

Aus der Universitätskinderklinik
Arbeitsbereich Neonatologie
der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Der Einfluss des MHC-Mismatch auf die Fertilität und die Immunreaktion
zwischen Eltern und ihren Nachkommen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

Vorgelegt von.....	ChristinaWeber
aus	Zwickau
Magdeburg	2014

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Der Einfluss des MHC-Mismatch auf die Fertilität und die Immunreaktion zwischen Eltern und ihren Nachkommen 2014.

55 Blatt, 19 Abb., Tab. 3, 177 Lit., 11 Anl.

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Dissertation

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob das Human Leukocyte Antigen einen Einfluss auf die Reproduktivität und die immunologische Reaktion zwischen Eltern und Kindern hat. Um dies realisieren zu können, wurde ein outbred- Maus- Modell etabliert. Mit diesem bestand die Möglichkeit vor einem gemischten genetischen Hintergrund definierte MHC- Kombinationen gegeneinander zu testen. Es wurden jeweils zwei Inzuchtmausstämme miteinander verpaart, von denen jeweils einer als Th₁, der andere als Th₂ gewichtet gilt. Es hing immer von der Immunantwort der mütterlichen Tiere ab, wie viele Nachkommen zur Welt kamen. Dieser Effekt war nach der Parental-Generation nicht mehr nachweisbar und ist nicht abhängig vom MHC der Tiere. In einem zweiten Teil wurde der Einfluss des MHC auf das Vorkommen und die Verteilung von T_{reg}- Lymphozyten während der Schwangerschaft untersucht. Es zeigte sich, dass die Anzahl der T_{reg} ebenso unabhängig vom MHC der verpaarten Tiere ist. In einem dritten Teil wurden Mixed Lymphocyte Reactions (MLRs) zwischen erwachsenen Tieren und ihren Eltern-Tieren angesetzt. Durch die Verwendung von MHC-Antikörpern und FACS-Messungen bestand die Möglichkeit auch gleichgeschlechtliche Kombinationen (z.B. Vater versus Sohn) zu untersuchen. Dies war bislang mit der FiSH-Methode nicht möglich. Nach 144 h zeigte sich eine signifikante Mehrproliferation maternaler CD8⁺-Lymphozyten gegenüber den Nachkommen. Väterliche Lymphozyten waren nach Co-Kultur mit weiblichen, allerdings nicht mit männlichen Nachkommen, erhöht. Retrospektiv fand sich eine kleine Anzahl von Familienuntersuchungen mit Paaren HLA-DR-identischer Geschwister als Nachkommen, bei denen eine MLC-Kinetik durchgeführt wurde. Auch

hier gab es einen Unterschied der paternalen Alloreaktivität gegenüber Töchtern bzw. Söhnen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es eine spezifische Immunreaktion zwischen Vätern und ihren Söhnen gibt, die vererbt wird, aber nicht mit gängigen Immunmodellen zu erklären ist.

Schlüsselwörter:

CD8⁺, fetal, maternal, GvH, HLA, HvG, mixed lymphocyte reaction (MLR), paternal, Schwangerschaft, T-cells, Transplantationsimmunologie

Inhaltsverzeichnis

Grundlagen	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.2. Die Struktur des MHC/HLA-Systems	1
1.3. Mausstämme und ihre Immunantwort	3
1.4. Arten der Transplantation	4
1.5. Transplantation und Abstoßungsreaktion	4
1.5.1. Stammzell- / Knochenmarktransplantation	4
1.6. Das Paradoxon: Ein immunologischer Fremdkörper wird nicht abgestoßen	5
1.7. Schwangerschaft und das Immunsystem	8
1.8. Die immunologische Situation bei Transplantationen im Vergleich zur Schwangerschaft	9
1.8.1. Immuntoleranz	9
1.9. Zusammenfassung und Fragestellung:	10
2. Patienten, Versuchstiere, Material und Methoden	12
2.1. Etablieren eines Outbred-Mausmodells mit 4 bekannten MHC- Haplotypen	12
2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien für die weiteren Versuche	13
2.3. Bestimmung des MHC in den Mäusen	15
2.4. Wurfgrößen	16
2.5. Bestimmung der CD4 ⁺ /CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen während der Schwangerschaft	17
2.6. Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der P-Generation	17
2.6.1. Bestimmung der Zellzahl	18
2.6.2. Unspezifisch stimulierte und unstimulierte Lymphozytenkulturen	19

2.6.3.	48 h-Messung	20
2.6.4.	144 h-Messung	20
2.7.	Analytische Methode Durchflusszytometrie	21
2.8.	Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der F2-Generation	22
2.8.1.	Kontrollen.....	23
2.9.	Unidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction in menschlichen Probanden	23
2.10.	Statistik	24
3.	Ergebnisse.....	25
3.1.	Wurfgrößen und Lebendgeburten.....	25
3.2.	Nachkommenzahl in Anhängigkeit vom MHC	26
3.3.	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen während der Schwangerschaft	27
3.4.	Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der P-Generation.....	29
3.5.	Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction zwischen Eltern-Tieren und ihren Nachkommen	32
3.5.1.	Kontrollen.....	33
3.6.	Unidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der menschlichen Probanden	34
3.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse	35
4.	Diskussion.....	36
4.1.	Wurfgrößen und Lebendgeburten der verwendeten Mausstämme.....	36
4.1.1.	Th ₁ /Th ₂ Paradigma	36
4.2.	Anzahl der Nachkommen in Abhängigkeit des MHC.....	38
4.2.1.	Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Übereinstimmung von MHC-/HLA-Antigenen und Fertilität?.....	38
4.3.	Einfluss des MHC der Eltern auf die Produktion von CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T _{reg} während der Schwangerschaft.....	40

4.4.	Auszucht-Maus-Modell und MLR	44
4.4.1.	Maus-Modell	44
4.4.2.	MLR der P- und F2-Generation	44
4.4.3.	Bidirektionale MLR zwischen Eltern-Tieren und ihren Nachkommen ...	45
4.4.4.	Gibt es zwischen Eltern und ihren Nachkommen eine MHC- vermittelte Immunität?.....	46
4.5.	Menschliche Probanden.....	48
4.6.	Experimentelle Fehlerquellen.....	50
4.7.	Klinische Aspekte.....	51
4.7.1.	Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft	51
4.7.2.	Graft versus Host Disease (GvHD).....	52
4.7.3.	Organ- und Stammzelltransplantation.....	52
5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturliste	V
7.	Eidstattliche Versicherung.....	XVIII
	Darstellung des Bildungsweges	XIX
	Danksagung	V
8.	Anlagen	VI

Abbildungsverzeichnis

Abb 1 Aufbau von MHC I- und MHC II-Molekülen.....	2
Abb 2 Aufbau des MHC beim Menschen	3
Abb 3 Schematischer Aufbau der murinen feto-plazentalen Einheit.....	7
Abb 4 Outbred-Mausmodell mit 4 bekannten MHC-Haplotypen.....	12
Abb 5 FACS-Messung der MHC-Bestimmung	16
Abb 6 Zelltypen FACS	22
Abb 7 Anzahl der Lebendgeburten Balb/c und CBA/J.....	25
Abb 8 Lebendgeburten C57BL/6 und DBA/1	26
Abb 9 MHC-unabhängige Nachkommenzahl.....	27
Abb 10 Anteil $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen an $CD4^+CD8^+$ -Zellen in Prozent.....	28
Abb 11 Anzahl regulatorischer T-Zellen im Vergleich	29
Abb 12 MLR zwischen P-Generation C57BL/6 (bb) und DBA1 (qq)	30
Abb 13 MLR zwischen P-Generation Balb/c (dd) und CBA/J (kk)	30
Abb 14 MLR zwischen F2-Generation H2Kq und H2Kb	31
Abb 15 MLR zwischen F2-Generation H2Kd und H2Kk	31
Abb 16 Verum Gruppe.....	32
Abb 17 Kontroll-Gruppe.....	33
Abb 18 MLRs menschlicher Probanden am 8. Tag.....	34
Abb 19 Modell für Expansion, Proliferation und Mobilisation der T_{reg}	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 spektrale Eigenschaften FACS.....	21
Tabelle 2 Notwendige Ansätze für ein Experiment.....	22
Tabelle 3 Verteilung der T-Zell-Suptypen.....	44

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen presenting cells
AS	Aminosäure
DC	dendritic cell
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FiSH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Foxp3	forkhead box P3
GvHD	Graft versus Host Disease
HCG	human chorionic Gonadotropin
HLA	Human Leucocyte Antigens
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon γ
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVF	In-vitro-Fertilisation
LGL	large granular lymphocytic cells
MHC	Major Histocompatibility (Molecules)
Min	Minute
MLC	mixed lymphocyte culture
MLR	mixed lymphocyte reaction
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Rpm	rounds per minute
TNF	tumor necrosis factor
T _{regs}	regulatorische T-Zellen

Grundlagen

1.1. Das Immunsystem

Ein zentrales Thema der Immunologie ist die immunologische Toleranz. Fehlregulationen der Selbsttoleranz eines Individuums führen zur Autoimmunität, während eine Erkennung von Fremdoberflächen in der artifiziellen Situation der Transplantation zur Abstoßung von nicht pathogenem Gewebe führt.

In diesem Zusammenhang ist eine erfolgreiche Schwangerschaft ein Phänomen, da es für den mütterlichen Organismus ein semi-allogenes Implantat darstellt. Dies ist Gegenstand intensiver Forschung. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass es lokale und systemische Veränderungen im mütterlichen Organismus für den Erhalt und den Erfolg einer Schwangerschaft gibt. Ein feto-maternaler Zelltransfer und damit ein direkter Kontakt der fremden Antigene konnte bewiesen werden. Dennoch ist bislang unklar, warum Eltern gegenüber ihren Kindern und umgekehrt, eine Art Toleranz entwickeln, wie diese entsteht und welchen Einfluss die Erkennung der Fremdoberflächen auf die Fertilität hat.

1.2. Die Struktur des MHC/HLA-Systems

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility complex; MHC) ist ein großer Genkomplex, der beim Menschen auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 17 liegt. Bei der Maus umfasst er etwa 2000 kb mit mehr als 120 Genen ⁽¹⁾. Der MHC wurde aufgrund seiner Fähigkeit entdeckt, in Inzuchtmäusen die Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen zu vermitteln ⁽²⁾. Die Gene des MHC werden in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Während MHC Klasse I und Klasse II Gene für die typischen Gewebeverträglichkeitsproteine, auch MHC-Moleküle genannt, kodieren, liegen im MHC Klasse III-Lokus andere, meist immunrelevante Gene wie z.B. Gene für die Komplementfaktoren C4 und C2, NOTCH4, RAGE und TNF α und β . Die MHC Klasse I Region kodiert für die α -Ketten klassischer und nicht

klassischer MHC Klasse I-Moleküle (MHC I). Klassische MHC-Moleküle präsentieren die Peptide für $\alpha\beta$ -T-Zellen und sind hochpolymorph.

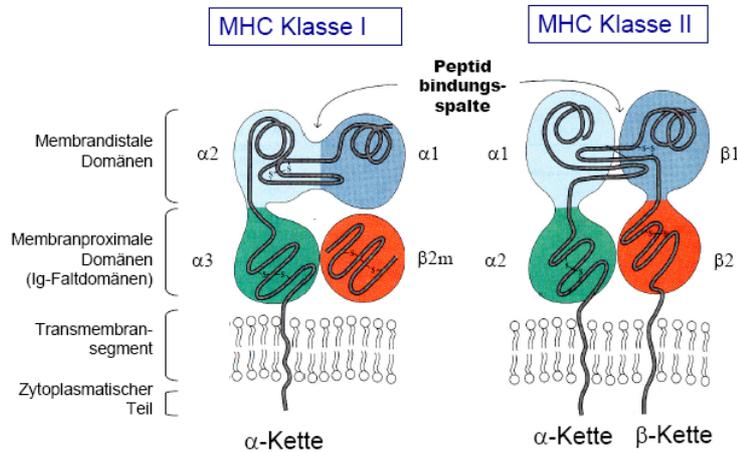


Abb 1 Aufbau von MHC I- und MHC II-Molekülen

Beim Menschen gibt es drei klassische MHC I: HLA-A, -B und -C (Humane Leukozyten Antigene). Die klassischen MHC I-Moleküle der Maus werden H-2K, H-2D und H-2L genannt. Für Maus-MHCs wurden die verschiedenen Allele nach dem Haplotyp der ersten Inzuchtlinien benannt, mit denen diese Allele serologisch definiert wurden. Da die Haplotypen mit H-2a, H-2b usw. benannt wurden, heißen die verschiedenen Allele eines MHC I-Moleküls H-2Kb, H-2Dk etc. oder abgekürzt nur Kb oder Dk. MHC I wird ubiquitär auf fast allen Zellen exprimiert.

MHC Klasse II-Moleküle sind Heterodimere aus polymorphen α - und β -Ketten, die beide im MHC II kodiert sind. Beim Menschen gibt es drei Loci für klassische MHC Klasse II-Moleküle, HLA-DR, -DP, -DQ und bei der Maus zwei: I-A und I-E.

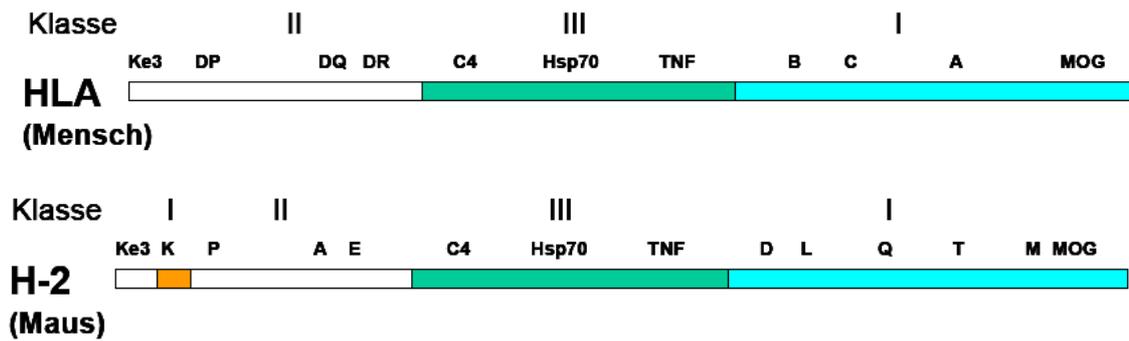


Abb 2 Aufbau des MHC beim Menschen (HLA auf Chromosom 6) und der Maus (H2 auf Chromosom 17). Graphik adaptiert nach Günther (Günther 1996, Günther und Walter 2001)

MHC I-Moleküle binden präferentiell kurze Peptide von 8-10 AS. Diese stammen vor allem aus intrazellulär synthetisierten, zytosolischen Proteinen. Die MHC I-Peptid-Komplexe werden auf der Zelloberfläche CD8-positiven T-Zellen präsentiert.

MHC II wird im Gegensatz zu MHC I nur von antigenpräsentierenden Zellen (APCs; B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen) und einigen wenigen spezialisierten Zelltypen, wie z.B. Thymusepithel, sowie im Menschen auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Zudem kann es auf vielen Zelltypen während einer Entzündung durch die Wirkung von IFN- γ induziert werden⁽³⁾. Die Peptide, die an MHC II binden, stammen größtenteils von exogenen extrazellulären, sezernierten oder membranständigen Proteinen. Die mit Peptid beladenen MHC II-Moleküle gelangen auf die Zelloberfläche und präsentieren das gebundene Peptid CD4-positiven T-Zellen.

1.3. Mausstämme und ihre Immunantwort

Die Mausstämme, die üblicherweise für Tierversuche eingesetzt werden, reagieren zum Teil sehr unterschiedlich auf verschiedenste Manipulationen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme C57BL/6 und Balb/c sind differierende Immunantworten beschrieben⁽⁴⁾. C57BL/6-Mäuse reagieren nach Antigenkontakt typischerweise mit einer Th₁-Antwort. Es werden große Mengen IFN- γ und andere proinflammatorische Zytokine (IL-2; TNF- α) produziert⁽⁵⁾; ⁽⁶⁾. Durch weitere Zytokinausschüttung von

antigenpräsentierenden Zellen (insbesondere Makrophagen) schaukelt sich die Immunantwort hoch, die Antigenpräsentation nimmt zu und auch zytotoxische T-Zellen sowie opsonisierende Antikörper aus B-Zellen sind am Entzündungsgeschehen beteiligt. Balb/c-Mäuse hingegen reagieren auf Stimulation des Immunsystems mit einer Th₂-Antwort ⁽⁴⁾. Hierbei interagieren CD4-T-Zellen mit B-Zellen, die zur Antikörperproduktion und Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (insbesondere IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10) stimuliert werden ⁽⁷⁾.

1.4. Arten der Transplantation

Bei einer Transplantation werden gezielt körperfremde Strukturen in einen Empfängerorganismus gebracht. Je nach Übereinstimmung der Gewebemerkmale von Spender und Empfänger werden unterschiedliche Transplantationstypen unterschieden ⁽⁸⁾. Bei der autologen Transplantation sind Spender und Empfänger identisch, das heißt dem Patienten werden vor Therapiebeginn oder während der Remission Stammzellen entnommen und nach Konditionierungstherapie (Chemotherapie und/oder Bestrahlung) wieder appliziert. Bei der syngen Form handelt es sich um die Transplantation zwischen genetisch identischen Individuen (eineiige Zwillinge bzw. zwei Individuen eines Inzuchtstammes im Tierversuch). Während bei einem allogenen Transplantat Spender und Empfänger der gleichen Spezies zuzuordnen sind, gehören bei einer xenogenen Transplantation Spender und Empfänger nicht der gleichen Art an. Die alloplastische Transplantation definiert die Implantation eines künstlichen Materials in einen Empfänger.

1.5. Transplantation und Abstoßungsreaktion

1.5.1. Stammzell- / Knochenmarktransplantation

Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantationen sind bei vielen hämatologischen Erkrankungen, insbesondere der Leukämie, ein effektives Therapieverfahren ⁽⁹⁾. Im Jahr

2012 wurden in Deutschland 3147 allogene Stammzelltransplantationen durchgeführt⁽¹⁰⁾. Trotz der Zunahme an eingetragenen Knochenmarkspendern in verschiedenen Registern, existiert nicht für jede notwendige Transplantation ein passender Spender. Bei den häufig stattfindenden allogenen Transplantationen kommen viele Komplikationen vor. Neben Infektionen^{(11); (12)} und dem Wiederkehren der Grunderkrankung^{(13); (14)} bzw. dem Auftreten von Sekundärtumoren⁽¹⁵⁾ ist die Graft versus Host Disease (GvHD), also die Immunreaktion des Spenders gegen den Empfänger, eine gefürchtete Komplikation⁽¹⁶⁾. Die Schwere der GvHD hängt im Mausmodell auch wesentlich von der Art der Transplantation ab. Bei syngener Transplantation im Mausmodell verhindert man praktisch eine GvHD durch Cotransplantation von Milzzellen. Viele Gruppen arbeiten mit einem „parent into F1 Modell“. Dabei handelt es sich um ein semiallogenes oder haploidentenes System, d.h. als Spender dient ein Elternteil des Empfängers^{(17); (18); (19)}. Bei allogener Transplantation sind schwere Verläufe von GvHD zu beobachten, die nicht selten mit dem Versterben der Tiere einhergehen^{(20); (21); (22)}.

Bei der Abstoßungsreaktion werden die in den Empfängerorganismus transplantierten Zellen des Spenderorgans vom Immunsystem des Empfängers als körperfremd erkannt und vernichtet. Abstoßungsreaktionen werden in hyperakute, akute (12 Tage bis 4 Monate nach Transplantation) und chronische (nach Monaten bis 1 Jahr) Transplantatabstoßung eingeteilt⁽²³⁾. Die Abstoßung beinhaltet T-Zell-vermittelte⁽²⁴⁾ und Antikörper-vermittelte⁽²⁵⁾ Reaktionen. Sind präexistente Antikörper gegen das Transplantat im Empfänger vorhanden (z.B. bei Empfängern von Spenderblut oder Zweittransplantationen, sowie nach Schwangerschaft), kommt es innerhalb von Minuten bis Stunden zur hyperakuten Abstoßung.

1.6. Das Paradoxon: Ein immunologischer Fremdkörper wird nicht abgestoßen

In einer normalen Auszuchtpopulation erbt der Fötus unterschiedliche Antigene von Mutter und Vater. Er ist bezüglich zur Mutter semiallogen. Vom immunologischen Standpunkt aus ist der Fötus daher für die Mutter ein Fremdkörper. Da semiallogene Transplantate, z.B. solche von den eigenen Kindern, abgestoßen werden, ist die

Erhaltung der Schwangerschaft in der immunkompetenten Mutter ein Paradoxon. Um dieses Paradoxon zu lösen, müssen sich, während der Entwicklung der Viviparie, ganz spezifische Mechanismen zum Überleben des Fötus, in Gegenwart des mütterlichen Immunsystems, entwickelt haben. Medawar und Billingham ⁽²⁶⁾, motiviert durch die Erfahrungen mit Transplantationsexperimenten, formulierten als erste die These des immunologischen Paradoxons der Schwangerschaft. Sie stellten vier unterschiedliche, sich gegeneinander nicht ausschließende Hypothesen auf, die dieses Paradoxon erklären sollten:

1. Der Uterus ist ein immunprivilegiertes Organ.

Diese Hypothese wurde widerlegt. Allogene Transplantate in den schwangeren Uterus wurden jedoch mit einer leichten Verzögerung von einigen Tagen abgestoßen. Eine vorherige Immunisierung der Tiere konnte die Abstoßung drastisch beschleunigen. Außerdem führte die intrauterine Immunisierung mit allogenen Zellen zu einer schnelleren Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten ⁽²⁷⁾. Zudem gibt es beim Menschen erfolgreiche extrauterine Schwangerschaften, was verdeutlicht, dass der Uterus als Organ verzichtbar für die Schwangerschaft ist.

2. Das fötale Gewebe ist nicht immunogen.

Diese Hypothese stimmt nur teilweise. In der Maus-Plazenta, die die Grenzfläche zwischen Fötus und Mutter bildet, exprimieren Trophoblastenzellen ab Tag 9 der Embryonalentwicklung, in direktem Kontakt zur Mutter, paternale MHC I Moleküle ⁽²⁸⁾; ⁽²⁹⁾. Beim Menschen werden in der Plazenta, im Kontakt zum mütterlichen Gewebe, nur die nichtklassischen MHC I-Moleküle HLA-G und -E und eventuell das klassische MHC I-Molekül HLA-C exprimiert ⁽³⁰⁾; ⁽³¹⁾. Die nicht klassischen MHC Ib-Moleküle HLA-E (Qa-1 in der Maus) und HLA-G sind nicht polymorph, binden $\beta 2m$ und werden im MHC kodiert. MHC Klasse II wird weder beim Mensch noch bei der Maus in der Plazenta von Trophoblasten exprimiert ⁽³²⁾. MHC II wird nur von Makrophagen der Plazenta und Endothelzellen der Chorion-Villi exprimiert ⁽³³⁾; ⁽³⁴⁾. Die Plazenta ist demnach nur in frühen Stadien nicht immunogen. Die fehlende MHC II Expression auf Trophoblasten könnte in der Maus einen wichtigen Schutzmechanismus darstellen, da die experimentelle Induktion von MHC II auf Spongiotrophoblasten und Labyrinth-Trophoblasten zum Abort führt, der durch Antikörper gegen MHC II verhindert werden kann ⁽³⁵⁾.

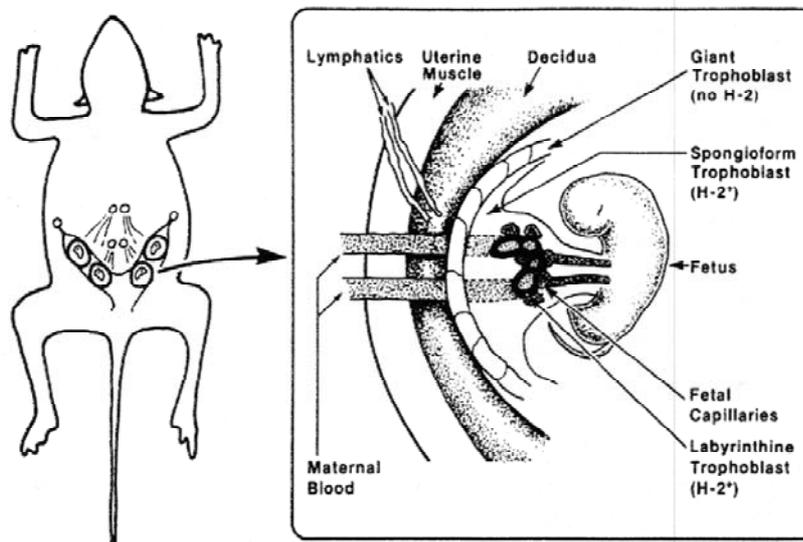


Abb 3 Schematischer Aufbau der murinen fetoplazentalen Einheit. Nach Clark et al., 1984 ⁽³⁶⁾. Die Decidua bildet den maternalen Teil der Plazenta, die in direktem Kontakt zum Giganten-Trophoblasten des Fötus steht. Der Giganten-Trophoblast degeneriert im Laufe der Schwangerschaft, so daß maternales Gewebe und Blut in direktem Kontakt zum Spongiotrophoblasten kommt.

Diese abgeschwächte Antigenität ist jedoch nicht hauptsächlich für das Überleben des Fötus verantwortlich. Deutlich wird das in Experimenten, in denen spezifische Toleranzmechanismen der Plazenta gebrochen wurden und dies zu einer starken Antigen- und T-Zell-spezifischen Immunantwort gegen das fötale Gewebe und damit zum Abort führte ⁽³⁷⁾. Auch in der normalen Schwangerschaft wird die Immunogenität des Fötus deutlich in Form von anti-paternalen Antikörpern oder der Hypertrophie der Uterusdrainierenden para-aortalen Lymphknoten, speziell in Schwangerschaften mit allogenen Föten ⁽²⁷⁾. Die Antigene des Fötus sind weder anatomisch getrennt von der Mutter, noch sind sie zu wenig immunogen. Dies wird deutlich in Experimenten mit TCR-transgenen Mäusen, die eine Toleranzinduktion in der Schwangerschaft spezifisch gegen paternale Antigene zeigten ⁽³⁸⁾. Die Frage, ob der MHC einen Einfluss auf die Immunogenität des Fötus hat, ist Gegenstand dieser Arbeit.

3. Der Fötus ist anatomisch von der Mutter getrennt.

Die These, die Plazenta könnte eine Art physikalische Barriere für das Immunsystem darstellen, wurde verworfen. Nagetiere und Primaten haben eine hemichoriale Plazenta, in denen die maternalen und fötalen Gewebe nicht durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind. Die invasiven Trophoblasten bewirken sogar den Bruch von

Uterus-Gefäßen, was zum direkten Kontakt zwischen mütterlichem Blut und fötalen Trophoblasten führt⁽³⁹⁾. In der Schwangerschaft werden fötale Zellen in der Zirkulation gefunden^{(40); (41)}. Auch noch Jahre nach einer Schwangerschaft konnten männliche Zellen im mütterlichen Blut nachgewiesen werden^{(42); (43)}. Maternale Zellen migrieren in den Fötus und können dort unter Umständen sogar zu postnatalen Graft-versus-Host-Reaktionen führen^{(44); (45)}. Trotzdem ist die Sicht der Plazenta als eine immunologische Barriere nicht falsch. Die aktive Abwehr von Fötus-reaktiven T-Zellen durch die Plazenta stellt eventuell den wichtigsten immunologischen Mechanismus zum Überleben des Fötus dar.

4. Die Schwangerschaft verändert die Immunantwort der Mutter.

Diese Hypothese ist auch nur teilweise richtig. Eine systemische Antigen-unspezifische Immunsuppression findet kaum statt. Die schwangere Mutter zeigt eine normale Immunantwort gegen die meisten Pathogene und allenfalls eine leicht verzögerte Transplantatabstoßung. Dass das maternale Immunsystem jedoch antigenspezifisch durch den Fötus supprimiert werden kann, ist sowohl für B-, als auch für T-Zellen demonstriert worden⁽⁴⁶⁾. Die Schwangerschaft wird oft in Verbindung mit einer dominanten Th₂-Immunantwort gebracht. So sind zum Beispiel die anti-paternalen Alloantikörper in der Schwangerschaft nicht-Komplement-fixierende IgG1-Antikörper, welche in Th₂-Immunantworten gebildet werden⁽⁴⁷⁾. In der Tat kann die Injektion oder die experimentelle Induktion der Th₁-Zytokine IFN- γ und IL2 zum Abort führen^{(48); (49)}. Aber auch Autoimmunerkrankungen können je nach Genese während der Schwangerschaft abgeschwächt oder verstärkt werden. In Mäusen schwächt die Deviation zur Th₂-Antwort während der Schwangerschaft die Resistenz von C57BL/6-Mäusen gegen *Leishmania major*⁽⁵⁰⁾.

1.7. Schwangerschaft und das Immunsystem

Die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), werden über die Expression den Transkriptionsfaktors Foxp3 definiert⁽⁵¹⁾. T_{regs} sind ein Teil der peripheren Toleranzmechanismen und verhindern eine überschießende Immunantwort. Sie können

allerdings auch autoimmune T-Zellen, welche der negativen Selektion im Thymus entkommen sind, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems in ihrer Aktivität unterdrücken⁽⁵²⁾. Jedoch können T_{regs} auch erwünschte Immunantworten wie z.B. gegen Tumore oder Pathogene unterdrücken⁽⁵³⁾. Insbesondere in der Transplantationsmedizin^{(54); (55); (56)}, aber auch bei Autoimmunität⁽⁵⁷⁾ und Allergien⁽⁵⁸⁾ haben T_{regs} große Bedeutung erlangt. Sowohl bei soliden Organtransplantationen als auch bei Stammzelltransplantationen gibt es vielversprechende Ansätze, die regulatorischen Eigenschaften dieser Zellen auszunutzen und therapeutisch anzuwenden.

Auch bei der Pathogenese spontaner Aborte scheint eine inadäquate Funktion von T_{regs} von Bedeutung zu sein. Diese werden durch Schwangerschaft induziert und spielen eine entscheidende Rolle bei der mütterlichen Toleranz des allogenen Fötus^{(59); (60)}. Bei Mäusen konnte eine Vermehrung der T_{regs} in para-aortalen Lymphknoten schwangerer Mäuse nachgewiesen werden. Nach Gabe von anti-CD25-Antikörpern kam es zum Rückgang der T_{regs}, einem Anstieg von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺-Lymphozyten und damit zum Abort. Interessanterweise kam es bei syngeneten Verpaarungen nicht zur Abstoßung der Frucht⁽⁶¹⁾. Ob der MHC der Elterntiere einen Einfluss auf die Zahl und Lokalisation von T_{regs} in schwangeren Tieren nimmt, soll hier untersucht werden.

1.8. Die immunologische Situation bei Transplantationen im Vergleich zur Schwangerschaft

1.8.1. Immuntoleranz

Verschiedene Organe werden als immunprivilegiert bezeichnet. Dies sind Organe, die nach Transplantation in histoinkompatible Empfänger verzögert abgestoßen bzw. in denen andere immunogene Allotransplantate nicht oder nur verzögert abgestoßen werden. Dies sind v.a. das Gehirn, die Augenlinse und Kornea, die Testes und Ovarien, sowie die Leber. Die Plazenta und der Fötus gelten ebenfalls als immunprivilegiert, da sie Alloantigene tragen und nicht abgestoßen werden. Die bisher bekannten Mechanismen der verzögerten Abstoßung sind:

1. physikalische Barriere zu dem Organ (z.B. die Blut-Hirn-Schranke im Gehirn oder die Sertoli-Zellen für Testes).
2. defiziente oder andersartige lymphatische Drainage (vordere Augenkammer, Gehirn).
3. reduzierte Immunogenität durch veränderte MHC I und/oder MHC II Expression (Gehirn, Plazenta und Fötus).
4. Expression von FasL (Testes, Plazenta, Kornea und Leber).
5. immunsuppressives Mikromilieu (v.a. TGF- β : vordere Augenkammer, Testes, Plazenta, Leber).

In einigen Experimenten zeigten sich systemische, aktive Immundeformationen, wenn allogene Transplantate in immunprivilegierte Organe verbracht wurden ^{(62); (63)}. Naive T-Zellen werden spezifisch in den Geweben, die Autoantigene exprimieren, toleriert ^{(64); (65)}. Dies stellt ein konzeptionell wichtiges Modell dar, da es erklärt, wieso naive T-Zellen periphere Antigene nicht ignorieren, sondern eine spezifische Toleranz entwickeln.

1.9. Zusammenfassung und Fragestellung:

Während der Schwangerschaft entwickelt sich eine Reihe von Toleranzmechanismen im mütterlichen Organismus. Diese und ihr Zusammenspiel sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein Teil dieser Immuntoleranz ist auf die Zeit der Schwangerschaft begrenzt. Es ist aber bekannt, dass zwischen Müttern und ihren Kindern eine spezifische Immuntoleranz auch über die Schwangerschaft hinaus besteht. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass post partum mütterliche Lymphozyten abgeschwächt gegen die ihrer männlichen Neugeborenen und väterliche gegen Lymphozyten ihrer Töchter reagieren. Auch zwischen erwachsenen Kindern und ihren Eltern besteht diese Imbalance fort und unterscheidet sich signifikant von der Reaktion zwischen Unverwandten ^{(66); (67)}. Eine Art „Impfreaktion“ während des engen Kontakts der Mutter durch die Schwangerschaft erklärt die Toleranzreaktion der Väter nicht. In zurückliegenden Untersuchungen bestand die Einschränkung durch x- und y- Marker mittels FiSH-Reaktion, nur getrenntgeschlechtliche Reaktionspartner gegeneinander

testen zu können⁽⁶⁸⁾. Unklar bleibt bislang, wie eine derartige Toleranz zustande kommt und welche immunologischen Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Daher sollte der Einfluss des MHC der Eltern, beziehungsweise deren Mismatch, auf die Fertilität und Nachkommenszahlen hier untersucht werden. Desweiteren sollte die Frage beantwortet werden, ob der MHC bzw. der MHC-Mismatch zwischen Vater und Mutter die Bildung von CD4⁺/CD25⁺-regulatorischen T-Zellen in Lymphknoten, Thymus und Plazenta während der Schwangerschaft beeinflusst. Dafür wurde die Reaktion der elterlichen und kindlichen Lymphozyten gegeneinander in Bezug auf den Einfluss des Geschlechts und der Ausbildung einer MHC-abhängigen Immunität untersucht.

2. Patienten, Versuchstiere, Material und Methoden

2.1. Etablieren eines Outbred-Mausmodells mit 4 bekannten MHC-Haplotypen

Für die Beantwortung der Fragestellung war es notwendig, bei gemischtem genetischem Hintergrund mit definiertem MHC-Match bzw. -Mismatch zwischen Vater und Mutter arbeiten zu können. Dazu wurden vier Inzuchtmausstämme mit jeweils verschiedenen MHC-Typen eines „Outbred-Stammes“ über jeweils 3 Generationen gekreuzt. Für die weiteren Versuche war es so möglich, bei gemischtem genetischem Hintergrund definierte MHC-Typen zu verwenden. Die dafür genutzten Inzuchtstämme, die Bezugsquellen sowie der entsprechende MHC-Typ sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet:

Mausstamm	Bezugsquelle	MHC-Typ
BALB C	Jackson Laboratories/Main/USA	H2 dd
CBA/J,		H2 kk
C57BL/6	(Taconic/Dänemark)	H2 bb
DBA/1		H2 qq

Die weitere Zucht erfolgte nach folgendem Schema:

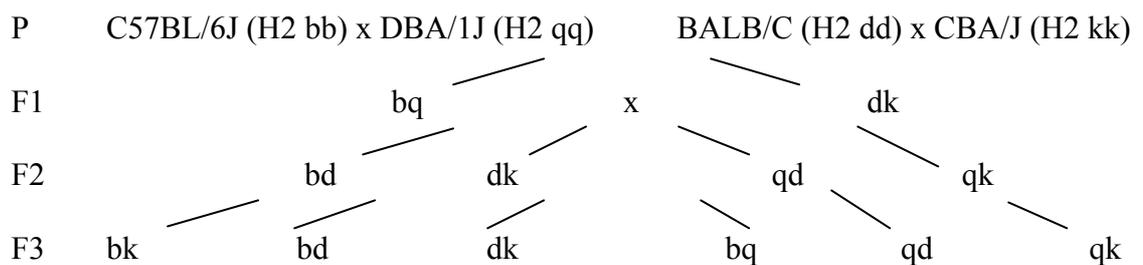


Abb 4 Outbred-Mausmodell mit 4 bekannten MHC-Haplotypen

Die Verwendung von Nachkommen für die Weiterzucht erfolgte jeweils im Alter von 12 Wochen. Die Nachkommen jeder Generation wurden gezählt, um mausstammbedingte Einflüsse auf den Verlauf der Schwangerschaft bzw. Nachkommenzahl zu erfassen.

Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des Bundeslandes Sachsen-Anhalt und entsprechend des Tierschutzgesetzes §11a(1) und der Verordnung über Aufzeichnungen über Versuchstiere und deren Kennzeichnung vom 20.05.1988, durchgeführt ^{(69); (70)}.

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien für die weiteren Versuche

Geräte:

Präparierbesteck (Schere, Pinzette) Desderman® Schülke & Mayr, (Norderstedt, BRD)

Zentrifuge: Multifuge 3 S-R Heraeus (Osterode, BRD)

Mikroskop Olympus CKX41 Olympus (Hamburg, BRD)

FACS Gerät FACS Calibur, Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg, BRD)

Software Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg, BRD)

Cell Quest Pro, FACS Array™ Software

FACSCComp Software and BD Calibrite beads

FACSDiva Software

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorfgefäße Safe-lock-tubes 1,5ml, Eppendorf AG, (Berlin, BRD)

Pipettenspitzen verschiedene Größen, Carl-Roth-GmbH (Karlsruhe, BRD)

Pasteurpipetten PE-LD, Brand GmbH & Co KG, (Wertheim, BRD)

0BPasteurpipetten Natron-Kalk-Glas, Brand GmbH & Co KG, (Wertheim, BRD)

Sterile Pipetten (10ml, 5ml), Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, BRD)

Gewebekultuplatten (96-well bzw. 24-well), Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, BRD)

PP-Test-tubes (15ml, 50ml), Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, BRD)

Cell Strainer 70µm Nylon, BD Falcon™ (Bedford, USA)

Multipipette, Eppendorf AG (Berlin, BRD)

FACS-Röhrchen, Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, BRD)

Petrischalen Ø60mm x 15mm, Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, BRD)

Sterile Spritzen 5ml, Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg, BRD)

Skalpellklingen Aesculap, B Braun AG (Melsungen, BRD)

Hämatokritkapillare 75mm Glas heparinisiert, Hirschmann AG (Heilbronn, BRD)

Puffer, Medien und Lösungen:

PBS Dulbecco (1x) w/o Ca²⁺, Mg²⁺ LE, Biochrom AG (Berlin, BRD)

FACSTM Lysing Solution 10x (1:10 verdünnt mit Aqua dest.), BD (San Jose, USA)

AIM-V® Medium Serum Free Medium 1x, +L-Glutamine, +50µg/ml Streptomycin Sulfate, +10µg/ml Gentamicin Sulfate, GIBCO12055, invitrogen™ (Karlsruhe/Heidelberg)+ 1,75µl ME

2-Mercaptoethanol (ME) >=99%, Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD)

Ionomycin 1mg/ml gelöst in DMSO, Calbiochem (La Jolla, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO) >= 99,9%, Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD)

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 10-4M, Approx 99% (TCC) (P1585), Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD)

Ethanol , ROTIPURAN®, ≥99,8 %, p.a., Ethylalkohol, Carl-Roth-GmbH (Karlsruhe, BRD)

Essigsäure 100 %, Carl-Roth-GmbH (Karlsruhe, BRD)

TrypanBlue Solution (0,4%), Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD)

PBS Dulbecco (1x) w/o Ca²⁺, Mg²⁺ LE, Biochrom AG (Berlin, BRD)

Antikörper für die Durchflusszytometrischen Bestimmungen:**MHC- Antikörper:**

PE b H2K b PE labeled anti-mouse (AF6-88.5) 0,2mg/ml, PE k PE anti-mouse H2Kk (36-7-5) 0,2mg/ml, FITC d FITC anti-mouse H-2Kd (SF1-1.1) 0,5mg, FITC q FITC anti-mouse H-2Kq (KH114) 0,5mg/ml , FITC k FITC anti-mouse H-2Kk (36-7-5) 0,5mg/ml; alle BD Pharmingen™ (San Diego, USA)

T-Zell-Antikörper:

PerCP-Cy™5.5 Rat Anti-Mouse CD8a (Ly-2) (53-6.7) 0,2mg/ml; PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD4 (CD4 antigen; L3T4) (RM4-5) 0,2mg/ml; APC Rat Anti-Mouse CD25 (Interleukin-2 receptor alpha chain) (PC61) 0,2mg/ml; Per CP 5.5 labeled anti-mouse CD69 (very early activation AG) (H1.2F3) 0,2mg/ml; alle BD Pharmingen™ (San Diego, USA)

Material für die Unidirektionalen humanen MLC:

Ficoll-Paque™, Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)

Gewebekulturplatten 96-well, Falcon®, Becton Dickinson Labware (Heidelberg, BRD)
Zellkulturmedium (RPMI 1640), plus 10% of inactivated pooled human serum, GIBCO
Life Technologies (Paisley, UK)

CiH3-thymidine (TRA.120), Amersham (Buckinghamshire, UK)

Zellernter Mach III Harvester 96, Tomtec (Hamden, USA)

Filtermatten Wallac (Turku, Finland)

Flüssigkeitsszintillationszähler 1450 Microbeta, Trilux®, Wallac

2.3. Bestimmung des MHC in den Mäusen

Durch einen kleinen Schnitt mittels Skalpellklinge wurden den Mäusen einige μl Blut aus der Schwanzvene entnommen und in einer heparinisierten Hämatokritkapillare aufgefangen. Anschließend wurde das Blut mit 5 ml PBS in ein FACS-Röhrchen gespült. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm und 4 °C.

Das nach Absaugen des Überstandes verbliebene Pellet wurde mit 50 μl des jeweils verdünnten Antikörpers resuspendiert. Dabei wurde jeweils ein PE- und ein FITC-Antikörper verwandt, um parallel beide Farben mit dem FACS-Calibur messen zu können (z.B. 50 μl H2K b PE und 50 μl FITC H-2Kq oder 50 μl H2Kk PE und 50 μl FITC H-2Kd). Jeder Ansatz wurde anschließend 20 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der Antikörper an die MHC-Moleküle zu gewährleisten.

Zu jeder Probe wurden 300 μl 1:10 verdünnte FACSTM Lysing Solution gegeben. Die Proben wurden für weitere 20 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert und während dieser Zeit einige Male geschüttelt um zusätzlich mechanischen Stress auf die Erythrozyten auszuüben. Durch Zugabe von 5 ml PBS wurde die Lysereaktion gestoppt und die Proben anschließend 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt nun fast ausschließlich Lymphozyten und wurde in 250 μl PBS aufgenommen und resuspendiert.

Je Probe wurden jeweils ein PE (Phycoerythrin) und ein FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) gegeneinander aufgetragen, um so die fehlerfreie Zuordnung auch bei der F2-Generation zu gewährleisten. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurden 10^4 Zellen jeder Probe gezählt.

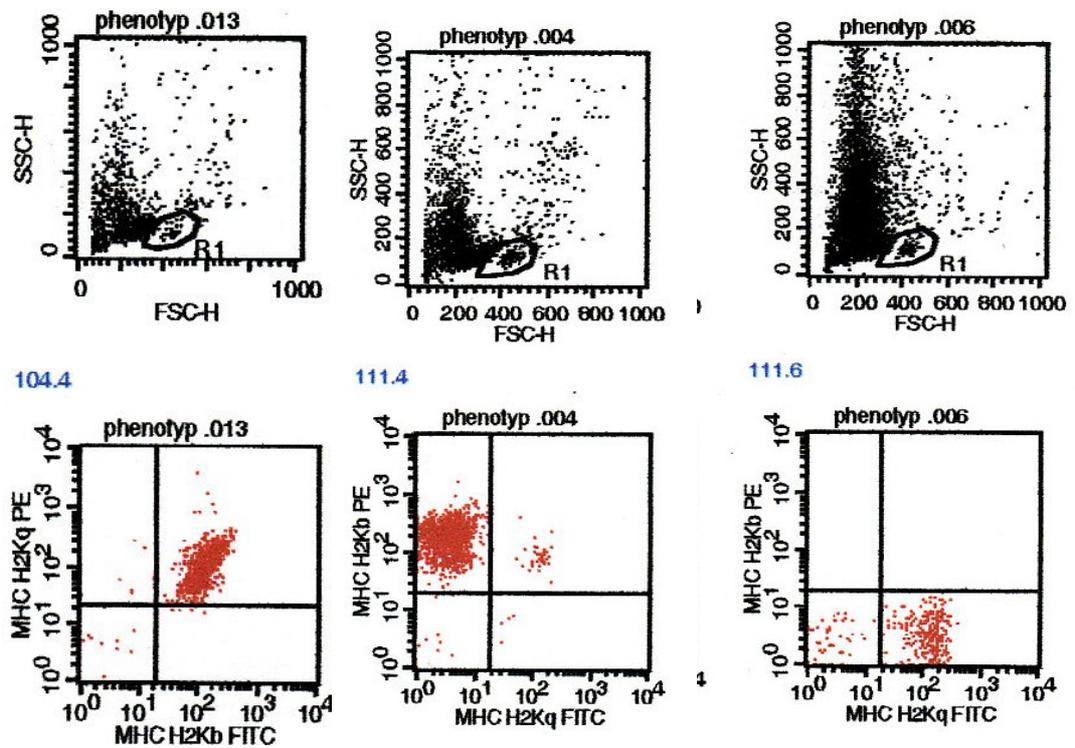


Abb 5 FACS-Messung der MHC-Bestimmung

2.4. Wurfgrößen

Die Nachkommen der jeweiligen Generationen wurden gezählt und nach ihrem H2k typisiert. Um den Einfluss des MHC auf die Wurfgrößen zu untersuchen erfolgten folgende Verpaarungen:

P- Generation:	DBA/1 (qq)	x	DBA/1 (qq)
F2- Generation:	(qq)	x	(qq)
F3- Generation:	(qq)	x	(qq)
	(qq)	x	(bb)

2.5. Bestimmung der CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen während der Schwangerschaft

Es erfolgte die Verpaarung von Männchen der F2-Generation (qq/bb) mit Weibchen der F2-Generation (qq).

non-mismatch Konstellation: ♂F2 qq x ♀F2 qq

mismatch Konstellation: ♂F2 bb x ♀F2 qq

Der Tag 0 der Schwangerschaft wurde durch Kontrolle der vaginalen Plaques festgelegt und die Verpaarungen am Tag 19 getötet. Es erfolgte die Beendigung der Trächtigkeit, die Feten bzw. Aborte wurden gezählt und die peripheren, paraaortalen Lymphknoten, Thymus und Plazenta entfernt. Als Kontrolltiere dienten ein nicht schwangeres Weibchen und ein Männchen (im MHC übereinstimmend mit dem Verum-Tier). Die Aufarbeitung der Lymphknoten, Plazenta und Thymus erfolgte durch Homogenisierung der Organe durch Cell Strainer 70 µm Nylon. Jeder Ansatz wurde in ein PP-Tube überführt und ggf. mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Bei 2000 rpm 4°C wurden die Proben für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Eine Zelldichte von 3×10^6 wurde hergestellt. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben mittels PerCP-Cy zur Markierung der CD8⁺-Zellen, PE für CD4⁺-Lymphozyten, sowie APC als Aktivierungsmarker für T_{reg}. Die Messung erfolgte via FACS.

2.6. Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der P-Generation

Die ausgewählten Inzuchtmausstämme wurden in der P-Generation auf ihre Immunantwort bezüglich der CD8⁺/CD69⁺-Lymphozyten in einer MLR getestet. Auch die F2-Generation aus diesen Kombinationen wurde durch MLR auf diese Weise untersucht. Um herauszufinden, ob der MHC der Inzuchtstämme einen Einfluss auf die Reaktion hat, wurden homozygote Kombinationen, wie die der P-Generation verwandt. Nach folgendem Kreuzungsschema wurde vorgegangen.

P-Generation:	CBA/J (kk) x BALB/C (dd) C57BL/6 (bb) x DBA/1 (qq)
F1-Generation	CBA/J/BALB/C (kd) x CBA/J/BALB/C (kd) C57BL/6/DBA/1 (bq) x C57BL/6/DBA/1 (bq)
F2-Generation	(kk), (kd), (kb), (kq), (bb), (bd), (bq), (qq), (qd), (dd)

Die Versuchstiere wurden im Alter von mindestens 12 Wochen durch Kohlenmonoxid getötet und die Milz präpariert. In PP-Tubes und 10 ml PBS aufgenommen. Auf Eis gekühlt erfolgte die Lagerung der Organe bis zur Weiterverarbeitung. Die Milzen wurden in Petrischalen durch Cell Strainer 70 µm Nylon homogenisiert, jeder Ansatz in ein PP-Tube überführt und ggf. mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Bei 2000 rpm und 4°C wurden die Proben über 5min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 10 ml PBS resuspendiert.

2.6.1. Bestimmung der Zellzahl

10 µl der homogenen Zellsuspension wurden mit 90 µl 2%iger Essigsäure in einer 96-well Platte für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend 10 µl dieser Lösung durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit 10 µl TrypanBlue Solution gut vermischt. Hierdurch nehmen tote Zellen den blauen Farbstoff auf, vitale Lymphozyten hingegen bleiben farblos. 10 µl dieser Lösung wurden in eine Neubauer Zählkammer gebracht und unter dem Mikroskop in zwei, einander nicht berührenden Großquadraten die vitalen Lymphozyten gezählt. Die Zelldichte der Ausgangslösung wurde mit folgender Formel bestimmt (nach: Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer).

$$x = N/(Q*VK)*VG/VZ$$

N = Anzahl der gezählten Zellen [Zellen]

Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate (=2)

VG = eingesetztes Gesamtvolumen (Trypanblau+Zellsuspension) (=20 μ l)

VZ = Volumen der eingesetzten Zellsuspension (=10 μ l)

VK = Kammervolumen über einem Großquadrat (=0,001 ml)

x = Zelldichte [Zellen/ml]

Für die MLR wurde eine Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml festgelegt. Die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde ein weiteres Mal 5 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend das Pellet je nach Organgröße in 10 ml ($30 \cdot 10^6$ Zellen) bzw. 20 ml ($60 \cdot 10^6$ Zellen) resuspendiert. Von jeweils zwei Tieren wurde je 1 ml in eine 24-well Kulturplatte überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂-Spannung im Brutschrank inkubiert. Dieser Ansatz erfolgte jeweils doppelt, da zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (48 h und 144 h) die Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten gemessen werden sollte.

2.6.2. Unspezifisch stimulierte und unstimulierte Lymphozytenkulturen

Für jedes Tier wurde als Kontrolle der Vitalität und Proliferationsfähigkeit, eine stimulierte und eine unstimulierte Lymphozytenkultur angelegt. Für die unstimulierte Kultur erfolgte die Pipettierung von je 2 ml pro Tier in ein well der 24-well-Kulturplatte. Die Stimulation erfolgte mit PMA/Ionomycin, dieses wurde wie folgt verdünnt:

- 1 mg PMA in 16,2 ml C₂H₅OH (unvergällt) gelöst -> 10⁻⁴M
- PMA (10⁻⁴M)-1:250 mit PBS verdünnt, 1 ml PBS + 4 μ l PMA
- davon 10 μ l in 10 ml AIM-V Medium
- 1mg Ionomycin in 1 ml DMSO gelöst
- portioniert 10 μ l pro Aliquot (eingefroren bei -20 °C)

Die Aliquots wurden bei Bedarf langsam aufgetaut und zu 10 ml AIM-V Medium mit PMA gegeben. Für die Stimulation wurde jeweils 1 ml der präparierten Lymphozyten eines jeden Tieres mit 1 ml des wie oben beschrieben hergestellten Mediums, in Kultur gebracht. Die Inkubation erfolgte zusammen mit den MLRs bei 37 °C und 5 % CO₂-Spannung im Brutschrank.

2.6.3. 48 h-Messung

Da das Medium bei längerer Kultivierung aufgebraucht ist, sind stimulierte und unstimulierte Kontrollen bereits nach 48 h geerntet worden. Der erste Ansatz der MLRs wurde ebenfalls zu diesem Zeitpunkt gemessen. Das Verhältnis der beiden Lymphozytenpopulationen sollte erwartungsgemäß bei 50 % : 50 % liegen. Zunächst erfolgten die lichtmikroskopische Begutachtung der Kultur sowie die Kontrolle des Farbumschlags im Medium. Jeder der Ansätze wurde in FACS-Röhrchen überführt, noch einmal mit PBS gewaschen und für 5 min bei 2000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Die bekannten MHC-Oberflächenmoleküle der Elterntiere wurden mit FITC und PE gefärbt (siehe Lymphozytenfärbung mittels Antikörper). Zusätzlich erfolgte die Färbung mit PerCy5.5, (1:200 verdünnt mit PBS) um den Aktivierungsmarker CD69 zu erfassen. Zur Identifizierung der Lymphozyten aus der CD8-Population erfolgte die Färbung mit APC (1:200 verdünnt mit PBS). Diese Ansätze wurden für weitere 20 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert und während dieser Zeit einige Male geschüttelt, mit dem FACS-Gerät gemessen und ausgewertet.

2.6.4. 144 h-Messung

Die Messung der Proliferation der MLRs erfolgte nach 144 h, denn Voruntersuchungen erbrachten, dass zu diesem Zeitpunkt die Lymphozyten optimal proliferiert, die Nährmedien jedoch noch nicht erschöpft sind. Ernte, Färbung und Messung der Zellen erfolgten analog zur 48 h-Messung.

2.7. Analytische Methode Durchflusszytometrie

Mit dem FACS-Gerät (FACS=Fluorescence Antibody Cell Sorter) kann sowohl der Zelltyp als auch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle gemessen werden. Hierfür passieren die Zellen eine Kapillare in einer Spülflüssigkeit, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht. FACS-Calibur verfügt über einen Argonlaser (488 nm) und eine rote Laserdiode (633 nm). Deren Licht trifft auf die Zellen, wodurch forward scatter, FSC (Vorwärtsstreulicht - das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht) und side scatter, SSC (Seitwärtsstreulicht -in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreutes Licht) entstehen. FSC erlaubt eine Aussage über die Größe, SSC ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Durch das Auftragen beider Größen in einem Diagramm können einzelne Leukozytenpopulationen unterschieden werden. Die zu messenden Oberflächenstrukturen (MHCs) wurden in der vorliegenden Arbeit mit monoklonalen Antikörpern markiert, welche sich mit derselben Wellenlänge anregen lassen. Die Antikörper verfügen über ein, für den jeweiligen Farbstoff charakteristisches, Emissionsspektrum. Aus diesem Grund ist es möglich verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu messen. Das emittierte Licht (Fluoreszenz) korreliert mit der Rezeptordichte der gemessenen Zelle. Von den 4 zur Verfügung stehenden Fluoreszenzkanälen wurden 2 genutzt: FL1 (für das Fluorochrom FITC) und FL2 (für PE).

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitations-Maximum (nm)	Emmissions-Maximum (nm)	Laser (nm)
FITC	495	520	488A
PE	564/495	576	488A

Tabelle 1 zeigt die spektralen Eigenschaften, Exzitationsmaxima, Emmissionsmaxima und geeigneten Lasertypen für Fluoreszeinisothiocyanath (FITC) und Phycoerythrin (PE). A= Argon-Ionen Laser Caltag Laboratories (International) GmbH (Hamburg, BRD)

Die differenzierte Auswertung der gemessenen Zellpopulationen erfolgte mit Cell Quest Pro, FACS Array™ Software für Apple-MacIntosh Computer. Die Leukozytenpopulation wurde durch Gates erfasst und die Antikörper je nach Fragestellung in Kombination gesetzt.

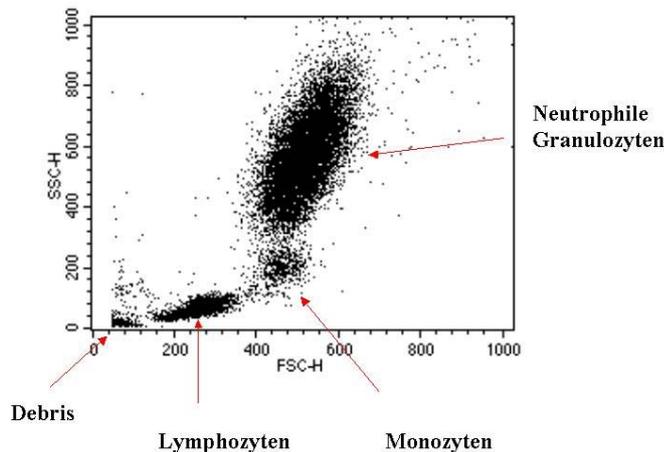


Abb 6 Neutrophile Granulozyten: groß, viel Granula , Monozyten: groß, kaum Granula, Lymphozyten: klein, kaum Granula

2.8. Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der F2-Generation

Nach der MHC-Bestimmung der Nachkommen erfolgte Analog zum Ansatz der MLR für die P-Generation dieser auch für die F2-Generation. Es wurden die MHC-Kombinationen der P-Generation (kk) x (dd) und (bb) x (qq) verwandt. Die Versuchstiere (F2- und F3-Generation) wurden im Alter von mindestens 12 Wochen und gleichzeitig die zugehörigen Elterntiere durch Kohlenmonoxid getötet. Wie unter 2.6. (Bidirektionale Mixed-lymphocyte-reaction der P-Generation) beschrieben, wurde die Milz präpariert. Die Bestimmung der Zellzahl und die entsprechende Verdünnung erfolgten ebenfalls analog den Voruntersuchungen. Die Kontrolle der Vitalität und Proliferationsfähigkeit fand durch angelegte stimulierte und eine unstimulierte Lymphozytenkulturen für jedes Tier statt.

F2 ♂ (bk) unstim.	F2 ♂ (bk) P/I	F2 ♂ (bk) + F3 ♀	F2 ♂ (bk) + +F3 ♂	F3 ♂ unstim.	F3 ♂ P/I
F2 ♂ (qd) unstim.	F2 ♂ (qd) P/I	F2 ♂ (qd) + F3 ♀	F2 ♂ (qd) + F3 ♂	F3 ♂ unstim.	F3 ♂ P/I
F2 ♀ (bk) unstim.	F2 ♀ (bk) P/I	F2 ♀ (bk) + F3 ♀	F2 ♀ (bk) + F3 ♂	F3 ♀ unstim.	F3 ♀ P/I
F2 ♀ (qd) unstim.	F2 ♀ (qd) P/I	F2 ♀ (qd) + F3 ♀	F2 ♀ (qd) + F3 ♂	F3 ♀ unstim.	F3 ♀ P/I

Tabelle 2 Notwendige Ansätze für ein Experiment

Die Fetalgeneration besitzt jeweils eines der bekannten Allele der Parentalgeneration. Das zweite identifiziert die F3-Generation, denn es stammt vom jeweils anderen Elternteil ab und unterscheidet sich in jedem Falle vom kombinierten Elternteil. Wie unter MHC-Typisierung beschrieben, wurden die bekannten MHC-Oberflächenmoleküle der Elterntiere und ihrer Nachkommen (FITC und PE) gefärbt. Zusätzlich erfolgte die Identifizierung der aktivierten Lymphozyten aus der CD8-Population mittels APC und Per CP 5.5 (1:200 verdünnt). Diese Ansätze wurden wie unter 2.6. beschrieben, inkubiert, anschließend gründlich geschüttelt, mit dem FACS-Gerät gemessen und ausgewertet.

2.8.1. Kontrollen

Es erfolgten Kontrollen für die MLRs zwischen unverwandten Tieren der F3-Generation. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese dem Alter und dem H2K der Verum-Tiere entsprachen. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 48 h und 144 h. Die Antikörperfärbung und anschließende FACS-Messung verlief identisch zu der Verum-Gruppe.

2.9. Unidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction in menschlichen Probanden

Um einen Hinweis zu erhalten, ob die in den Mäusen generierten MLR-Ergebnisse auf das Humanmodell übertragbar sind, fanden sich Daten der Knochenmarkspenderdatei der Universitätsklinik Essen von Transplantationskandidaten sowie deren Söhnen und Töchtern. Diese kamen als mögliche Spender in Frage. Als Einschlusskriterien wurden das Vorhandensein sowohl eines weiblichen und eines männlichen Nachkommens, sowie dem Mausmodell entsprechend, deren HLA- Identität festgelegt. Diese seltene Konstellation fand sich nur bei vier Vätern und drei Müttern, welche an unterschiedlichen hämatopoetischen Neoplasien litten. Um die Eignung für eine potentielle Knochenmarkspende zu testen, wurden bei diesen Probanden Unidirektionale MLCs durchgeführt. Als Kontrollen dienten jeweils drei gesunde Personen, jeweils HLA-DRB1 verschieden.

Sowohl den Patienten, den potentiellen Spendern als auch den Kontrollprobanden wurden jeweils Proben á 20 ml hepanisierten Blutes, durch eine periphere venöse Punktion mit einem Adaptersystem und Heparinmonovetten entnommen.

Aus diesem Blut wurden dann mononucleäre Zellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation durch Ficoll-PaqueTM nach Herstellerangaben gewonnen. Für die unidirektionalen MLRs wurden rundbodige Gewebekulturplatten verwendet. Pro well wurden 200 µl Zellkulturmedium, 5×10^4 Responder-Zellen (RC) und 5×10^4 Stimulator-Zellen (mit 12,5 Gy bestrahlt) zugegeben. Es wurden Triplets (drei Ansätze) angelegt und für 6, 7 und 8 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Für die letzten 18 Stunden wurden die Zellen mit 1 µl CiH³-Thymidin pro well markiert. Die Kulturen wurden mittels Mach III Harvester 96 auf Filtermatten geerntet und die inkorporierte Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszähler quantifiziert und als cpm (counts per minute) angegeben. Die MLR-Ergebnisse wurden als Stimulations-Index (SI = Median der allogenen stimulierten cpm geteilt durch den Median der autologen (spontanen) cpm) angegeben.

2.10.Statistik

Die Aufarbeitung der Daten erfolgte mit Methoden der deskriptiven Statistik. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007[©] und GraphPad Prism 3.02[©]. Das Signifikanzniveau wurde zuvor auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Zum Stichprobenvergleich kamen nichtparametrische Tests zum Einsatz. Hierbei wurde der Student's T-Test verwendet. Für die Vergleichbarkeit der SI-Werte bei menschlichen Paaren bestehend aus Eltern-Sohn, Eltern-Tochter wurde der Wilcoxon matched pairs Test verwendet. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Wurfgrößen und Lebendgeburten

Das Outbred-Mausmodell mit 4 bekannten H2-K-Haplotypen entstand aus 4 häufig verwendeten Inzuchtmausstämmen. Die Nachkommen der jeweiligen Generation wurden gezählt und für die weitere Zucht nach ihrem H2-K-Haplotyp typisiert. Dies erfolgte im Alter von mindestens 12 Wochen, damit die Tiere ein voll entwickeltes Immunsystem aufwiesen. Die Kombination erfolgte jeweils nach der erwarteten Immunantwort. DBA/1(qq) und Balb/c(dd) reagieren laut Voruntersuchungen und Literaturangaben eher in Richtung Th₂, C57BL/6(bb) und CBA/J(kk) in Richtung Th₁. Deswegen wurde jeweils ein Th₁- mit einem Th₂-reagierenden Inzuchtmausstamm gekreuzt.

Die Anzahl der Lebendgeburten der mit Balb/c Männchen verpaarten CBA/J Weibchen ($7,4 \pm 1,2$) zeigen keinen Unterschied gegenüber den Pärchen der F1-Generation ($7,1 \pm 1,7$). Die Anzahl der Lebendgeburten der mit CBA/J Männchen verpaarten Balb/c ($6,1 \pm 1,5$) unterscheidet sich davon signifikant.

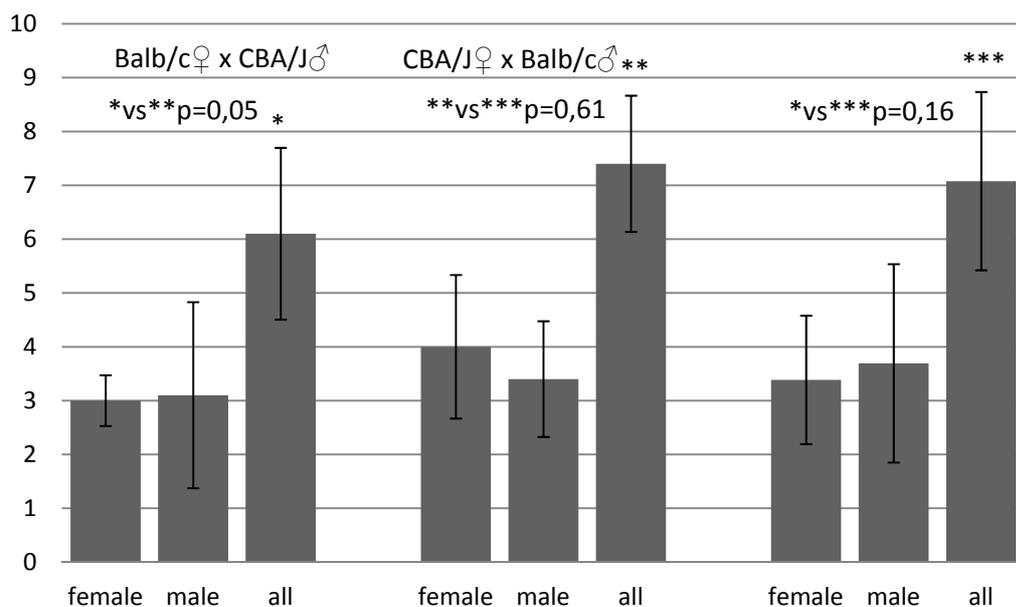


Abb 7 Anzahl der Lebendgeburten Balb/c und CBA/J

Ähnliche Ergebnisse zeigten die Verpaarungen von C57BL/6 und DBA/1 Tieren. Wurden DBA/1 Weibchen mit C57BL/6 Männchen verpaart kam es zu geringeren Wurfgrößen ($3,0 \pm 1,9$). Wurden C57BL/6 Weibchen mit DBA/1 Männchen verpaart ($5,3 \pm 2,7$) entstanden zwar mehr Nachkommen, aber die F1-Generation war noch fruchtbarer ($7,4 \pm 2,1$). Die jeweiligen Ergebnisse unterscheiden sich signifikant.

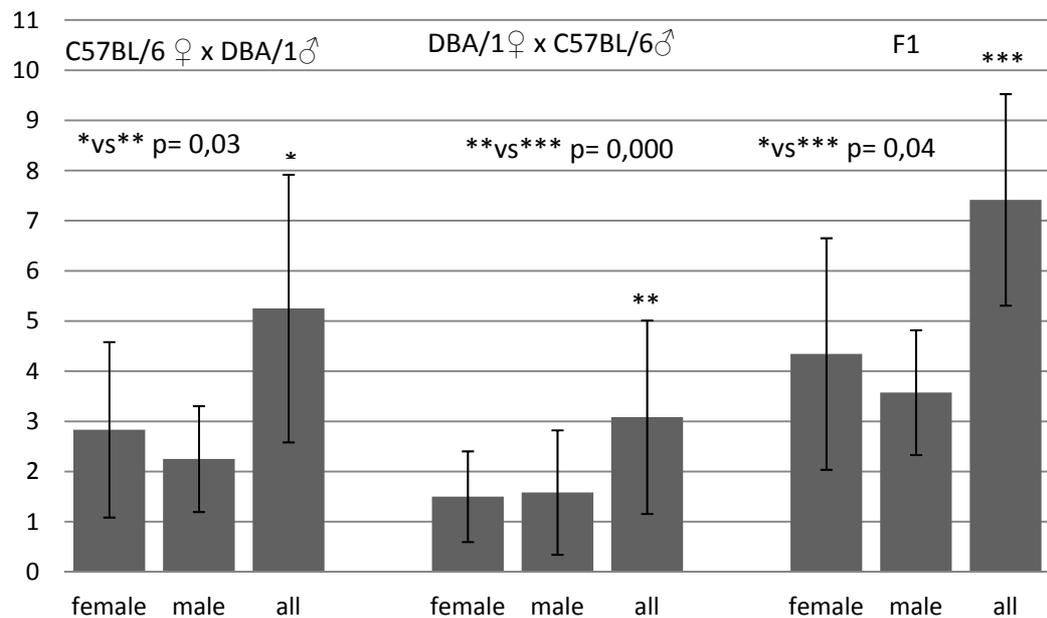


Abb 8 Lebendgeburten C57BL/6 und DBA/1

3.2. Nachkommenzahl in Anhängigkeit vom MHC

Um zu zeigen, dass die geringe Reproduktivität eines Zuchtstammes nicht in dessen MHC begründet liegt, wurde die P-Generation von DBA1 Mäusen untereinander verkreuzt. Deren Nachkommen wurden mit der Anzahl von Nachkommen von DBA1 mit C57/BL6 gekreuzten Mäusen der F2-Generation, wobei Vater und Mutter dieselbe MHC-Konstellation aufwiesen (jeweils qq), verglichen. Abbildung 9a zeigt, dass die Anzahl der Nachkommen der DBA1/C57/BL6 Hybride signifikant höher ist als die Nachkommen des Inzuchtstammes. Dies ist unabhängig vom MHC, der bei beiden

gleich ist. Wurden DBA/1/C57/BL6 Hybride der F3-Generation gekreuzt, so konnte kein Unterschied in der Nachkommenzahl von MHC-Mismatch-Paaren (qb) gegenüber Non-Mismatchverpaarungen (qq) festgestellt werden (Abb 9b)

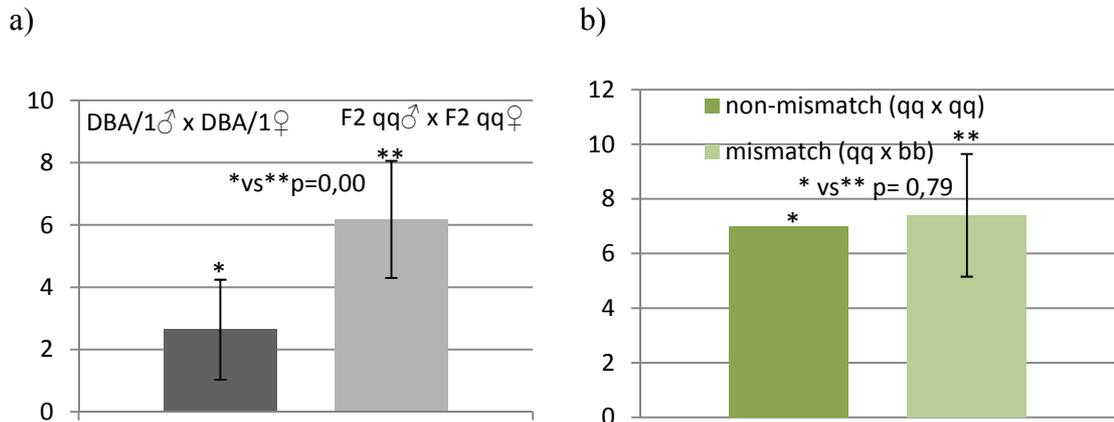


Abb 9 MHC-unabhängige Nachkommenzahl

3.3. CD4⁺/CD25⁺ regulatorische T-Zellen während der Schwangerschaft

Abbildung 10 zeigt, dass es während der Schwangerschaft keinen Unterschied im prozentualen Anteil der CD25⁺T_{reg}-Zellen an CD4⁺CD8⁺-Lymphozyten in den peripheren und paraortalen Lymphknoten zwischen Mismatch- und Non-mismatch-Konstellation der Eltern-Tiere gab. Gekreuzt wurden Outbred-Männchen der F2-Generation (qq/bb) mit Outbred-Weibchen der F2-Generation (qq).

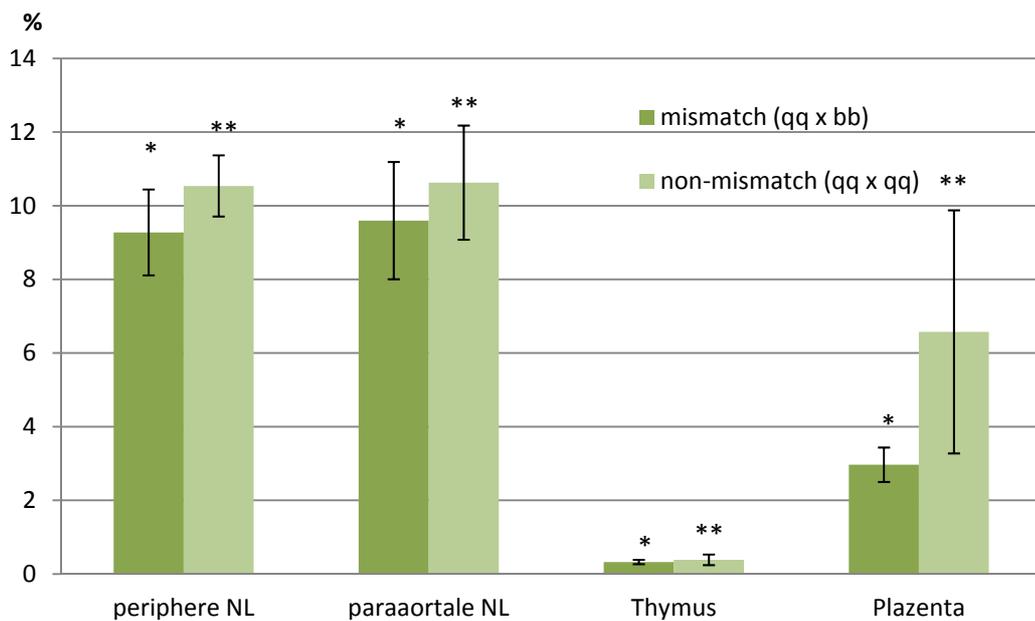


Abb 10 Anteil $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen an $CD4^+CD8^+$ -Zellen in Prozent, Periphere NL * vs** p= 0,15, paraaortale NL * vs** p= 0,42, Thymus * vs** p= 0,66, Plazenta * vs** p= 0,07, n= 5

Lediglich in der Plazenta ist ein fast signifikanter Unterschied zu beobachten ($p = 0.07$). Der prozentuale Anteil der $CD25^+$ T_{reg}-Zellen war hier aber überraschend bei den Non-Mismatch-Tieren höher.

Für den prozentualen Anteil $CD4^+/CD25^+$ Lymphozyten an den $CD4^+$ -Zellen konnte zwischen schwangeren und nicht schwangeren MHC-Mismatch Tieren kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Relationen entsprachen in etwa dem vorangegangenen Versuch. In der Plazenta waren wiederum weniger T_{reg} nachweisbar als in den Lymphknoten, aber mehr als im Thymus (Abb 11).

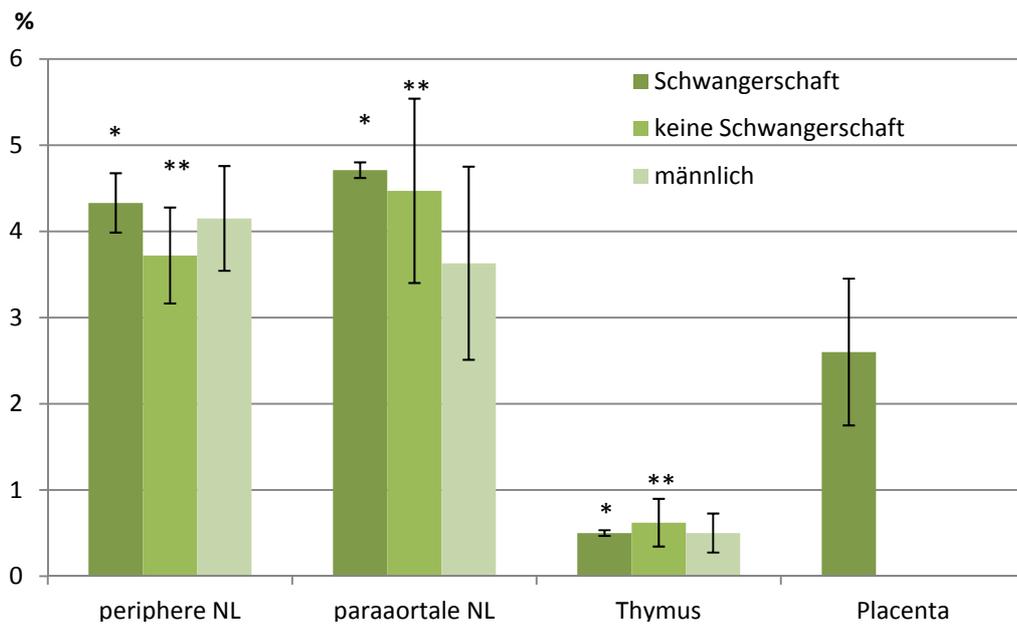


Abb 11 Anzahl regulatorischer T-Zellen im Vergleich, periphere NL *vs ** p= 0,17, paraaortale NL * vs** p= 0,8, Thymus *vs ** p= 0,27, n=5

3.4. Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der P-Generation

Um die Immunantwort zwischen Eltern-Tieren und deren Nachkommen zu bestimmen, erfolgten zunächst MLRs zwischen gleichgeschlechtlichen Balb/C- und CBA/J-, sowie zwischen C57BL/6- und DBA/1-Mäusen. Die prozentualen Anteile der CD8⁺CD69⁺-Zellen nach 48, 96 und 144 Stunden sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

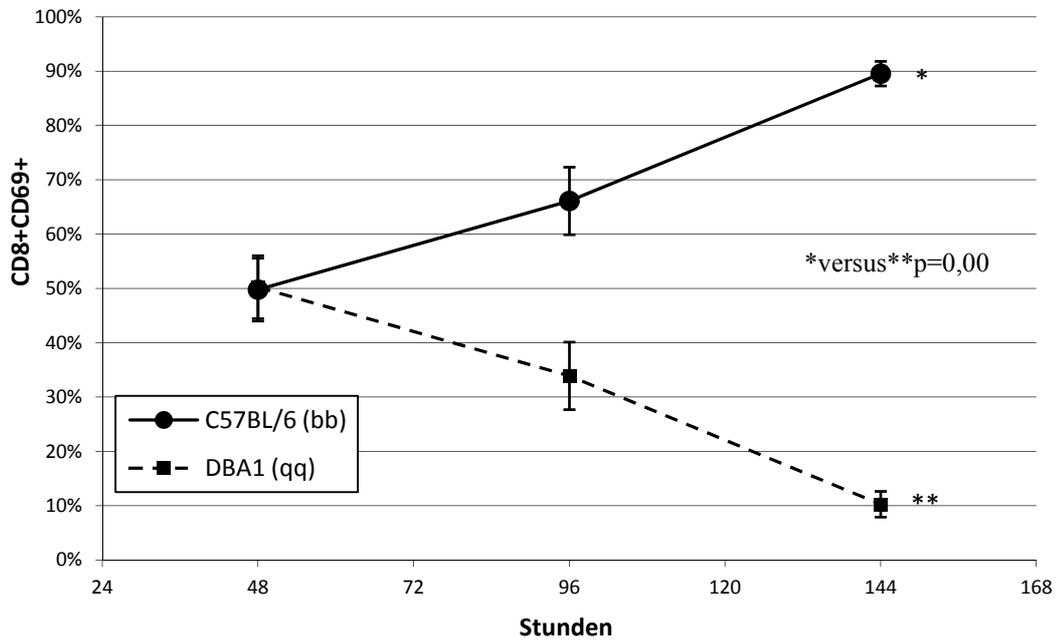


Abb 12 zwischen P-Generation C57BL/6 (bb) und DBA1 (qq)

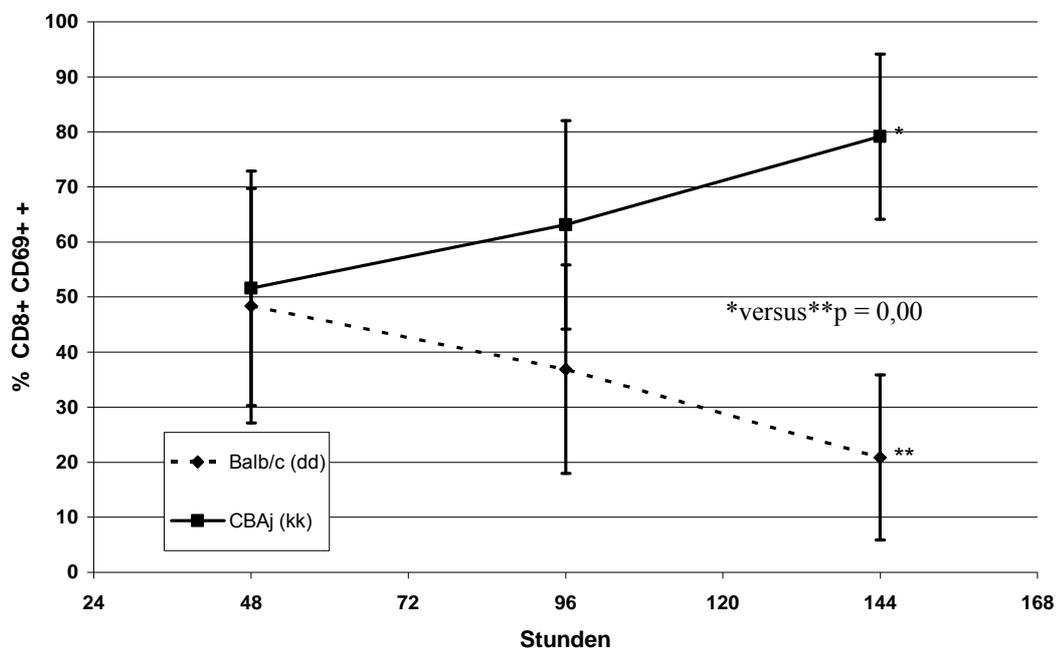


Abb 13 MLR zwischen P-Generation Balb/c (dd) und CBA/J (kk)

Die Ergebnisse zeigen, dass jeweils die CD8⁺CD69⁺-Zellen der C57BL/6 und CBA/J in den MLRs deutlich gegenüber denen der DBA/1- bzw. Balb/C-Mäusen dominieren.

In den MLRs zwischen Tieren der F2-Generation, mit der P-Generation entsprechenden MHC-Eigenschaften, konnten keine Unterschiede zwischen beiden Populationen mehr festgestellt werden. Die MLRs waren ausgeglichen (Abb 14 und 15), die Tiere haben also eine vergleichbare Immunreaktivität.

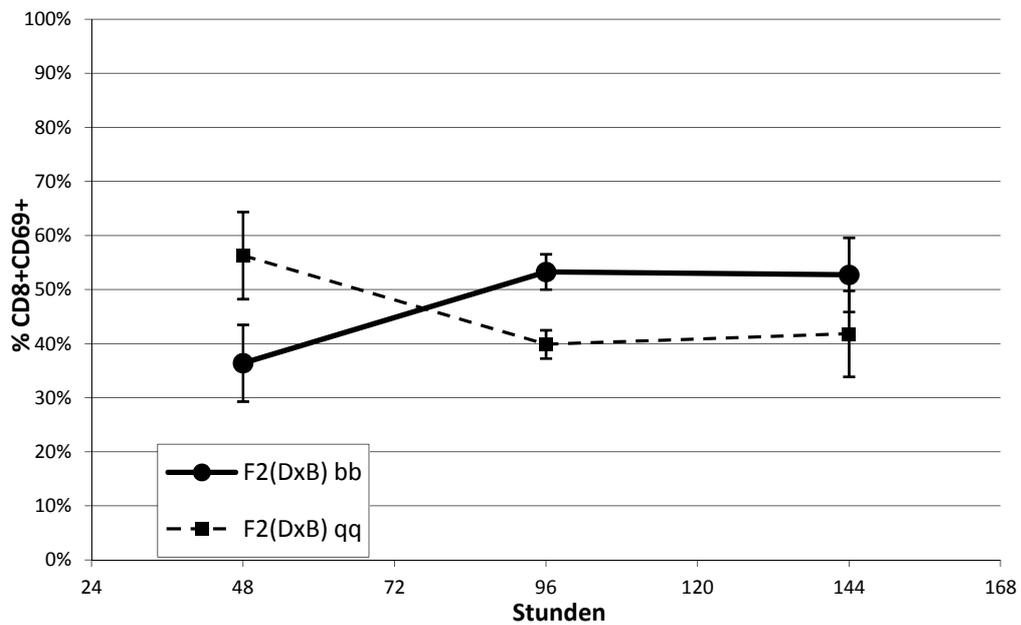


Abb 14 MLR zwischen F2-Generation H2Kq und H2Kb

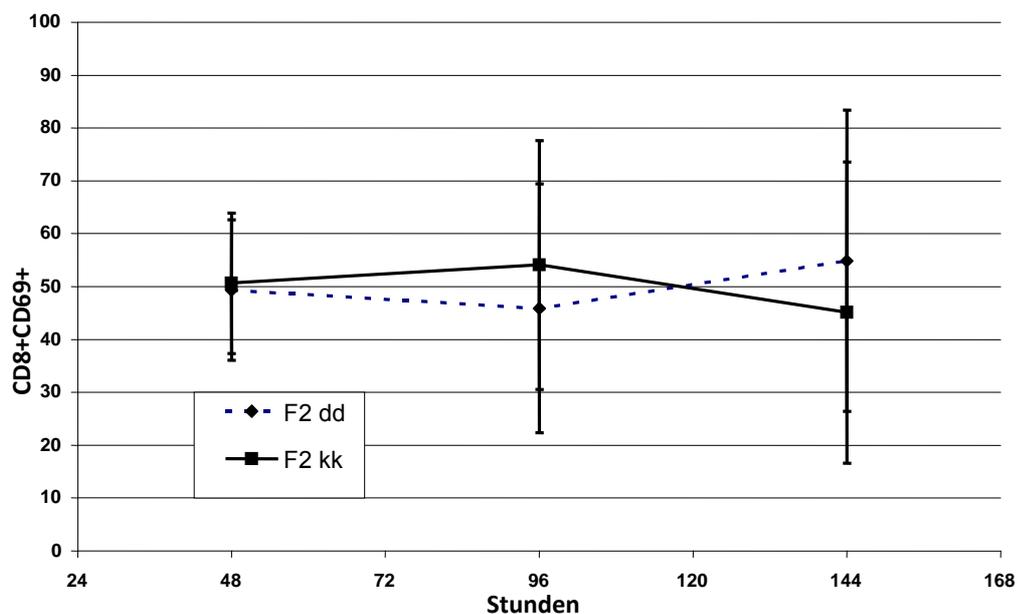


Abb 15 MLR zwischen F2-Generation H2Kd und H2Kk

3.5. Bidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction zwischen Eltern-Tieren und ihren Nachkommen

Um die Immunreaktion zwischen Eltern-Tieren und ihren Nachkommen zu testen, erfolgten MLRs. Dabei waren beide Elternteile haploid in ihren MHCs und unterschieden sich komplett, das heißt, „Vater“ und „Mutter“ wiesen jeweils einen kompletten Mismatch auf. Nach jeweils 144 Stunden wurde der Anteil der jeweiligen Zellen in den Kulturen flowcytometrisch gemessen. Die Ergebnisse der Versuche sind in den Abbildung 16 A-D dargestellt. Diese zeigen, dass die CD8⁺-Lymphozyten der elterlichen Subpopulation gegenüber ihren Nachkommen eine signifikant höhere Proliferationsrate nach 144 h aufweist. Lediglich die MLR zwischen paternalen Lymphozyten und Lymphozyten ihrer „Söhne“ zeigten ein ausgeglichenes Verhältnis beider Populationen.

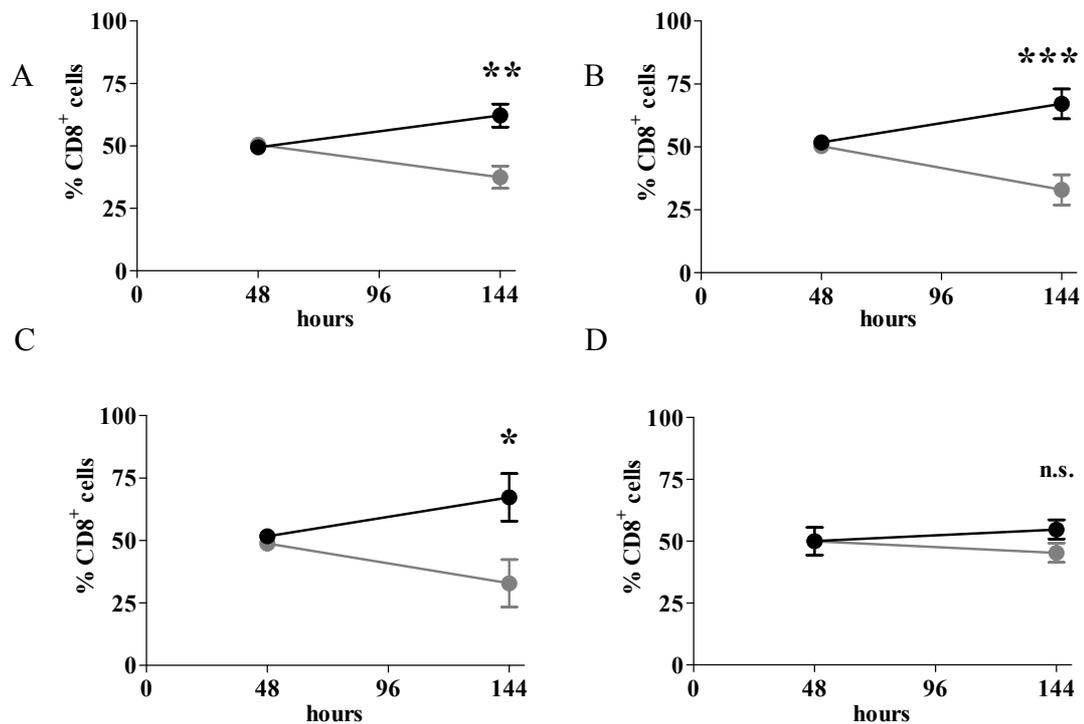


Abb 16 Verum Gruppe: Anteile der CD8⁺-Lymphozyten nach 48 und 144 Stunden in MLR mit Lymphozyten von

(A) Müttern (schwarz) und ihren Töchtern (grau), (n=5)

(B) Müttern (Schwarz) und ihren Söhnen (grau), (n=5)

(C) Vätern (schwarz) und ihren Töchtern (grau) (n=5)

(D) Vätern (schwarz) und ihren Söhnen (grau), (n=5)

Mittelwerte \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$

3.5.1. Kontrollen

In den als Kontrolle angelegten MLRs zwischen unverwandten Tieren der F3-Generation blieb das Verhältnis während der gesamten Inkubationszeit bei 50:50 ausgeglichen und stabil. (Abb 17 A–C)

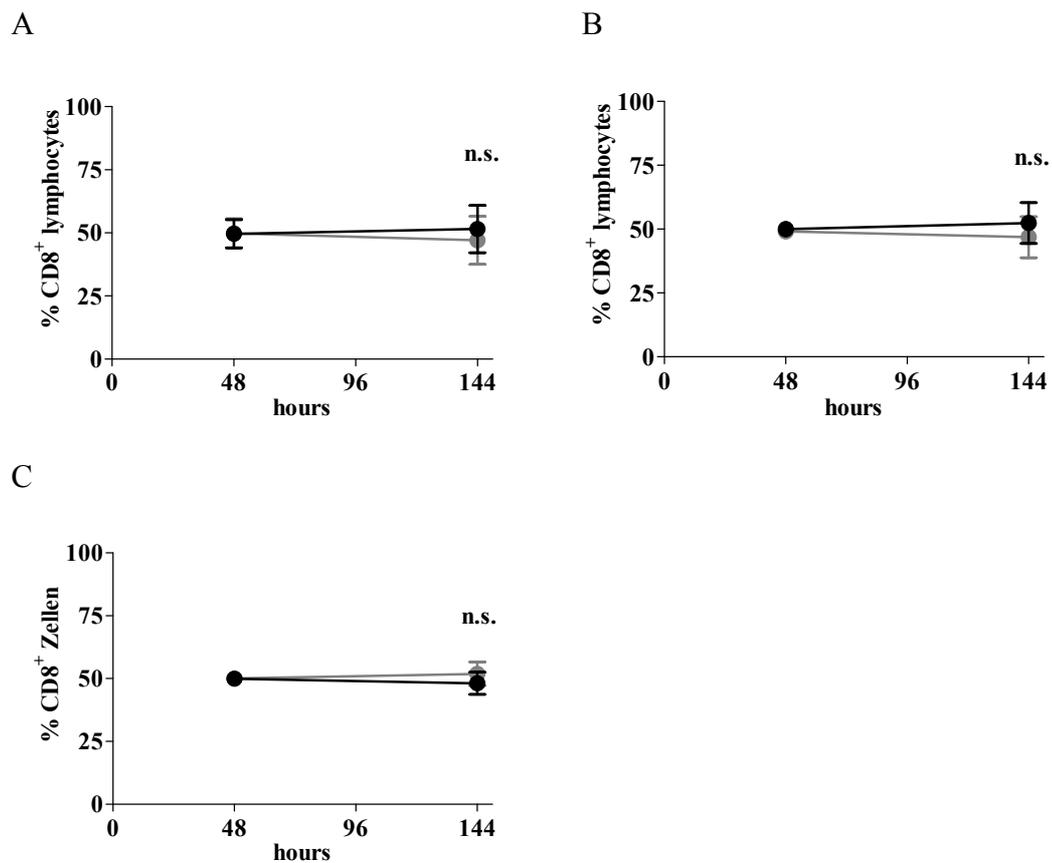


Abb 17 Kontroll-Gruppe: Anteil der CD8⁺-Lymphozyten nach 48 und 144 Stunden in MLC mit Splenozyten von unverwandten

- (A) weiblichen Mäusen in beiden Gruppen, (n=5)
 (B) weibliche (Schwarz) und männliche (Grau), (n=5)
 (C) männlichen Mäusen in beiden Gruppen, (n=5)
 Mittelwerte \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede

3.6. Unidirektionale Mixed Lymphocyte Reaction der menschlichen Probanden

Die Ergebnisse der one-way MLR der menschlichen Patienten/Probanden sind in Abbildung 18 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass sich die Reaktion zwischen Vater und Sohn von der zwischen Vater und Tochter unterscheidet, während bei den Müttern kein Unterschied festzustellen war. Wurden die Zellen des Vaters als Stimulus in der MLR verwendet, d.h. vorher mit 12.5 Gy bestrahlt, um die eigene Proliferation zu verhindern, so reagierten die Zellen der Söhne und Töchter mit einem mittleren Stimulationsindex von 40.6 (Söhne) bzw. 9.9 (Töchter). Wurden die paternalen Zellen hingegen als Responder in Kultur gebracht, reagierten diese mit einem Stimulationsindex von 78.8 (gegenüber den Söhnen) und 37.0 (gegenüber den Töchtern). Das Ergebnis ist wegen der geringen Fallzahl nicht signifikant, bestätigt aber die Richtung der in den Mäusen gefundenen Ergebnisse.

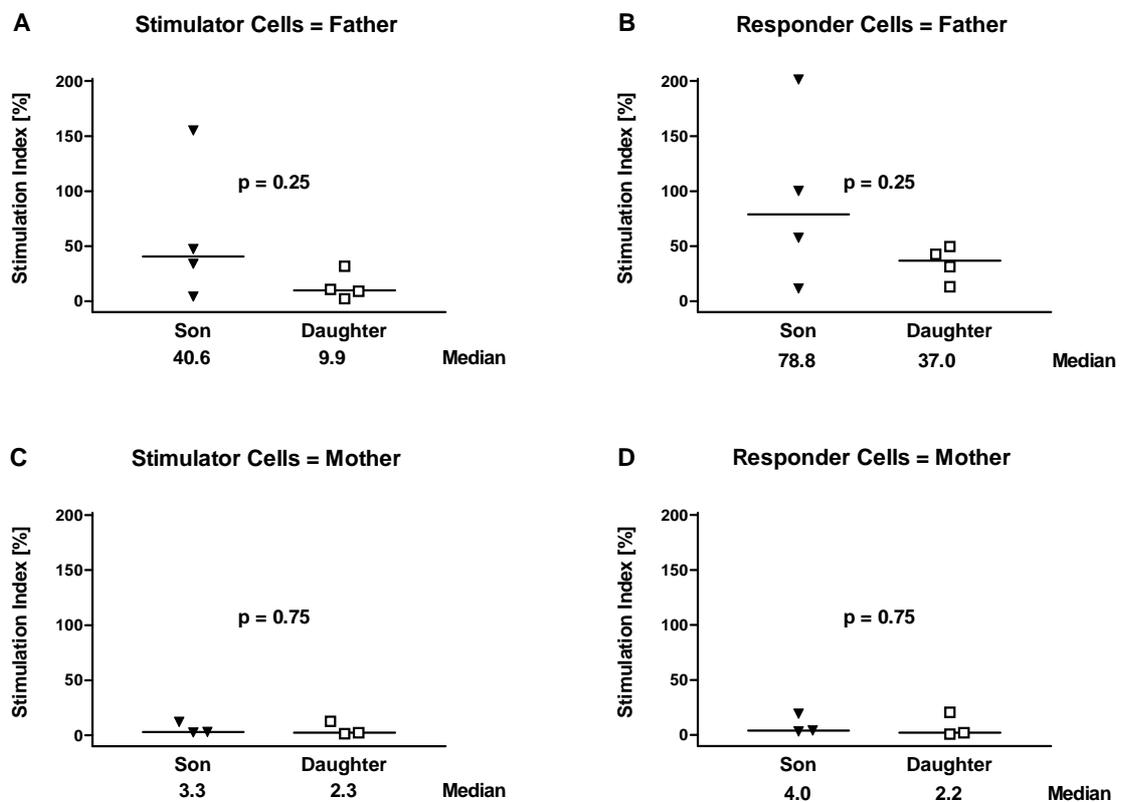


Abb 18 MLRs menschlicher Probanden am 8. Tag, (A;B) Väter (n=4), (C;D) Mütter (n=3) und ihre Nachkommen (HLA-DRB1-identische Geschwisterpaare), sowie drei gesunde Kontrollpersonen (HLA-DRB1-verschieden). Der Stimulationsindex ist als Prozent der HLA-DRB1-verschiedenen Kontrollpersonen angegeben.

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Versuche, dass

- die Nachkommenanzahl von Mäusen nicht durch den jeweiligen MHC bzw. den Grad des MHC-Mismatches beeinflusst wird.
- der Anteil an regulatorischen T-Zellen während der Schwangerschaft unabhängig vom MHC-Mismatch in den peripheren, periaortalen Lymphknoten sowie dem Thymus ist.
- in der Plazenta der Anteil regulatorischer T-Zellen bei MHC-Non-Mismatch Mäusen deutlich höher ist, als bei MHC-Mismatch-Mäusen.
- die Immunreaktion zwischen Vätern und ihren erwachsenen Söhnen bzw. Töchtern geschlechtsspezifisch unterschiedlich ist, während die Immunreaktion zwischen Müttern und ihren erwachsenen Nachkommen, unabhängig von deren Geschlecht, gleich ist.

4. Diskussion

4.1. Wurfgrößen und Lebendgeburten der verwendeten Mausstämme

Die Ergebnisse zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied in der Reproduktivität zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen gibt. Da nach Literaturangaben eine Th₂-Immunantwort eine erfolgreiche Schwangerschaft begünstigt, wurden jeweils ein Th₁- und ein Th₂-reagierender Mausstamm in Kombination für die Zuchtversuche verwendet. Interessanterweise zeigten die Weibchen der als Th₂-gewichtet geltenden Mausstämme geringere Wurfgrößen. Es konnte beobachtet werden, dass es sich positiv auf die Nachkommenzahl auswirkt, wenn genetisch nicht identische Tiere verpaart wurden (F1-Generation). Dies lässt darauf schließen, dass eine immunogene Erkennung die Wurfgröße günstig beeinflusst, diese aber MHC-unabhängig ist und wahrscheinlich über Minorhistokompatibilitätsantigene vermittelt wird. Da die Ergebnisse in beiden Versuchsreihen trotz verschiedener Inzuchtstämmen (C57/BL6 x DBA/1 und BALB/c x CBA/J) identisch waren, scheinen die vorliegenden Ergebnisse grundlegende Regeln der Reproduktionsimmunologie darzustellen.

4.1.1. Th₁/Th₂ Paradigma

Die verminderte Anzahl an Lebendgeburten der mit CBA/J- oder C57BL/6-Männchen verpaarten Balb/c- oder DBA/1-Weibchen zeigt, dass die Einteilung in Th₁- bzw. Th₂-Antwort keine Aussage über die Reproduktivität zulässt. Denn die in der MLR schwächer reagierenden Stämme, also die eher Th₂-gewichteten, zeigen eine geringere Wurfgröße. Dies stellt das Th₁/Th₂-Paradigma weiter in Frage.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass anti-inflammatorische Th₂-Zytokine (insbesondere Interleukin- (IL)-4 und IL-10 schwangerschaftsprotective Eigenschaften besitzen und bei normalverlaufender Schwangerschaft dominieren ^{(71); (72); (73) ; (74); (4); (75); (76)}. Th₁-Zytokine dagegen sind die dominierende Population bei Abortfällen und können zur placentaren Nekrose sowie zur Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen und somit zu einer Abstoßungsreaktion führen. Zu diesen Th₁-Zytokinen werden Interferon-

γ (IFN- γ), IL-1, IL-2, IL-6 und Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) gezählt^{(77); (71); (78); (79); (80); (81)}.

Chaouat und Mitarbeiter haben die essentielle Rolle der Th₂-Zytokine am CBA/J x DBA/2J Mausmodell verdeutlicht, indem sie eine defiziente plazentare Produktion von IL-4 und IL-10 bei Tieren der Abortkombination, verglichen mit normal trächtigen Tieren, nachwiesen. Durch Gabe von rekombinantem IL-10 oder anti-IFN τ konnte die Abortrate reduziert und mittels Applikation von anti-IL-10 wiederum gesteigert werden⁽⁷³⁾. Die Arbeitsgruppe demonstrierte auch den schwangerschaftsschädigenden Einfluss von Th₁-Zytokinen in Form intravenöser Applikationen von TNF α , IFN γ und IL-2, welche zu gestationsalters- und 9 dosisabhängigen Steigerungen der Abortrate sowohl bei Tieren der Abort- (CBA/J x DBA/2) als auch der Normalträchtigkeitskombination CBA/J x BALB/c führten⁽⁷⁷⁾.

Vielmehr kommt es auf die Art der Provokation des Immunsystems an, mit welcher Antwort die jeweiligen Mausstämme reagieren^{(82); (83); (84); (85); (86); (87)}. Daher haben die gewählten Mausstämme einen Einfluss auf unsere Ergebnisse. Auch in Bezug auf eine erfolgreiche Schwangerschaft kann nicht von einer alleinigen Th₁ oder Th₂-Antwort ausgegangen werden. Die Th₁/Th₂-Balance unterliegt Veränderungen. So ist zum Zeitpunkt der Implantation eher von einem Th₁-Übergewicht auszugehen, im weiteren Verlauf jedoch scheinen Th₂-Zytokine zu dominieren⁽⁸⁸⁾. Das starre Th₁/Th₂-Paradigma erscheint heute als unzureichend und sollte deshalb Gegenstand weiterer Diskussionen sein. Allerdings ist eine erfolgreiche Schwangerschaft von der mütterlichen Immunantwort abhängig. Auch Ghaderi et al fanden in ihren Untersuchungen am Menschen und in der Maus heraus, dass es vom mütterlichen Immunsystem abhängt mit welchem Partner eine erfolgreiche Schwangerschaft und Nachkommen zustande kommen. Sie untersuchten den Einfluss des Oberflächenmoleküls N-Glycolylneuramin-Säure und dessen Expression in Bezug auf die sexuelle Selektion durch das weibliche Immunsystem⁽⁸⁹⁾.

4.2. Anzahl der Nachkommen in Abhängigkeit des MHC

Um zu untersuchen, ob der MHC eine Rolle für die unterschiedliche Reproduktivität der Mausstämmen spielt, wurden die Nachkommen der jeweils verpaarten Kombinationen (WT, F2- und F3-Generation) mit identischem MHC und mismatch- Konstellation gezählt. Es wurde der Mausstamm DBA/1 ausgewählt, da dieser die geringste Fruchtbarkeit in unseren Untersuchungen zeigte. Wurde der Wildtyp als Muttertier genutzt, zeigte sich eine signifikant geringere Nachkommenzahl, als nach Verpaarung der MHC-identischen F2-Generation. Da die Reproduktivität der F3-Generation in mismatch- und non- mismatch- Konstellation vergleichbar mit der der F2-Generation ist, lässt sich schlussfolgern, dass der MHC keinen Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Mausstämmen hat und die Vermischung des genetischen Hintergrundes der Inzuchtstämmen bereits ab der F2-Generation ausreichend erfolgt ist. Die Verpaarung genetisch verschiedener Tiere führt zu einer höheren Nachkommenzahl und ist ein Hinweis dafür, dass eine immunologische Erkennung des Fetus durch die Mutter eine Schwangerschaft günstig beeinflusst.

4.2.1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Übereinstimmung von MHC-/HLA-Antigenen und Fertilität?

Seit der Entdeckung des HLA-Systems durch Jean B. Dausset beschäftigt sich die Forschung auch mit der Fragestellung, wie der lediglich zur Hälfte HLA-identische Embryo vom Immunsystem der Mutter toleriert wird. Auf Grund der Beobachtung, dass genetisch identische Inzuchtmausstämmen mit identischen MHC-Antigenen eine deutlich eingeschränkte Reproduktionsfähigkeit aufweisen, schloss man auf einen Zusammenhang zwischen der Übereinstimmung von MHC-/HLA-Antigenen und Fertilität^{(90); (91); (92)}.

Die ersten Untersuchungen bei Paaren mit habituellen Aborten zeigten dann auch tatsächlich eine erhöhte Übereinstimmung in HLA-Merkmalen (HLA-sharing)⁽⁹³⁾.

Erklärt wurde dieses Phänomen durch die Hypothese, dass die allogenen väterlichen HLA-Antigenmerkmale des Embryos auf Seiten der Mutter zu einer „schützenden Immunantwort“ führen, die bei zu großer Übereinstimmung unterbleibt. Nachdem man davon ausging, dass wiederholte Schwangerschaften zu einer Art „Impfreaktion“ bei der Mutter führen, dass heißt eine zellvermittelte Immunität gegen väterliche Antigene aufgebaut wird, untersuchte man zunächst in Mäusen den Effekt der artifiziellen Immunisierung vor Schwangerschaft mit väterlichen Zellen ⁽⁹⁴⁾. Auch bei Paaren mit einer Anamnese habitueller Aborte und erfolglosen IVF-Versuchen wird diese Methode, bei der die Frauen mit Lymphozyten ihrer Ehemänner „immunisiert“ werden, durchgeführt ⁽⁹⁵⁾. Schon 1958 entdeckte man, dass in der Schwangerschaft durch väterliche HLA-Antigene, besonders bei Mehrgebährenden, die Bildung zytotoxischer Antikörper induziert wurde ⁽⁹⁶⁾. Es gilt als gesichert, dass die wiederholte Exposition des maternalen Immunsystems mit paternalen Alloantigenen - wie bei Transfusionen oder während einer erfolgreichen Schwangerschaft (semi-allogene fetale Leukozyten können die Plazentaschranke überwinden) - bei der Mutter zur Bildung von antipaternalen Antikörpern führt. Diese sind bei Primigravidae seltener zu finden, nehmen jedoch abhängig von der Zahl und Dauer vorangegangener Schwangerschaften zu ⁽⁹⁷⁾. Ungefähr 50% der Multiparae haben HLA-Antikörper gegen die HLA-Merkmale des Partners ⁽⁹⁸⁾. Auch wenn die Bildung von Antikörpern nicht unbedingt mit dem erfolgreichen Austragen einer Schwangerschaft korreliert, so zeigt sich doch eine positive Assoziation zwischen dem Auftreten dieser Antikörper und der Geburt eines Kindes ^{(99); (100)}.

Da eine Th₂-Zytokindominanz in der Schwangerschaft mit vermehrter Antikörperproduktion durch B- Zellen mit folgender Degradation paternaler Antigene verbunden sein müsste, bietet sich die Anwesenheit asymmetrischer Antikörper als Erklärungsmodell an ^{(101); (102)}. Sie sind unfähig zur Auslösung von Effektormechanismen einer Immunantwort. Diese These wird dadurch untermauert, dass bei Patientinnen mit Fehlgeburt ein nicht ausreichendes Niveau an asymmetrischen Antikörpern im Serum festgestellt werden kann ⁽¹⁰³⁾.

Hamilton et al untersuchten in Verpaarungen zwischen vier Inzuchtstämmen den Einfluss des MHC auf das Gewicht der fetoplazentaren Einheit. Sie fanden heraus, dass Minor-Histokompatibilitäts-Antigene den entscheidenden positiven Einfluss auf die Nachkommen haben und nicht der MHC ⁽¹⁰⁴⁾.

Das Abortmodell der Inzuchtmausstämmen CBA/J × DBA/2J gab der Arbeitsgruppe um

Chaout die Möglichkeit, die zugrunde liegenden Mechanismen für immunologisch bedingte Aborte zu untersuchen. Auffallend war, dass CBA/J-Weibchen ($H2^k$) mit DBA/2J-Männchen ($H2^d$) verpaart, eine sehr hohe Spontanabortrate aufwiesen. Aber Verpaarungen von CBA/J-Weibchen mit BALB/c-Männchen, welche ebenfalls $H2^d$ Antigene aufweisen, in unauffälligen Trächtigkeiten endeten⁽¹⁰⁵⁾. Dies zeigt die eher untergeordnete Rolle des MHC im Zusammenhang spontaner Aborte.

4.3. Einfluss des MHC der Eltern auf die Produktion von $CD4^+/CD25^+$ T_{reg} während der Schwangerschaft

Seitdem das sogenannte CBA x DBA/2-System als Abortmodell entdeckt wurde, stellte sich die Frage, ob eine erfolgreiche Schwangerschaft das Resultat von Immunsuppression oder –Stimulation ist⁽¹⁰⁶⁾. In diesem Modell (♀ CBA/J ($H2^k$) x ♂ DBA/2J ($H2^d$) treten bis zu 20 % mehr spontane Aborte auf. Im Thymus dieser Muttertiere konnten weniger $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, als in der Kontrollgruppe (♀ CBA/J ($H2^k$) x ♂ Balb/c ($H2^d$)⁽⁵⁹⁾.

Ist die Immunerkennung fetaler Zellen durch die maternalen Zellen MHC-abhängig und verantwortlich für erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen?

In den hier vorliegenden Versuchen wurden die Stämme DBA/1 und C57BL/6 genutzt und eine mismatch und eine non-mismatch Konstellation in Bezug auf den MHC der Elterntiere generiert. Jeweils die Männchen und Weibchen der F2-Generation (bb und qq) wurden verpaart, um die inzuchtbedingten Eigenschaften der Mausstämmen als Ursache für eine Immunreaktion auszuschließen und den menschlichen Verhältnissen möglichst Nahe zu kommen. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an regulatorischen T-Zellen während der Trächtigkeit unabhängig vom MHC-Mismatch in den peripheren und periaortalen Lymphknoten sowie dem Thymus ist. Eine Verpaarung mit gemischt genetischem Hintergrund, aber identischem MHC zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl der aktivierten T_{reg} -Zellen. Interessanterweise war in der Plazenta der Anteil regulatorischer T-Zellen bei MHC-non-mismatch- Mäusen deutlich höher, als bei

MHC-mismatch-Mäusen. Im vorliegenden Experiment konnten keine signifikanten Ergebnisse generiert werden. Eine Tendenz ist dennoch zu erkennen, da ein fast signifikanter Unterschied bei den T_{reg} -Zellen der Placenta zugunsten der non-mismatch-Gruppe besteht. Hierzu sollten weitere Experimente mit höheren Fallzahlen erfolgen und die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

Die Allogrenität des Fetus löst eine Immunreaktion im mütterlichen Organismus aus, wobei T_{regs} und Th_{17} zu den möglichen protektiven Faktoren einer suffizienten Schwangerschaft gehören und die Immunantwort der Mutter eindämmen. Hierbei wurde beobachtet, dass bereits vor der Implantation die T_{reg} -Zahl in den uterusdrainierenden Lymphknoten erhöht war. Als Auslöser wurde die Samenflüssigkeit gefunden, welche, neben Östrogen, für die Induktion der spezifischen Toleranz gegenüber väterlichen Antigenen verantwortlich gemacht wird ^{(107); (108); (109)}. Neue Daten zeigten, dass paternal Antigen-spezifische T_{reg} -Zellen in den uterusdrainierenden Lymphknoten bereits drei Tage nach dem Koitus proliferierten. Nach der Implantation (am Tag fünf nach Koitus) stieg die Zahl der $Ki67+$ paternal-antigen-spezifischen T_{reg} im Uterus von Balb/c x DBA/2-Mäusen an ⁽¹¹⁰⁾. Dies belegt, dass antigenspezifische T_{reg} aus den Lymphknoten schnell in den Uterus wandern und proliferieren, welches zu einer spezifischen Toleranz gegenüber paternalen Antigenen im frühen Schwangerschaftsstadium führt.

Auch eine Gabe von väterlichen Lymphozyten als Alloimmunisierung, ist in der Lage die Anzahl der T_{reg} zu erhöhen. Ebenso wichtig sind Zytokine bei der Regulation schützender Antikörper in der Schwangerschaft ^{(111); (112)}. Nach Lymphozytentherapie wurden bei Frauen mit rezivierenden Aborten gleiche Mengen von IL6 und sIL6R gefunden, wie bei Normalschwangeren. Wohingegen die Level bei nicht behandelten Patientinnen höher lagen. Dies zeigt dass der IL6- Signalweg eine bedeutende Rolle für die Balance zwischen Th_{17} und T_{regs} spielt ⁽¹¹³⁾. Schumacher et al konnten bestätigen, dass die Aktivierung von T_{reg} nicht durch Hormone während der Schwangerschaft geschieht, sondern durch paternale Antigene ⁽¹¹⁴⁾.

Zenclussen et al konnten die essentielle Rolle von T_{reg} während der normalen Trächtigkeit von Mäusen im Thymus bestätigen ⁽⁵⁹⁾. Außerdem fanden sie heraus, dass bereits am Tag 2 einer Trächtigkeit in den uterusdrainierenden Lymphknoten und der feto-maternalen Oberfläche paternale Antigene gefunden werden können. Diese lassen T_{reg} , spezifisch für paternale Antigene, entstehen ⁽¹¹⁵⁾. T_{reg} -Zellen exprimieren in

Korrelation zu ihrer biologischen Aktivität den Transkriptionsfaktor FoxP3 (forkhead box P3). Sie bewirken eine Proliferationsinhibition, die sie auf Th₁- im Vergleich zu Th₂-Zellen stärker ausüben⁽¹¹⁶⁾. Eine normale Schwangerschaft geht mit einem Anstieg der T_{reg}-Zellen bis zum Zeitpunkt der maximalen Trophoblastinvasion einher⁽¹¹⁷⁾. Im peripheren Blut von Frauen in einer normalen Frühschwangerschaft befanden sich mehr T_{reg}-Zellen als im Vergleich zu Nichtschwangeren oder Frauen mit einem Spontanabort (118).

Im Mausmodell zeigte sich, dass ein Mangel an T_{reg}-Zellen in einer Fehlgeburt enden kann. Dies geschieht vermutlich durch die Akkumulation von Th₁-Zellen in der Dezidua⁽⁵⁹⁾.

Die Implantation ist durch eine Entzündungsreaktion charakterisiert und ein Fehlen der inflammatorischen Zytokine IL12 und IL18 korrelierte mit weiblicher Sterilität im Menschen⁽¹¹⁹⁾. Eine exzessive Entzündung kann zur Resorption führen. T_{reg} sorgen möglicherweise dafür, dass es zu keiner überschießenden Entzündung kommt, denn endometriale T_{reg} steigen zahlenmäßig bei Mäusen und Menschen während der Implantation an^{(59); (120); (121); (117); (122)}. Diese T_{reg}-Zellen der Decidua inhibieren in MLRs umbilikale mononukleare Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass fetale Antigen-spezifische T_{reg} in die Decidua wandern. Auch NK-Zellen sowie IFN γ sind für erfolgreiche Schwangerschaften notwendig, indem sie z. B. die lokalen arteriellen Gefäße beeinflussen⁽¹²³⁾.

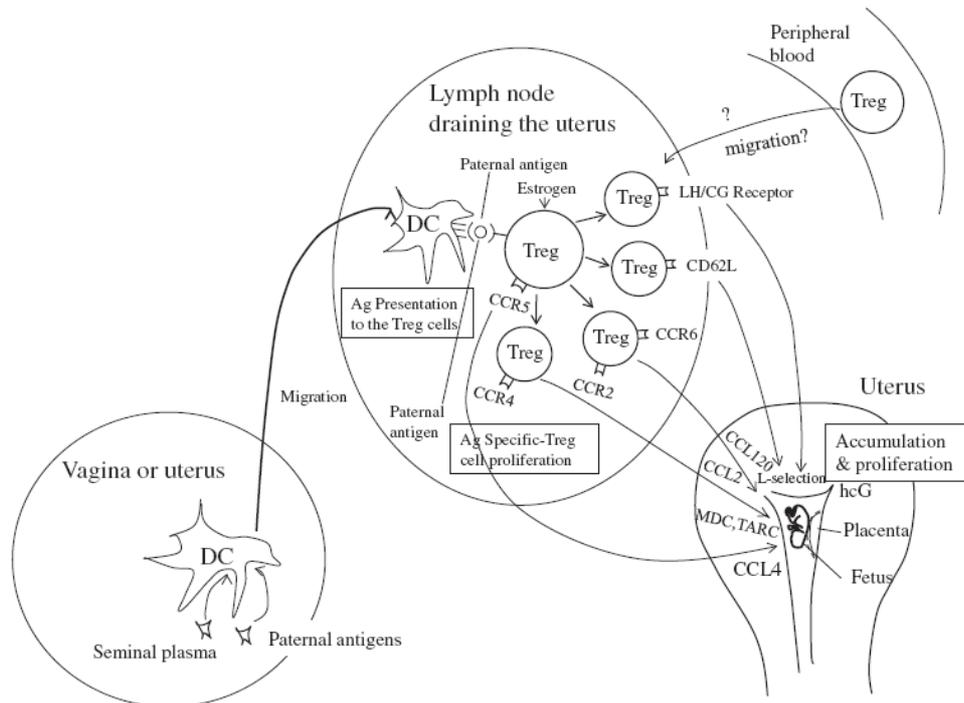


Abb 19 Modell für Expansion, Proliferation und Mobilisation der T_{reg} von der Vagina zum schwangeren Uterus. Als ersten Schritt nehmen DCs paternale Antigene auf und migrieren zu den Uterus-drainierenden Lymphknoten. Die DCs präsentieren die paternalen Antigene den T_{reg} , welche vor der Implantation proliferieren. Diese paternal - Antigen-spezifischen T_{reg} wandern in den schwangern Uterus durch Chemokine und HCG angelockt ⁽¹²⁴⁾

HLA-G ist ein nicht klassisches Klasse Ib Antigen und agiert als ein Peptid-präsentierendes Molekül. Es besitzt starke immuninhibierende Eigenschaften und gilt als Mediator der Immuntoleranz, besonders in immunprivilegierten Geweben, wie Trophoblast oder Thymus. Es ist in der Lage die Proliferation allogener T-Zellen ^{(125); (126); (127); (128)} NK-Zellen ^{(129); (130); (131); (132)} und antigen-spezifische Zytotoxizität von T-Zellen ^{(133); (134)} zu inhibieren. HLA-G Moleküle werden nach Transplantationen ^{(135); (136)} und während MLRs ^{(127); (137)} induziert. T-Zellen sind in der Lage lösliche HLA-G (sHLA-G) zu sezernieren, welches die Akzeptanz von Allografts erhöht. Es wurde eine kleine Subpopulation von T_{reg} gefunden, welche positiv für HLA-G ist und stark supprimierende Eigenschaften besitzt ⁽¹³⁸⁾. Dies ist ein Ansatz der die MHC-unabhängige Verteilung von T_{reg} in den vorliegenden Ergebnissen erklärt, aber weiterer Forschung bedarf.

Table I Th1/Th2/Th17 and Treg Cells in Normal Pregnancy and Abortion

	Normal pregnancy		Abortion		Depletion of Th1, Th2, Th17 or Treg cells
	Peripheral blood	Uterus	Peripheral blood	Uterus	
Th1 cells	↘	↓	↗ →	↑ →	Abortion is not observed.
Th2 cells	↗	↑	→	↓ → ↑ (conflict data)	Abortion is not observed.
Th17 cells	→ ↘	↗	→ ↗	→ (missed abortion) ↑ (inevitable abortion) ↑ (recurrent abortion: inevitable abortion)	There is no data, but IL-17 null mice are fertile.
Treg cells	↑	↑↑	→	→	Abortion and implantation failure are observed in allogeneic pregnancy.

→ : no change, ↗ : slightly elevate, ↑ : elevate, ↑↑ : markedly elevate, ↘ : slightly decrease, ↓ : decrease.

Tabelle 3 Verteilung der T-Zell-Suptypen bei normalen Schwangerschaften und Aborten ⁽¹²⁴⁾

4.4. Auszucht-Maus-Modell und MLR

4.4.1. Maus-Modell

Nachdem C57BL/6 (MHC H2k^{bb}) mit DBA/1 (MHC H2k^{9q}), sowie Balb/c (MHC H2k^{dd}) und CBA/J (MHC H2k^{kk}) Mäuse gekreuzt wurden, ergab sich die Möglichkeit MHC-heterozygote Tiere mit entgegengesetztem MHC (zum Beispiel bq gegen dk) auszuwählen. Es wurde die einfache Methode des FACS mit verschiedenen Fluorochromen (PE und FITC) genutzt, um die Subpopulationen der Lymphozyten zu unterscheiden. Zusätzlich ist das heterozygote Mausmodell eine Möglichkeit, die komplexen Gegebenheiten im menschlichen System zu simulieren.

Durch die Erzeugung eines Mausmodells mit bekannten MHC-Haplotypen, ist die komplexe Differenzierung zwischen parentalen und filialen Lymphozyten mittels FiSH-Markern nicht mehr notwendig. Außerdem ist die Einschränkung, die MLRs nur mit Zellen von unterschiedlichen Geschlechtern zu bestücken, aufgehoben.

4.4.2. MLR der P- und F2-Generation

Die MLR der P-Generation zeigt, dass die immunologischen Eigenschaften der verschiedenen Inzuchtstämme das Ergebnis der MLR signifikant beeinflussen.

In den MLRs zwischen den Inzuchtstämmen zeigte sich eine deutliche Imbalance. Um den Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse möglichst gering zu halten, wurden die MLRs zwischen jeweils gleichgeschlechtlichen Tieren durchgeführt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nach 144 h erwartungsgemäß eine Verschiebung des Gleichgewichtes zu Gunsten der Th₁-gewichteten Stämme (C57BL/6 und CBA/J) auftritt. Da eine Th₂-Antwort bislang als vorteilhaft in Bezug auf erfolgreiche Schwangerschaften galt, müssten die in der MLR schwächer reagierenden Stämme die fruchtbareren sein. Unsere Untersuchungen widerlegen diese These (vgl. Nachkommenszahlen der Inzuchtstämmen)⁽¹³⁹⁾.

Die MLR-Ergebnisse der F2-Generationen mit den Kombinationen der H2K-Phenotypen entsprechend der P-Generation (H2Kb x H2Kq; H2Kd x H2Kk) zeigten eine ausgeglichene, balancierte Proliferation der CD8⁺-Lymphozyten. Dies beweist, dass die Proliferation der Lymphozyten unabhängig vom H2K-Phenotyp der in Kultur gebrachten Tiere ist. Andere Eigenschaften der P-Generation, also der Inzuchtstämmen, sind hierfür verantwortlich. Der genetische Hintergrund der Tiere der F2-Generation wurde durch die Kreuzung über zwei Generationen gut gemischt und der Einfluss inzuchtbedingter Immuneigenschaften damit aufgehoben.

4.4.3. Bidirektionale MLR zwischen Eltern-Tieren und ihren Nachkommen

Wie schon in früheren Untersuchungen beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die mixed Lymphocyte reaction (MLR) zwischen elterlichen Lymphozyten und denen ihrer erwachsenen Kinder auch bei Mäusen unbalanciert ist^{(66); (67); (68)}.

In diesen vorangegangenen Voruntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Verschiebung der MLR zwischen Eltern und ihren Neonaten und erwachsenen Kindern beim Menschen, auf aktivierte zytotoxische CD8⁺-Lymphozyten zurückzuführen ist⁽¹⁴⁰⁾. Der Suppression parentaler CD8⁺CD69⁺-Lymphozyten scheinen unterschiedliche Mechanismen durch erwachsene und neonatale Zellen zugrunde zu liegen. So waren mehr neonatale CD8⁺-Lymphozyten bereits vor der Inkubation aktiviert, welches die

Imbalance der MLR auch nach Inkubation in Bezug auf CD8⁺CD69⁺ mit mütterlichen Lymphozyten erklärt⁽¹⁴¹⁾. Da dieser Effekt nicht bei Inkubation von väterlichen mit neonatalen Lymphozyten auftrat, besitzen mütterliche Zellen wohl eine geringe Kapazität der Aktivierung von CD8⁺ gegen ihre Neugeborenen⁽¹⁴²⁾. Wurden Lymphozyten erwachsener Kinder und ihrer Eltern inkubiert, zeigte sich eine erhöhte Aktivierung von kindlichen CD8⁺-Lymphozyten. Die unterschiedliche Aktivierung der CD8⁺-Lymphozyten scheint also einen anderen zugrunde liegenden Mechanismus aufzuweisen. Eine mögliche Erklärung sind aktivierte CD8⁺-T_{reg}^{(143); (144)} oder unbekannte Oberflächeneigenschaften der Lymphozyten, sowie eine vererbte Immunität beim Menschen. Da diese Untersuchungen mittels FisH-Analyse durchgeführt wurden, konnten nur getrenntgeschlechtliche Kombinationen, also Vater vs. Tochter und Mutter vs. Sohn untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Kontrollen bestätigen, dass MLRs zwischen unverwandten Tieren für mindestens 6 Tage ausgeglichen sind⁽¹⁴¹⁾.

Es wurden F2- und F3-Generationen verwandt, sowie ein Mismatch bezüglich des MHC erzeugt. Die Kultur der CD8⁺/CD69⁺-Lymphozyten ist zugunsten der Lymphozyten der Eltern-Tiere verschoben. Signifikant waren die Ergebnisse, wenn maternale gegen erwachsene Nachkommen-Lymphozyten reagierten und paternale gegen ihre „Töchter“ getestet wurden. Interessanterweise war die Kultur aber zwischen „Vätern“ und ihren männlichen Nachkommen ausgeglichen.

4.4.4. Gibt es zwischen Eltern und ihren Nachkommen eine MHC-vermittelte Immunität?

Während der Schwangerschaft gibt es viele Einflussfaktoren die für den Erhalt und den Erfolg eine Rolle spielen. Viele Forschungsergebnisse der letzten Jahre widerlegen den zunächst als überragend angesehenen Einfluss des MHC.

Jean et al fanden bei der Verpaarung von MHC identischen und haploidenten Mausstämmen heraus, dass Minorhistokompatibilitätsantigene der möglicherweise entscheidende Faktor für immunbedingte Aborte sein können und nicht, wie häufig vermutet, paternale Antigene⁽¹⁴⁵⁾.

Voruntersuchungen konnten belegen, dass die Immunität zwischen Eltern und ihren Kindern auch im Erwachsenenalter eine andere als zwischen Fremden und nicht ausschließlich MHC-vermittelt ist. In bidirektionalen MLRs dominierten die Lymphozyten von männlichen Neugeborenen bereits nach 72 Stunden über die mütterlichen Lymphozyten. Dies wurde durch eine Hemmung der Proliferation der mütterlichen Lymphozyten durch neonatale erreicht, sowie eine gesteigerte spontane Zytotoxizität neonataler Lymphozyten ⁽⁶⁶⁾. Auch zwischen erwachsenen Kindern und ihren Eltern ist die Immunantwort, in Bezug auf Proliferation, Zytotoxizität und Apoptose-Induktion, schwächer als gegenüber Fremden ⁽⁶⁷⁾.

Für die unterschiedliche Immunantwort von Vätern und Müttern gegenüber ihren Kindern muss der Kontakt des mütterlichen Immunsystems mit Antigenen der Nachkommen in Betracht gezogen werden. Die Dominanz der mütterlichen Lymphozyten ist durch einen Immunisierungseffekt während der Schwangerschaft erklärbar. Es ist bewiesen, dass ein bidirektionaler Zellaustausch zwischen Mutter und Fetus in der Plazenta während der Schwangerschaft stattfindet ⁽¹⁴⁶⁾. Die Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem Fetus ist Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht vollständig aufgeklärt. Diese „Immunisierung“ findet bei Vätern aufgrund des fehlenden Kontaktes während einer Schwangerschaft nicht statt. Deshalb sind die Imbalancen in den MLRs zwischen paternalen und filialen Lymphozyten hiermit nicht zu erklären.

Lokale ebenso wie systemische Faktoren führen zu dieser Immuntoleranz während einer Schwangerschaft. Plazentagewebe, wie Decidua oder Zytotrophoblast, können aktiv eine Abstoßung des Fetus durch die Mutter verhindern, indem sie immunsuppressive Faktoren produzieren, welche lokal Reaktionen gegen den fetalen HLA-Komplex oder andere Antigene verhindern. B-Lymphozyten, welche spezifisch für väterliche MHCs sind, werden während einer Schwangerschaft durch Milz und Knochenmark aus dem mütterlichen Körper entfernt. Dieser Effekt beginnt etwa in der Mitte der Schwangerschaft und konnte, allerdings nur bis zur Geburt, nachgewiesen werden ⁽¹⁴⁷⁾. Ein vorübergehender Zustand der Toleranz wird auch durch mütterliche T-Zellen, welche gegen väterliche Alloantigene reaktiv sind, erzeugt ⁽³⁸⁾. Die T-Zell-Phenotypen und ihre Reaktionsfreudigkeit werden nach der Entbindung wieder hergestellt. In vitro führten regulatorische T-Zellen zu einer Hyporeaktivität von Mutter und Neugeborenen

gegeneinander. Sie spielen bei der Unterdrückung der alloreaktiven Immunantwort gegenüber dem Fetus während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle ^{(148); (59); (117); (149); (150)}. Dennoch können fetale Vorläuferzellen und Mikrochimerismen mütterlichen Ursprungs für eine lange Zeit in immunkompetenten Individuen nachgewiesen werden ^{(151); (42)}.

In diesem experimentellen Setting waren die Filialgenerationen älter als 12 Wochen und hatten somit ein vollständig entwickeltes Immunsystem. Deshalb sind die schwangerschaftsbedingten Veränderungen keine Erklärung für ihre abgeschwächte Reaktion gegenüber den Eltern.

Würde das Y-Chromosom eine große Rolle spielen, so müssten Lymphozyten weiblicher Kinder eine erhöhte Reaktion gegen die väterlichen Lymphozyten zeigen. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen jedoch eine genau entgegengesetzt gerichtete Reaktion. Dies kann nicht mit gängigen Immun-Modellen erklärt werden. Möglicherweise kommt Minorhistokompatibilitäts-Antigenen in der Immuntoleranz zwischen Eltern und ihren Kindern eine größere Bedeutung zu.

4.5. Menschliche Probanden

Die Resultate in der menschlichen one-way-MLR zeigen dieselbe Tendenz, nämlich eine erhöhte Immunantwort der Väter gegenüber ihren Söhnen und umgekehrt. Interessant ist, dass dieser Effekt erst ab Tag acht der MLR zu beobachten war. Dies mag dazu geführt haben, dass die Reaktion zwischen Vater und Söhnen so lange unentdeckt blieb, denn normalerweise werden MLRs nur über sechs Tage kultiviert. Auch nach Durchsuchen aller verfügbaren Daten in Deutschland, blieb nur eine kleine Fallzahl, in welchen Transplantationskandidaten und ihre Kinder, die für eine mögliche Transplantation mittels MLR über acht Tage getestet wurden. Voraussetzung waren HLA-identische Nachkommen mit getrenntem Geschlecht. Auch zum getesteten Elternteil bestanden nur geringe Mismatches. Auffallend war, dass Unterschiede in den Ergebnissen bestanden, wenn väterliche Lymphozyten als Stimulator bzw. als

Responder dienten. Wäre der HLA der einzige Grund für den Shift der Population in Richtung der väterlichen Lymphozyten, hätte die Population der Söhne, im Vergleich zu den Töchtern, abgeschwächt reagieren müssen, wenn väterliche Zellen als Stimulator dienten. Insgesamt ist allerdings die Reaktion der Nachkommen als Responder geringer gegenüber ihren Vätern oder Müttern, als umgekehrt. Diese Reaktion ist analog zu der im Mausmodell, obwohl dort der H2K der Mausstämme als Unterscheidungsmerkmal der Populationen genutzt wurde und selbst eine Reaktion der jeweiligen Lymphozyten ausgelöst haben könnte. Es ist eine Tendenz zu erkennen, welche auf einen MHC-unabhängigen Mechanismus schließen lässt. Eine Signifikanz konnte bei einer zu geringen Fallzahl nicht erreicht werden.

Die vorliegenden Daten deuten einen geschlechtsspezifischen Unterschied der Immunantwort von Vätern gegenüber ihren Nachkommen an. Dieses Phänomen konnte bei mütterlichen Lymphozyten nicht beobachtet werden.

Es gibt Hinweise dafür, dass nicht nur der MHC eine wichtige Rolle in der Transplantationsimmunologie spielt, sondern auch das Geschlecht von Spender und Empfänger⁽¹⁵²⁾.

So genannte NIMA (noninherited maternal antigens)-mismatches scheinen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Knochenmarkspende zwischen haploidentischen Geschwistern zu spielen. Denn die Rate von akuten GvHD ist geringer als bei NIPA-mismatches (NIPA- noninherited paternal antigen). Weiterhin fanden Rood et al heraus, dass nach einer Knochenmarktransplantation von Mutter zu Kind in den ersten 4 Monaten ein signifikant geringeres Risiko für eine chronische GvHD besteht, als bei Vater zu Kind Transplantationen. Die Behandlungsbedingte Sterblichkeit war nach Knochenmarkspenden durch haploidente Geschwister mit NIMA-mismatch am geringsten⁽¹⁵³⁾. Mariko et al fanden heraus, dass es low- und high-Responder im Bezug auf NIMA-Antigene nach einer Transplantation gibt. Einen entscheidenden Einfluss hatten auch hier T_{reg} auf die Vorhersage der Toleranz⁽¹⁵⁴⁾. Spenden zwischen HLA-identischen Geschwistern haben das beste Outcome⁽¹⁵⁵⁾.

Die zugrunde liegenden Mechanismen, sowohl bei der Transplantation solider Organe, als auch in der Stammzelltransplantation und den unterschiedlichen Erfolgen und

Überlebensaussichten der Empfänger von geschlechtsverschiedenen Organen sind nicht geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

4.6. Experimentelle Fehlerquellen

Die *in vitro* vorgefundenen Reaktionen sind nicht vollständig auf die Verhältnisse *in vivo* zu übertragen, daher besteht eine eingeschränkte Beurteilbarkeit aller Versuchsgruppen. Durch die Anlage von spezifisch und unspezifisch stimulierten Kontrollen, ist die Wahrscheinlichkeit der Kontamination und deren Einfluss auf die Ergebnisse gering, da alle fraglich vitalen Kulturansätze sofort erkannt und aus der Untersuchung genommen wurden.

Die Auswahl der Mausstämme nimmt ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse. Vogelsang et al. zeigten, dass es Unterschiede zwischen verschiedenen Inzuchtmausstämmen in Bezug auf DCs, sowie T_{reg} -Lymphozyten im Blut und der Milz von Balb/c und C57/BL/10J gibt ⁽¹⁵⁶⁾. Dies bestätigt, dass der genetische Hintergrund der Mausstämme eine Rolle in der Entwicklung unterschiedlicher immunologisch verbundener Zell-Subtypen und wahrscheinlich auch ihrer Zytokin-Produktion spielt. Da Mausstämme in ihren Zytokinprofilen als Th_1 - oder Th_2 -gewichtet beschrieben werden, sind ihre Reaktionen auf gleiche Stimuli unterschiedlich, wie z.B. bei der künstlichen Induktion von Asthma ⁽⁸³⁾.

Obwohl die Methodik im Menschen mit der Bestimmung eines Stimulationsindex als veraltet gilt, war es nicht möglich andere Datenbanken mit ähnlichen MLR-Ansätzen für Transplantationskandidaten und ihren leiblichen, HLA-identischen und getrenntgeschlechtlichen Nachkommen für unsere Experimente zu aquirieren. Die Ergebnisse sind nicht signifikant, aber es ist eine Tendenz zu erkennen. Die Daten der Mausversuche sind dieser Tendenz gleichgerichtet.

Außerdem ist kritisch anzumerken, dass bei den menschlichen Transplantationskandidaten und deren Nachkommen unidirektionale MLRs, bei den

Mausexperimenten hingegen bidirektionale durchgeführt wurden. Diese sind nicht unmittelbar miteinander vergleichbar.

4.7. Klinische Aspekte

4.7.1. Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft

Bei jedem Individuum werden zwei Allele (ein mütterliches und ein väterliches) für jeden HLA-Genort exprimiert. Somit sind Eltern und ihre Kinder jeweils haploidentisch (zur Hälfte gleich). Bei einer Transplantation sollen die HLA-Antigene von Spender und Empfänger eine weitestgehende Übereinstimmung (sharing) bzw. möglichst wenige Differenzen (mismatch) zeigen, da allogene HLA-Allele Zielstrukturen für immunologische Abstoßungsreaktionen sind.

Im Menschen werden auf fötalen Trophoblasten der Plazenta vor allem HLA-G und HLA-E exprimiert. Daher nimmt man an, dass die beiden Moleküle die Toleranz gegenüber maternalen NK-Zellen der Decidua vermitteln. Etwa 70 % der hämatopoetischen Zellen in der Decidua sind große granuläre NK-Zellen (LGL). Diese können nach IL-2 Stimulation Trophoblasten lysieren ^{(157); (158)}. Die Expression von HLA-G scheint jedoch nicht essentiell für das Überleben des Fötus zu sein, da Individuen identifiziert wurden, die homozygot für ein HLA-G-Null Allel sind ⁽¹⁵⁹⁾.

Der bisher am eindeutigsten definierte Mechanismus zur Erhaltung einer allogenen Schwangerschaft, ist die Inhibition von T-Zellen durch den Entzug von Tryptophan in der Plazenta.IDO wird in der humanen Plazenta von Syncytiotrophoblasten (Gigantenzellen) ⁽¹⁶⁰⁾ und im Maus-Fötus ab Tag 9,5 exprimiert (ab Tag 10,5 nur in der Plazenta) ⁽³⁷⁾. Beim Menschen wird während der Schwangerschaft eine systemische Reduktion des Tryptophanspiegels im Plasma gefunden ⁽¹⁶¹⁾. Um zu testen, ob IDO eventuell die Toleranz gegenüber dem allogenen Fötus verursacht, behandelten Munn et al ⁽¹⁶²⁾ syngen und allogenen verpaarte, schwangere Mäuse ab Tag 4,5 mit einem IDO-Inhibitor (1-Methyl-Tryptophan). In allen allogenen Verpaarungen führte die Behandlung ab Tag acht zu einer progressiven Entzündung und Infiltration von Monozyten mit nachfolgender Degeneration der Föten. In syngen Verpaarungen kam es zu keiner Entzündung und zu normalen Würfen. Auch die Schwangerschaft mit Föten, die nur ein

allogenes MHC I-Transgen auf Trophoblasten exprimierten, führte zum Abort ⁽³⁷⁾. Föten, die nur Minor-Alloantigene (genetischer nicht- MHC-Hintergrund) trugen, wurden, je nach genetischer Distanz, von der Mutter abgestoßen ⁽¹⁶³⁾. Diese Daten zeigen, dass der Fötus, wenn die Tryptophanblockade aufgebrochen ist, wie ein normales Transplantat abgestoßen wird.

4.7.2. Graft versus Host Disease (GvHD)

Die transplantierten T-Lymphozyten des Spenders greifen die als „fremd“ erkannten Organe des Empfängers an und zerstören diese. Die Schwere der GvHD hängt wesentlich von der Konditionierungstherapie (Bestrahlung/Chemotherapie) und von den Gewebemerkmale von Spender und Empfänger ab ^{(164); (165)}. Das durch die Konditionierungstherapie vorgeschädigte Gewebe wird durch differenzierte Spender-T-Effektorzellen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen zerstört. Edinger et al ⁽¹⁶⁶⁾ fanden heraus, dass regulatorische T-Zellen die frühe Expansion alloreaktiver Spender-T-Zellen hemmen und somit die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer GvHD mindern. Nach allogener Stammzelltransplantation erleiden bis zu 30 % aller Patienten mit HLA-identischen Spenderzellen bzw. sogar bis zu 90 % aller Empfänger nicht verwandter Spenderzellen eine GvHD ⁽¹⁶⁷⁾. Unabhängig vom Spender kommt es bei 20-50 % aller transplantierten Personen trotz vorbeugender immunsuppressiver Therapie zu einer GvHD Grad 2 oder schwereren Verlaufsformen ⁽¹⁶⁸⁾. Um dem Auftreten einer GvHD vorzubeugen, werden derzeit Immunsuppressiva eingesetzt, die ihrerseits wiederum viele Nebenwirkungen mit sich bringen oder zu sekundären, nicht kontrollierbaren Tumoren führen ^{(169); (170), (171)}.

4.7.3. Organ- und Stammzelltransplantation

Das Th₁/Th₂ Paradigma geht von den beiden Extremen einer großen Bandbreite der Zytokinproduktion während der Immunreaktion aus. Jedes Zytokin kann abhängig von der Konzentration der stimulierten Zellart und dem Zeitpunkt während der

Immunantwort verschiedene Auswirkungen haben. Bedeutende Einflüsse auf das Langzeitüberleben von Organen haben ebenfalls antigenpräsentierende Zellen und costimulierende Signale. Da Immunsuppressiva sowohl die Th₁-, als auch die Th₂-Antworten blockieren, muss davon ausgegangen werden, dass der Erfolg dieser Medikamente vor allem in der Blockade der costimulierend wirkenden Wege liegt⁽¹⁷²⁾.

Es ist bekannt, dass HLA-Kompatibilität einen guten prognostischen Faktor bei der Stammzelltransplantation darstellt⁽¹⁷³⁾. Spenden Verwandte, so wurde ein besseres Outcome, als bei unverwandten Spendern beobachtet⁽¹⁷⁴⁾. Aber auch das Geschlecht der Spender scheint von Bedeutung zu sein. Gahrton et al⁽¹⁷⁵⁾ fanden bei der Transplantation von Patienten mit Multiplem Myelom einen Graft vs. Myelom-Effekt, wenn männlichen Empfängern hämatopoetische Stammzellen von weiblichen HLA-identischen verwandten Frauen transplantiert wurden. Allerdings konnte in dieser Gruppe auch eine erhöhte Rate an chronischer GvHD und eine höhere transplantationsassoziierte Mortalität registriert werden. Als Ursache wurden Spender T-Zellen identifiziert, die spezifisch für das Empfänger minor-Histokompatibilitäts-Antigen (H-Y) waren. Diese zytotoxischen T-Zellen der weiblichen Spender könnten das Resultat früherer Schwangerschaften sein und waren dann bereits vor der Transplantation vorhanden. In dieser Studie zeigten allerdings weibliche Empfänger von weiblichen verwandten Stammzellen mit Abstand die besten Langzeitergebnisse. Auch Gregory et al⁽¹⁷⁶⁾ fanden als statistisch signifikanten Risikofaktor das Spender-Geschlecht. So hatten männliche Empfänger, die weibliches Knochenmark transplantiert bekamen, ein erhöhtes Risiko auch noch zwei Jahre nach erfolgreicher Transplantation zu versterben.

Am Vorbild von Mikrochimerismen, wie sie bei der Schwangerschaft entstehen und im immunkompetenten Organismus über Jahre fortbestehen können und Toleranz induzieren, orientierten sich Trivedi et al⁽¹⁷⁷⁾. Sie behandelten Empfänger von Lebendnierspendsen, welche von Verwandten stammten, mit einer Transplantation von Nierengewebe in den Thymus, zwei Spender-Transfusionen, sowie high-dose hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) vor der anschließenden Nierentransplantation. Spenderspezifische zytotoxische Antikörper wurden mittels intravenösen Immunglobulinen und Plasmapherese eliminiert. Gemischte Chimerismen waren in Mutter-zu-Kind-Transplantationen vorbestehend, in allen anderen nicht vorhanden. Durch endotheliale Spenderzellen, die reich an MHC II waren, konnten direkt nach dieser Implantation spenderspezifische T_{regs} nachgewiesen werden. Auch

konnten die Immunsuppressiva in der so behandelten Gruppe, eher abgesetzt werden, als in der Kontrollgruppe.

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte die Bedeutung des Geschlechts in der Transplantationsimmunologie bestätigt werden. Engste Verwandte gelten heute als die Patientengruppe, mit den besten Erfolgsaussichten nach einer Transplantation. Aber auch hier müssen in Zukunft die auslösenden Mechanismen für die unterschiedlichen Reaktionen zwischen Vätern und ihren Kindern untersucht werden um mögliche Organverluste zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

Zwischen Eltern und ihren Kindern besteht eine Immuntoleranz, die sich von der zwischen Fremden unterscheidet. Mixed Lymphocyte Reaktionen (MLRs) zeigten eine spezifische Reaktion zwischen erwachsenen Kindern und ihren Eltern im Menschen. Hierbei wurde in FISH-Analysen das Y-Chromosom als Differenzierungsmarker verwendet, weshalb es nur möglich war getrenntgeschlechtliche Kombinationen zu untersuchen. Daher wurde ein outbred-Maus-Modell etabliert und dieser Effekt auch bei gleichgeschlechtlichen Kombinationen (z.B. Vater vs. Sohn) überprüft. Außerdem wurde der Einfluss des MHC auf die Reproduktivität der Mausstämme, sowie des MHC der Elterntiere auf das Vorkommen und die Verteilung von T_{reg} -Lymphozyten während der Schwangerschaft untersucht. Es zeigte sich, dass der MHC keinen Einfluss auf die Reproduktivität hat, aber die Allogenetität die Nachkommenzahl erhöht. Die Anzahl der T_{reg} ist ebenso unabhängig vom MHC der verpaarten Tiere. Bidirektionale MLRs wurden im Maus-Modell durchgeführt, welche mittels FACS-Analyse und MHC-mismatch eine signifikante Mehrproliferation maternaler $CD8^+$ -Lymphozyten gegenüber ihren Nachkommen zeigten. Väterliche Lymphozyten waren nach Co-Kultur mit weiblichen, allerdings nicht mit männlichen Nachkommen, erhöht.

Retrospektiv fand sich eine kleine Anzahl von Familienuntersuchungen infolge notwendiger Knochenmarktransplantationen, bei denen eine MLR-Kinetik, das heißt eine unidirektionale MLR über 8 Tage durchgeführt wurde. Auch in den unidirektionalen MLRs der menschlichen Blutproben gab es eine geschlechtsspezifische Alloreaktivität der paternalen Lymphozyten gegenüber Töchtern bzw. Söhnen. Hieraus kann geschlossen werden, dass es eine geschlechtsspezifische, vererbte Immunreaktion zwischen Vätern und ihren Söhnen gibt. Dieses Phänomen gilt es in weiteren Studien genauer zu untersuchen.

6. Literaturliste

1. **Allcock, R.J., Martin, A.M. and Price, P.** The mouse as a model for the effects of MHC genes on human disease. *Immunol Today*, 21, 328-32. 2000.
2. **Snell, G.D.** Methods for the study of histocompatibility genes. *J.Genetics*, 49, 87-108. 1948.
3. **Benoist, C. and Mathis, D.** Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. . *Annu Rev Immunol*, 8, 681-715. 1990.
4. **Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 15. Jun 2000, 164 (12), S. 6166-73.
5. **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1. April 1986, 136(7), S. 2348-57.
6. **Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM.** Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*. 1. Jan 1989, 169(1), S. 59-72.
7. **Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1. Dec 1989 , 170(6), S. 2081-95.
8. **Anasetti C, Hansen JA.** Marrow transplantation in cancer therapy. . *Tohoku J Exp Med* 1992 Oct;168(2):333-43. 1992.
9. **Duran-Struuck R, Dysko RC.** Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. . *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009 Jan;48(1):11-22. 2009.
10. **(DRST)., Deutsches Register für Stammzelltransplantationen.** *Deutsches Register für Stammzelltransplantation*. <http://www.drst.de/download/jb2012.pdf> : DRST, 2012.
11. **Safdar A, Rodriguez GH, Mihiu CN, Mora-Ramos L, Mulanovich V, Chemaly RF et al.** Infections in non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation patients with lymphoid malignancies: spectrum of infections, predictors of outcome and proposed guidelines for fungal infections prevention. *Bone Marrow Transplant* 2010, 45(2):339-347. 2010.
12. **Tuthill M, Chen F, Paston S, De La PH, Rusakiewicz S, Madrigal A.** The prevention and treatment of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation. . *Cancer Immunol Immunother* 2009 Sep;58(9):1481-8. 2009.
13. **Dazzi F, Foza C.** Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: risk factors and treatment. . *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Jun;20(2):311-27. 2007.
14. **Kornacker M, Stumm J, Pott C, Dietrich S, Sussmilch S, Hensel M, et al.** Characteristics of relapse after autologous stem-cell transplantation for follicular lymphoma: a long-term follow-up. *Ann Oncol* 2009 Apr;20(4):722-8. 2009.
15. **Lai YH, Chang CS, Liu YC, Liu TC.** Postallogeneic hematopoietic stem cell

transplantation relapse of acute myeloid leukemia presenting with salivary gland myelosarcoma. . *AnnHematol* 2010; 89(6):631-633. 2010.

16. **Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL.** GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. . *Biol Blood Marrow Transplant* 2009 Jan;15(1 Suppl):162-8. 2009.

17. **Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al.** Recipienttype specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graftversus- host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(11):1688-96. 2003.

18. **Stelljes M, Strothotte R, Pauels HG, Poremba C, Milse M, Specht C, et al.** Graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces a CD8+ T cellmediated graft-versus-tumor effect that is independent of the recognition of allogeneic tumor targets. *Blood* 2004 Aug 15;104(4):1210-6. 2004.

19. **Pulaiev RA, Puliaeva IA, Ryan AE, Via CS.** The Parent-into-F1 Model of Graft-vs-Host Disease as a Model of In Vivo T Cell Function and Immunomodulation. . *Curr Med Chem Immunol Endocr Metab Agents* 2005 Dec 1;5(6):575-83. 2005.

20. **Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S.** Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. . *J Exp Med* 2002 Aug 5;196(3):389-99. 2002.

21. **Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al.** Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005 Mar 1;105(5):2220-6. 2005.

22. **Yang J, Gao L, Liu Y, Ren Y, Xie R, Fan H et al.** Adoptive therapy by transfusing expanded donor murine natural killer T cells can suppress acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. . *Transfusion* 2010; 50(2):407-417.). 2010.

23. **Cornell LD, Smith RN, Colvin RB.** Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol* 2008;3:189-220. 2008.

24. **Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W.** Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2008 May;14(5):688-94. 2008.

25. **Uber WE, Self SE, Van Bakel AB, Pereira NL.** Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation. . *Am J Transplant* 2007 Sep;7(9):2064-74. 2007.

26. **Billingham, R.E. and Medawar, P.B.** Actively acquired tolerance of foreign cells. . *Nature*, 172, 603-606. 1953.

27. **Beer, A.E. and Billingham, R.E.** Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. . *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 21, 59-88. 1974.

28. **Chatterjee-Hasrouni, S. and Lala, P.K.** Localization of paternal H-2K antigens on murine trophoblast cells in vivo. . *J Exp Med*, 155, 1679-89. 1982.

29. **Hedley, M.L., Drake, B.L., Head, J.R., Tucker, P.W. and Forman, J.** Differential expression of the class I MHC genes in the embryo and placenta during midgestational development in the mouse. . *J Immunol*, 142, 4046-53. 1989.

30. **Braud, V.M., Allan, D.S. and McMichael, A.J.** Functions of nonclassical MHC and non-MHC encoded class I molecules. . *Curr Opin Immunol*, 11, 100-8. 1999.
31. **King, A., Boocock, C., Sharkey, A.M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A.G. and Loke, Y.W.** Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. . *J Immunol*, 156, 2068-76. 1996.
32. **Chatterjee-Hasrouni, S. and Lala, P.K.** MHC antigens on mouse trophoblast cells: paucity of Ia antigens despite the presence of H-2K and D. . *J Immunol*, 127, 2070-3. 1981.
33. **Natali, P.G., De Martino, C., Pellegrino, M.A. and Ferrone, S.** Analysis of the expression of IAk- like antigens in murine fetal and adult tissues with the monoclonal antibody 10-2.16. . *Scand J Immunol*, 13, 541-6. 1981.
34. **Wood, G.W.** Is restricted antigen presentation the explanation for fetal allograft survival? . *Immunol Today*, 15, 15-8. 1994.
35. **Chaouat, G.** *Immunology of pregnancy*. 1993.
36. **Clark, D.A., Slapsys, R.M., Croy, B.A. and Rossant, J.** Immunoregulation of host-versus graft responses in the uterus. . *Immunology Today*, 5, 111-115. 1984.
37. **Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A.L.** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism [see comments]. . *Science*, 281, 1191-3. 1998.
38. **Tafari, A., Alferink, J., Moller, P., Hammerling, G.J. and Arnold, B.** T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*, 270, 630-3. 1995.
39. **Cross, J.C., Werb, Z. and Fisher, S.J.** Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. . *Science*, 266, 1508-18. 1994.
40. **Bonney, E.A. and Matzinger, P.** The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. . *J Immunol*, 158, 40-7. 1997.
41. **Herzenberg, L.A., Bianchi, D.W., Schroder, J., Cann, H.M. and Iverson, G.M.** Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1453-5. 1979.
42. **Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA.** Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, S. 93(2):705-8.
43. **Piper KP, Mc Larnon A, Arrazi J, Horlock C, Ainsworth J, Kilby MD, Martin WL, Moss PA.** Functional HY- specific CD8+ T cells are found in a high proportion of woman following pregnancy with a male fetus. *Biol Reprod*. Jan 2007, 76(1), S. 96-101.
44. **Beer, A.E. and Billingham, R.E.** Maternally acquired runt disease. . *Science*, 179, 240-3. 1973.
45. **Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, Nelson JL.** Microchimerism of maternal origin persist into adult life. *J Clin Invest*. Jul 1999, 104(1), S. 41-7.
46. **Jacoby, D.R., Olding, L.B. and Oldstone, M.B.** Immunologic regulation of fetal-maternal balance. . *Adv Immunol*, 35, 157-208. 1984.

47. **Bell, S.C. and Billington, W.D.** Major anti-paternal alloantibody induced by murine pregnancy is non-complement-fixing IgG1. . *Nature*, 288, 387-8. 1980.
48. **Chaouat, G., Menu, E., Clark, D.A., Dy, M., Minkowski, M. and Wegmann, T.G.** Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. . *J Reprod Fertil*, 89, 447-58. 1990.
49. **Krishnan, L., Guilbert, L.J., Wegmann, T.G., Belosevic, M. and Mosmann, T.R.** T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J. Immunol*, 156, 653-62. 1996.
50. **Krishnan, L., Guilbert, L.J., Russell, A.S., Wegmann, T.G., Mosmann, T.R. and Belosevic, M.** Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol*, 156, 644-52. 1996.
51. **Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. . *Fontenot, J.D., Gavin, M.Nat Immunol* 4, 330-336. 2003.
52. **S., Sakaguchi.** Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. . *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62. 2004.
53. **Belkaid, Y., and Rouse, B.T.** Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6, 353-360. 2005.
54. **Walsh PT, Taylor DK, Turka LA.** Tregs and transplantation tolerance. . *J Clin Invest* 2004 Nov;114(10):1398-403. 2004.
55. **Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Bocian K, Klosowska D, Niemczyk M, Wyzgal J, et al.** The influence of immunosuppressive therapy on the development of CD4+CD25+ T cells after renal transplantation. . *Transplant Proc* 2007 Nov;39(9):2721-3. 2007.
56. **Velásquez-Lopera MM, Eaton VL, Lerret NM, Correa LA, DeCresce RP, García LF, et al.** Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Transplant Immunology* 2008 May;19(2):127-35. 2008.
57. **McHugh RS, Shevach EM, Thornton AM.** Control of organ-specific autoimmunity by immunoregulatory CD4(+)CD25(+) T cells. *Microbes Infect* 2001 Sep;3(11):919-27. 2001.
58. **Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL.** Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/-) regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol* 2008 Jun;121(6):1460-6, 1466. 2008.
59. **A.C. Zenclussen, K. Gerlof, M. L. Zenclussen, A. Sollwedel, A. Zambon Bertoja, T. Ritter, K. Kotsch, J. Leber, H.-D. Volk.** Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. *American Journal of Pathology*. March 2005, 166, S. 811-22.

60. **Zenclussen, Ana Claudia.** Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immun.* 2006, 28, S. 31-39.
61. **Darasse- Jeze, Klatzmann, Charlotte, Salomon, Cohen.** CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunology Letters.* 2006, 102, S. 106-109.
62. **Ksander, B.R. and Streilein, J.W.** Regulation of the immune response within privileged sites. *Chem Immunol,* 58, 117-45. 1994.
63. **Streilein, J.W.** Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. *Transplant Proc,* 28, 2066-70. 1996.
64. **Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J. and Arnold, B.** Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. . *Science,* 282, 1338-41. 1998.
65. **Brabb, T., von Dassow, P., Ordonez, N., Schnabel, B., Duke, B. and Goverman, J.** In situ tolerance within the central nervous system As a mechanism for preventing autoimmunity [In Process Citation]. . *J Exp Med,* 192, 871-80. 2000.
66. **Brune T, Beier K, Exeler R, Harms E, Louwen F.:** Neonatal lymphocytes dominate against lymphocytes of their own mother but not against allogenic maternal or adult lymphocytes in bidirectional mixed lymphocyte cultures. . *Fetal Diagn. Ther.* 2003; 18:154-159. 2003.
67. **Brune T, Riepe FG, Garritsen H, Exeler R, Louwen F, Harms E.:** The cellular immune response of children is specifically decreased against their parents but not vice versa, independent of pregnancy, age, or HLA or HY antigens. *Am.J Reprod.Immunol;*49:255-260. 2003.
68. **Brune T., Riepe FG, Beier K., Exeler R., Louwen F., Garritsen H.** Differentiation of single populations in a bidirectional mixed lymphocyte culture using X- and Y- chromosome-specific FiSH markers. . *J Immunol Methods.;* 266(1-2):105-10. 2002 Aug 1.
69. **BGBII 1972, 1277.** Tierschutzgesetz. 24. Juli 1972.
70. **k.a.Abk.), Verordnung über Aufzeichnungen über Versuchstiere und deren Kennzeichnung (VersTierAufzKennzV.** V. v. 20.05.1988 BGBI. I S. 639. *aufgehoben durch Artikel 2 V. v. 01.08.2013 BGBI. I S. 3125.*
71. **Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG.** Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol.* 151(9), 1993, S. 4562-73.
72. **Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* 14(7), 1993, S. 353-6.
73. **Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG.** IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol.* 1995, 154(9), S. 4261-8.
74. **Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M,**

- Klapp BF, Arck PC.** The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids*. 68(10-13), 2003, S. 931-40.
75. **Adams B., Nagy N, Paulart F, Vanderhaeghen ML und Goldman M, Flamand V.** CD8+ T lymphocytes regulating Th2 pathology escape neonatal tolerization. *J Immunol*. 15. Nov 2003, 171(10), S. 5071-6.
76. **Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. . *J Exp Med* 1989;170(6):2081-2095. 1989.
77. **Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG.** Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil*. . 89(2):, 1990, S. 447-58.
78. **R., Raghupathy.** Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*. 18(10), 1997, S. 478-82.
79. **Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, Klapp BF, Arck PC.** Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells via substance P. *Am J Reprod Immunol*. 45(5), 2001, S. 303-9.
80. **Zenclussen AC, Fest S, Sehmsdorf US, Hagen E, Klapp BF, Arck PC.** Upregulation of decidual P-selectin expression is associated with an increased number of Th1 cell populations in patients suffering from spontaneous abortions. *Cell Immunol*. 213(2):, 2001, S. 94-103.
81. **Murphy KM, Travers P, Walport M.** *Janeway's Immunobiology*. 7. Auflage ed. 2007.
82. **Kemin Chen, Yongzhong Wei, Gordon C. Sharp and Helen Braley-Mullen.** Mechanisms of Spontaneous Resolution versus Fibrosis in Granulomatous Experimental Autoimmune Thyroiditis. *J Immunol*. 2003, 171, S. 6236-6243.
83. **Vanessa De Vooght.*, Jeroen A. J. Vanoirbeek., Katrien Luyts, Steven Haenen, Benoit Nemery.,** Choice of Mouse Strain Influences the Outcome in a Mouse Model of Chemical-Induced Asthma. *PLoS one*. 2010, S. e12581. doi:10.1371/journal.pone.0012581.
84. **GLEN C. ULETT, 1* NATKUNAM KETHEESAN,2 AND ROBERT G. HIRST1.** Cytokine Gene Expression in Innately Susceptible BALB/c Mice. *INFECTION AND IMMUNITY*. 2000, 68, S. 2034–2042.
85. **Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. . *J Immunol* 2000; 164(12):6166-6173. 2000.
86. **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. . 1986. *J Immunol* 2005; 175(1):5-14. 2005.
87. **Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM.** Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. . *J Exp Med* 1989; 169(1):59-72. 1989.
88. **Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N,**

- Martal J.** A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.* 53(1-2):, 2002, S. 241-56.
89. **Ghaderi D, Springer SA, Ma F, Cohen M, Secrest P, Taylor RE, Varki A, Gagneux P.** Sexual selection by female immunity against paternal antigens can fix loss of function alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108(43), S. 17743-8. .
90. **Beer A.E., Scott J.R. and Billingham R.E.** Histoincompatibility and maternal immunological status as determinants of fetoplacental weight and litter size in rodents. *J. Exp. Med.* . 142, 1975, S. 180-196.
91. **Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, and Haines RF.** Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol.* 1981, 141, S. 987-999.
92. **Beer AE, Semprini AE, Zhu XY, and Quebbeman JF.** Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortions: HLA antigen profiles; HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leukocyte immunization. *Exp Clin Immunogenet,* 2, 137-153. 1985.
93. **Komlos L, Zamir R, Joshua H, and Halbrecht I.** Common Hla Antigens in Couples with repeated abortions. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 1977, 7, S. 330-335.
94. **Humber DP, Mahouy G, Chinn S, Barnes RD.** The influence of parity and maternal preimmunization on fetal survival in mice. *J Reprod Fertil.* 1974, 41(1), S. 193-6. .
95. **Matsuyama T, Kobayashi Y, Honda I, Inoue M, Fujii A.** Analysis of HLA antigens and immunotherapy for infertile couples who failed to conceive after in vitro fertilization-embryo tubal replacement (IVF-ETR). *Zasshi., Nihon Sanka Fujinka Gakkai.* 1992, 44(10), S. 1241-7.
96. **Van Rood JJ, Eernisse JG, and Van Leeuwen A.** Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature.* 1958, 181, S. 1735-1736.
97. **Regan L, Braude PR, and Hill DP.** A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. *Hum Reprod.* 1991, 6, S. 294-298.
98. **Morin-Papunen L, Tiilikainen A, and Hartikainen-Sorri AL.** Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti HLA antibodies in half of multigravidous women. *Med Biol.* 1984, 62, S. 323-325.
99. **Gharesifard B, Zolghadri J, Foroughinia L, Tavazoo F, and Samsami DA.** Effectiveness of leukocyte immunotherapy in primary recurrent spontaneous abortion (RSA). *Iran J Immunol.* 2007, 4, S. 173-178.
100. **Chaichian S, Shoaee S, Saremi A, Pedar S, and Firouzi F.** Factors influencing success rate of leukocyte immunization and anti-paternal antibodies in spontaneous recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2007, 57, S. 169-176.
101. **Margni RA, Malan Borel I.** Paradoxical behavior of asymmetric IgG antibodies. *Immunol Rev.* 163, 1998, S. 77-87.
102. **Margni RA, Zenclussen AC.** During pregnancy, in the context of a Th2-type

cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *Am J Reprod Immunol.* 46(3):, 2001, S. 181-7.

103. **Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R.** Asymmetric antibodies and pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 45(5):, 2001, S. 289-94.

104. **Hamilton BL, Hamilton MS.** Effect of maternal-fetal histoincompatibility on the weight of the fetoplacental unit in mice: the role of minor histocompatibility antigens. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* . 1987, 15(4), S. 153-5. .

105. **Chaouat G, Clark DA, Wegmann TG, Allen WR, Clark DA, Gill TJ, Mowbray JF, Robertson WE, editors.** Genetic aspects of the CBA x DBA/2 and B10 x B10. A model of murine abortion and its prevention by lymphocytes immunisation. *London RCOG Press, Early Pregnancy loss Mechanisms and Treatment.* 1988, S. 89-102.

106. **TG, Wegmann.** Fetal protection against abortion: is it immuno suppression or immuno-stimulation? *Ann Immunol Inst Pasteur.* 1984, 135D, S. 309-311.

107. **Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Jung S.** Uterine DCs are crucial for decidual formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest.* 2008, S. 3954-3965.

108. **Krey G, Frank P, Shaikly V, Barrientos G, Gordo-Russo R, Ringel F, Moschansky P, Chermukhin IV, Metodiev M, Fernandez N, Klapp BF, Arck PC, Blois SM.** In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice. *J Mol Med.* 2008, 86, S. 999-1011.

109. **Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlström AC, Care AS.** Seminal fluid drives expansion of CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod.* 2009, 80, S. 1036-1045.

110. **T, Shima.** Paternal antigen-specific regulatory T cells proliferate in the draining lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation, and are necessary for maintenance of allogeneic pregnancy. *ASRI Annual Meeting.* 2010.

111. **Margni RA, Zenclussen AC.** AmDuring pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *J Reprod Immunol.* 2001, 46(3), S. 181-7. .

112. **Zenclussen AC, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R, Malan Borel I.** Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor serum levels in recurrent spontaneous abortion women immunized with paternal white cells. *Am J Reprod Immunol.* 2000, 44(1), S. 22-9. .

113. **Arruvito L, Billordo, A, Capicchino M, Pada ME, Fainboim L.** IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol.* 2009, 82, S. 158-165.

114. **Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, Thuere C, Wollenberg I, Yagita H, Volk HD, Zenclussen AC.** Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2007, 110(5), S. 1137-45. .

115. **Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, Wafula PO, Fest S, Teles A, Leber A, Casalis PA, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC.** The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010, 63(3), S. 200-8.
116. **Cosmi L, Liotta F, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Lasagni L, Vanini V, Romagnani P, Maggi E et al.** Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. *Blood.* 2004, 103, S. 3117-3121.
117. **Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, and Drayson MT.** Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004, 112, S. 38-43.
118. **Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, and Saito S.** Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 2004, 10, S. 347-353.
119. **Stewart CL, Kaspar P, Brune LJ, et al.** Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature.* 1992, 359, S. 76-9.
120. **Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L.** Expansion of CD4+CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol.* 2007, Bd. 178, S. 2572-2578.
121. **Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S.** Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 10, 2004, S. 347-353.
122. **Zhao JX, Zeng YY, Liu Y.** Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol.* 75, 2007, S. 71-81.
123. **Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA.** Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000, 192, S. 259-70.
124. **Shigeru Saito, Akitoshi Nakashima, Tomoko Shima, Mika Ito.** Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 63, 2010, S. 601-610.
125. **Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, et al.** HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *Reprod Immunol.* 43, 1999, S. 203-211.
126. **Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL.** HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod. Immunol.* 48, 2000, S. 17-26.
127. **Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED.** Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 2001, S. 12150-12155.
128. **Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, et al.** The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain.* 126, 2003, S. 176-

185.

129. **Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED.** Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad.* 94, 1997, S. 11520-11525.

130. **Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED.** The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 1997, S. 5249-5254.

131. **Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, et al.** Role of HLA-G versus HLA-E on NK function: HLA-G is able to inhibit NK cytotoxicity by itself. *J Reprod Immunol.* 43, 1999, S. 175-182.

132. **Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, et al.** HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol.* 166, 2001, S. 5018-5026.

133. **Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, et al.** A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol.* 168, 2002, S. 4772-4780.

134. **Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, et al.** HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* 11, 1999, S. 1351-1356.

135. **Lila N, Amrein C, Guillemain R, et al.** Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *transplantation is associated with a reduced incidence of rejection.* 105, 2002, S. 1949-1954.

136. **Lila N, Carpentier A, Amrein C, et al.** Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet.* 355, 2000, S. 2138.

137. **Le Rond S, Le Maoult J, Creput C, et al.** Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol.* 34, 2004, S. 649-660.

138. **Ute Feger, Eva Tolosa, Yu-Hwa Huang, Anne Waschbisch, Tilo Biedermann, Arthur Melms.** HLA-G expression defines a novel regulatory T cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood.* 2007.

139. **Bobé P, Kiger N.** Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. III. Non-H-2 antigens and gestation. *J Immunogenet.* 1989, Jun;16(3), S. 223-31.

140. **Brune T, Masjoshusmannk, Reinhold D, Steinhardt J, Exeler R, Volleth M, Louwen F.** The imbalanced mixed lymphocyte reaction between maternal and fetal lymphocytes as well between the lymphocytes of adult children and their parents is mediated by activated CD8+ T cells. *Am.J Reprod.Immunol.* 52, 2004, S. 284-289.

141. *Interactions of allogeneic human mononuclear cells in the two-way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporine.* **T. Sato, A. Deiwick, G. Raddatz, K. Koyama & H. J. Schlitt.** 1999, Clin Exp Immunol, Bd. 115, S. 301-308.

142. **Olding LB, Oldstone MBA.** Lymphocytes from human newborns abrogate mitosis of their mother's lymphocytes. *Nature.* 1974., 249, S. 161-162. .

143. **Zheng SG, Wang JH, Koss MN, Quismorio F Jr, Gray JD, Horwitz DA.** CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated ex vivo with IL-2 and TGF-beta suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome. *J Immunol.* 2004, 172, S. 1531–1539.
144. **Molteni M, Rossetti C, Scrofani S, Bonara P, Scorza R, Kohn LD.** Regulatory CD8+ T cells control thyrotropin receptor-specific CD4+ clones in healthy subjects. *Cancer Detect Prev.* 2003, 27, S. 167–174.
145. **Jean A. Kundert, Amy L. Sealey, Yan Li, Mario R. Capecchi, and Edward E. Schmidt.** Syngeneic Immune- Dependent Abortions in Mice Suggest Paternal Alloantigen-Independent Mechanisms. *Am J Reprod Immunol.* 2008, 60(4), S. 290–297.
146. **C.Venrochet, S.M. Caucheteux, C. Kanellopoulos-Langevin.** Bi-directional cell trafficking between mother and fetus in mouse placenta. *Placenta.* Sept. 30 2006, S. doi:10.1016.
147. **Ait-Azzouzene D, Gendron MC, Houdayer M, Langkopf A, Burki K, Nemazee D, et al.** Maternal B lymphocytes specific for paternal histocompatibility antigens are partially deleted during pregnancy. *Journal of immunology.* 1998, S. 161(6):2677-83.
148. **Stankova J, Rola-Pleszczynski M.** Suppressor cells in the human maternal-fetal relationship. *Journal of reproductive immunology.* 1984, S. 6(1):49-59.
149. **Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG.** Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology.* 2004, S. 5(3):266-71.
150. **Roncarolo MG, Gregori S, Levings M.** Type 1 T regulatory cells and their relationship with CD4+CD25+ T regulatory cells. *Novartis Foundation symposium.* 2003, S. 252:115-27; discussion 27-31, 203-10.
151. **Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, et al.** Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *The Journal of clinical investigation.* 1999, S. 104(1):41-7.
152. **Simmons RL, Thompson EJ, Kjellstrand CM, Yunis EJ, Condie RM, Mauer SM, Buselmeier TJ, Najarian JS.** Parent-to-child and child-to-parent kidney transplants. Experience with 101 transplants at one centre. *Lancet.* 1976, 1(7955), S. 321-4.
153. **van Rood JJ, Loberiza FR Jr, Zhang MJ, Oudshoorn M, Claas F, Cairo MS, Champlin RE, Gale RP, Ringden Q, Hows JM, Horowitz MH.** Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft- versus- host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA- haploidentical sibling. *Blood.* March 2002, 99(5), S. 1572-7.
154. **Mariko Araki, Masahiro Hirayama, Eiichi Azuma, Tadashi Kumamoto, Shotaro Iwamoto, Hidemi Toyoda, Mitsue Ito, Keishiro Amano, Yoshihiro Komada.** Prediction of Reactivity to noninherited Maternal Antigen in MHC-Mismatched, Minor Histocompatibility Antigen-Matched Stem Cell Transplantation in a Mouse Model. *J Immunol.* 2010, 185, S. 7739-774.
155. **O'Meara Y, Green A, Donohoe J, Hanson J, Murphy DM, McLean P, Carmody M.** Living related renal transplantation in Ireland: a sixteen year review. *Ir J Med Sci.* 1989, 158(8), S. 206-9.

156. **Vogelsang P, Hovden AO, Jonsson R, Appel S.** Levels of dendritic cell populations and regulatory T cells vary significantly between two commonly used mouse strains. *Scand J Immunol.* 70, 2009, S. 541.
157. **Johnson, P.M., Vince, G.S. and Christmas, S.E.** NK cells and reproduction. *Immunol Today*, 18, 605-6. 1997.
158. **King, A., Loke, Y.W. and Chaouat, G.** NK cells and reproduction. *Immunol Today*, 18, 64-6. 1997.
159. **Ober, C., Aldrich, C., Rosinsky, B., Robertson, A., Walker, M.A., Willadsen, S., Verp, M.S., Geraghty, D.E. and Hunt, J.S.** HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta*, 19, 127-32. 1998.
160. **Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M. and Sekiba, K.** Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama*, 45, 135-9. 1991.
161. **Schrocksadel, H., Baier-Bitterlich, G., Dapunt, O., Wachter, H. and Fuchs, D.** Decreased plasma tryptophan in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 88, 47-50. 1996.
162. **Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A. and Mellor, A.L.** Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999, S. 189, 1363-72.
163. **Mellor, A.L., Sivakumar, J., Chandler, P., Smith, K., Molina, H., Mao, D. and Munn, D.H.** Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nature Immunology*, 2, 64-68. 2001.
164. **JL., Ferrara.** Advances in the clinical management of GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008 Dec;21(4):677-82. 2008.
165. **Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Lei J, Miyazaki T, Yoshie O, et al.** Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. *Gene Ther* 2008 Feb;15(3):171-82. 2008.
166. **Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al.** CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003 Sep;9(9):1144-50. 2003.
167. **Berger M, Biasin E, Saglio F, Fagioli F.** Innovative approaches to treat steroid-resistant or steroid refractory GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2008 Oct;42 Suppl 2:S101-S105. 2008.
168. **Ball LM, Egeler RM.** Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant* 2008 Jun;41 Suppl 2:S58-S64. 2008.
169. **Lee JW, Joachim DH.** Prevention of chronic GVHD. Prevention of chronic GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008 Jun;21(2):259-70. 2008.
170. **Ho VT, Cutler C.** Current and novel therapies in acute GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008 Jun;21(2):223-37. 2008.
171. **SN., Wolff.** Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002 Apr;29(7):545-52. 2002.

172. **Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ et al.** Long-term acceptance of skin and cardiac allografts blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*. 1996, 381, S. 434-438.
173. **Sasazuki T., Juji T. & Morishima Y et al.** Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of haematopoietic stem cells on unrelated donor. *N Engl J Med*. 1998, 339, S. 1177-1185.
174. **Gahrton G, Tura S, Ljungman P et al.** An update of prognostic factors for allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma using matched sibling donors. *Stem Cells*. 1995, 13, S. 122-125.
175. **Gahrton G, S Iacobelli, J Apperley, G Bandini, B Björkstrand, J Blade, JM Boiron, m Cavo et al.** The Impact of Donor gender on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: reduced risk in female to male transplants. *Bone Marrow Transplantation*. 2005, 35, S. 609-617.
176. **Gregory R. Pond, Jeffrey H. Lipton, Hans A. Messner.** Long-Term survival after Blood and Marrow Transplantation: Comparison with Age- and Gender- Matched normative Population. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006, 12, S. 422-429.
177. **H.L. Trivedi, A.V. Vanikar, P.R. Modi, V.R. Shah, J.M. Vakil, V.B. Trivedi, S.I. Khemchandani.** Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, mixed chimerism, and tolerance in living related donor renal allograft. *Transplantation Proceedings*. 2005, 37, S. 737-742.

7. Eidstattliche Versicherung

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

**Der Einfluss des MHC-Mismatch auf die Fertilität und die Immunreaktion
zwischen Eltern und ihren Nachkommen**

in der Universitätskinderklinik, Arbeitsbereich Neonatologie der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Prof. Dr. Thomas Brune, Dr. Uwe Kölsch und Prof. Dr. Monika Lindemann (Transfusionsmedizin, Universität Essen) 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 23.07.2014

Unterschrift

Darstellung des Bildungsweges

Name:	Christina Weber
Geburtsdatum:	30.08.1984
Geburtsort:	Zwickau
Schulische Ausbildung:	09/1991 Einschulung in die „Politechnische Oberschule am Sandberg“ (Wilkau-Haßlau) 1992- 1995 Besuch der Gundschule „Ditteschule“ (Wilkau- Haßlau) 1995-2003 „Gymnasium am Sandberg“ (Wilkau-Haßlau) Abschluss mit Abitur
Studium:	10/2003- 05/2010 Studium der Medizin an der „Otto-von-Guericke Universität“ Magdeburg Physikum: 09/2005 Hammerexamen: 05/2010

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Brune danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die Hilfsbereitschaft und Geduld, die er mir trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung entgegenbrachte. Ebenso möchte ich mich für die Durchsicht der Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren, bei ihm bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Kölsch und allen Mitarbeitern des Labors der experimentellen Pädiatrie, Neonatologie und Pädiatrische Immunologie- danke für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die Einarbeitung in die Arbeitstechniken und Methoden.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Lindemann der Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Essen für die Vermittlung und Überlassung der Daten der menschlichen Probanden bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Wegbegleiterin Caroline Kreuschmer für die problemlose und aufregende Zusammenarbeit- vielen Dank für die anstrengende, aber auch schöne Zeit im Labor.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht hat. Ihnen gilt mein besonderer Dank, ohne sie wären ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden.

8. Anlagen

Nachkommenzahlen C57Bl/6 x DBA/1

	C57Bl/6 ♀	C57Bl/6 ♀	C57Bl/6 ♀	DBA/1 ♀	DBA/1 ♀	DBA/1 ♀	F1	F1	F1
	female	male	all	female	male	all	female	male	all
	6	3	9	0	1	1	5	6	11
	6	4	10	1	1	2	6	5	11
	3	2	6	1	2	3	3	4	7
	3	2	6	2	1	3	3	4	7
	2	2	4	2	0	2	3	2	5
	3	2	5	2	1	3	4	2	6
	1	1	2	1	1	2	2	3	5
	0	1	1	1	1	2	3	4	7
	2	1	3	3	4	7	2	4	6
	2	2	4	3	4	7	3	3	6
	3	3	6	1	2	3	6	3	9
	3	4	7	1	1	2	6	3	9
MW	2,83333	2,25	5,25	1,5	1,58333	3,08333	4,34426	3,57377	7,41666
STABW	1,74945	1,05528	2,66714	0,90453	1,24011	1,92865	2,30857	1,24444	2,10878
p			0,03263			2,8E-05			0,03801

Nachkommenzahlen Balb/c x CBA/J

	Balb/c♀	Balb/c♀	Balb/c♀	CBA/J ♀	CBA/J ♀	CBA/J ♀	F1	F1	F1
	female	male	all	female	male	all	female	male	all
							5	4	9
	3	6	9	5	3	8	5	4	9
	2	6	8	6	3	9	4	3	7
	3	2	5	5	5	10	4	3	7
	3	3	6	3	4	7	1	9	10
	3	2	5	4	2	6	2	4	6
	3	2	5	5	2	7	3	5	8
	3	4	7	4	3	7	2	2	4
	4	3	7	4	3	7	3	4	7
	3	1	4	2	4	6	4	2	6
	3	2	5	2	5	7	4	3	7
							4	3	7
							3	2	5
MW	3	3,1	6,1	4	3,4	7,4	3,38461	3,69230	7,07692
STABW	0,47140	1,72884	1,59513	1,33333	1,07496	1,26491	1,19292	1,84321	1,65637
p			0,05859			0,61422			0,16898

Nachkommenzahl in Abhängigkeit des MHC

F2 m qq x f qq	Anzahl/♀	DBA1 x DBA1	Anzahl/♀
61.1 x 60.1	6	77.1 x 78.3, 78.4	4,5
61.1 x 60.1	5	77.1 x 78.3, 78.4	3
61.1 x 60.1	8	77.1 x 78.3, 78.4	1
61.1 x 60.1	6	168.2 x 243.1, 243.2	1,5
61.1 x 60.1	7	168.1 x 169.1	3
61.1 x 60.1	6	168.2 x 243.1, 243.2	1
61.1 x 60.1	2	168.2 x 243.1, 243.2	2,5
199.1 x 186.1	9	168.2 x 243.1, 243.2	2
199.2 x 186.2	10	168.1 x 169.1	2
184.2 x 181.2	4	356.1 x 365.1	2
184.1 x 181.1	9	168.2 x 243.1, 243.2	1
211.1 x 212.1, 212.2	7	356.1 x 365.1	3
211.1 x 212.1, 212.2	4,5	356.1 x 365.1	7
211.1 x 212.1, 212.2	4,5	356.1 x 365.1	6
211.1 x 212.1, 212.2	6,5	356.1 x 365.1	2
211.1 x 212.1, 212.2	8	356.1 x 365.1	2
211.1 x 212.1, 212.2	4,5	356.1 x 365.1	2
211.1 x 212.1, 212.2	4,5	356.1 x 365.1	2
211.1 x 212.1, 212.2	6		
211.1 x 212.1, 212.2	5		
211.1 x 212.1, 212.2	4		
280.2 x 279.2	8		
280.1 x 279.1	8		
355.1 x 338.2	5		
355.5 x 338.3	7		
MW	6,18		2,639
STABW	1,881		1,606
p			1,5332E-07

mismatch (qq x bb)			non-mismatch (qq x qq)
298.1 x 289.1	9	8	280.2 x 279.2
298.2 x 289.2	8	8	280.1 x 279.1
298.3 x 289.3	9	5	355.1 x 338.2
339.2 x 336.2	3	7	355.5 x 338.3
339.3 x 336.3	8		
MW	7,400	7	
STABW	2,245	1,225	p=0,785775264

T_{reg} mismatch vs. non- mismatch

qq x bb

Schwangerschaft							
periphere NL						MW	Stabw.
	298.1	298.2	298.3	339.2	339.3		
CD4+	44,7	51,54	51,04	42,92	42,68		
CD8+	15,6	13,01	13,25	17,29	17,35		
CD4+CD8+	0,19	0,1	0,14	0,15	0,25		
Summe CD4+CD8+	60,49	64,65	64,43	60,36	60,28		
CD4+CD25+	6,66	5,55	5,66	4,7	6,15		
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	11,010	8,585	8,785	7,787	10,202	9,274	1,166
%CD4+CD25+ an CD4+	14,899	10,768	11,089	10,951	14,410	12,423	1,671
paraaortale NL							
CD4+	44,98	37,53	39,31	24,51	24,87		
CD8+	14,85	13,22	15,89	12,7	11,46		
CD4+CD8+	0,17	0,18	0,19	0,16	0,22		
Summe CD4+CD8+	60	50,93	55,39	37,37	36,55		
CD4+CD25+	7	4,36	4,96	2,82	4,11		
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	11,667	8,561	8,955	7,546	11,245	9,595	1,593
%CD4+CD25+ an CD4+	15,562	11,617	11,617	11,506	16,526	13,366	2,208
Thymus							
CD4+	7,75	5,65	4,92				
CD8+	0,93	0,92	0,84				
CD4+CD8+	84,62	91,56	93,07				
Summe CD4+CD8+	93,3	98,13	98,83				
CD4+CD25+	0,38	0,26	0,3				
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	0,407	0,265	0,304			0,325	0,060
%CD4+CD25+ an CD4+	4,903	4,602	6,098			5,201	0,646
Plazenta							
CD4+	19,87	27,78	18,36	16,96	12,39		
CD8+	7,74	7,85	7,44	5,87	6,09		
Summe CD4+CD8+	27,61	35,63	25,8	22,83	18,48		
CD4+CD25+	0,57	1,12	0,77	0,75	0,62		
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	2,064	3,143	2,984	3,285	3,355	2,967	0,469
%CD4+CD25+ an CD4+	2,869	4,032	4,194	4,422	5,004	3,879	0,645

qq x qq

Schwangerschaft							
periphere NL					p	MW	Stabw.
	280.2	280.1	355.1	355.5			
CD4+	45,7	44,33	36,94	38,82			
CD8+	13,98	11,86	13,49	13,62			
CD4+CD8+	0,37	0,21	0,29	0,23			
Summe CD4+CD8+	60,05	56,4	50,72	52,67			
CD4+CD25+	6,24	5,9	4,81	6,22			
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	10,391	10,461	9,483	11,809	0,15128803	10,536	0,830
%CD4+CD25+ an CD4+	13,654	13,309	13,309	16,023		14,074	1,134
paraaortale NL							
CD4+	41,32	45,37	24,43	34,47			
CD8+	13,83	12,41	10,97	12,86			
CD4+CD8+	0,27	0,15	0,39	0,45			
Summe CD4+CD8+	55,42	57,93	35,79	47,78			
CD4+CD25+	5,31	5,2	3,91	6,22			
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	9,581	8,976	10,925	13,018	0,4180612	10,625	1,551
%CD4+CD25+ an CD4+	12,851	11,461	16,005	18,045		14,590	2,586
Thymus							
CD4+	4,68	3,63					
CD8+	6,18	0,92					
CD4+CD8+	66,89	91,56					
Summe CD4+CD8+	77,75	96,11					
CD4+CD25+	0,41	0,23					
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	0,527	0,239			0,66304226	0,383	0,144
%CD4+CD25+ an CD4+	8,761	6,336				7,548	1,212
Plazenta							
CD4+	7,69	19,56	16,46	11,76			
CD8+	1,99	5,7	7,26	4,22			
Summe CD4+CD8+	9,68	25,26	23,72	15,98			
CD4+CD25+	1,18	1,44	0,97	0,69			
%CD4+CD25+ an CD4+CD8+	12,190	5,701	4,089	4,318	0,07074592	6,575	3,300
%CD4+CD25+ an CD4+	15,345	7,362	5,893	5,867		8,617	3,931

T_{reg} in der Schwangerschaft

♀, SS	Periph. NL			Paraaor. NL			Thymus			Placenta
	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	% Treg
280.2	7,8	4,97	38,766	1,6	4,76	7,616	60,8	0,31	18,848	3,51
298.1	8,9	4,79	42,631	0,3	4,59	1,377	52,1	0,61	31,781	2,11
280.1	6,9	4,05	27,945	0,5	4,83	2,415	55	0,51	28,05	2,26
298.2	5,9	4,26	25,134	0,5	4,68	2,34	55	0,46	25,3	3,87
298.3	12	4,69	56,28	0,5	4,61	2,305	55	0,54	29,7	1,67
Stbw.			11,160			2,235			4,478	
MW			38,1512			3,211			26,736	
p			0,17543			0,80907			0,27087	
♀, keine SS	Periph. NL			Paraaor. NL			Thymus			
	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	
280.3	7,7	5,02	38,654	3,1	6,81	21,111	51	0,64	32,64	
298.4	6,8	4,14	28,152	0,4	3,93	1,572	52,8	0,63	33,264	
280.4	8,2	4,11	33,702	0,5	4,76	2,38	55	0,45	24,75	
298.5	10	3,7	37	0,5	3,84	1,92	55	1,01	55,55	
298.6	5,4	3,36	18,144	0,5	4,8	2,4	55	0,4	22	
Stbw.			7,419			7,623			11,796	
MW			31,130			5,877			33,641	
♂	Periph. NL			Paraaor. NL			Thymus			
	gezählt (Mio)	% Treg	Abs. Zahl	gezählt (Mio.)	% Treg	Abs. Zahl	gezählt (Mio.)	% Treg	Abs. Zahl	
279.2	7,8	3,84	29,952	0,2	2,85	0,57	53,9	0,4	21,56	
289.1	8,4	3,52	29,568	0,5	1,35	0,675	56,3	0,46	25,898	
279.1	7,3	4,41	32,193	0,5	4,88	2,44	55	0,65	35,75	
289.2	4,8	3,18	15,264	0,5	3	1,5	55	0,18	9,9	
289.3	3,5	4,87	17,045	0,5	3,01	1,505	55	0,67	36,85	
Stbw.			7,142			0,678			6,482	
MW			24,804			1,338			25,992	

MLR P-Generation C57Bl/6 vs. DBA/1

MHC	h	D1xB1	D2xB2	D3xB3	D4xB4	D5xB5	MW	STABW
C57BL/6 (bb)	48	40,0	51,0	41,0	51,7	55,6	47,9	6,939
DBA1 (qq)	48	60,0	49,0	59,0	48,3	44,4	52,1	6,939
C57BL/6 (bb)	96	62,0	70,4	53,4	73,8	73,0	66,5	8,699
DBA1 (qq)	96	38,0	29,6	46,6	26,2	27,0	33,5	8,699
C57BL/6 (bb)	144	90,6	87,8	88,1	91,5	88,7	89,3	1,617
DBA1 (qq)	144	9,4	12,2	12,0	8,6	11,3	10,7	1,617
p	0,000							

MLR F2- Generation C57Bl/6 vs. DBA/1

MHC	h	6/1	7/2	8/3	9/4	10/5	mean	stdv
F2(DxB) bb	48	44,5	26,7	42,3	29,4	39,1	36%	7,1%
F2(DxB) qq	48	48,9	69,3	47,4	60,8	55,1	56%	8,1%
F2(DxB) bb	96	51,9	48,5	56,2	52,2	57,6	53%	3,3%
F2(DxB) qq	96	37,8	39,4	40,8	44,4	37,0	40%	2,6%
F2(DxB) bb	144	45,9	48,4	56,5	64,4	48,4	53%	6,9%
F2(DxB) qq	144	48,2	44,3	39,5	27,6	49,6	42%	7,9%

MLR P-Generation Balb/c vs. CBA/J

dd	Pair F	Pair G	Pair H	Pair I	Pair J	Mittelwert	STABW
48h	31	19	49	21	31	48,4	21,3
96h	21	18	28	19	14	36,9	18,9
144h	16	15	9	8	10	20,9	15,0
kk	Pair F	Pair G	Pair H	Pair I	Pair J		
48h	69	81	51	79	69	51,6	21,3
96h	79	82	72	81	86	63,1	18,9
144h	84	85	91	92	90	79,1	15,0

MLR F2- Generation Balb/c vs. CBA/J

dd	Pair 1	Pair 2	Pair 7	Pair 22	Pair 28	Pair 16	Pair 21	Pair 23	Pair 30	Pair 31	MW	STABW
48h	55	45	29	71	36	42		67	42	57	49,3	13,3
96h	35	37	17	76	32	45	20	90	35	72	45,9	23,6
144h			20	83	12	52	30	77	84	81	54,9	28,5
kk	Pair 1	Pair 2	Pair 7	Pair 22	Pair 28	Pair 16	Pair 21	Pair 23	Pair 30	Pair 31		
48h	45	55	71	29	64	58		33	58	43	50,7	13,3
96h	65	63	83	24	68	55	80	10	65	28	54,1	23,6
144h			80	17	88	48	70	23	16	19	45,1	28,5

MLR Eltern vs. Nachkommen

Kontrollen

♀ x ♀

48h	47,34	34,2	68,45	31,43	50,91	67,65
144h	70,28	17,1	63,91	35,74	27,49	82,16

♀ x ♂

48h	50,83	54,45	39,84	49,88	54,8	49,17	45,36	57,78	47,88	45,28
144h	28,64	76,96	60,93	47,23	48,22	70,77	22,38	38,18	51,75	51,17
	♂					♀				

♂ x ♂

48h	49,92	44,17	54,92	54,96	46,01	48,8	52,93	47,01	46,16	55,11
144h	60,57	61,76	44,71	60,54	56,37	39,97	38,95	56,0	39,97	41,22

Eltern vs. Nachkommen

Mutter Tochter

h	Mutter			Tochter		
48	52,71	47,86	44,56	47,31	52,17	55,5
144	59,48	70,0	68,79	40,61	30,0	31,87

Mutter vs. Sohn

H	Mutter							
48	46,17	53,05	45,76	48,21	51,97	57,17	54,89	57,42
144	48,37	78,05	34,93	67,3	73,6	82,35	75,74	76,58
	Sohn							
48	53,86	47,07	54,4	58,12	53,41	47,42	45,29	42,52
144	51,97	22,18	65,07	34,24	27,93	17,65	24,3	20,22

Vater vs. Tochter

H	Vater					Tochter				
48	44,21	56,96	47,47	53,86	56,09	55,85	43,04	52,53	46,22	46,3
144	54,72	82,05	75,0	36,58	88,0	45,28	17,95	25,0	63,61	12,57

Vater vs. Sohn

h	Vater					Sohn				
48	31,8	41,74	45,83	62,06	58,48	68,24	58,17	54,22	37,96	41,55
144	59,8	55,4	44,39	42,6	61,4	40,34	45,02	55,64	57,3	38,5

Menschliche MLR am Tag 8

	Stimulationsindex (percent of controls)				CPM			
	SC= Vater		RC= Vater		SC= Vater		RC= Vater	
	Sohn	Tochter	Sohn	Tochter	Sohn	Tochter	Sohn	Tochter
1	47,28%	2,26%	201,37%	31,36%	5.724	273	29.154	4.540
2	33,98%	9,19%	11,69%	13,02%	1.687	456	4.784	5.329
3	155,16%	31,70%	57,49%	49,70%	8.883	1.815	3.310	2.862
4	4,26%	10,67%	100,19%	42,56%	533	1.335	1.615	686
Median	40,63%	9,93%	78,84%	36,96%	3.706	896	4.047	3.701

	Stimulationsindex (percent of controls)				CPM			
	SC= Mutter		RC= Mutter		SC= Mutter		RC= Mutter	
	Sohn	Tochter	Sohn	Tochter	Sohn	Tochter	Sohn	Tochter
1	3,34%	1,41%	4,01%	0,89%	698	294	1.404	312
2	12,11%	12,67%	19,37%	20,69%	891	932	1.539	1.644
3	2,60%	2,27%	3,13%	2,16%	613	536	1.149	793
Median	3,34%	2,27%	4,01%	2,16%	698	536	1.404	793