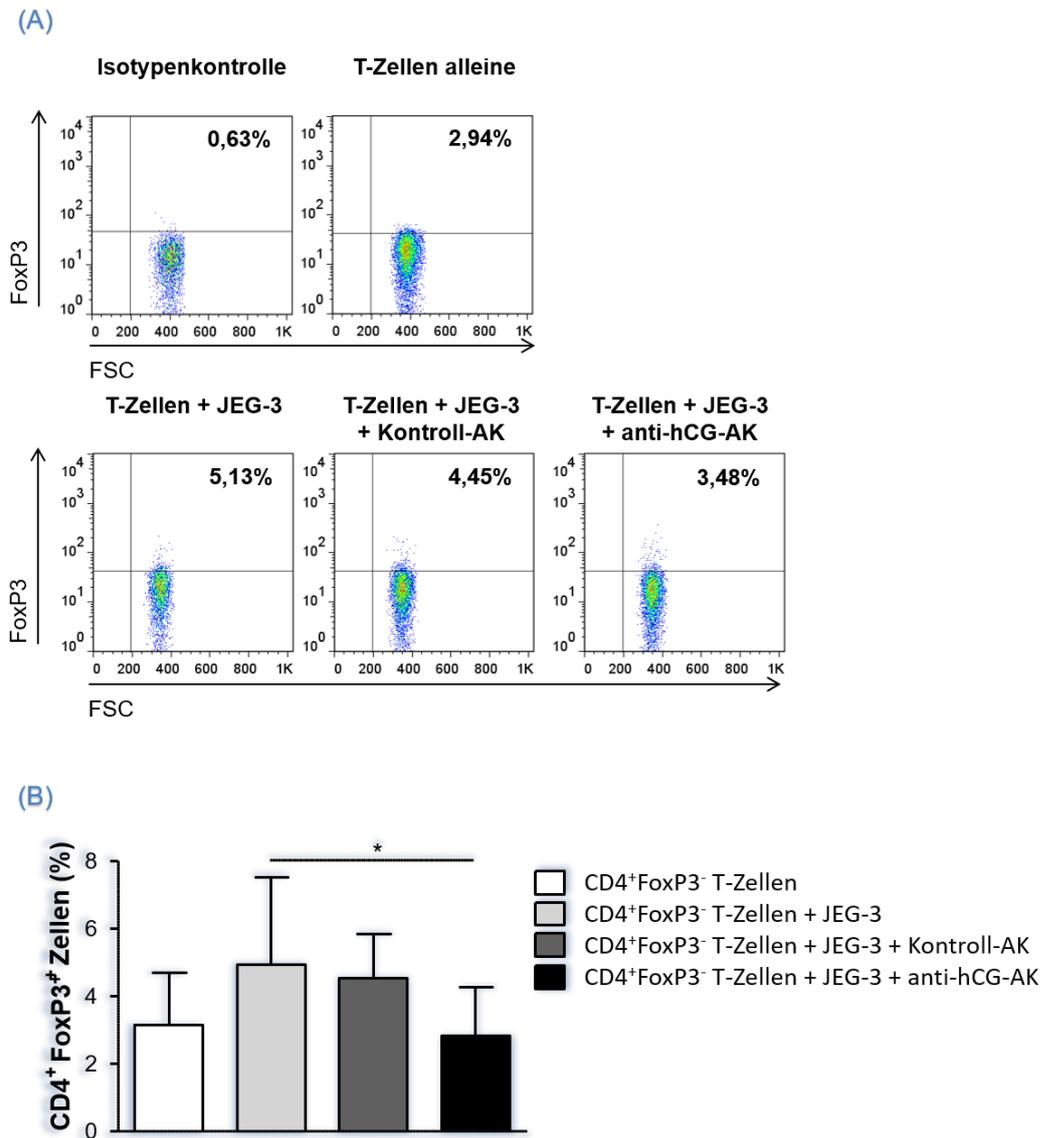


Abbildung 17: Blockierung von hCG verhindert die Induktion von CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen.

CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen wurden zusammen mit hCG-produzierenden JEG-3 Zellen unter Zugabe versus ohne Zugabe eines neutralisierenden anti-hCG-AK in Kultur genommen. Nach 72 Stunden Kultur wurde die Anzahl an CD4⁺FoxP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Ergebnisse sind als Dot Plot (A) und Diagramm (B) dargestellt. Die Versuche wurden 3 Mal (Blut von 3 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind aufgeführt als Mediane und Interquartilsabstand. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit dem Friedman-Test gefolgt vom Dunn's posttest durchgeführt. *=p<0,05.

4.2. Die Zugabe von rhCG oder uhCG bewirkt eine Konversion von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen zu CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen, hat aber keinen Einfluss auf die Produktion von IL-10 und TGF- β

Um den bisher gezeigten Effekt des hCG auf die Entstehung von T_{reg} zu verifizieren, wurden die CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen unter Hinzugabe von rhCG oder uhCG kultiviert. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des jeweiligen hCG verwendet um zu analysieren, ob eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der Auswirkung auf die CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen vorliegt.

Unabhängig von der Konzentration führten sowohl das rhCG als auch das uhCG zu einem signifikanten Anstieg an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen (Abbildung 18 A, B und E), hatten jedoch keinen Einfluss auf die CTLA-4- oder PD-1-Expression in diesen Zellen (Abbildung 18 C und F sowie 18 D und G).

Es wurde auch die Sekretion von IL-10 und TGF- β untersucht. Dabei zeigte sich keinerlei Erhöhung von IL-10 und TGF- β im Überstand und dementsprechend kein Einfluss des rhCG oder uhCG auf die Produktion dieser Zytokine durch CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen (Tabelle 5 und 6).

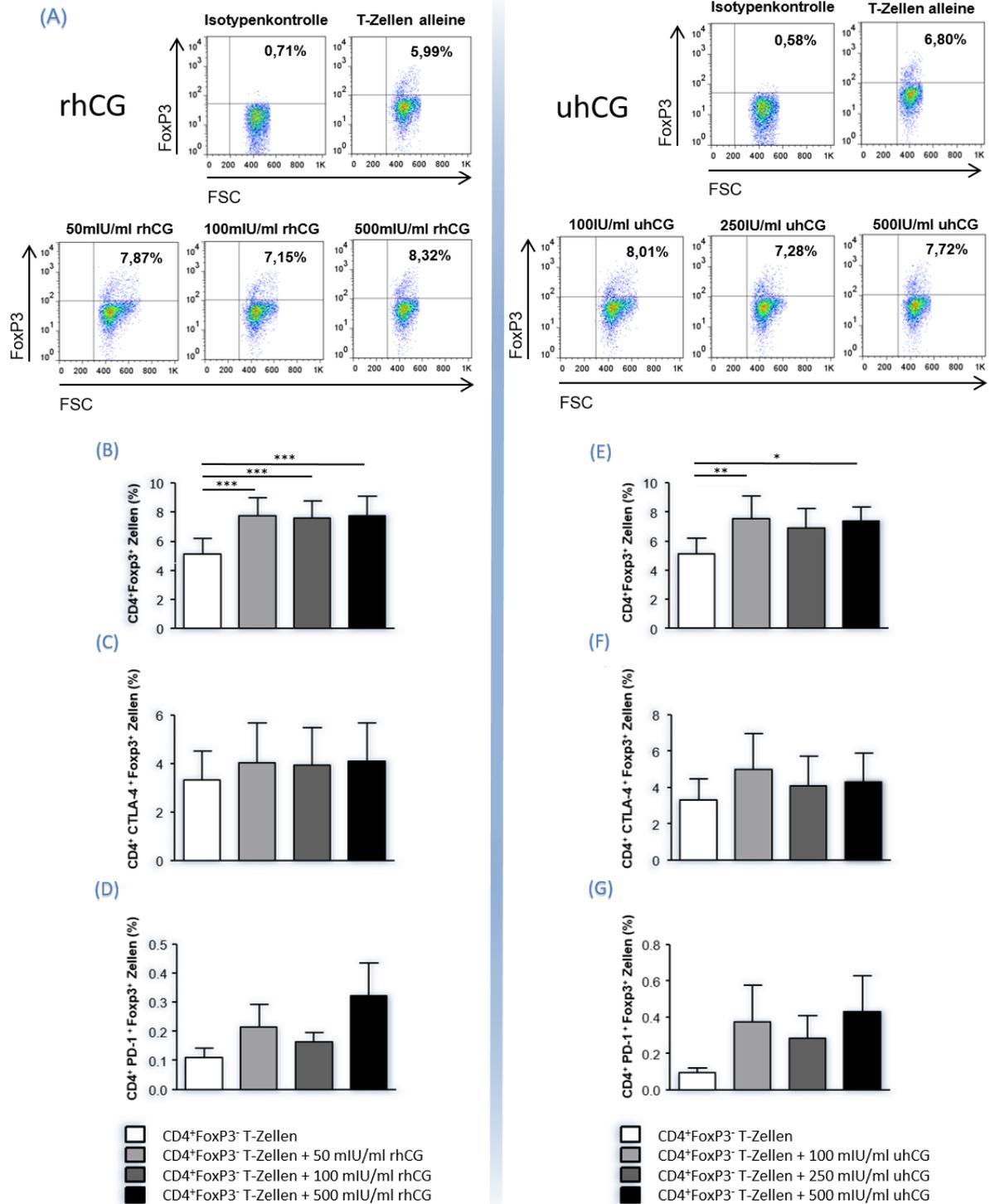


Abbildung 18: rhCG und uhCG induzieren CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen

CD4⁺FoxP3⁺ T-Zellen wurden unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an rhCG (B-D) oder uhCG (E-G) kultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Anzahl der CD4⁺FoxP3⁺Zellen (B, E), sowie der CTLA-4-exprimierenden (C, F) und PD-1-exprimierenden CD4⁺FoxP3⁺Zellen (D, G) mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Repräsentative Dot Plots sind exemplarisch für die Bestimmung von CD4⁺FoxP3⁺ Zellen dargestellt (A). Die Versuche wurden 7 Mal (Blut von 7 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit S.E.M. dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$.

Tabelle 5: Konzentration an IL-10 und TGF- β in den Überständen der mit rhCG behandelten CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen. Die Versuche wurden 4 Mal (Blut von 4 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit S.E.M. dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden. CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen alleine dienten als Kontrolle.

	IL-10 [pg/ml] pro 10000 Zellen	TGF- β [pg/ml] pro 10000 Zellen
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen alleine	1,53 \pm 0,72	49,48 \pm 0,89
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen + 50mIU/ml rhCG	1,25 \pm 0,57	50,41 \pm 4,03
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen + 100mIU/ml rhCG	1,43 \pm 0,86	48,22 \pm 3,25
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen + 500mIU/ml rhCG	1,48 \pm 0,98	53,63 \pm 0,21

Tabelle 6: Konzentration an IL-10 und TGF- β in den Überständen der mit uhCG behandelten CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen. Die Versuche wurden 4 Mal (Blut von 4 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit S.E.M. dargestellt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektiert werden. CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen alleine dienten als Kontrolle.

	IL-10 [pg/ml] pro 10000 Zellen	TGF- β [pg/ml] pro 10000 Zellen
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen alleine	1,51 \pm 0,71	52,99 \pm 3,55
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen + 100IU/ml uhCG	1,20 \pm 0,56	46,69 \pm 0,50
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen + 250IU/ml uhCG	1,32 \pm 0,66	46,49 \pm 1,63
CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ T-Zellen + 500IU/ml uhCG	1,25 \pm 0,82	47,95 \pm 2,95

4.3. Die Kultur mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen steigert die suppressive Kapazität der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen.

Abschließend galt es zu ergründen, ob die CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen, welche mit hCG behandelt wurden, eine höhere Kapazität zur Immunsuppression besitzen als unbehandelte CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen. Dafür wurde ermittelt ob die hCG-behandelten CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen in der Lage sind die Proliferation auto- und allogener T-Zellen zu hemmen. Es wurde vermutet, dass eine Zunahme an suppressiver Aktivität des Zellpools durch eine Erhöhung der Anzahl an T_{reg} innerhalb dieses Pools zustande kommt.

Leider war es aufgrund der geringen Anzahl an T_{reg} technisch nicht möglich diese aus dem Gesamtzellpool zu reisolieren um ihre suppressive Kapazität separat zu beurteilen. Daher wurde die suppressive Aktivität aller hCG-behandelten CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen (kultiviert mit JEG-3-Zellen oder 100 mIU/ml rhCG) bestimmt und diese mit der suppressiven Aktivität der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen verglichen, die nicht mit hCG behandelt worden waren. CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen wurden auch mit SWAN-71-Zellen kultiviert, da diese kein hCG produzieren, aber dennoch in der Lage waren, die Zahl an T_{reg} zu erhöhen. Des Weiteren war es von Interesse, ob die T-Zell-Funktion dadurch beeinflusst wird, dass diese zuvor Kontakt mit väterlichen Antigenen hatten. Dementsprechend wurde die Fähigkeit von hCG-behandelten und nicht-hCG-behandelten CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen getestet, sowohl die Proliferation von autologen als auch von allologenen T-Zellen zu unterdrücken.

Dabei zeigte sich, dass die suppressive Aktivität der CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen signifikant erhöht

war, wenn diese zuvor mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen oder rhCG kultiviert worden waren. Die Kultur mit SWAN-71-Zellen führte, wenn auch nicht signifikant, zu einer Erhöhung der Fähigkeit von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen die Proliferation anderer T-Zellen zu unterdrücken. Autologe und allogene T-Zellen wurden dabei in gleichem Maße supprimiert (Abbildung 19 A und B).

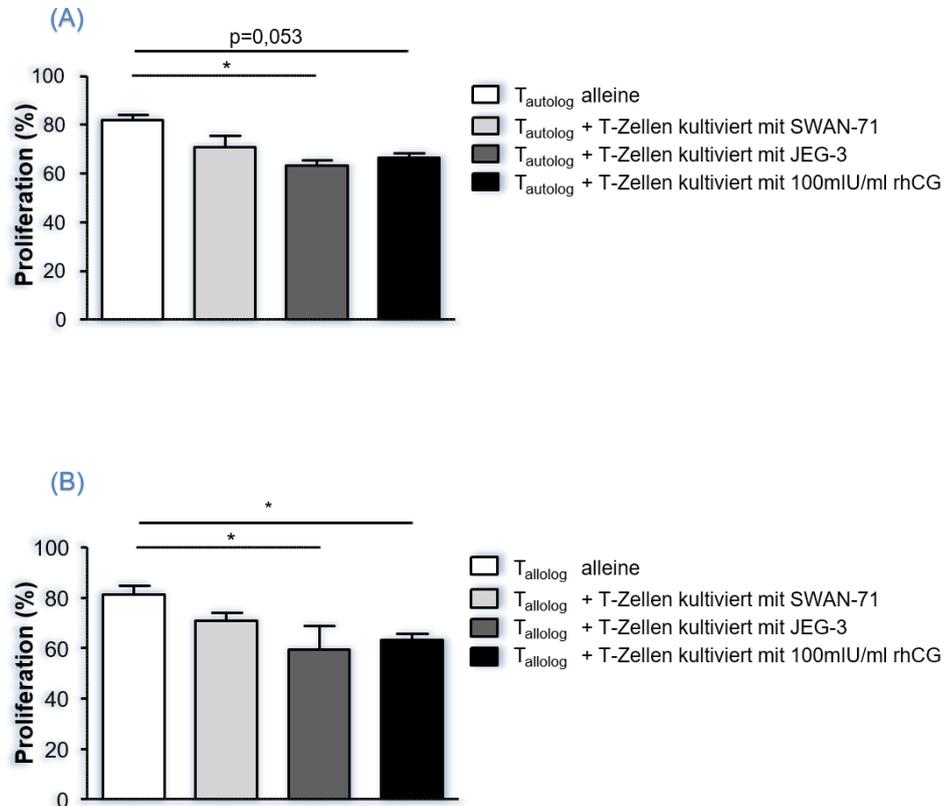


Abbildung 19: hCG-produzierende Trophoblastenzellen erhöhen die suppressive Fähigkeit von T-Zellen.

$CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen wurden für 72 Stunden zusammen mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen, nicht-hCG-produzierenden SWAN-71-Zellen oder 100 mIU/ml rhCG kultiviert. Im Anschluss wurden die hCG-behandelten bzw. unbehandelten $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen entnommen und entweder mit (A) autologen (vom selben Spender stammend) oder (B) allogenen T-Zellen (von einem anderen Spender stammend) für 48 Stunden kultiviert. Die suppressive Kapazität der hCG-behandelten bzw. unbehandelten $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen wurde ermittelt, indem ihre Fähigkeit zur Unterdrückung der Proliferation der auto- bzw. allogenen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Die Versuche wurden jeweils 3 Mal (Blut von 3 verschiedenen Probandinnen) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten sind aufgeführt als Mediane und Interquartilsabstand. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit dem Friedman-Test gefolgt vom Dunn's posttest durchgeführt. $*=p<0,05$.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Kultur von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen zu einer signifikanten Zunahme an $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} führte. Nach Blockierung des hCG durch einen anti-hCG-AK in der Kokultur war dieser Effekt nicht mehr nachzuweisen. Auch die Zugabe von rhCG und uhCG führte unabhängig von der Konzentration zu einer Konversion von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen zu $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} . Des Weiteren führte die Behandlung der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit hCG dazu, dass diese die Proliferation konventioneller T-Zellen hemmten. Die Kultur von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen sowohl mit Trophoblastenzellen als auch mit Keratinozyten führte zu einem Anstieg an IL-10, wobei dieser nur für die Kultur mit HaCat-Zellen signifikant war. Die

Zugabe von rhCG oder uhCG hatte keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion. Eine Zunahme an TGF- β fand sich in keinem der Versuche.

5. Diskussion

Die Geburt eines Kindes ist für viele Menschen das wichtigste und glücklichste Erlebnis ihres Lebens. Der Weg dorthin, die Schwangerschaft, stellt wohl eines der größten Wunder der Biologie dar. Leider treten in etwa 15 % der Schwangerschaften Komplikationen auf. Neben vergleichsweise harmlosen Erkrankungen wie Gestationsdiabetes oder schwangerschaftsinduzierter Hypertonie finden sich leider auch schwerwiegende Störungen wie beispielsweise Präeklampsien, Eklampsien und Aborte. Es wird davon ausgegangen, dass die Anzahl an Fehlgeburten deutlich höher liegt, als statistisch erfasst. Treten diese bei einer Frau gehäuft auf, spricht man vom habituellen Abort, was zu einem enormen Leidensdruck der betroffenen Frau und ihrem Partner führen kann. Häufig sind immunologische Fehlfunktionen des schwangeren Organismus eine Ursache für wiederholte Fehlgeburten. Der weibliche Organismus muss während der Schwangerschaft einen immunologischen Balanceakt vollführen. Einerseits muss der Körper vor Infektionen durch fremde Erreger geschützt werden, andererseits muss der Fetus, der zu 50 % aus Fremdartigen besteht, toleriert werden. Man weiß heutzutage, dass ein aktiver Immunregulationsprozess stattfindet, sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene.

Die Schwangerschaft ist durch starke hormonelle Schwankungen gekennzeichnet. Es gibt Hinweise darauf, dass Hormone einen entscheidenden Beitrag zur Regulierung des Immunsystems während der Schwangerschaft leisten. In vielen Studien wurde bereits gezeigt, dass Hormone wie Progesteron, Östrogen und hCG sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem modulieren (Schumacher et al. 2014, Review) und auf diesem Wege zur Immuntoleranz gegenüber dem Fetus beitragen. Mehrere Studien der letzten Jahre identifizierten hCG als bedeutend für die Regulation von B-Zellen (Rolle et al. 2013; Jensen et al. 2012; Fettke et al. 2016), DZ (Segeer et al. 2009) und T-Zellen (Shirshv 1997; Khan et al. 2001) in der Schwangerschaft. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass T_{reg} einen Rezeptor für hCG exprimieren (Schumacher et al. 2013; Schumacher et al. 2009) und hCG einen Hauptfaktor für die Migration von humanen T_{reg} zur feto-maternalen Grenzfläche darstellt (Schumacher et al. 2009). Die Bedeutung der T_{reg} für die menschliche Schwangerschaft ist mittlerweile unbestritten. Zahlreiche Studien bestätigen die Assoziation von Fehlgeburten und dem Krankheitsbild der Präeklampsie mit einem insuffizienten Anstieg an Zahl und Funktionalität der T_{reg} (Sasaki et al. 2004; Arruvito et al. 2007; Hafeez et al. 2014). Des Weiteren zeigen Patientinnen, die im Rahmen einer IVF-Behandlung hCG injiziert bekamen, dass sich die Anzahl an T_{reg} im peripheren Blut nach der Injektion signifikant erhöhte (Koldehoff et al. 2011). Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von hCG in schwangere Tiere, die eine Störung der fetalen Toleranz aufwiesen, zu einer signifikant verringerten Abortrate führte. Dieser schwangerschaftsfördernde Effekt war mit einer Erhöhung der T_{reg} -Zellzahl und -aktivität vergesellschaftet. Außerdem konnte auch ein Transfer der T_{reg} von hCG-behandelten Aborttieren diesen Effekt erreichen (Schumacher et al. 2013). Es kann demnach angenommen werden, dass hCG nicht nur die Migration von T_{reg} , sondern auch deren Expansion und

eine Erhöhung ihrer Funktionalität bewirkt. Dennoch muss die Wirkungsweise von hCG auf *humane* T_{reg} noch untersucht werden.

5.1. hCG induziert die de-novo Synthese von T_{reg} aus CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen

Da es ein Ziel dieser Arbeit war zu ergründen, ob hCG, welches vom Trophoblasten gebildet wird, zu einer Induktion von T_{reg} in der menschlichen Schwangerschaft führt, wurden in einer ersten Versuchsreihe CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit verschiedenen Trophoblastenzelllinien kultiviert. Einerseits wurden die hCG-produzierende Chorionkarzinomzelllinie JEG-3- und HTR-8-Zellen verwendet, andererseits die nicht hCG-produzierende SWAN-71-Zelllinie (Straszewski-Chavez et al. 2009; Graham et al. 1993). Die Hautkrebszelllinie HaCat diente der Kontrolle. Dabei wurden Trophoblastenzelllinien anstelle von Primärtrophoblasten verwendet, da diese immortalisiert und damit insbesondere für Versuche geeignet sind, in denen notwendige Proben (im Falle dieser Arbeit Blut von Schwangeren) nicht ständig und sofort zur Verfügung stehen. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Die Methode, die zur Immortalisierung dieser Zellen verwendet wurde, hatte keinen Einfluss auf den Karyotyp oder den Phänotyp der Zellen (Jiang et al. 1999; Krikun et al. 2005). Beide Zelllinien weisen gleichartige Charakteristika wie Primärtrophoblasten auf und wurden bereits erfolgreich in *in vitro* Studien verwendet (Fest et al. 2008; Mulla et al. 2009; Fettke et al. 2016). Es ist jedoch einzuräumen, dass auch Unterschiede zwischen Primärtrophoblasten und Trophoblastenzelllinien gefunden wurden, beispielsweise bezüglich ihrer Expression von HLA- oder mRNA- Molekülen (Apps et al. 2009; Bilban et al. 2010; Tilburgs et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurde sich jedoch für Zelllinien entschieden, da sie in Kultur konstante Mengen an hCG sezernieren. Dies ist bei Primärtrophoblasten nicht der Fall. Demzufolge diente die Verwendung von Trophoblastenzelllinien dem vorab gesetzten Ziel, den Einfluss von hCG auf T_{reg} zu erforschen.

Es zeigte sich, dass sich die Anzahl an T_{reg} nach der Kokultur mit der hCG-produzierenden Trophoblastenzelllinie JEG-3 signifikant erhöhte, wohingegen die Keratinozyten, welche kein hCG produzieren, diesen Effekt nicht zeigten. Interessanterweise fand sich auch nach der Kultur mit den Trophoblastenzellen HTR-8 und SWAN-71 eine Erhöhung der T_{reg}-Zellzahl, obwohl auch diese nur eine geringe bzw. keine hCG-Produktion aufwiesen. Diese Beobachtung stimmt mit den Erkenntnissen einer Studie von Ramhorst und Kollegen überein, bei der Niedrigserum-Medien von SWAN-71- und HTR-8-Zellen eine Differenzierung von mütterlichen naiven T-Zellen zu induzierten T_{reg} (iT_{reg}) bewirkten, welche sich durch eine signifikante Erhöhung der FoxP3-Expression auszeichneten (Ramhorst et al. 2012a). Die Autoren beschrieben außerdem eine hohe Expression von TGF-β1 und TGF-β2 durch HTR-8- und SWAN-71-Zellen und stellten fest, dass TGF-β an der lokalen T_{reg}-Zell-Differenzierung an der fetomaternalen Grenzfläche beteiligt ist. Eine aktuellere Studie zeigte zudem, dass das von SWAN-71-Zellen gebildete antiinflammatorische Molekül VIP auch einen Einfluss auf die lokale Induktion von T_{reg} hat (Fraccaroli et al. 2015).

Des Weiteren wurden bis heute viele antigenabhängige und antigenunabhängige Mechanismen der trophoblasteninduzierten T_{reg}-Zell-Generierung und -Expansion beschrieben. Beispielsweise

wurden nicht-MHC-Antigene und nicht-klassische MHC-Antigene, welche von Trophoblastenzellen exprimiert werden, in diesem Zusammenhang identifiziert (Shao et al. 2005). Auch Oberflächenmarker, wie PD-L1 wurden als hierfür bedeutend beschrieben (Taglauer et al. 2008). Neben TGF- β könnten auch andere vom Trophoblasten gebildete Faktoren, wie zum Beispiel Galectin-1 und IL-10 eine Induktion von T_{reg} an der fetomaternalen Grenzfläche bewirken (Ramhorst et al. 2012b; Groux et al. 1997; Roth et al. 1996).

Auch die Wirkung des von der Plazenta produzierten Progesterons auf die Anzahl an T_{reg} wird diskutiert, wenn auch kontrovers. Während Mao und Kollegen zeigten, dass physiologische Mengen an Progesteron, wie sie in der Schwangerschaftsmitte vorliegen, im Mausmodell zu einer Konversion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen führten (Mao et al. 2010), berichteten Mjösberg und Kollegen Gegenteiliges. Hier führten Progesteronkonzentrationen, die denen des zweiten Trimenons der menschlichen Schwangerschaft entsprachen, zu einer Reduktion von CD4^{dim}CD25^{high}FoxP3⁺ Zellen (Mjösberg et al. 2009). Weiterhin zeigten Schumacher und Kollegen im Mausmodell, dass die Gabe von Progesteron zwar zu einer erhöhten Zahl an T_{reg} führte, dies jedoch nicht mit einem Schutz vor Aborten korrelierte (Schumacher et al., eingereicht).

Neben den direkten Stoffwechselwegen können auch indirekte Wege, beispielsweise über DZ, zu einer Akkumulation von T_{reg} führen. In diesem Fall bedingen vom Trophoblasten exprimierte Faktoren eine Differenzierung von DZ hin zu einem tolerogenen Phänotyp, was wiederum die Generierung von T_{reg} unterstützt (Du et al. 2014; Salamone et al. 2012). Im Mausmodell wurde diesbezüglich schon gezeigt, dass nach Applikation von sowohl LH als auch hCG die Zahl an reifen DZ in der Dezidua und der Peripherie vermindert war und das DZ nach hCG-Behandlung eine erhöhte Fähigkeit zur Induktion von T_{reg} hatten (Schumacher et al. 2013). Außerdem wurde belegt, dass die Gabe von hCG-behandelten DZ zu einer Verringerung der Abortrate führte (Dauven et al. 2016).

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass das vom Trophoblasten gebildete hCG einen weiteren wichtigen Faktor für die lokale T_{reg}-Zell-Induktion aus konventionellen T-Zellen darstellt. Obwohl vermutet wird, dass eine Konversion von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen in T_{reg} stattgefunden hat, muss doch gesagt werden, dass eine Expansion von präexistenten T_{reg}, die der magnetischen Zellsortierung entgangen sind, während der Kokulturen stattgefunden haben könnte. Aufgrund der sehr geringen Gesamtzahl an T_{reg} (0,025 %) zu Beginn der Kokultur sollte ihr Anteil am Gesamt-T_{reg}-Zellpool jedoch zu vernachlässigen sein.

Wie bereits erwähnt, existieren in den *in vitro* Systemen, die für die Versuche in dieser Arbeit verwendet wurden, neben dem hCG andere Faktoren, die eine Generierung von T_{reg} verursachen könnten. Dementsprechend wurden weitere Versuche durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, inwiefern tatsächlich das hCG für die *de-novo*-Synthese der T_{reg} verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment das hCG in Kokulturen von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit JEG-3-Zellen mittels AK geblockt. Hierbei wurde beobachtet, dass eine Blockierung von hCG die JEG-3-induzierte Vermehrung von T_{reg} verhinderte. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass tatsächlich das

von den JEG-3-Zellen gebildete hCG einen der Hauptfaktoren für die Induktion von T_{reg} darstellt. In Übereinstimmung damit konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden, dass sowohl rhCG als auch uhCG eine signifikante Erhöhung der T_{reg} -Zellzahl mit sich brachte. Dies war unabhängig von der verwendeten Konzentration. Die Konzentrationen des uhCG waren so gewählt, wie sie im Serum von Normalschwangeren im ersten Trimester gefunden werden. Da bereits beschrieben wurde, dass rhCG wirksamer ist als uhCG, wurden hier wesentlich niedrigere Konzentrationen gewählt. Um dennoch auszuschließen, dass die Konzentrationsunabhängigkeit etwa durch zu hohe Konzentrationen im Sinne einer Übersättigung des Systems zustande kam, wurde für das rhCG der Versuch unter Verwendung von 10 mIU/ml wiederholt. Auch hier zeigte sich ein Anstieg an $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} -Zellen, eine Abhängigkeit von der Konzentration ließ sich weiterhin nicht feststellen.

Insgesamt hatte das rhCG einen geringfügig höheren Effekt auf $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen als uhCG. Kajihara und Kollegen entdeckten, dass rhCG, jedoch nicht uhCG, das Endometrium vor Schäden durch Sauerstoffradikale schützt (Kajihara et al. 2011). Im Zusammenhang mit Techniken der assistierten Reproduktion (*Assisted reproductive technology*, ART) zeigte eine Studie von Zeke und Kollegen, dass eine Behandlung mit rhCG während einer *in-vitro*-Fertilisation häufiger zu einer Schwangerschaft führte als die Applikation von uhCG (Zeke et al. 2011). Daraus ließe sich eventuell schlussfolgern, dass die Verwendung von rhCG der von uhCG im Rahmen von ART vorzuziehen ist. Dementgegen existieren aber auch Studien, die keinerlei Unterschied zwischen den beiden hCG-Formen, zumindest nicht bezüglich ihrer Fähigkeit eine Ovulation auszulösen, fanden (Youssef et al. 2016; Uhler et al. 2006; Al-Inany et al. 2005). Es sind demnach in Zukunft weitere *in vivo* Studien notwendig um eventuelle Vorteile des rhCG gegenüber dem uhCG aufzuzeigen.

5.2. Die Behandlung von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit hCG erhöht die Fähigkeit zur Immunsuppression.

Neben der *de-novo*-Synthese von T_{reg} wurde im Rahmen dieser Arbeit auch gezeigt, dass hCG-produzierende JEG-3-Zellen in der Lage sind, die suppressive Kapazität von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen zu erhöhen. Der gleiche Effekt zeigte sich nach Behandlung der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit rhCG. Leider war es technisch nicht möglich die *de-novo*-generierten $FoxP3^+$ T_{reg} aus dem Gesamtzellpool in ausreichender Anzahl für die weitere separate Analyse ihrer suppressiven Kapazität zu reisolieren. Aus diesem Grund wurde eine Variante gewählt, bei der verglichen wurde, ob die Fähigkeit des gesamten T-Zell-Pools die Proliferation von anderen T-Zellen zu unterdrücken sich unterscheidet, je nachdem ob diese zuvor mit hCG behandelt wurden oder nicht. Da die SWAN-71-Zellen ebenfalls eine Erhöhung der T_{reg} -Zellzahl bewirkten, obwohl hier kein hCG im System war, ergab sich die Frage, ob auch diese Trophoblastenzelllinie eine Auswirkung auf die suppressive Kapazität der T-Zellen haben würde. Dementsprechend wurde der Versuch analog mit SWAN-71-Zellen durchgeführt.

Des Weiteren interessierte es, ob der vorherige Kontakt der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit Selbst- oder Fremdanigenen diesen Prozess beeinflusst.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die suppressive Kapazität der $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen in

der Tat verstärkt wird, wenn diese zuvor mit hCG in Kontakt waren. Dabei kann angenommen werden, dass dies durch die *de-novo*-generierten FoxP3⁺T-Zellen bedingt ist. Die Kokultur mit den SWAN-71-Zellen resultierte zwar auch in einer erhöhten Fähigkeit der CD4⁺FoxP3⁻T-Zellen zur Suppression von anderen T-Zellen, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant. Dies ist eventuell bedingt durch die geringere Anzahl an konvertierten T_{reg} im Gesamt-T-Zell-Pool.

Die Wirkung war antigenunabhängig; mit hCG-behandelte CD4⁺FoxP3⁻T-Zellen unterdrückten die Proliferation von auto- und allologenen T-Zellen in gleichem Maße. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie im Mausmodell von Schumacher und Kollegen, bei der mit hCG-behandelte T_{reg} andere T-Zellen antigenspezifisch hemmten (Schumacher et al. 2013). Jedoch war hier aufgrund der Tatsache, dass im Maussystem gearbeitet wurde, eine Reisolierung der T_{reg} und damit eine direkte Analyse der suppressiven Kapazität der T_{reg} möglich. Wie bereits erwähnt, kann angenommen werden, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene Erhöhung der suppressiven Aktivität der CD4⁺FoxP3⁻T-Zellen durch eine Zunahme an T_{reg} innerhalb des gesamten Zellpools verursacht wird, dennoch ist zu erwägen, dass der Effekt der T_{reg} durch die anderen im Zellpool vorhandenen T-Zellen maskiert wird.

Bezüglich des Einflusses von hCG auf konventionelle T-Zellen wurde in einem Modell von Mäusen, welche an Diabetes litten (aus dem Englischen: *non obese diabetic mouse* – nicht übergewichtige diabetische Maus, NOD) bereits gezeigt, dass die Applikation von hCG neben einer Erhöhung der Anzahl an T_{reg} auch eine Verminderung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen bewirkte. Des Weiteren führte sie zu einer verminderten IFN- γ Produktion und einer erhöhten Sekretion von IL-10 und TGF- β , was zeigt, dass hCG grundlegend in die Regulation sowohl der Anzahl als auch der Aktivität von T-Zellen eingreift. Außerdem wurde die Entwicklung des Diabetes, welcher nicht nur eine Stoffwechsel- sondern auch eine Autoimmunerkrankung ist, verhindert (Khan et al. 2001). In diesem Zusammenhang sei noch auf eine ältere Studie verwiesen, die ebenfalls zeigte, dass die T-Zell-Proliferation durch hCG gehemmt wird (Hammarstrom et al. 1979). Dementsprechend kann angenommen werden, dass hCG hier neben der Induktion von T_{reg} auch eine Modifizierung der Funktion von konventionellen T-Zellen bewirkt.

5.3. Die hCG-vermittelte immunsuppressive Wirkung von T_{reg} wird weder durch die Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 noch durch die Zytokine TGF- β und IL-10 vermittelt

T_{reg} üben ihre immunmodulierende Funktion sowohl über direkten Zell-Zell-Kontakt durch Moleküle an der Zelloberfläche als auch über die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen aus. So sind die Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 sowie die Zytokine IL-10 und TGF- β erwiesenermaßen Mediatoren von T_{reg} um die Antwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu regulieren (Hara et al. 2001; Wahl et al. 2004; Friedline et al. 2009). Im Mausmodell wurde beobachtet, dass der Transfer von T_{reg} in Abortmäuse protektiv auf die Feten wirkte, eine Blockierung von PD-1 und IL-10 diesen Effekt jedoch wieder rückgängig machte (Wafula et al. 2009; Schumacher et al. 2007). Die Blockierung von CTLA-4 und TGF- β zeigte diese Wirkung nicht, sodass sich vermuten lässt, dass für

dieses spezifische Model der gestörten fetalen Toleranz die protektive Wirkung der T_{reg} über die Moleküle PD-1 und IL-10 ausgeübt wurde. Demgegenüber zeigten Jin und Kollegen, dass die Rate an $CTLA-4^+ T_{reg}$ im Falle eines Aborts signifikant verringert waren im Vergleich zur normalen humanen Schwangerschaft sowohl in der Dezidua als auch im peripheren Blut und schlussfolgerten, dass der schwangerschaftsfördernde Effekt der T_{reg} auch durch eine vermehrte Expression von CTLA-4 vermittelt wird (Jin et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage aufgeworfen, ob hCG die Expression von CTLA-4 und PD-1 in humanen T-Zellen moduliert. Dabei konnten weder nach Kokultur von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit hCG-produzierenden oder nicht-hCG-produzierenden Zelllinien, noch nach Behandlung mit rhCG oder uhCG signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine aktuelle Studie von Svensson-Arvelund und Kollegen zeigte, dass die Kultur von $CD4^+$ T-Zellen mit Überständen von Ersttrimester-Trophoblastenzellen zu einer Induktion von funktionellen $CD25^{high}FoxP3^+$ T_{reg} führte, die eine hohe Expression an CTLA-4 aufwiesen (Svensson-Arvelund et al. 2015). Passend hierzu wurde in einer Studie von Koldehoff und Kollegen beschrieben, dass eine Injektion von hCG im Rahmen der IVF-Behandlung zwar zunächst zu einem Anstieg an $CTLA-4^+ T_{reg}$ führte, dieser aber nach der zweiten Injektion wieder rückläufig war, sodass die Autoren suggerieren, dass diesbezüglich signifikante Unterschiede zwischen IVF-Patientinnen und Normalschwangeren bestehen (Koldehoff et al. 2011). Es kann demnach vermutet werden, dass eine Induktion von $CTLA-4^+ T_{reg}$ vielmehr von anderen vom Trophoblasten sezernierten Faktoren als dem hCG hervorgerufen wird. Beispielsweise wurden von der Plazenta gebildete Exosomen identifiziert, die die Funktion von zytotoxischen T-Zellen beeinflussen (Hedlund et al. 2009). In vom Trophoblasten gebildeten Exosomen finden sich unter anderem Mikropartikel, die die Anzahl an aktivierten T-Zellen reduzieren und so das Zusammenspiel zwischen der fetoplazentaren Einheit und der Mutter beeinflussen (Frangsmyr et al. 2005; Sabapatha et al. 2006), wobei die genauen molekularen Mechanismen noch weitestgehend unerforscht sind. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass HTR-8-Zellen etwa dreimal mehr Exosomen produzieren als JEG-3-Zellen (Salomon et al. 2014). Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass daneben noch weitere bisher nicht identifizierte vom Trophoblasten sezernierte Faktoren zur Immuntoleranz beitragen (Gupta et al. 2005).

Daraufhin wurde der Fokus auf immunmodulierende Zytokine gelegt und die Mengen an IL-10 und TGF- β bestimmt, die während der Kultur von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen entweder unter Anwesenheit oder Abwesenheit von hCG sezerniert wurden. Khil und Kollegen zeigten in einer Studie, dass Splenozyten *in vivo*, wenn sie mit hCG behandelt wurden, vermehrt IL-10 und TGF- β produzierten (Khil et al. 2007). In der vorliegenden *in vitro* Studie, waren signifikant erhöhte Mengen an IL-10 nur nach Kokultur mit der Keratinozytenzelllinie HaCat nachweisbar, obwohl sich kein hCG im System befand. Dabei lässt sich nicht ausschließen, dass die Keratinozyten selbst zu der Vermehrung von IL-10 im Überstand beigetragen haben, auch wenn die IL-10-Produktion der Zelllinie alleine nur sehr gering war. Dass HaCat-Zellen auf exogene Stimuli mit einer vermehrten Sekretion von IL-10 reagieren ist mittlerweile vielfach gezeigt worden, so zum Beispiel nach Applikation von UV-Licht (Byun et al.

2009) oder durch das Psoriasismedikament Dithranol (Farkas et al. 2001). Weitere Analysen der IL-10-Sekretion durch CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen nach Behandlung mit rhCG oder uhCG erbrachten ebenfalls keinen Anhalt für eine erhöhte hCG-getriggerte IL-10-Produktion.

Auch auf die Sezernierung von TGF- β durch konventionelle CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen bzw. T_{reg} scheint hCG im in dieser Arbeit verwendeten System keinen Einfluss zu haben. Dies steht im Einklang mit der bereits oben genannten Studie von Koldehoff und Kollegen, die nach hCG-Injektion ebenfalls keine Erhöhung an TGF- β fanden. Dementsprechend muss wohl geschlussfolgert werden, dass hCG, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle für die Induktion einer TGF- β -Sekretion durch CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen und/oder T_{reg} spielt. Demgegenüber zeigte ebendiese Arbeit, dass sich die Menge an IL-10 nach hCG-Injektion erhöht. Dabei ist jedoch zu vermerken, dass hier allgemein die IL-10-Menge im Blut gemessen wurde, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Zellen das IL-10 produzierten. Schließlich sezernieren auch andere Lymphozyten, wie beispielsweise regulatorische B-Zellen, IL-10 (Rolle et al. 2013).

Insgesamt muss demnach gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine Moleküle identifiziert werden konnten, die potentielle Kandidaten für die hCG-vermittelte T_{reg}-Zell-Funktion darstellen. Da sich aufgrund der Ergebnisse jedoch sehr wohl ein Effekt des hCG auf die Funktionalität von CD4⁺ FoxP3⁻ T-Zellen bzw. T_{reg} vermuten lässt, wäre es von großem Interesse die Faktoren, die ebendies bewirken, im Rahmen zukünftiger Studien zu demaskieren.

Intention der vorliegenden Arbeit war es, das Zusammenspiel von hCG und T_{reg} zur Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz in der menschlichen Schwangerschaft genauer zu ergründen. Dafür wurde zunächst untersucht, ob von Trophoblastenzellen gebildetes hCG zu einer Umwandlung von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen zu CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen führt, also von konventionellen T-Zellen zu T_{reg}. Für alle Versuche wurden CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen von Schwangeren verwendet, da diese bereits Kontakt mit väterlichen Antigenen hatten und frühere Studien im Mausmodell gezeigt haben, dass väterliche Antigene einen Effekt auf die Induktion von T_{reg} durch hCG haben (Schumacher et al. 2013). Dabei ließ die deutliche Zunahme an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen nach Kultur mit hCG-produzierenden Trophoblastenzellen im Gegensatz zur Kultur mit nicht-hCG-produzierenden Zelllinien vermuten, dass neben anderen vom Trophoblasten sezernierten Faktoren insbesondere das hCG zu einer T_{reg}-Zell-Induktion beiträgt. Diese Erkenntnis wurde dadurch noch weiter bekräftigt, dass nach Blockierung des hCG durch einen anti-hCG-AK dieser Effekt nicht nachzuweisen war und das analoge Versuche mit rekombinantem bzw. urin-aufgereinigtem hCG unabhängig von der Konzentration ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg an CD4⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen führten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von CD4⁺FoxP3⁻ T-Zellen mit hCG dazu führte, dass diese in der Lage waren die Proliferation anderer T-Zellen zu hemmen. Dementsprechend hatte hCG nicht nur einen quantitativen Effekt im Sinne einer Erhöhung der Anzahl an T_{reg}, sondern auch einen Einfluss auf die suppressive Kapazität. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen ein Zusammenspiel von hCG und T_{reg} im Menschen und lassen vermuten, dass die daraus resultierende Verschiebung der Immunantwort in Richtung einer

erhöhten Toleranz gegenüber Fremdanigenen ein wichtiger Mechanismus für die Entstehung und Aufrechterhaltung der humanen Schwangerschaft ist.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit wichtige Mechanismen identifiziert werden, durch welche hCG zur Toleranz einer Schwangeren gegenüber dem Feten beiträgt. Neben der bereits in früheren Studien beschriebenen Fähigkeit, die Migration von T_{reg} zur feto-maternalen Grenzfläche zu induzieren, konnte hier gezeigt werden, dass ein Anstieg der Zahl an T_{reg} auf lokaler Ebene durch eine hCG-vermittelte Konversion von konventionellen T-Zellen zu T_{reg} erreicht wird.

Außerdem konnte belegt werden, dass hCG den für den Feten schädlichen Einfluss der allopathen T-Zell-Antwort inhibiert, indem es die suppressive Aktivität von konventionellen T-Zellen fördert. Zusammenfassend vermitteln die in dieser Arbeit erhobenen Daten auch mögliche Erklärungen für die erhöhte Anzahl erfolgreicher Schwangerschaften nach hCG-Applikation im Rahmen von künstlichen Befruchtungen.

7. Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft muss der weibliche Organismus in der Lage sein, sich selbst vor Angriffen durch Pathogene, die Fremdantigene exprimieren, zu schützen. Gleichzeitig gilt es den heranwachsenden Feten zu tolerieren, obwohl dieser ebenfalls zu 50 % aus Fremdantigenen, nämlich denen des Vaters, besteht. Es ist mittlerweile unumstritten, dass zahlreiche aktive Toleranzmechanismen sowohl von Seiten der Mutter als auch des Feten zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft beitragen. Ein Zelltyp, der als bedeutend hierfür identifiziert wurde, sind die $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Auch das Schwangerschaftshormon humanes Choriongonadotropin (hCG) beeinflusst das Immunsystem, sowohl das angeborene als auch das adaptive. Es wurde bereits gezeigt, dass es die Migration von T_{reg} zur feto-maternalen Grenzfläche unterstützt und die Anzahl und Funktionalität der T_{reg} im Mausmodell erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob hCG und hCG-produzierende humane Trophoblastenzellen zu einer Konversion von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen zu T_{reg} führen und die suppressive Kapazität dieser Zellen erhöhen. Dafür wurden $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen aus dem Blut von Normalschwangeren isoliert und entweder zusammen mit hCG-produzierenden oder nicht-hCG-produzierenden Zelllinien kultiviert. Um den Effekt eindeutig dem hCG zuordnen zu können, wurden die Versuche auch unter Hinzugabe eines anti-hCG-Antikörpers durchgeführt. Außerdem wurden $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen zusammen mit rekombinantem oder urinaufgereinigtem hCG kultiviert. Im Anschluss wurde die Anzahl an $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} ermittelt und die suppressive Kapazität des Gesamtzellpools bestimmt. Da bekannt ist, dass T_{reg} ihre immunsuppressive Aktivität auch über die Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β ausüben, wurde der Gehalt an diesen Zytokinen im Überstand nach erfolgter Kokultur ermittelt. Auch wurde untersucht, ob hCG eine Zunahme an T-Zellen bewirkt, die ebenfalls PD-1 und CTLA-4 exprimieren, da auch über diese Oberflächenmoleküle eine Ausübung der Immunsuppression erfolgt. Die Kultur von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit hCG-produzierenden Trophoblastenzellen führte im Gegensatz zur Kultur mit nicht-hCG-produzierenden Zelllinien zu einer signifikanten Zunahme an $CD4^+FoxP3^+$ T_{reg} , ebenso die Zugabe von urinaufgereinigtem oder rekombinantem hCG. Nach Blockierung des hCG in T-Zell-Trophoblasten-Kokulturen war dieser Effekt nicht mehr nachzuweisen. Des Weiteren führte die Behandlung von $CD4^+FoxP3^-$ T-Zellen mit hCG dazu, dass diese in der Lage waren die Proliferation anderer T-Zellen zu hemmen. Eine hCG-bedingte Zunahme von IL-10 und TGF- β im Überstand oder ein Anstieg von PD-1 oder CTLA-4 konnten nicht nachgewiesen werden. Es kann demnach geschlussfolgert werden, dass hCG zu einer Umwandlung von konventionellen T-Zellen zu T_{reg} beiträgt. Außerdem hat es einen Einfluss auf die suppressive Kapazität der T-Zellen. Die vorliegende Arbeit beschreibt demnach einen weiteren Mechanismus, wie hCG das Immunsystem in der Schwangerschaft zugunsten des Feten reguliert. Dabei konnte kein Einfluss des hCG auf die für die Funktion der T_{reg} wichtigen Zytokine IL-10 und TGF- β und auf die Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 nachgewiesen werden. Es wäre daher interessant, in zukünftigen Studien die molekularen Mechanismen

für die hCG-vermittelte T_{reg}-Funktion zu identifizieren. Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der immunregulatorischen Mechanismen in der humanen Schwangerschaft bei, insbesondere dem Zusammenhang zwischen hCG und dem Anstieg der T_{reg}-Zahl und deren immunsuppressiver Funktion an der feto-maternalen Grenzfläche.

Literaturverzeichnis

1. Aaleyaşin, Ashraf; Aghahosseini, Marzieh; Rashidi, Mandana; Safdarian, Leila; Sarvi, Fatemeh; Najmi, Zahra et al. (2015): In vitro fertilization outcome following embryo transfer with or without preinstillation of human chorionic gonadotropin into the uterine cavity: a randomized controlled trial. In: *Gynecologic and obstetric investigation* 79 (3), S. 201–205. DOI: 10.1159/000363235.
2. Adams KM, Nelson J. L. (2006): Bi-directional cell trafficking during pregnancy. In: Gil Mor (Hg.): *Immunology of Pregnancy*. New York, NY: Eureka.com and Springer Science+Business Media Inc (Medical Intelligence Unit).
3. Al-Inany, Hesham; Aboulghar, Mohamed A.; Mansour, Ragaa T.; Proctor, Michelle (2005): Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 20 (8), S. 2061–2073. DOI: 10.1093/humrep/dei035.
4. Anne Leber (2011): Untersuchungen zur Generierung, Migration und Funktion von Regulatorischen T-Zellen in der Schwangerschaft. Online verfügbar unter urn:nbn:de:kobv:11-100196393.
5. Apps, Richard; Murphy, Shawn P.; Fernando, Raymond; Gardner, Lucy; Ahad, Tashmeeta; Moffett, Ashley (2009): Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. In: *Immunology* 127 (1), S. 26–39. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03019.x.
6. Arruvito, L.; Billordo, A.; Capucchio, M.; Prada, M. E.; Fainboim, L. (2009): IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. In: *Journal of reproductive immunology* 82 (2), S. 158–165. DOI: 10.1016/j.jri.2009.04.010.
7. Arruvito, Lourdes; Sanz, Marianela; Banham, Alison H.; Fainboim, Leonardo (2007): Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (4), S. 2572–2578.
8. Aspillaga, M. O.; Whittaker, P. G.; Taylor, A.; Lind, T. (1983): Some new aspects of the endocrinological response to pregnancy. In: *British journal of obstetrics and gynaecology* 90 (7), S. 596–603.
9. Baban, Babak; Chandler, Phillip; McCool, Doris; Marshall, Brendan; Munn, David H.; Mellor, Andrew L. (2004): Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. In: *Journal of reproductive immunology* 61 (2), S. 67–77. DOI: 10.1016/j.jri.2003.11.003.
10. Balandya, Emmanuel; Wieland-Alter, Wendy; Sanders, Katherine; Lahey, Timothy (2012): Human seminal plasma fosters CD4(+) regulatory T-cell phenotype and transforming growth factor-beta1 expression. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 68 (4), S. 322–330. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2012.01176.x.
11. Bansal, Amolak S.; Bora, Shabana A.; Saso, Srdjan; Smith, J. Richard; Johnson, Mark R.; Thum, Meen-Yau (2012): Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. In: *Expert review of clinical immunology* 8 (8), S. 747–753. DOI: 10.1586/eci.12.77.
12. Basiji, David A.; Ortyn, William E.; Liang, Luchuan; Venkatachalam, Vidya; Morrissey, Philip (2007): Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. In: *Clinics in laboratory medicine* 27 (3), 653-70, viii. DOI: 10.1016/j.cll.2007.05.008.
13. Basta, Pawel; Majka, Marcin; Jozwicki, Wojciech; Lukaszewska, Ewelina; Knafel, Anna; Grabiec, Marek et al. (2010): The frequency of CD25+CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in ectopic endometrium and ectopic decidua. In: *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 8, S. 116. DOI: 10.1186/1477-7827-8-116.

14. BD Biosciences (Hg.): Fluorochrome Specifications. Online verfügbar unter http://www.bdbiosciences.com/documents/Multicolor_Fluorochrome_Specs.pdf, zuletzt geprüft am 21.09.2016.
15. Berndt, Sarah; Perrier d'Hauterive, Sophie; Blacher, Silvia; Pequeux, Christel; Lorquet, Sophie; Munaut, Carine et al. (2006): Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (14), S. 2630–2632. DOI: 10.1096/fj.06-5885fje.
16. Bilban, M.; Tauber, S.; Haslinger, P.; Pollheimer, J.; Saleh, L.; Pehamberger, H. et al. (2010): Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. In: *Placenta* 31 (11), S. 989–996. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.08.011.
17. Blois, Sandra M.; Ilarregui, Juan M.; Tometten, Mareike; Garcia, Mariana; Orsal, Arif S.; Cordo-Russo, Rosalia et al. (2007): A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. In: *Nature medicine* 13 (12), S. 1450–1457. DOI: 10.1038/nm1680.
18. Boehmer, H. von; Teh, H. S.; Kisielow, P. (1989): The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. In: *Immunology today* 10 (2), S. 57–61. DOI: 10.1016/0167-5699(89)90307-1.
19. Boehmer, Harald von (2005): Mechanisms of suppression by suppressor T cells. In: *Nature immunology* 6 (4), S. 338–344. DOI: 10.1038/ni1180.
20. Bonduelle, M. L.; Dodd, R.; Liebaers, I.; van Steirteghem, A.; Williamson, R.; Akhurst, R. (1988): Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from triprounucleate zygotes. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 3 (7), S. 909–914.
21. Boorstein, W. R.; Vamvakopoulos, N. C.; Fiddes, J. C. (1982): Human chorionic gonadotropin beta-subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. In: *Nature* 300 (5891), S. 419–422.
22. Borghans, J. A.; Noest, A. J.; Boer, R. J. de (1999): How specific should immunological memory be? In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (2), S. 569–575.
23. Braunstein, G. D.; Rasor, J.; Danzer, H.; Adler, D.; Wade, M. E. (1976): Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 126 (6), S. 678–681.
24. Burt, Trevor D. (2013): Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 69 (4), S. 346–358. DOI: 10.1111/aji.12083.
25. Byun, Ji Yeon; Choi, Hae Young; Myung, Ki Bum; Choi, You Won (2009): Expression of IL-10, TGF-beta(1) and TNF-alpha in Cultured Keratinocytes (HaCaT Cells) after IPL Treatment or ALA-IPL Photodynamic Treatment. In: *Annals of dermatology* 21 (1), S. 12–17. DOI: 10.5021/ad.2009.21.1.12.
26. Cederbom, L.; Hall, H.; Ivars, F. (2000): CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. In: *European journal of immunology* 30 (6), S. 1538–1543. DOI: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1538::AID-IMMU1538>3.0.CO;2-X.
27. Chen, Wanjun; Jin, Wenwen; Hardegen, Neil; Lei, Ke-Jian; Li, Li; Marinos, Nancy et al. (2003): Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (12), S. 1875–1886. DOI: 10.1084/jem.20030152.
28. Clark, David A.; Fernandes, Jason; Banwatt, Daljeet (2008): Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 59 (6), S. 525–534. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2008.00582.x.

29. Crawford, R. J.; Tregear, G. W.; Niall, H. D. (1986): The nucleotide sequences of baboon chorionic gonadotropin beta-subunit genes have diverged from the human. In: *Gene* 46 (2-3), S. 161–169.
30. Croy, B. Anne; van den Heuvel, Marianne J; Borzychowski, Angela M.; Tayade, Chandrakant (2006): Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. In: *Immunological reviews* 214, S. 161–185. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00447.x.
31. Dauven, Dominique; Ehrentraut, Stefanie; Langwisch, Stefanie; Zenclussen, Ana Claudia; Schumacher, Anne (2016): Immune Modulatory Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Dendritic Cells Supporting Fetal Survival in Murine Pregnancy. In: *Frontiers in endocrinology* 7, S. 146. DOI: 10.3389/fendo.2016.00146.
32. Dealtry, G. B.; O'Farrell, M. K.; Fernandez, N. (2000): The Th2 cytokine environment of the placenta. In: *International archives of allergy and immunology* 123 (2), S. 107–119.
33. Del Prete, G.; Carli, M. de; Almerigogna, F.; Giudizi, M. G.; Biagiotti, R.; Romagnani, S. (1993): 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. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150 (2), S. 353–360.
34. Dimova, Tanya; Nagaeva, Olga; Stenqvist, Ann-Christin; Hedlund, Malin; Kjellberg, Lennart; Strand, Magnus et al. (2011): Maternal Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 66 Suppl 1, S. 44–56. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01046.x.
35. DRZE: embryonic-development. Hg. v. Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften. Online verfügbar unter http://www.drze.de/in-focus/figures/embryonic-development-pgd/image_preview, zuletzt geprüft am 25.09.2016.
36. Du, Mei-Rong; Guo, Pei-Fen; Piao, Hai-Lan; Wang, Song-Cun; Sun, Chan; Jin, Li-Ping et al. (2014): Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (4), S. 1502–1511. DOI: 10.4049/jimmunol.1203425.
37. Dunker, Nicole; Krieglstein, Kerstin (2002): Tgfbeta2 -/- Tgfbeta3 -/- double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. In: *Anatomy and embryology* 206 (1-2), S. 73–83. DOI: 10.1007/s00429-002-0273-6.
38. eawag aquatic research: Schematic view of the flow cytometry method, zuletzt geprüft am 21.09.2016.
39. Eller, Kathrin; Wolf, Dominik; Huber, Julia M.; Metz, Martin; Mayer, Gert; McKenzie, Andrew N. J. et al. (2011): IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (1), S. 83–91. DOI: 10.4049/jimmunol.1001183.
40. Fallon, Padraic G.; Jolin, Helen E.; Smith, Philippa; Emson, Claire L.; Townsend, Michael J.; Fallon, Rosie et al. (2002): IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. In: *Immunity* 17 (1), S. 7–17.
41. Fan, Deng-Xuan; Duan, Jie; Li, Ming-Qing; Xu, Bin; Li, Da-Jin; Jin, Li-Ping (2011): The decidual gamma-delta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 141 (3), S. 284–292. DOI: 10.1016/j.clim.2011.07.008.
42. Farkas, A.; Kemeny, L.; Szonyi, B. J.; Bata-Csorgo, Z.; Pivarcsi, A.; Kiss, M. et al. (2001): Dithranol upregulates IL-10 receptors on the cultured human keratinocyte cell line HaCaT. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 50 (1), S. 44–49. DOI: 10.1007/s000110050723.

43. Fest, Stefan; Aldo, Paulomi B.; Abrahams, V. M.; Visintin, I.; Alvero, A.; Chen, R. et al. (2007): Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 57 (1), S. 55–66. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2006.00446.x.
44. Fest, Stefan; Brachwitz, Nadja; Schumacher, Anne; Zenclussen, Maria Laura; Khan, Faisal; Wafula, Paul O. et al. (2008): Supporting the hypothesis of pregnancy as a tumor: survivin is upregulated in normal pregnant mice and participates in human trophoblast proliferation. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 59 (1), S. 75–83. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2007.00557.x.
45. Fettke, Franziska; Schumacher, Anne; Canellada, Andrea; Toledo, Natalia; Bekeredjian-Ding, Isabelle; Bondt, Albert et al. (2016): 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. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 495. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00495.
46. Fluhr, Herbert; Bischof-Islami, Dorina; Krenzer, Stefanie; Licht, Peter; Bischof, Paul; Zygmont, Marek (2008): Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. In: *Fertility and sterility* 90 (4 Suppl), S. 1390–1395. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.023.
47. Fontenot, Jason D.; Dooley, James L.; Farr, Andrew G.; Rudensky, Alexander Y. (2005): Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (7), S. 901–906. DOI: 10.1084/jem.20050784.
48. Fraccaroli, Laura; Alfieri, Julio; Larocca, Luciana; Calafat, Mario; Mor, Gil; Leiros, Claudia Perez; Ramhorst, Rosanna (2009): A potential tolerogenic immune mechanism in a trophoblast cell line through the activation of chemokine-induced T cell death and regulatory T cell modulation. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 24 (1), S. 166–175. DOI: 10.1093/humrep/den344.
49. Fraccaroli, Laura; Grasso, Esteban; Hauk, Vanesa; Papparini, Daniel; Soczewski, Elizabeth; Mor, Gil et al. (2015): VIP boosts regulatory T cell induction by trophoblast cells in an in vitro model of trophoblast-maternal leukocyte interaction. In: *Journal of leukocyte biology* 98 (1), S. 49–58. DOI: 10.1189/jlb.1A1014-492RR.
50. Francisco, Loise M.; Sage, Peter T.; Sharpe, Arlene H. (2010): The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. In: *Immunological reviews* 236, S. 219–242. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
51. Frangmyr, L.; Baranov, V.; Nagaeva, O.; Stendahl, U.; Kjellberg, L.; Mincheva-Nilsson, L. (2005): Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. In: *Molecular human reproduction* 11 (1), S. 35–41. DOI: 10.1093/molehr/gah129.
52. Friedline, Randall H.; Brown, David S.; Nguyen, Hai; Kornfeld, Hardy; Lee, Jinhee; Zhang, Yi et al. (2009): CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (2), S. 421–434. DOI: 10.1084/jem.20081811.
53. Galazka, Krystyna; Wicherek, Lukasz; Pitynski, Kazimierz; Kijowski, Jacek; Zajac, Kszysztof; Bednarek, Wieslawa et al. (2009): Changes in the subpopulation of CD25+ CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in decidua with respect to the progression of labor at term and the lack of analogical changes in the subpopulation of suppressive B7-H4 macrophages--a preliminary report. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 61 (2), S. 136–146. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2008.00674.x.
54. Ghiringhelli, Francois; Menard, Cedric; Terme, Magali; Flament, Caroline; Taieb, Julien; Chaput, Nathalie et al. (2005): CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (8), S. 1075–1085. DOI: 10.1084/jem.20051511.

55. Gorivodsky, M.; Torchinsky, A.; Zemliak, I.; Savion, S.; Fein, A.; Toder, V. (1999): TGF beta 2 mRNA expression and pregnancy failure in mice. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 42 (2), S. 124–133.
56. Graham, C. H.; Hawley, T. S.; Hawley, R. G.; MacDougall, J. R.; Kerbel, R. S.; Khoo, N.; Lala, P. K. (1993): Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. In: *Experimental cell research* 206 (2), S. 204–211.
57. Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; Vries, J. E. de; Roncarolo, M. G. (1997): A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. In: *Nature* 389 (6652), S. 737–742. DOI: 10.1038/39614.
58. Guerin, Leigh R.; Moldenhauer, Lachlan M.; Prins, Jelmer R.; Bromfield, John J.; Hayball, John D.; Robertson, Sarah A. (2011): Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment. In: *Biology of reproduction* 85 (2), S. 397–408. DOI: 10.1095/biolreprod.110.088591.
59. Guerin, Leigh R.; Prins, Jelmer R.; Robertson, Sarah A. (2009): Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? In: *Human reproduction update* 15 (5), S. 517–535. DOI: 10.1093/humupd/dmp004.
60. Gupta, Anurag Kumar; Holzgreve, Wolfgang; Hahn, Sinuhe (2005): Microparticle-free placentally derived soluble factors downmodulate the response of activated T cells. In: *Human immunology* 66 (9), S. 977–984. DOI: 10.1016/j.humimm.2005.07.006.
61. Hafeez, Neveen A. Abedel; Fouda, Mona El-Toukhy; Abdel Gawad, Eman R.; Assar, Tamer; Mansour, Amira I. (2014): The role of regulatory T cells in preeclampsia. In: *The Egyptian journal of immunology / Egyptian Association of Immunologists* 21 (1), S. 45–55.
62. Hammarstrom, L.; Fuchs, T.; Smith, C. I. (1979): The immunodepressive effect of human glucoproteins and their possible role in the nonrejection process during pregnancy. In: *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 58 (5), S. 417–422.
63. Hara, M.; Kingsley, C. I.; Niimi, M.; Read, S.; Turvey, S. E.; Bushell, A. R. et al. (2001): IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (6), S. 3789–3796.
64. Harrington, Laurie E.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Turner, Henrietta; Murphy, Theresa L.; Murphy, Kenneth M.; Weaver, Casey T. (2005): Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. In: *Nature immunology* 6 (11), S. 1123–1132. DOI: 10.1038/ni1254.
65. harun yahya: Aufgaben der Plazenta. Online verfügbar unter <http://www.harunyahya.de/de/Bucher/10013/das-wunder-des-werden-den/chapter/8425>, zuletzt geprüft am 25.09.2016.
66. Hedlund, Malin; Stenqvist, Ann-Christin; Nagaeva, Olga; Kjellberg, Lennart; Wulff, Marianne; Baranov, Vladimir; Mincheva-Nilsson, Lucia (2009): Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (1), S. 340–351. DOI: 10.4049/jimmunol.0803477.
67. Heikkinen, J.; Mottonen, M.; Alanen, A.; Lassila, O. (2004): Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. In: *Clinical and experimental immunology* 136 (2), S. 373–378. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02441.x.
68. Hill, J. M.; McCune, S. K.; Alvero, R. J.; Glazner, G. W.; Henins, K. A.; Stanziale, S. F. et al. (1996): Maternal vasoactive intestinal peptide and the regulation of embryonic growth in the rodent. In: *The Journal of clinical investigation* 97 (1), S. 202–208. DOI: 10.1172/JCI118391.

69. Hoshina, M.; Boothby, M.; Hussa, R.; Pattillo, R.; Camel, H. M.; Boime, I. (1985): Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. In: *Placenta* 6 (2), S. 163–172.
70. Huang, Ching-Tai; Workman, Creg J.; Flies, Dallas; Pan, Xiaoyu; Marson, Aimee L.; Zhou, Gang et al. (2004): Role of LAG-3 in regulatory T cells. In: *Immunity* 21 (4), S. 503–513. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.08.010.
80. Hunt, J. S.; Andrews, G. K.; Wood, G. W. (1987): Normal trophoblasts resist induction of class I HLA. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 138 (8), S. 2481–2487.
81. Itoh, M.; Takahashi, T.; Sakaguchi, N.; Kuniyasu, Y.; Shimizu, J.; Otsuka, F.; Sakaguchi, S. (1999): Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (9), S. 5317–5326.
82. Jaffe, R. B.; Lee, P. A.; Midgley, A. R., JR (1969): Serum gonadotropins before, at the inception of, and following human pregnancy. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 29 (9), S. 1281–1283. DOI: 10.1210/jcem-29-9-1281.
83. Jasper, Melinda J.; Tremellen, Kelton P.; Robertson, Sarah A. (2006): Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. In: *Molecular human reproduction* 12 (5), S. 301–308. DOI: 10.1093/molehr/gal032.
84. Jensen, Federico; Wallukat, Gerd; Herse, Florian; Budner, Oliver; El-Mouseleh, Tarek; Costa, Serban-Dan et al. (2012): CD19+CD5+ cells as indicators of preeclampsia. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 59 (4), S. 861–868. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.188276.
85. Jensen, Federico; Woudwyk, Mariana; Teles, Ana; Woidacki, Katja; Taran, Florin; Costa, Serban et al. (2010): Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. In: *PLoS one* 5 (12), e14409. DOI: 10.1371/journal.pone.0014409.
86. Jeschke, U.; Toth, B.; Scholz, C.; Friese, K.; Makriganakis, A. (2010): Glycoprotein and carbohydrate binding protein expression in the placenta in early pregnancy loss. In: *Journal of reproductive immunology* 85 (1), S. 99–105. DOI: 10.1016/j.jri.2009.10.012.
87. Jiang, X. R.; Jimenez, G.; Chang, E.; Frolkis, M.; Kusler, B.; Sage, M. et al. (1999): Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. In: *Nature genetics* 21 (1), S. 111–114. DOI: 10.1038/5056.
88. Jin, Li-Ping; Chen, Qiao-Ying; Zhang, Tai; Guo, Pei-Fen; Li, Da-Jin (2009): The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 133 (3), S. 402–410. DOI: 10.1016/j.clim.2009.08.009.
89. Joachim, Ricarda; Zenclussen, Ana Claudia; Polgar, Beata; Douglas, Alison J.; Fest, Stefan; Knackstedt, Maike et al. (2003): The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. In: *Steroids* 68 (10-13), S. 931–940.
90. Jonuleit, Helmut; Schmitt, Edgar (2003): The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (12), S. 6323–6327.
91. Jurisicova, A.; Antenos, M.; Kapasi, K.; Meriano, J.; Casper, R. F. (1999): Variability in the expression of trophoblastic markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 14 (7), S. 1852–1858.
92. Kajihara, T.; Tochigi, H.; Uchino, S.; Itakura, A.; Brosens, J. J.; Ishihara, O. (2011): Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. In: *Placenta* 32 (8), S. 592–597. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.05.002.

93. Kallikourdis, Marinos; Betz, Alexander G. (2007): Periodic accumulation of regulatory T cells in the uterus: preparation for the implantation of a semi-allogeneic fetus? In: *PloS one* 2 (4), e382. DOI: 10.1371/journal.pone.0000382.
94. Kane, Nicole; Kelly, Rodney; Saunders, Philippa T. K.; Critchley, Hilary O. D. (2009): Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. In: *Endocrinology* 150 (6), S. 2882–2888. DOI: 10.1210/en.2008-1309.
95. Karman, Jozsef; Jiang, Ji-Lei; Gumlaw, Nathan; Zhao, Hongmei; Campos-Rivera, Juanita; Sancho, Jose et al. (2012): Ligation of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 to T cell receptor inhibits T cell activation and directs differentiation into Foxp3+ regulatory T cells. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (14), S. 11098–11107. DOI: 10.1074/jbc.M111.283705.
96. Kayisli, Umit A.; Selam, Belgin; Guzeloglu-Kayisli, Ozlem; Demir, Ramazan; Arici, Aydin (2003): Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (5), S. 2305–2313.
97. Keay, S. D.; Vatish, M.; Karteris, E.; Hillhouse, E. W.; Randeve, H. S. (2004): The role of hCG in reproductive medicine. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 111 (11), S. 1218–1228. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2004.00412.x.
98. Khan, N. A.; Khan, A.; Savelkoul, H. F.; Benner, R. (2001): Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. In: *Human immunology* 62 (12), S. 1315–1323.
99. Khil, L-Y; Jun, H-S; Kwon, H.; Yoo, J. K.; Kim, S.; Notkins, A. L.; Yoon, J-W (2007): Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice. In: *Diabetologia* 50 (10), S. 2147–2155. DOI: 10.1007/s00125-007-0769-y.
100. Khosrotehrani, Kiarash; Johnson, Kirby L.; Guegan, Sarah; Stroh, Helene; Bianchi, Diana W. (2005): Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. In: *Journal of reproductive immunology* 66 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.jri.2005.02.001.
101. Kiechle, Marion (2011): Gynäkologie und Geburtshilfe. Mit über 237 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]. 2., überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://els.pdn.ipublishcentral.com/reader/gynkologie-und-geburtshilfe-2a>.
102. Kingsley, Cherry I.; Karim, Mahzuz; Bushell, Andrew R.; Wood, Kathryn J. (2002): CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (3), S. 1080–1086.
103. Koldehoff, Michael; Katorke, Thomas; Wisbrun, Natalie C.; Propping, Dirk; Wohlers, Susanne; Bielfeld, Peter et al. (2011): Modulating impact of human chorionic gonadotropin hormone on the maturation and function of hematopoietic cells. In: *Journal of leukocyte biology* 90 (5), S. 1017–1026. DOI: 10.1189/jlb.0910520.
104. Kopicow, Hernan D.; Rosetti, Florencia; Leung, Yiuka; Allan, David S. J.; Kutok, Jeffrey L.; Strominger, Jack L. (2008): T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (47), S. 18472–18477. DOI: 10.1073/pnas.0809233105.
105. Kornyei, J. L.; Lei, Z. M.; Rao, C. V. (1993): Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. In: *Biology of reproduction* 49 (6), S. 1149–1157.
106. Krikun, G.; Mor, G.; Huang, J.; Schatz, F.; Lockwood, C. J. (2005): Metalloproteinase expression by control and telomerase immortalized human endometrial endothelial cells. In: *Histology and histopathology* 20 (3), S. 719–724.

107. Laphorn, A. J.; Harris, D. C.; Littlejohn, A.; Lustbader, J. W.; Canfield, R. E.; Machin, K. J. et al. (1994): Crystal structure of human chorionic gonadotropin. In: *Nature* 369 (6480), S. 455–461. DOI: 10.1038/369455a0.
108. Li, Guiyu; Lu, Caixia; Gao, Jing; Wang, Xietong; Wu, Huanling; Lee, Chao et al. (2015): Association between PD-1/PD-L1 and T regulate cells in early recurrent miscarriage. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 8 (6), S. 6512–6518.
109. Lim, Hyung W.; Hillsamer, Peter; Banham, Allison H.; Kim, Chang H. (2005): Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (7), S. 4180–4183.
110. Lin, H.; Mosmann, T. R.; Guilbert, L.; Tuntipopipat, S.; Wegmann, T. G. (1993): Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (9), S. 4562–4573.
111. Linzke, Nadja; Schumacher, Anne; Woidacki, Katja; Croy, B. Anne; Zenclussen, Ana C. (2014): Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 63 (3), S. 580–588. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02403.
112. Liu, Chaodong; Wang, Xian-Zhong; Sun, Xin-Bo (2013): Assessment of sperm antigen specific T regulatory cells in women with recurrent miscarriage. In: *Early human development* 89 (2), S. 95–100. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2012.08.003.
113. Lopata, A.; Hay, D. L. (1989): The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 4 (8 Suppl), S. 87–94.
114. Lu, Li-Fan; Lind, Evan F.; Gondek, David C.; Bennett, Kathy A.; Gleeson, Michael W.; Pino-Lagos, Karina et al. (2006): Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. In: *Nature* 442 (7106), S. 997–1002. DOI: 10.1038/nature05010.
115. Lyons, A. Bruce; Parish, Christopher R. (1994): Determination of lymphocyte division by flow cytometry. In: *Journal of Immunological Methods* 171 (1), S. 131–137. DOI: 10.1016/0022-1759(94)90236-4.
116. Makrigiannakis, A.; Zoumakis, E.; Kalantaridou, S.; Coutifaris, C.; Margioris, A. N.; Coukos, G. et al. (2001): Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. In: *Nature immunology* 2 (11), S. 1018–1024. DOI: 10.1038/ni719.
117. Mao, Guanping; Wang, Junpeng; Kang, Youmin; Tai, Ping; Wen, Jing; Zou, Qiang et al. (2010): Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. In: *Endocrinology* 151 (11), S. 5477–5488. DOI: 10.1210/en.2010-0426.
118. Medawar, Peter B.; others (1953): Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. In: *Symp Soc Exp Biol*, Bd. 7, S. 38.
119. Mellor, A. L.; Munn, D. H. (2001): Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. In: *Journal of reproductive immunology* 52 (1-2), S. 5–13.
120. Mills, Kingston H. G. (2004): Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? In: *Nature reviews. Immunology* 4 (11), S. 841–855. DOI: 10.1038/nri1485.
121. Misra, Namita; Bayry, Jagadeesh; Lacroix-Desmazes, Sebastien; Kazatchkine, Michel D.; Kaveri, Sridini V. (2004): Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (8), S. 4676–4680.
122. Miyara, Makoto; Sakaguchi, Shimon (2007): Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. In: *Trends in molecular medicine* 13 (3), S. 108–116. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.01.003.

123. Mjosberg, Jenny; Berg, Goran; Jenmalm, Maria C.; Ernerudh, Jan (2010): FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. In: *Biology of reproduction* 82 (4), S. 698–705. DOI: 10.1095/biolreprod.109.081208.
124. Mjosberg, Jenny; Svensson, Judit; Johansson, Emma; Hellstrom, Lotta; Casas, Rosaura; Jenmalm, Maria C. et al. (2009): Systemic reduction of functionally suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17 β -estradiol. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (1), S. 759–769. DOI: 10.4049/jimmunol.0803654.
125. Moffett, Ashley; Colucci, Francesco (2015): Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. In: *Immunological reviews* 267 (1), S. 283–297. DOI: 10.1111/imr.12323.
126. Mold, Jeff E.; Michaelsson, Jakob; Burt, Trevor D.; Muench, Marcus O.; Beckerman, Karen P.; Busch, Michael P. et al. (2008): Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5907), S. 1562–1565. DOI: 10.1126/science.1164511.
127. Moldenhauer, Lachlan M.; Diener, Kerrilyn R.; Thring, Dougal M.; Brown, Michael P.; Hayball, John D.; Robertson, Sarah A. (2009): Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (12), S. 8080–8093. DOI: 10.4049/jimmunol.0804018.
128. Morgan, F. J.; Birken, S.; Canfield, R. E. (1975): The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit. In: *The Journal of biological chemistry* 250 (13), S. 5247–5258.
129. Mulla, Melissa J.; Yu, Andrew G.; Cardenas, Ingrid; Guller, Seth; Panda, Britta; Abrahams, Vikki M. (2009): Regulation of Nod1 and Nod2 in first trimester trophoblast cells. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 61 (4), S. 294–302. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2009.00694.x.
130. Munn, D. H.; Zhou, M.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Conway, S. J.; Marshall, B. et al. (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5380), S. 1191–1193.
131. Nakashima, Akitoshi; Ito, Mika; Shima, Tomoko; Bac, Nguyen Duy; Hidaka, Takao; Saito, Shigeru (2010): Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 64 (1), S. 4–11. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00812.x.
132. Ormerod, M. G.; Novo, David (2008): Flow cytometry. A basic introduction. Redhill: Michael G. Ormerod.
133. Parham, Peter (2004): NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (8), S. 951–955. DOI: 10.1084/jem.20041783.
134. Parish, C. R. (1999): Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. In: *Immunology and cell biology* 77 (6), S. 499–508. DOI: 10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x.
135. Park, Heon; Li, Zhaoxia; Yang, Xuexian O.; Chang, Seon Hee; Nurieva, Roza; Wang, Yi-Hong et al. (2005): A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. In: *Nature immunology* 6 (11), S. 1133–1141. DOI: 10.1038/ni1261.
136. Perez Leiros, Claudia; Ramhorst, Rosanna (2013): Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 69 (4), S. 359–368. DOI: 10.1111/aji.12087.
137. Perillo, N. L.; Pace, K. E.; Seilhamer, J. J.; Baum, L. G. (1995): Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. In: *Nature* 378 (6558), S. 736–739. DOI: 10.1038/378736a0.

138. Piccinni, M. P.; Beloni, L.; Livi, C.; Maggi, E.; Scarselli, G.; Romagnani, S. (1998): Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. In: *Nature medicine* 4 (9), S. 1020–1024. DOI: 10.1038/2006.
139. Piccinni, M. P.; Giudizi, M. G.; Biagiotti, R.; Beloni, L.; Giannarini, L.; Sampognaro, S. et al. (1995): Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (1), S. 128–133.
140. Piccirillo, C. A.; Shevach, E. M. (2001): Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (3), S. 1137–1140.
141. Pittaway, D. E.; Reish, R. L.; Wentz, A. C. (1985): Doubling times of human chorionic gonadotropin increase in early viable intrauterine pregnancies. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 152 (3), S. 299–302.
142. Polanczyk, Magdalena J.; Carson, Bryan D.; Subramanian, Sandhya; Afentoulis, Michael; Vandembark, Arthur A.; Ziegler, Steven F.; Offner, Halina (2004): Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173 (4), S. 2227–2230.
143. Policastro, P.; Ovitt, C. E.; Hoshina, M.; Fukuoka, H.; Boothby, M. R.; Boime, I. (1983): The beta subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes. In: *The Journal of biological chemistry* 258 (19), S. 11492–11499.
144. Raghupathy, R.; Makhseed, M.; Azizieh, F.; Hassan, N.; Al-Azemi, M.; Al-Shamali, E. (1999): Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. In: *Cellular immunology* 196 (2), S. 122–130. DOI: 10.1006/cimm.1999.1532.
145. Ramhorst, Rosanna; Fraccaroli, Laura; Aldo, Paulomi; Alvero, Ayesha B.; Cardenas, Ingrid; Leiros, Claudia Perez; Mor, Gil (2012a): Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 67 (1), S. 17–27. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01056.x.
146. Ramhorst, Rosanna E.; Giribaldi, Laura; Fraccaroli, Laura; Toscano, Marta A.; Stupirski, Juan C.; Romero, Marta D. et al. (2012b): Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. In: *Glycobiology* 22 (10), S. 1374–1386. DOI: 10.1093/glycob/cws104.
147. Reuter, Peter (2007): Springer Klinisches Wörterbuch. [2007/2008 ; 75000 Stichwörter, 2050 Seiten mit 2450 vierfarbigen Abbildungen und Tabellen, 50000 englische Übersetzungen ; die ganze Welt der Medizin]. 1. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin. Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2855503&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
148. Robertson, S. A. (2000): Control of the immunological environment of the uterus. In: *Reviews of reproduction* 5 (3), S. 164–174.
149. Robertson, S. A.; Sharkey, D. J. (2001): The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. In: *Seminars in immunology* 13 (4), S. 243–254. DOI: 10.1006/smim.2000.0320.
150. Robertson, Sarah A. (2005): Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. In: *Cell and tissue research* 322 (1), S. 43–52. DOI: 10.1007/s00441-005-1127-3.
151. Robertson, Sarah A.; Guerin, Leigh R.; Bromfield, John J.; Branson, Kim M.; Ahlstrom, Aisling C.; Care, Alison S. (2009): Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. In: *Biology of reproduction* 80 (5), S. 1036–1045. DOI: 10.1095/biolreprod.108.074658.
152. Robinson, J. P. (Hg.) (1993): Handbook of flow cytometry methods. New York: Wiley-Liss. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/wiley033/92047082.html>.

153. Rogers, A. M.; Boime, I.; Connolly, J.; Cook, J. R.; Russell, J. H. (1998): Maternal-fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. In: *European journal of immunology* 28 (11), S. 3479–3487. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3479::AID-IMMU3479>3.0.CO;2-U.
154. Rolle, Luise; Memarzadeh Tehran, Maryam; Morell-Garcia, Anselm; Raeva, Yanitsa; Schumacher, Anne; Hartig, Roland et al. (2013): Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 70 (6), S. 448–453. DOI: 10.1111/aji.12157.
155. Roth, I.; Corry, D. B.; Locksley, R. M.; Abrams, J. S.; Litton, M. J.; Fisher, S. J. (1996): Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. In: *The Journal of experimental medicine* 184 (2), S. 539–548.
156. Rouas-Freiss, N.; Goncalves, R. M.; Menier, C.; Dausset, J.; Carosella, E. D. (1997): Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21), S. 11520–11525.
157. Rowe, Jared H.; Ertelt, James M.; Xin, Lijun; Way, Sing Sing (2012): Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. In: *Nature* 490 (7418), S. 102–106. DOI: 10.1038/nature11462.
158. Sabapatha, Anuradha; Gercel-Taylor, Cicek; Taylor, Douglas D. (2006): Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 56 (5-6), S. 345–355. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2006.00435.x.
159. Sadler, Thomas W.; Langman, Jan; Drews, Ulrich (2003): Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 10., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme.
160. Saito, S. (2000): Cytokine network at the feto-maternal interface. In: *Journal of reproductive immunology* 47 (2), S. 87–103.
161. Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M.; Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (3), S. 1151–1164.
162. Salamone, Gabriela; Fraccaroli, Laura; Gori, Soledad; Grasso, Esteban; Papparini, Daniel; Geffner, Jorge et al. (2012): Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 27 (9), S. 2598–2606. DOI: 10.1093/humrep/des208.
163. Salomon, Carlos; Yee, Sarah; Scholz-Romero, Katherin; Kobayashi, Miharuru; Vaswani, Kanchan; Kvaskoff, David et al. (2014): Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. In: *Frontiers in pharmacology* 5, S. 175. DOI: 10.3389/fphar.2014.00175.
164. Sasaki, Y.; Sakai, M.; Miyazaki, S.; Higuma, S.; Shiozaki, A.; Saito, S. (2004): Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. In: *Molecular human reproduction* 10 (5), S. 347–353. DOI: 10.1093/molehr/gah044.
165. Schumacher, Anne; Brachwitz, Nadja; Sohr, Sindy; Engeland, Kurt; Langwisch, Stefanie; Dolaptchieva, Maria et al. (2009): Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (9), S. 5488–5497. DOI: 10.4049/jimmunol.0803177.
166. Schumacher, Anne; Costa, Serban-Dan; Zenclussen, Ana Claudia (2014): Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 196. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00196.
167. Schumacher, Anne; Heinze, Kristina; Witte, Jeanette; Poloski, Eileen; Linzke, Nadja; Woidacki, Katja; Zenclussen, Ana C. (2013): Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy

- immune tolerance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (6), S. 2650–2658. DOI: 10.4049/jimmunol.1202698.
168. Schumacher, Anne; Wafula, Paul O.; Bertoja, Annarosa Zambon; Sollwedel, Andre; Thuere, Catharina; Wollenberg, Ivonne et al. (2007): Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. In: *Obstetrics and gynecology* 110 (5), S. 1137–1145. DOI: 10.1097/01.AOG.0000284625.10175.31.
169. Schumacher, Anne; Wafula, Paul Ojiambo; Teles, Ana; El-Mousleh, Tarek; Linzke, Nadja; Zenclussen, Maria Laura et al. (2012): Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. In: *PloS one* 7 (8), e42301. DOI: 10.1371/journal.pone.0042301.
170. Segerer, Sabine E.; Muller, Nora; van den Brandt, Jens; Kapp, Michaela; Dietl, Johannes; Reichardt, Holger M. et al. (2009): Impact of female sex hormones on the maturation and function of human dendritic cells. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 62 (3), S. 165–173. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2009.00726.x.
171. Shao, Ling; Jacobs, Adam R.; Johnson, Valrie V.; Mayer, Lloyd (2005): Activation of CD8+ regulatory T cells by human placental trophoblasts. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (12), S. 7539–7547.
172. Shirshv, S. V. (1997): Molecular mechanisms of immunomodulating effect of chorionic gonadotropin on T- and B-lymphocytes of intact spleen. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 62 (5), S. 514–522.
173. Somerset, David A.; Zheng, Yong; Kilby, Mark D.; Sansom, David M.; Drayson, Mark T. (2004): Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. In: *Immunology* 112 (1), S. 38–43. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x.
174. Straszewski-Chavez, S. L.; Abrahams, V. M.; Alvero, A. B.; Aldo, P. B.; Ma, Y.; Guller, S. et al. (2009): The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. In: *Placenta* 30 (11), S. 939–948. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.08.007.
175. Sundara, Yayan T.; Jordanova, Ekaterina S.; Hernowo, Bethy S.; Gandamihardja, Supriadi; Fleuren, Gert Jan (2012): Decidual infiltration of FoxP3(+) regulatory T cells, CD3(+) T cells, CD56(+) decidual natural killer cells and Ki-67 trophoblast cells in hydatidiform mole compared to normal and ectopic pregnancies. In: *Molecular medicine reports* 5 (1), S. 275–281. DOI: 10.3892/mmr.2011.633.
176. Svensson, L.; Arvola, M.; Sallstrom, M. A.; Holmdahl, R.; Mattsson, R. (2001): The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. In: *Journal of reproductive immunology* 51 (1), S. 3–7.
177. Svensson-Arvelund, Judit; Mehta, Ratnesh B.; Lindau, Robert; Mirrasekhian, Elahe; Rodriguez-Martinez, Heriberto; Berg, Goran et al. (2015): The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (4), S. 1534–1544. DOI: 10.4049/jimmunol.1401536.
178. Taams, Leonie S.; van Amelsfort, Jocea M R; Tiemessen, Machteld M.; Jacobs, Kim M. G.; Jong, Esther C. de; Akbar, Arne N. et al. (2005): Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *Human immunology* 66 (3), S. 222–230. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.12.006.
179. Taglauer, Elizabeth S.; Trikhacheva, Ann S.; Slusser, Joyce G.; Petroff, Margaret G. (2008): Expression and function of PDCD1 at the human maternal-fetal interface. In: *Biology of reproduction* 79 (3), S. 562–569. DOI: 10.1095/biolreprod.107.066324.
180. Tai, Ping; Wang, Junpeng; Jin, Huali; Song, Xiaoming; Yan, Jun; Kang, Youmin et al. (2008): Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. In: *Journal of cellular physiology* 214 (2), S. 456–464. DOI: 10.1002/jcp.21221.

181. Teles, Ana; Schumacher, Anne; Kuhnle, Marie-Cristine; Linzke, Nadja; Thuere, Catharina; Reichardt, Peter et al. (2013): Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 158. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00158.
182. Tepper, M. A.; Roberts, J. L. (1984): Evidence for only one beta-luteinizing hormone and no beta-chorionic gonadotropin gene in the rat. In: *Endocrinology* 115 (1), S. 385–391. DOI: 10.1210/endo-115-1-385.
183. Tilburgs, T.; Roelen, D. L.; van der Mast, B J; van Schip, J. J.; Kleijburg, C.; Groot-Swings, G. M. de et al. (2006): Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. In: *Placenta* 27 Suppl A, S47-53. DOI: 10.1016/j.placenta.2005.11.008.
184. Tilburgs, Tamara; Crespo, Angela C.; van der Zwan, Anita; Rybalov, Basya; Raj, Towfique; Stranger, Barbara et al. (2015): Human HLA-G+ extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (23), S. 7219–7224. DOI: 10.1073/pnas.1507977112.
185. Tilburgs, Tamara; Roelen, Dave L.; van der Mast, Barbara J; Groot-Swings, Godelieve M. de; Kleijburg, Carin; Scherjon, Sicco A.; Claas, Frans H. (2008): Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (8), S. 5737–5745.
186. Tsampalas, Marie; Gridelet, Virginie; Berndt, Sarah; Foidart, Jean-Michel; Geenen, Vincent; Perrier d'Hauterive, Sophie (2010): Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. In: *Journal of reproductive immunology* 85 (1), S. 93–98. DOI: 10.1016/j.jri.2009.11.008.
187. Uhler, Meike L.; Beltsos, Angeline N.; Grotjan, H. Edward; Lederer, Kevin J.; Lifchez, Aaron S. (2006): Age-matched comparison of recombinant and urinary HCG for final follicular maturation. In: *Reproductive biomedicine online* 13 (3), S. 315–320.
188. UniProt Consortium. P01215[25-116]: Glycoprotein hormones alpha chain precursor - Homo sapiens (Human). UniProt accession number P01215. Online verfügbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/P01215>, zuletzt geprüft am 20.09.2016.
189. UniProt Consortium. P01233[21-165]: Choriogonadotropin subunit beta precursor - Homo sapiens (Human). UniProt accession number P01233. Online verfügbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/P01233>, zuletzt geprüft am 20.09.2016.
190. Varayoud, J.; Ramos, J. G.; Bosquiazzo, V. L.; Munoz-de-Toro, M.; Luque, E. H. (2004): Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 127 (3), S. 379–387. DOI: 10.1530/rep.1.00018.
191. Wafula, Paul Ojiambo; Teles, Ana; Schumacher, Anne; Pohl, Kerstin; Yagita, Hideo; Volk, Hans-Dieter; Zenclussen, Ana Claudia (2009): PD-1 but not CTLA-4 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells in a pregnancy murine model. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 62 (5), S. 283–292. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2009.00737.x.
192. Wahl, Sharon M.; Swisher, Jennifer; McCartney-Francis, Nancy; Chen, Wanjun (2004): TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. In: *Journal of leukocyte biology* 76 (1), S. 15–24. DOI: 10.1189/jlb.1103539.
193. Wakkach, Abdelilah; Fournier, Nathalie; Brun, Valerie; Breittmayer, Jean-Philippe; Cottrez, Françoise; Groux, Herve (2003): Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. In: *Immunity* 18 (5), S. 605–617.
194. Wan, Hui; Versnel, Marjan A.; Leijten, Lonke M. E.; van Helden-Meeuwssen, Cornelia G.; Fekkes, Durk; Leenen, Pieter J. M. et al. (2008): Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. In: *Journal of leukocyte biology* 83 (4), S. 894–901. DOI: 10.1189/jlb.0407258.

195. Wang, Chunhe; Dehghani, Babak; Li, Yuexin; Kaler, Laurie J.; Vandebark, Arthur A.; Offner, Halina (2009): Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. In: *Immunology* 126 (3), S. 329–335. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03051.x.
196. Wang, Jun; Ioan-Facsinay, Andreea; van der Voort, Ellen I H; Huizinga, Tom W. J.; Toes, Rene E. M. (2007): Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. In: *European journal of immunology* 37 (1), S. 129–138. DOI: 10.1002/eji.200636435.
197. Wang, Wen-Juan; Hao, Cui-Fang; Yi-Lin; Yin, Guang-Jie; Bao, Shi-Hua; Qiu, Li-Hua; Lin, Qi-De (2010): Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. In: *Journal of reproductive immunology* 84 (2), S. 164–170. DOI: 10.1016/j.jri.2009.12.003.
198. Weinberg, Adriana; Enomoto, Laura; Marcus, Roland; Canniff, Jennifer (2011): Effect of menstrual cycle variation in female sex hormones on cellular immunity and regulation. In: *Journal of reproductive immunology* 89 (1), S. 70–77. DOI: 10.1016/j.jri.2010.11.009.
199. Weiner, H. L. (2001): Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. In: *Immunological reviews* 182, S. 207–214.
200. White, Christine A.; Johansson, Martina; Roberts, Claire T.; Ramsay, Alistair J.; Robertson, Sarah A. (2004): Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. In: *Biology of reproduction* 70 (1), S. 123–131. DOI: 10.1095/biolreprod.103.018754.
201. Wiczorek, Georg; Asemisen, Anne; Model, Fabian; Turbachova, Ivana; Floess, Stefan; Liebenberg, Volker et al. (2009): Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. In: *Cancer research* 69 (2), S. 599–608. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2361.
202. Wing, Kajsia; Yamaguchi, Tomoyuki; Sakaguchi, Shimon (2011): Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. In: *Trends in immunology* 32 (9), S. 428–433. DOI: 10.1016/j.it.2011.06.002.
203. Woidacki, K.; Popovic, M.; Metz, M.; Schumacher, A.; Linzke, N.; Teles, A. et al. (2013): Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency. In: *Cell death & disease* 4, e462. DOI: 10.1038/cddis.2012.214.
204. Woidacki, Katja; Meyer, Nicole; Schumacher, Anne; Goldschmidt, Alexandra; Maurer, Marcus; Zenclussen, Ana Claudia (2015): Transfer of regulatory T cells into abortion-prone mice promotes the expansion of uterine mast cells and normalizes early pregnancy angiogenesis. In: *Scientific reports* 5, S. 13938. DOI: 10.1038/srep13938.
205. Xiong, Shiqiu; Sharkey, Andrew M.; Kennedy, Philippa R.; Gardner, Lucy; Farrell, Lydia E.; Chazara, Olympe et al. (2013): Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (10), S. 4264–4272. DOI: 10.1172/JCI68991.
206. Youssef, Mohamed A.; Abou-Setta, Ahmed M.; Lam, Wai Sun (2016): Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 4, CD003719. DOI: 10.1002/14651858.CD003719.pub4.
207. Zarei, Afsoon; Parsanezhad, Mohammad Ebrahim; Younesi, Masoumeh; Alborzi, Saeed; Zolghadri, Jaleh; Samsami, Alamtaj et al. (2014): Intrauterine administration of recombinant human chorionic gonadotropin before embryo transfer on outcome of in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection: A randomized clinical trial. In: *Iranian journal of reproductive medicine* 12 (1), S. 1–6.
208. Zeke, Jozsef; Kanyo, Katalin; Zeke, Helga; Cseh, Aron; Vasarhelyi, Barna; Szilagyi, Andras; Konc, Janos (2011): Pregnancy rates with recombinant versus urinary human chorionic gonadotropin in in vitro fertilization: an observational study. In: *TheScientificWorldJournal* 11, S. 1781–1787. DOI: 10.1100/2011/409140.

209. Zenclussen, Ana C.; Gerlof, Katrin; Zenclussen, Maria L.; Ritschel, Stefanie; Zambon Bertoja, Annarosa; Fest, Stefan et al. (2006): Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. In: *European journal of immunology* 36 (1), S. 82–94. DOI: 10.1002/eji.200535428.
210. Zenclussen, Ana Claudia; Gerlof, Katrin; Zenclussen, Maria Laura; Sollwedel, Andre; Bertoja, Annarosa Zambon; Ritter, Thomas et al. (2005): Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. In: *The American journal of pathology* 166 (3), S. 811–822. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62302-4.
211. Zenclussen, Maria L.; Jensen, Federico; Rebelo, Sofia; El-Mousleh, Tarek; Casalis, Pablo A.; Zenclussen, Ana C. (2012): Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 67 (5), S. 376–382. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01096.x.
212. Zenclussen, Maria Laura; Casalis, Pablo Ariel; El-Mousleh, Tarek; Rebelo, Sofia; Langwisch, Stefanie; Linzke, Nadja et al. (2011): Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. In: *The Journal of pathology* 225 (2), S. 293–304. DOI: 10.1002/path.2946.
213. Zenclussen, Maria Laura; Thuere, Catharina; Ahmad, Nadja; Wafula, Paul O.; Fest, Stefan; Teles, Ana et al. (2010): The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 63 (3), S. 200–208. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2009.00793.x.
214. Zhang, Yong-Hong; Tian, Mei; Tang, Mao-Xing; Liu, Zhao-Zhao; Liao, Ai-Hua (2015): Recent Insight into the Role of the PD-1/PD-L1 Pathway in Feto-Maternal Tolerance and Pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 74 (3), S. 201–208. DOI: 10.1111/aji.12365.
215. Zygmunt, Marek; Herr, Friederike; Keller-Schoenwetter, Stefanie; Kunzi-Rapp, Karin; Munstedt, Karsten; Rao, C. V. et al. (2002): Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87 (11), S. 5290–5296. DOI: 10.1210/jc.2002-020642.

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst rechtherzlich bei meiner Doktormutter Prof. Ana Zenclussen bedanken, die mich während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation wissenschaftlich unterstützt hat und ausnahmslos immer ein offenes Ohr für mich hatte. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Anne Schumacher, die mir stets methodisch und inhaltlich zur Seite stand und in ihrer lebenswerten Art Ordnung in mein Chaos brachte. Für ihre anhaltende Hilfestellung und motivierenden Gespräche kann ich gar nicht genug danken.

Außerdem danke ich dem gesamten Team der Experimentellen Gynäkologie für die vielen technischen Ratschläge, sowie allen Klinikern, insbesondere Prof. Costa, für die Bereitstellung der Proben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner wundervollen Familie bedanken, die mir solange ich denken kann immer zur Seite stand und mir ermöglicht hat, meine Träume zu verwirklichen.

Und dann danke ich noch meinem lieben Freund Gregor Kleemann, der immer für mich da ist, unendlich rücksichtsvoll und geduldig ist und aufpasst, dass ich beim Träumen nicht von einem Auto überfahren werde.

Ehrenerklärung

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

Humanes Choriongonadotropin induziert Regulatorische T-Zellen und erhöht die T-Zellsuppressivität

in der Abteilung für Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Ana Zenclussen und Dr. Anne Leber

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 22.03.2017

Unterschrift

