

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

Untersuchungen zum Einfluss von Schwangerschaftshormonen  
und Alpha-Fetoprotein auf IL-10-produzierende B-Zellen in der  
Schwangerschaft

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Franziska Fettke

aus Magdeburg

Magdeburg 2021

## Bibliographische Beschreibung

Fettke, Franziska:

Untersuchungen zum Einfluss von Schwangerschaftshormonen und Alpha-Fetoprotein auf IL-10-produzierende B-Zellen in der Schwangerschaft - 2021. – 96 Bl., 24 Abbildungen, 4 Tabellen., 1 Anlage

### Kurzreferat:

Die menschliche Schwangerschaft stellt eine besondere Situation für das mütterliche Immunsystem dar, die in der aktiven Toleranz des zur Hälfte immunologisch fremden Fetus und der konstanten Reaktionsfähigkeit gegenüber Krankheitserregern besteht. IL-10-produzierende B-Zellen treten als neue Akteure der mütterlichen Toleranzmechanismen auf. Um physiologische Auslöser ihrer Expansion zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss Trophoblast-abgeleiteter Faktoren auf die Fähigkeit von B-Zellen IL-10 zu produzieren untersucht. Die Untersuchungen im Maussystem bestätigten, dass die Kultur von B-Zellen mit Trophoblastzellen bzw. Plazentagewebe die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen unterstützt. Unter Verwendung humaner Proben wurde der Einfluss Trophoblast-abgeleiteter Hormone, speziell des humanen Choriongonadotropin (hCG), Progesteron (P4) und Östradiol (E2), auf IL-10-produzierende B-Zellen untersucht. Die *in-vitro*-Versuche zeigten, dass hCG sowohl die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen als auch die Produktion schwangerschaftsprotektiver asymmetrischer Antikörper (AAk) induziert. Die Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselrolle des hCG auf B-Zell-assoziierte Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft. Weiterführende Versuche zum Einfluss des vom Fetus selbst produzierten AFP konnten zudem zeigen, dass die Behandlung der B-Zellen mit AFP in hoher Konzentration die Apoptose der Zellen bewirkt. Die Ergebnisse deuten auf die Existenz fetaler Mechanismen hin, die den Eintritt potenziell schädlicher B-Zellen in den fetalen Organismus regulieren. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der mütterlichen und fetalen Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft bei. Sie bilden die Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Schwangerschaftskomplikationen, die auf einer immunvermittelten Abstoßung des Fetus basieren.

### **Schlüsselwörter**

B-Zellen, AFP, E2, P4, hCG, regulatorische B-Zellen, Schwangerschaft

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	V
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
<b>1</b> <b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b> <b>Die Schwangerschaft des Menschen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1   Physiologie in der Frühschwangerschaft .....	1
1.1.2   Entwicklung, Aufbau und Funktion der Plazenta .....	1
1.1.3   Die biologische Funktion von hCG, Progesteron, Östradiol und AFP in der Schwangerschaft .....	3
<b>1.2</b> <b>Die Schwangerschaft der Maus</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3</b> <b>Allgemeine Konzepte der Immunologie</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4</b> <b>Immunologische Prozesse innerhalb der Schwangerschaft</b> .....	<b>6</b>
1.4.1   Trophoblast-vermittelte Immunregulation.....	7
1.4.2   Zellbedingte Immunmechanismen in der Schwangerschaft .....	7
1.4.3   Störung der Frühschwangerschaft .....	8
<b>1.5</b> <b>B-Zellen</b> .....	<b>9</b>
1.5.1   B-Zell-Untergruppen .....	9
1.5.2   Regulatorische B-Zellen .....	10
<b>1.6</b> <b>Immunglobuline: Struktur und Subklassen</b> .....	<b>12</b>
1.6.1   Immunglobulin G .....	12
1.6.2   IgG-Fc-Glykosylierung.....	13
1.6.3   IgG-Fab-Glykosylierung.....	14
<b>1.7</b> <b>Die Rolle von B-Zellen innerhalb der Schwangerschaft</b> .....	<b>14</b>
1.7.1   Veränderungen des B-Zellkompartiments und die Bedeutung mütterlicher Antikörper ....	14
1.7.2   IL-10-produzierende B-Zellen als Regulatoren der Immuntoleranz.....	16
<b>1.8</b> <b>Immunmodulierende Eigenschaften von Hormonen und AFP in der Schwangerschaft</b> ..	<b>16</b>
1.8.1   hCG.....	17
1.8.2   Progesteron .....	17
1.8.3   Östradiol .....	18
1.8.4   AFP.....	19
<b>1.9</b> <b>Zielstellung</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b> <b>MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b> <b>Materialien</b> .....	<b>21</b>
2.1.1   Allgemeine Laborausstattung .....	21
2.1.2   Computerprogramme .....	21

2.1.3	Geräte und Materialien für die Zellkultur .....	22
2.1.4	Geräte und Materialien für die magnetische Zellsortierung (MACS®) .....	22
2.1.5	Geräte und Materialien für die Durchflusszytometrie .....	22
2.1.6	Chemikalien und Lösungen .....	22
2.1.7	Hormone, Proteine und andere biologisch aktive Substanzen .....	23
2.1.8	Antikörper .....	23
2.1.9	Kitsysteme .....	24
2.1.10	Medien und Pufferlösungen .....	24
2.1.11	Zelllinien .....	25
2.1.12	Mausstämme .....	25
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Zellkulturtechniken unter Verwendung von JEG-3- und SM9-2-Zellen .....	26
2.2.1.1	Auftauen und Kultivierung .....	26
2.2.1.2	Passagieren und Einfrieren .....	26
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung .....	27
2.2.2	Tierexperimentelle Methoden .....	27
2.2.2.1	Tierhaltung .....	27
2.2.2.2	Verpaarung der Mäuse .....	27
2.2.2.3	Mauspräparation für die Isolierung von Lymphozyten aus der Milz .....	27
2.2.2.4	Durchflusszytometrische Zellsortierung von CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	28
2.2.2.5	Mauspräparation zur Gewinnung von Plazentagewebe .....	28
2.2.2.6	Kokultur von CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen und SM9-2-Zellen .....	28
2.2.2.7	Kokultur von CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen mit Plazenta-Explantaten .....	29
2.2.3	Humanexperimentelle Methoden .....	29
2.2.3.1	Blutgewinnung .....	29
2.2.3.2	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMZ) .....	30
2.2.3.3	Isolierung von B-Zellen mittels MACS® .....	30
2.2.3.4	Behandlung von B-Zellen mit Stimulanzen, Hormonen und AFP .....	30
2.2.3.5	Kokultur von B-Zellen und JEG-3-Zellen .....	31
2.2.4	Durchflusszytometrie .....	31
2.2.4.1	Theoretische Grundlagen .....	31
2.2.4.2	Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung von humanen B-Zellen .....	32
2.2.4.3	Auswertung durchflusszytometrischer Daten für humane B-Zellen .....	33
2.2.4.4	Durchflusszytometrisch-basierte Zellsortierung .....	33
2.2.4.5	Auswertung durchflusszytometrischer Daten für murine B-Zellen .....	33
2.2.4.6	Apoptosebestimmung mittels Annexin V- / Propidiumiodid-Färbung .....	34
2.2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	34
2.2.5.1	ELISA zum Nachweis von IL-10 .....	34

2.2.5.2	ELISA zum Nachweis von IgM, IgA und IgG .....	35
2.2.6	Bestimmung der IgG Fc-N-Glykosylierungsprofile .....	35
2.2.7	hCG-Behandlung von Hybridomazellen und Bestimmung der asymmetrischen Fab-Glykosylierungen produzierter anti-DNP-Ak.....	35
2.2.8	Caspase-Glo®-Analyseverfahren .....	35
2.2.9	Statistik .....	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Analyse der Mausproben .....</b>	<b>37</b>
3.1.1	Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Auslese CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen .....	37
3.1.2	Die Kokultur von CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen mit Trophoblastzellen fördert die Erzeugung von IL-10-produzierenden B-Zellen <i>in vitro</i> .....	38
3.1.3	Die Blockade von TGF- $\beta$ hat keinen Einfluss auf die Trophoblast-vermittelte Konvertierung in CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen .....	39
3.1.4	Die Kokultur von CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen mit Plazenta-Explantaten bewirkt eine signifikante Differenzierung in CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen .....	39
<b>3.2</b>	<b>Analyse humaner Zellexperimente .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Etablierung der B-Zell-Aktivierung und Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Messung von CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD27 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen.....	41
3.2.2	hCG-produzierende JEG-3-Zellen bewirken einen signifikanten Anstieg der IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen, der durch die Blockade von hCG signifikant beeinträchtigt wird .....	41
3.2.3	Die Kultivierung der gesamten B-Zell-Population mit JEG-3-Zellen hat keine Auswirkung auf die IL-10-Sekretion der B-Zellen .....	42
3.2.4	Der Einfluss von rhCG, Progesteron und Östradiol auf das Oberflächenrezeptorprofil und die IL-10-Sezernierung von B-Zellen.....	43
3.2.4.1	hCG, jedoch nicht Progesteron oder Östradiol, erzeugt einen signifikanten Anstieg der IL-10-produzierenden B-Zellen <i>in vitro</i> .....	43
3.2.4.2	Die <i>in-vitro</i> -Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit rhCG, Progesteron oder Östradiol hat keinen Einfluss auf die IL-10-Sezernierung .....	44
3.2.5	Der Einfluss von AFP auf B-Zellen.....	45
3.2.5.1	Die <i>in-vitro</i> -Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP beeinflusst weder die Generierung von IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen noch die IL-10-Sezernierung .....	45
3.2.5.2	Zellmorphologische Veränderungen der B-Zell-Population unter Zugabe von AFP in fetaler Serumkonzentration.....	47
3.2.5.3	Die <i>in-vitro</i> -Stimulation der gesamten B-Zell-Population mit AFP in fetaler Serumkonzentration induziert apoptotische Vorgänge in B-Zellen .....	47
3.2.5.4	Die <i>in-vitro</i> -Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP in fetaler Serumkonzentration zeigt signifikant erhöhte Caspase-3 und -7 Aktivitäten .....	48
3.2.6	Der Einfluss von hCG, Progesteron, Östradiol und AFP auf die Antikörperbildung der B-Zellen .....	49
3.2.6.1	Weder hCG, Progesteron, Östradiol noch AFP haben einen Einfluss auf die Konzentration von IgM, IgG und IgA .....	49

3.2.6.2	hCG, Progesteron, Östradiol und AFP haben keinen Einfluss auf das Fc-Glykosylierungsprofil der IgG1-Unterklasse .....	51
3.2.6.3	hCG erhöht die F(ab)-asymmetrische Glykosylierung von IgG in Hybridom-112D5-Zellen.....	53
<b>3.3</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Vom Trophoblasten sezernierte Faktoren induzieren die <i>de-novo</i>-Konvertierung IL-10-positiver B-Zellen aus IL-10-negativen B-Zellen .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>hCG induziert einen Anstieg IL-10-produzierender B-Zellen in der frühen Schwangerschaft, nicht jedoch Progesteron und Östradiol.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Gabe von AFP induziert apoptotische Vorgänge in kultivierten B-Zellen.....</b>	<b>59</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Wirkung der Schwangerschaftshormone und des AFP auf Antikörper, speziell deren Fc- und Fab-Glykosylierungen.....</b>	<b>60</b>
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>64</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>81</b>
	<b>EHRENERKLÄRUNG.....</b>	<b>82</b>
	<b>DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGES .....</b>	<b>83</b>
	<b>WISSENSCHAFTLICHE LEISTUNGEN .....</b>	<b>84</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>86</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung der Trophoblastinvasion in die Dezidua.....	2
Abbildung 2: Darstellung der immunologischen Stadien der Schwangerschaft .....	6
Abbildung 3: Funktionelle Effektormechanismen der Breg-Zellen.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls inklusive der Fc-Glykosylierung und asymmetrischen Fab-Glykosylierung.....	13
Abbildung 5: Auslese der CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>-</sup> B-Zellen.....	37
Abbildung 6: Trophoblastzellen fördern die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen <i>in vitro</i> .....	38
Abbildung 7: Die Behandlung mit einem anti-TGF- $\beta$ -Ak hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung in CD19 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen <i>in vitro</i> .....	39
Abbildung 8: Lösliche plazentare Faktoren förderten die Generierung von IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen <i>in vitro</i> .....	40
Abbildung 9: Identifizierung der CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD27 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen innerhalb des B-Zellpools. ....	41
Abbildung 10: hCG-produzierende JEG-3-Zellen induzieren einen signifikanten Anstieg der IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen.....	42
Abbildung 11: Die Kokultur von stimulierten (st.) B-Zellen mit JEG-3-Zellen in An- oder Abwesenheit von hCG zeigte keine signifikante Auswirkung auf die IL-10-Sekretion. ....	43
Abbildung 12: hCG, jedoch nicht P4 oder E2 stimulierten die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen.....	44
Abbildung 13: Die <i>in-vitro</i> -Behandlung der magnetisch isolierten B-Zellen mit rhCG, P4 oder E2 hat keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion. ....	45
Abbildung 14: Die <i>in-vitro</i> -Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP in mütterlicher oder fetaler Serumkonzentration zeigt keinen Effekt auf die Generierung von IL-10 <sup>+</sup> B-Zellen.....	46
Abbildung 15: Die <i>in-vitro</i> -Behandlung totaler stimulierter (st.) B-Zellen mit AFP in mütterlicher oder fetaler Serumkonzentration übt keinen Effekt auf die IL-10-Freisetzung aus. ....	46
Abbildung 16: AFP in fetaler Serumkonzentration führt zu zellmorphologischen Veränderungen innerhalb der gesamten B-Zell-Population.....	47
Abbildung 17: Die fetale Serumkonzentration von AFP induzierte die Apoptose und Nekrose innerhalb der gesamten B-Zell-Population.....	48
Abbildung 18: Die <i>in vitro</i> Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP in fetaler Serumkonzentration erhöht die Caspase-3 und -7-Aktivität. ....	49
Abbildung 19: Die Behandlung mit rhCG, P4 oder E2 zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Quantifizierung von IgM, IgG und IgA. ....	50
Abbildung 20: Die IgM-, IgG- und IgA-Quantifizierung zeigte sich nach Kultivierung mit AFP in fetaler Serumkonzentration vermindert.....	51
Abbildung 21: IgG1 Fc-Glykosylierungsprozesse wurden nicht durch Schwangerschaftshormone beeinflusst. ....	52
Abbildung 22: IgG1 Fc-Glykosylierungsprozesse wurden nicht durch die Behandlung mit AFP beeinflusst. ....	53
Abbildung 23: Der Zusatz von hCG zu Hybridom-112D5-Zellen erhöhte den Anteil AAK. ....	54
Abbildung A.1: Die <i>in vitro</i> Stimulation von B-Zellen mit AFP in fetaler Serumkonzentration induzierte apoptotische Vorgänge in B-Lymphozyten.....	86

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Mütterliche Serumwerte für hCG, P4, E2 und AFP innerhalb der Schwangerschaft .....	4
Tabelle 2: Charakteristika der weiblichen, nulliparen Studienteilnehmer. ....	29
Tabelle 3: Exzitations- und Emissionsmaxima (Exmax/Emmax) der Fluorochrome für die durchflusszytometrische Vermessung humaner B-Zellen.....	32
Tabelle A.1: Behandlungsschema für humane B-Zellen.....	86

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAk	Asymmetrische Antikörper
AFP	Alpha-Fetoprotein
Ak	Antikörper
APS	Antiphospholipidsyndrom
APZ	Antigen(-)präsentierende Zelle
Breg-Zelle	regulatorische B-Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E2	Östradiol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-basierte Zellsortierung)
FBS	Fetales bovines Serum
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hCG	humanes Choriongonadotropin
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQR	Interquartile range (Interquartilsabstand)
IUGR	Intrauterine Growth Restriction (intrauterine Wachstumsrestriktion)
LH	Luteinisierendes Hormon
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting (magnetische Zellsortierung)
min	Minute/n
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
MZ	Mastzelle
MZ-B-Zelle	Marginalzonen B-Zelle
NaCl	Natriumchlorid

NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NK	Natürliche Killerzelle
NS	normale Schwangerschaft
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (periphere mononukleäre Zelle/n)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PIBF	Progesteron-induzierter Blockierungsfaktor
PIGF	Plazentawachstumsfaktor
pNK	periphere Natürliche Killerzelle
P/S	Penicillin/Streptomycin
P4	Progesteron
RA	Rheumatoide Arthritis
RLE	Relative Lichteinheit
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSA	rezidivierender Spontanabort
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
sFlt-1	soluble fms-like tyrosin kinase-1
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
SSW	Schwangerschaftswoche
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$ (transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
ü.N.	über Nacht
uNK-Zelle	uterine Natürliche Killerzelle

# 1 Einleitung

*"Cases of recurrent abortions, preeclampsia or babies born with hemolytic diseases of the newborn still puzzle us with the question "Why did your mother reject you?" Although, after looking at the complexity of the maternal-fetal immune interaction [...] the question now becomes: "Why didn't your mother reject you?"* [1]. Die Schwangerschaft wird maßgeblich durch Immunzellen reguliert. Während diverse Mechanismen der peripheren und lokalen Toleranzinduktion die Abstoßung des semiallogenen Fetus verhindern, wird der Schutz vor Krankheitserregern gewährleistet. Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer Toleranzmechanismen, um neue Bereiche für die Diagnostik und Therapie von Schwangerschaftskomplikationen aufzudecken.

## 1.1 Die Schwangerschaft des Menschen

Die Schwangerschaft des Menschen umfasst 40 Schwangerschaftswochen (SSW). Klinisch erfolgt die Einteilung in drei Trimenen: erstes Trimenon: 1.-13. SSW, zweites Trimenon: 14.-26. SSW, drittes Trimenon: 27.-40. SSW.

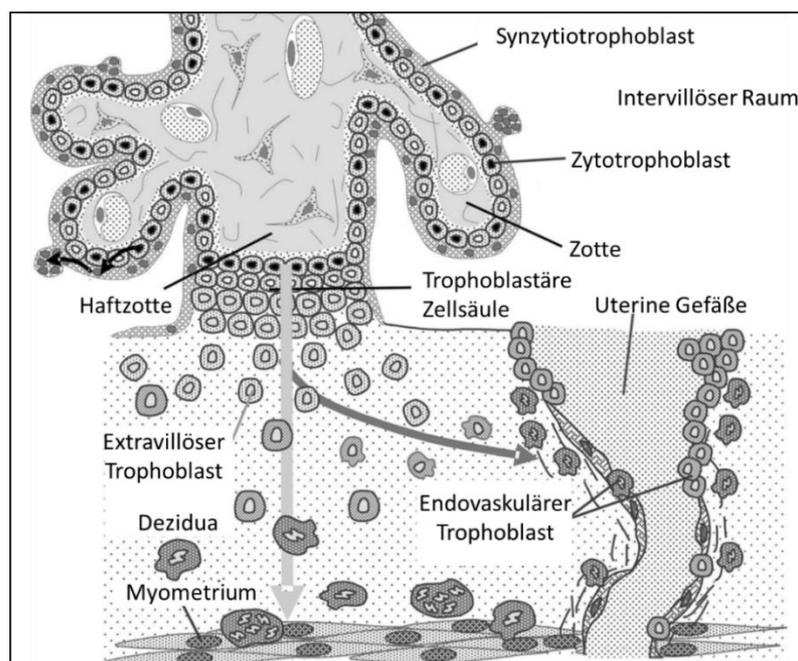
### 1.1.1 Physiologie in der Frühschwangerschaft

Die Oozyte wird nach der Ovulation von den Fimbrien des Eileiters aufgenommen und zum Uteruslumen transportiert. Im Eileiter erfolgt die Befruchtung der Oozyte durch das Spermium. Die Gametenkerne verschmelzen zu einer Zygote, die 4–5 Tage nach der Ovulation in das Uteruslumen eintritt. Zu diesem Zeitpunkt hat der Embryo durch mitotische Zellteilungen und Flüssigkeitsanreicherung das Blastozystenstadium erreicht. Die Blastozyste differenziert sich in die äußere trophoblastische Zellschicht, die von Trophoblastzellen gebildet wird und in die innere Zellmasse, aus der der Embryo hervorgeht [2]. Der Trophoblast bildet die Grundlage für die Entwicklung der überwiegenden Anteile der Plazenta. Das Uterusepithel durchläuft einen strukturellen und funktionellen Umbau und wird zur Dezidua umgebaut, welche zugleich von mütterlichen Immunzellen infiltriert wird. Die Dezidualisierung des Uterusepithels ist essenziell für die Adhäsion der Blastozyste und wird durch Hormone gefördert. 7-12 Tage nach der Fertilisation erfolgt die Trophoblastinvasion in das rezepptive Uterusepithel und die Implantation der Blastozyste. Die Invasions- und Implantationsprozesse werden von Faktoren, wie beispielsweise Hormonen, gesteuert, die von Trophoblastzellen und Immunzellen produziert werden [3].

### 1.1.2 Entwicklung, Aufbau und Funktion der Plazenta

Die Plazentaentwicklung beginnt mit der Bildung eines polynukleären Synzytiums. Im Zuge der Implantation proliferiert der fetale Trophoblast und wird mehrschichtig. Durch die Verschmelzung der äußeren, mononukleären Trophoblastzellen entsteht der mehrkernige, invasive Synzytiotrophoblast, welcher den Embryo umgibt und fingerförmige, in das mütterliche Gewebe reichende, Ausstülpungen

aufweist. Die darunterliegenden Zytotrophoblasten garantieren durch weitere Zellfusionen das Wachstum des Synzytiums. Innerhalb des Synzytiotrophoblasten entstehen, durch Erosion der mütterlichen Kapillaren, mit Blut gefüllte Lakunen, die zusammenfließen und den intervillösen Raum bilden. Die Bereiche zwischen den Lakunen werden Trabekel genannt. Sie verbinden die fetale Seite der Plazenta (Chorionplatte) mit der mütterlichen Seite (Basalplatte). Durch Migration der Zytotrophoblasten in die Trabekel entstehen astähnliche Primärzotten. Anschließend schieben sich mesenchymale Zellen des Embryoblasten in diese Bereiche (Sekundärzotten), gefolgt von der Entwicklung darin verlaufender fetaler Blutgefäße (Tertiärzotten). Die im intervillösen Raum freischwimmenden Zotten werden von mütterlichem Blut umspült und gewährleisten den bidirektionalen Stoffaustausch. Dieser Kontakt zwischen mütterlichen im Blut zirkulierenden Immunzellen und fetalen Trophoblastzellen stellt eine fetomaternale Grenzfläche dar. Einige Zytotrophoblasten durchdringen die Trabekel des Synzytiotrophoblasten in Form von Zellsäulen bis sie das mütterliche Gewebe erreichen. Als extravillöser Trophoblast invadieren sie die Dezidua, leiten die uterine Gefäßumwandlung ein und erzeugen weitere fetomaternale Grenzflächen (Abbildung 1). Die Infiltration des mütterlichen Gewebes unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen, die das Proliferations- und Migrationspotenzial der Trophoblastzellen steuern. Fehlfunktionen können zu Komplikationen wie dem Abort, intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR) oder Präeklampsie führen. Ab dem 4. Monat lässt sich die Plazenta in drei Bereiche gliedern: die Basalplatte, den intervillösen Raum mit Zottenbäumen und die Chorionplatte. Die Hauptaufgabe der Plazenta besteht in der Versorgung des Fetus mit Nährstoffen sowie dem Austausch von Blutgasen, Zellen, Immunglobulinen (Ig), Stoffwechselendprodukten und ggf. Medikamenten. Als endokrines Organ produziert die Plazenta Hormone, die für den Erfolg der Schwangerschaft entscheidend sind [4].



**Abbildung 1: Darstellung der Trophoblastinvasion in die Dezidua (modifiziert nach Huppertz 2018 [5])**

### 1.1.3 Die biologische Funktion von hCG, Progesteron, Östradiol und AFP in der Schwangerschaft

Das humane Choriongonadotropin (hCG) gehört der Familie der Glykoproteine an. hCG wird initial von der Blastozyste, im weiteren Verlauf vom Synzytiotrophoblasten freigesetzt. Nach Sekretion in den mütterlichen Kreislauf wird hCG über die Nieren ausgeschieden. Die Bestimmung des hCG im Urin wird zur Feststellung der Frühschwangerschaft genutzt [6]. Die Serum-hCG-Werte steigen im ersten Trimenon rasch an, erreichen um die 10. SSW ihren Höhepunkt und nehmen bis zum Ende der Schwangerschaft sukzessive ab [4]. Funktionell stimuliert hCG die Progesteron- und Östrogensynthese des *Corpus luteum* (Gelbkörper) bis der Synzytiotrophoblast den Gelbkörper in dieser Funktion ablöst [6]. Weiterhin agiert hCG als Regulator der Trophoblastinvasion und fördert die deziduale Angiogenese [7]. Bei Mäusen werden vergleichbare Funktionen durch das homologe luteinisierende Hormon (LH) ausgeführt. hCG hat eine dem LH ähnliche Struktur und beide binden an den gleichen Rezeptor [8]. Die LH/CG-Rezeptoren werden vom Synzytium, den Zytotrophoblastzellen und extravillösen Trophoblastzellen exprimiert [7]. Immunzellen exprimieren ebenfalls den LH/CG-Rezeptor und initiieren toleranzförderliche Prozesse an der fetomaternalen Grenzfläche über diesen [9].

Das Steroidhormon Progesteron (P4) wird zunächst im *Corpus luteum graviditatis* und danach vom Synzytiotrophoblasten gebildet [4]. Der P4-Spiegel im mütterlichen Blut steigt kontinuierlich und rapide nach der 10. SSW, als Folge des Plazentawachstums, an (Tabelle 1) [10]. Die schwangerschaftserhaltenden Funktionen von P4 umfassen die Umwandlung vom proliferativen in ein sekretorisches Endometrium und Relaxation der Uterusmuskulatur. Beides sind grundlegende Voraussetzungen für die Implantation des Embryos [6]. Ferner moduliert P4 proinflammatorische (Th1) und antiinflammatorische (Th2) Elemente des mütterlichen Immunsystems, um die Toleranz des Fetus zu unterstützen [10]. Verschiedene Immunzellen exprimieren P4-Rezeptoren und produzieren in Gegenwart von P4 den Progesteron-induzierten Blockierungsfaktor (PIBF), welcher immunsuppressive Effekte vermittelt [11].

Östrogene gehören ebenfalls der Gruppe der Steroidhormone an. Sie werden im Ovar, der Plazenta, den mütterlichen und fetalen Nebennieren gebildet und setzen sich aus Östron (E1), Östradiol (E2) Östriol (E3) sowie Östetrol (E4) zusammen. E2 stellt das endokrinologisch wirksamste Östrogen der Frau dar [7]. In der Schwangerschaft wird die E2-Synthese zunächst im *Corpus luteum graviditatis* unter hCG-Einfluss gesichert. Anschließend übernimmt der Synzytiotrophoblast die überwiegende Produktion. E2 wird in großen Mengen in die mütterliche Blutzirkulation gegeben, sodass die Serum-E2-Werte kontinuierlich bis zur Geburt ansteigen. Funktionell fördern Östrogene das Wachstum des graviden Uterus und des Brustdrüsengewebes [6]. E2 stimuliert das Wachstum sowie die Differenzierung des Uterusepithels und unterstützt damit die Embryoimplantation. Außerdem reguliert es die Angiogenese und uteroplazentare Perfusion [12]. Am Schwangerschaftsende erhöhen E2 und E3 die Kontraktilität des Myometriums, um Wehen auszulösen [7]. Östrogenrezeptoren werden von Lymphozyten, natürlichen Killer (NK)-Zellen und dendritischen Zellen (DZ) exprimiert [13].

**Tabelle 1: Mütterliche Serumwerte für hCG, P4, E2 und AFP innerhalb der Schwangerschaft**

<b>Protein</b>	<b>hCG<sup>*[14]</sup></b>	<b>P4<sup>[15, 16]</sup></b>	<b>E2<sup>[16]</sup></b>	<b>AFP<sup>*[17]</sup></b>
<b>Zeitraum</b>	<b>mIU/ml</b>	<b>ng/ml</b>	<b>pg/ml</b>	<b>ng/ml</b>
<b>Nicht schwanger</b>	< 1 **	< 20	< 443	< 7
<b>1. Trimenon</b>	5 – 188000	8 – 48	188 – 2497	9 – 18
<b>2. Trimenon</b>	109990-2390	32–79	1278-7192	53 – 80
<b>3. Trimenon</b>	58125-2228	99-342	3460 - 6137	98 – 283

\* **Referenzwerte, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Uniklinik Magdeburg**

\*\* **prämenopausal**

Das Glykoprotein Alpha-Fetoprotein (AFP) wird physiologisch primär während der Schwangerschaft produziert. Synthesorte sind der Dottersack, die fetale Leber und der fetale Gastrointestinaltrakt. Daher ist AFP in hoher Konzentration im fetalen Serum (50-3000 µg/ml) und in der Amnionflüssigkeit nachweisbar [18]. Es diffundiert diaplazentar in das mütterliche Serum (Tabelle 1). Im Erwachsenenalter ist die AFP-Produktion bis auf Kleinstmengen supprimiert [19]. AFP wird als Tumormarker für das hepatozelluläre Karzinom und im Rahmen der Pränataldiagnostik eingesetzt, da abweichende Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit oder im mütterlichen Serum auf Chromosomenbesonderheiten und körperliche Fehlbildungen hinweisen können. Strukturell ähnelt AFP dem Albumin und fungiert als Transportmolekül [18]. Zudem wird diskutiert, ob AFP den Embryo vor mütterlichen Östrogenen schützt und immunologischen Abstoßungsreaktionen vorbeugt [20]. Obwohl mehrere Studien das immunregulatorische Potenzial von AFP im Hinblick auf das hepatozelluläre Karzinom belegen, gibt es wenige Informationen darüber, ob und wie AFP die Modulation des Immunsystems innerhalb der Schwangerschaft beeinflusst [21].

## 1.2 Die Schwangerschaft der Maus

Die Mechanismen, die der Plazentation beim Menschen und der Maus zugrunde liegen, sind zu einem großen Teil vergleichbar [22]. Eine kurze Trächtigkeitdauer, hohe Reproduktionsrate und die Möglichkeiten genetischer Manipulation bei der Maus sind attraktive Voraussetzungen für die Aufklärung dieser Mechanismen und die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den Menschen. Für diese Arbeit insbesondere sind die, für Mensch und Maus vergleichbaren, regulatorischen Immunmechanismen während der Schwangerschaft wichtig. Die Embryonalentwicklung der Maus

dauert 18-21 Tage und lässt sich in drei Abschnitte unterteilen. Im ersten Abschnitt wird die Eizelle im Eileiter befruchtet, wandert in das Uteruslumen und entwickelt sich über Zellteilungsprozesse zu einer Blastozyste heran. Im zweiten Abschnitt, etwa 4,5 Tage nach der Befruchtung, nistet sich die reife Blastozyste in der Uteruswand ein [23]. Das Zeitfenster der Implantation wird durch das Zusammenspiel von P4 und Östrogenen bestimmt. Der Implantation folgt der Prozess der Dezidualisierung. Der letzte Abschnitt umfasst die Embryonalentwicklung.

Im Blastozystenstadium formt sich eine mit Flüssigkeit gefüllte Blastozystenhöhle (Blastozöl). Diese wird von einer äußeren epithelialen Schicht, dem Trophektoderm, umgeben. Das Trophektoderm differenziert sich in die verschiedenen Trophoblastzelltypen, darunter Trophoblastriesenzellen, die das Uterusepithel infiltrieren und mütterliche Blutgefäße eröffnen [24]. Dadurch bilden sich Blutsinusoiden, die in direktem Kontakt mit den fetalen Trophoblastzellen stehen. Im Blastozöl entsteht die innere Zellmasse, aus der sich embryonale Strukturen entwickeln [24]. Die innere Zellmasse ist auch der Ursprung der Dottersackhöhle, die bis zur Entwicklung der Plazenta den Nährstoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Embryo reguliert. Ab Tag Neun wird diese Funktion schrittweise von der Plazenta übernommen. Die Plazenta entsteht durch die Fusion von Allantois und Chorionplatte. Mit dem Fusionsprozess beginnt die Differenzierung der drei abgrenzbaren Trophoblaststrukturen der Plazenta: Trophoblastriesenzellen, Spongiotrophoblast und Labyrinth [22]. Etwa ab Tag 10,5 ist die Mausplazenta ausgebildet. Sie setzt sich aus den folgenden Schichten zusammen: Dezidua Trophoblastriesenzellen, Spongiotrophoblast und Labyrinth [24]. Die Dezidua beinhaltet große mütterliche Blutgefäße, welche die Blutversorgung der Implantation sicherstellen. Durch die Invasion der Trophoblastriesenzellen in die mütterlichen Gefäße entsteht ein fortwährender Blutfluss ausgehend von den mütterlichen Sinusoiden, über den Spongiotrophoblasten zum Labyrinth. Das Labyrinth sichert die Versorgung des Fetus. Der labyrinthine Trophoblast besteht aus den beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten und dem Endothel der fetomaternalen Blutgefäße [25]. Die Hauptaufgabe der Plazenta beinhaltet den Austausch von Nährstoffen und Gasen zwischen mütterlichem und fetalem Blut. Darüber hinaus produzieren Spongiotrophoblast und Trophoblastriesenzellen Hormone, die sowohl lokale als auch systemische Adaptationen des Muttertiers gewährleisten [22, 25].

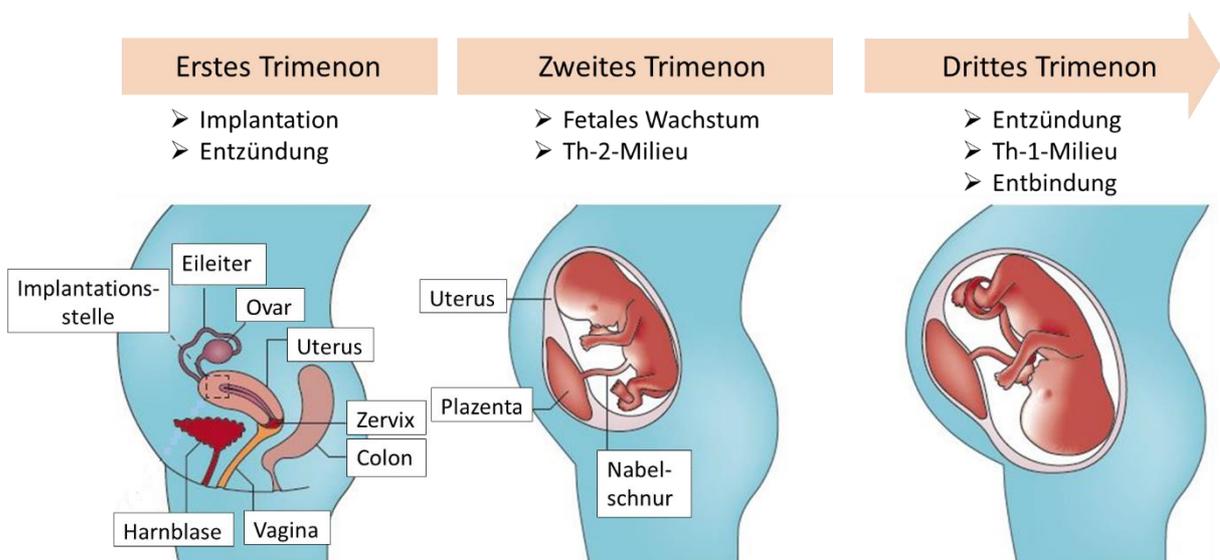
### **1.3 Allgemeine Konzepte der Immunologie**

Das Immunsystem erkennt Pathogene und reagiert auf sie über die angeborene und die adaptive Immunantwort. Die angeborene Immunantwort produziert unspezifische und schnelle Reaktionen. Die adaptive Immunantwort führt spezifische und effektivere Reaktionen aus und lässt sich in einen humoralen (Antikörper [Ak] -produzierenden) Arm und einen zellulären Arm unterteilen. Treffen Pathogene auf naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Th0), entwickeln sich diese in Th1- oder Th2-Zellen. Th1-Zellen unterstützen den zellulären Arm, Th2-Zellen unterstützen den humoralen Arm. Beide Systeme hemmen sich gegenseitig, sodass es Th1-dominierte oder Th2-dominierte Immunreaktionen gibt. Immunzellen vermitteln ihre Wirkung über die Freisetzung von Zytokinen. Diese werden funktionell in

zwei Gruppen eingeteilt: pro- und antiinflammatorisch. Vereinfacht dargestellt produzieren Th1-Immunreaktionen proinflammatorische Zytokine und Th2-Immunreaktionen antiinflammatorische Zytokine. Neben CD4<sup>+</sup> Helferzellen gibt es CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, die infizierte Zellen eliminieren, und regulatorische T-Zellen (Treg), die entzündliche Immunantworten supprimieren.

## 1.4 Immunologische Prozesse innerhalb der Schwangerschaft

Mit Beginn der Implantation steht der semiallogene Fetus, der mütterliche und paternale Gene exprimiert, in direktem Kontakt zur Dezidua. Infiltrierende Immunzellen sind ein wesentlicher Bestandteil der Dezidua. Aus frühen Studien geht hervor, dass die Anzahl mütterlicher Immunzellen in der Dezidua mit erfolgreicher Implantation ansteigt [26]. Diese Beobachtung unterstützte auf den ersten Blick die von Peter Medawar zuvor vorgeschlagene Theorie basierend auf einem immunsupprimierten Wirt-Transplantat-Modell [27]. In der Theorie stellt der Embryo ein Semiallotransplantat dar, dessen Implantation eine, gegen den Embryo gerichtete, mütterliche Immunreaktion auslöst, die für eine erfolgreiche Schwangerschaft unterdrückt werden muss. Neuere Erkenntnisse widerlegen diese Theorie [1]. Unsere Gruppe konnte 2005 zeigen, dass mütterliche Immunzellen fetale Antigene erkennen und aktiv tolerieren [28]. Darüber hinaus zeigten Hanna und Kollegen, dass Immunzellen die Trophoblastinvasion aktiv unterstützen [29]. Der Vergleich einer Schwangerschaft mit einem Transplantat hätte auch in den 50er Jahren nicht so erstellt werden sollen, denn schon damals galt es als bewiesen, dass fetale Antigene die mütterliche Zirkulation erreichen [30]. Aktuell vergleichen die meisten Kollegen die immunologischen Prozesse, die während der Schwangerschaft auftreten, mit den Immunprozessen, die Tumorwachstum und Metastasenbildung begünstigen. Prof. Mor unterteilt die immunologischen Veränderungen in drei Stadien (Abbildung 2) [31].



**Abbildung 2: Darstellung der immunologischen Stadien der Schwangerschaft (modifiziert nach Mor 2017 [31])**

Das erste Stadium ist auf eine proinflammatorische lokale Umgebung angewiesen. Immunzellen werden aktiv rekrutiert, um die Implantation der Blastozyste zu unterstützen. Gleichzeitig werden immunmodulierende Prozesse eingeleitet, um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden und die Trophoblastinvasion zu kontrollieren. Das Gelingen der Prozesse hängt wesentlich davon ab, dass Trophoblastzellen gut mit mütterlichen Immunzellen in der Dezidua interagieren. Das zweite Stadium umfasst das fetale Wachstum und zeichnet sich durch ein entzündungshemmendes Th2-Profil aus. Die Zeit kurz vor der Geburt bis zur Entbindung ist durch ein erneutes Th1-Milieu gekennzeichnet, um Uteruskontraktionen und die Abstoßung der Plazenta zu begünstigen. Dieses Gesamtkonzept verlangt ein dynamisches und reaktionsfähiges Immunsystem, das Implantation und fetales Wachstum fördert und dabei die Ausbreitung von Infektionen verhindert. Ein Ungleichgewicht kann zum Implantationsversagen oder Schwangerschaftskomplikationen führen.

#### **1.4.1 Trophoblast-vermittelte Immunregulation**

Aktuelle Studien zeigen, dass der Trophoblast eine aktive Rolle bei der Formung des immunologischen Milieus an der Implantationsstelle übernimmt. Von Trophoblastzellen produzierte Zytokine sind für die Rekrutierung der Immunzellen zur fetomaternalen Grenzfläche verantwortlich und fördern deren Differenzierung in zelluläre Phänotypen, die für den Erfolg der Schwangerschaft förderlich sind [32–34]. Beispielsweise kann der vom Trophoblasten sezernierte transformierende Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ) die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Treg-Zellen induzieren [35].

#### **1.4.2 Zellbedingte Immunmechanismen in der Schwangerschaft**

Die Dezidua wird frühzeitig von zahlreichen Immunzellen, die dem angeborenen und adaptiven Immunsystem zuzuordnen sind, infiltriert. Den größten Anteil machen uterine NK-Zellen (uNK-Zellen) (70 %) und Makrophagen (20 %) aus [36]. DZ, Mastzellen, T- und B-Zellen treten seltener auf [37].

Uterine NK-Zellen unterscheiden sich von peripheren NK-Zellen (pNK-Zellen) hinsichtlich ihres Phänotyps sowie ihrer Funktion. Im Gegensatz zu pNK Zellen, die überwiegend Virus-infizierte Zellen eliminieren, üben uNK-Zellen eine eher regulatorische Funktion aus [38]. Diese zeichnet sich durch eine stark herunterregulierte Zytotoxizität und die Induktion von Treg-Zellen aus [39]. Über die Produktion von inflammatorischen Zytokinen beispielsweise IFN- $\gamma$ , Angiogenese-fördernden Substanzen wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und Wachstumsfaktoren regulieren sie die Trophoblastinvasion und fördern den Umbau der Spiralarterien [40].

Makrophagen sind wichtig für die Phagozytose absterbender Trophoblastzellen. Als heterogene Population passen sie ihren Phänotyp an die jeweilige Umgebung an. M2-Makrophagen sezernieren entzündungshemmende Th2-Zytokine und werden mehrheitlich innerhalb der gesunden Schwangerschaft gefunden. Fehlfunktionen von Makrophagen sowie ein Anstieg von proinflammatorischen M1-Makrophagen werden der IUGR und Präeklampsie zugeordnet [41]. Die

Rolle von uNK-Zellen und Makrophagen in der Schwangerschaft wird in der Arbeit von Fass und de Vos ausführlich diskutiert [40].

Die Rolle von DZ ist vergleichsweise ungeklärt. Faktisch können sie je nach Reifegrad als antigenpräsentierende Zellen (APZ) Immunantworten generieren oder unterdrücken [36]. Darüber hinaus üben sie wichtige Funktionen an der fetomaternalen Grenzzone aus, welche den Implantationsprozess fördern [42].

Mastzellen sind als Effektorzellen allergischer Erkrankungen bekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Zellen immunregulatorische Funktionen in der Schwangerschaft ausüben. Sie sind in großer Anzahl in der Dezidua vorhanden und hauptsächlich in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert. Ihre Abwesenheit in Mäusen führt zu schwerwiegenden Implantationsstörungen, gefolgt von einem mangelhaften Umbau der Spiralarterien, welcher durch den systemischen Transfer von Mastzellen wiederhergestellt werden kann [43]. Uterine Mastzellen und uNK-Zellen arbeiten synchron am Umbau der Spiralarterien, gleichen sich gegenseitig aus und die Abwesenheit von beiden führt im Mausmodell zu einer schweren IUGR [44, 45].

Eine essenzielle Zellpopulation in der Schwangerschaft sind die Treg-Zellen [46, 47]. Die Generierung zirkulierender sowie uteriner Treg-Zellen wird durch väterliche Antigene in der Frühschwangerschaft induziert, um alloreaktive Immunantworten zu unterdrücken [28, 48, 49, 50]. Sasaki und Kollegen zeigten eine lokale Anreicherung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> Treg-Zellen in der Dezidua gesunder schwangerer Frauen [51]. Ihre Rekrutierung in die Dezidua wird unter anderem durch hCG gesteuert [9]. Eine geringe Anzahl systemischer und lokaler Treg-Zellen wurde sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen mit Fehlgeburten nachgewiesen [28, 51]. Die Übertragung von Treg-Zellen auf trächtige Mäuse, die unter spontanen Fehlgeburten litten, rettete die Feten vor einer Abstoßung [28]. Es wird vermutet, dass Treg-Zellen über immunregulatorische Moleküle eine Fetus-freundliche Mikroumgebung induzieren.

Ebenso wie T-Zellen werden B-Zellen primär dem adaptiven Immunsystem zugeordnet. Die Rolle von B-Zellen in der Schwangerschaft ist von großem Interesse, nicht nur aufgrund der Produktion von Antikörpern, die durch die Plazenta den Fetus erreichen können, sondern auch weil kürzlich regulatorische Subpopulationen identifiziert wurden. Das Kapitel 1.5 geht detailliert auf diese Zellpopulation und deren Bedeutung für die Schwangerschaft ein.

### **1.4.3 Störung der Frühschwangerschaft**

Eine erfolgreiche Schwangerschaft basiert unter anderem auf einer gut abgestimmten Interaktion zwischen mütterlichen Immunzellen und Trophoblastzellen, wobei beide durch Hormone reguliert werden. Die Beeinträchtigung der Interaktion kann die Ursache für Entwicklungs- und Funktionsstörungen der Plazenta oder Abstoßungsreaktionen sein. Frühaborte betreffen ca. 15-20% der Schwangerschaften und treten meist sporadisch auf. Von einem rezidivierenden Geschehen spricht die deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, wenn drei oder mehr aufeinanderfolgende

Schwangerschaftsverluste vor der 24. SSW eingetreten sind [52]. RSA betreffen etwa 1–3% der Paare im reproduktionsfähigen Alter und stellen eine große psychische Belastung für die Betroffenen dar [53]. Die Ursachen sind multifaktoriell und beinhalten angeborene und erworbene Störungen in variabler Kombination [54]. Etwa 50% der Fälle bleiben ungeklärt. Hier sind immunologische Faktoren wahrscheinlich beteiligt [55]. Vergleichsstudien von RSA-Patienten mit gesunden Kontrollpersonen haben zahlreiche immunologische Veränderungen aufgedeckt [56]. Beispielsweise wird vermutet, dass das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  bei RSA-Patienten verstärkt auftritt und die Ausbildung einer zytotoxischen Immunantwort der Mutter gegenüber dem Fetus stimulieren kann [57–59]. Die Einordnung der Ergebnisse entsprechend einer Ursache oder Folge ist jedoch problematisch. Ebenso schwierig ist es die zugrundeliegenden Mechanismen der Immundysregulation zu verstehen, da die physiologischen Mechanismen zur Etablierung der Schwangerschaftstoleranz nicht vollständig geklärt sind. Eine immunologische Diagnostik und immunmodulatorische Therapieansätze werden in erster Linie im Rahmen klinischer Studien durchgeführt.

## **1.5 B-Zellen**

B-Zellen sind Effektorzellen des adaptiven Immunsystems und repräsentieren 5–15% der zirkulierenden Lymphozyten [60]. Überwiegend im Knochenmark entwickeln sie sich ausgehend von hämatopoietischen Stammzellen in Pro-B-, Prä-B- und dann unreife B-Zellen [61]. Letztere exprimieren eine große Vielfalt einzigartiger Antigenbindungsstellen und werden an mehreren Kontrollpunkten auf ihren Grad an Autoreaktivität getestet [62]. Funktionell unreife B-Zellen, die den Ig-Rezeptor IgM (als B-Zell-Rezeptor) auf der Zelloberfläche exprimieren, verlassen das Knochenmark und migrieren in die Milz. Dort differenzieren sie sich in folliculäre oder Marginalzonen-B-Zellen (MZ-B-Zellen). Folliculäre B-Zellen zirkulieren im Blut, den Geweben sowie Lymphknotenfollikeln und werden dort von spezifischen Antigenen aktiviert. Die Antigenbindung erfolgt über den B-Zell-Rezeptor [63]. Die Aktivierung der B-Zelle durch das Antigen allein bewirkt die Umwandlung in eine kurzlebige IgM-produzierende Plasmazelle (extrafolliculäre Aktivierung). Kommen B-Zellen sowohl mit dem Antigen als auch T-Zellen in Berührung bildet sich ein Keimzentrum. So entstehen bedingt durch die folliculäre Keimzentrumsreaktion Plasmazellen, die hochaffine Ak produzieren, und persistierende Gedächtniszellen (primäre Immunantwort). Die wiederholte Aktivierung der Gedächtniszellen durch das gleiche Antigen führt zu einer prompten Generierung von Plasmazellen, die große Mengen spezifischer IgG-Ak produzieren (sekundäre Immunantwort). So können B-Zellen auf eine Reinfektion deutlich schneller und effektiver reagieren. Neben der Ak-Produktion fungieren B-Zellen als APZ und beeinflussen die Reifung, Migration und Funktion anderer Effektorzellen (z.B. über Zytokine) [64].

### **1.5.1 B-Zell-Untergruppen**

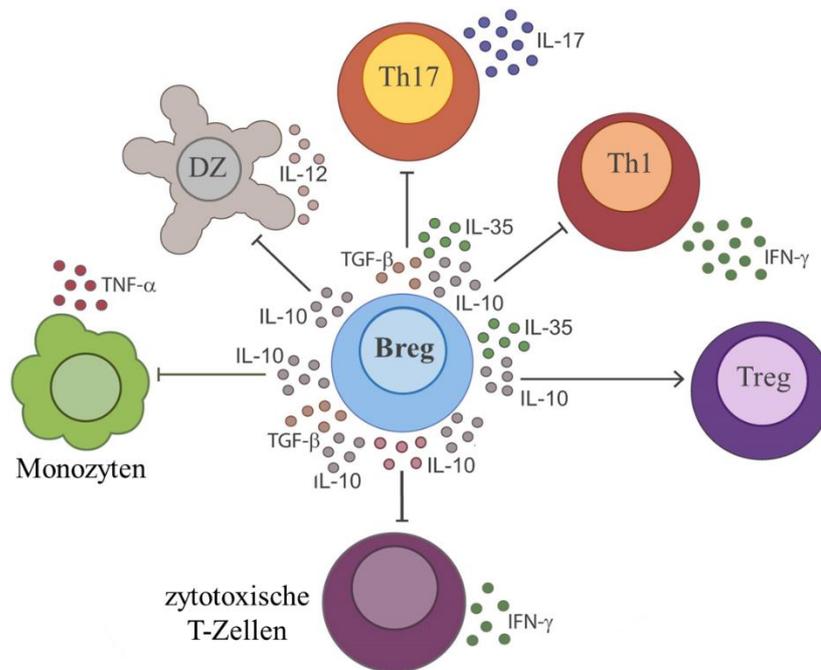
Entsprechend ihrer Entwicklung, anatomischen Lage, Oberflächenmarkerexpression und Funktion werden reife B-Zellen häufig in drei Subpopulationen eingeteilt: B1-, folliculäre B2- und MZ-B-Zellen

[65]. B1-Zellen werden früh in der Ontogenie in der fetalen Leber gebildet. Ihre Anzahl bleibt durch Selbsterneuerung erhalten. Sie produzieren kreuzreaktive, natürliche Ak, insbesondere IgM, gegen ein breites Spektrum an Antigenen und sind somit eher unspezifisch. Die Ak-Produktion ist schnell und T-Zell-unabhängig. Den B1-Zellen wird eine Beteiligung an Autoimmunerkrankungen zugesprochen, da ihre Ak autoreaktiv wirken können. Basierend auf phänotypischen Merkmalen werden B1-Zellen in B1a und B1b-Zellen unterteilt [65]. Im Konsens exprimieren humane B1a-Zellen den Oberflächenmarker CD5, B1b-Zellen nicht. Follikuläre B2-Zellen entstammen dem Knochenmark. Sie machen den Hauptteil der zuvor illustrierten B-Zellen aus. Ihre Proliferation ist auf die Antigenbindung angewiesen, nach der sie sich primär an einer T-Zell-abhängigen Immunantwort beteiligen. B2-Zellen reagieren mit hoher Spezifität und sind für das B-Zell-Gedächtnis verantwortlich. MZ-B-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der frühen Immunantwort gegen Pathogene, die über das Blut eindringen. Sie zirkulieren nicht, sondern besiedeln die Marginalzone der Milz. Dort sind ebenfalls Makrophagen angereichert, die den MZ-B-Zellen Antigene aus dem Blut präsentieren. Über den Kontakt mit membrangebundenen Ak entwickeln sie sich T-Zell-unabhängig schnell zu IgM-sekretierenden Plasmazellen. Eine jüngst identifizierte Gruppe sind die regulatorischen B-Zellen (Breg-Zelle). Sie entstammen unterschiedlichen B-Zell-Linien und Entwicklungsstadien und werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

### **1.5.2 Regulatorische B-Zellen**

Am Beispiel der Treg-Zellen wird deutlich, dass regulatorische Zellen für den Aufbau bzw. Erhalt der fetalen Toleranz essenziell sind. Es gibt Hinweise, dass B-Zellen ein Teil dieses regulatorischen Netzwerkes sind. Publikationen zur Erforschung von Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Tumorerkrankungen und Organtransplantationen haben B-Zellen identifiziert, die für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und die Unterdrückung von Entzündungen von entscheidender Bedeutung sind [66–70]. So berichteten Janeway und Kollegen zuerst, dass sich die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE, Tiermodell der humanen Multiplen Sklerose [MS]) in Mäusen mit B-Zell-Mangel verschlechtert [71]. Mizoguchi und Kollegen entdeckten, dass die Gegenwart von B-Zellen übermäßige Entzündungsreaktionen unterdrückt, die andernfalls zu der Entwicklung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung beitragen können [72]. Die als regulatorische B-Zellen zusammengefasste Population besteht aus einer Vielzahl von B-Zell-Untergruppen, entsprechend ihres Ursprungs und ihrer Oberflächenmarkerprofile. Das Hauptmerkmal der Breg-Zellen ist eine funktionelle Eigenschaft, und zwar die Produktion von IL-10, einem potenten entzündungshemmenden Zytokin. Daher werden IL-10-produzierende B-Zellen aus funktioneller Sicht auch als „B10-Zellen“ bezeichnet [73, 74]. In Mausstudien beträgt der prozentuale Anteil an B10-Zellen innerhalb der gesamten B-Zell-Population in der Milz 1–3% [75, 76]. IL-10 besitzt die Fähigkeit Immunantworten über zahlreiche Mechanismen zu modellieren (Abbildung 3). Mauri und Kollegen entdeckten, dass IL-10-produzierende B-Zellen die Th1-Differenzierung unterdrückten und die Entwicklung einer Autoimmunarthritis verhinderten bzw. die bereits ausgebrochene Krankheit linderten [77]. Dieser Mechanismus erwies sich als IL-10-abhängig, da isolierte B-Zellen aus IL-10-defizienten Mäusen sowie

die Blockierung von IL-10 die protektiven Prozesse hemmte [75, 77]. Carter und Kollegen zeigten, dass IL-10-produzierende B-Zellen nach Antigenstimulation die Differenzierung in Treg-Zellen fördern können [78]. Die Differenzierung proinflammatorischer Th17-Zellen wird dagegen gehemmt [79]. IL-10-produzierende B-Zellen können auch die antigenpräsentierenden Kapazitäten von DZ supprimieren und deren Zytokinsekretion beeinflussen [80]. Gleichwohl üben Breg-Zellen ihre regulatorische Funktion über mehr als einen Mechanismus aus. IL-10-unabhängige Mechanismen umfassen die Freisetzung der Zytokine IL-35 und TGF- $\beta$  sowie die Fähigkeit mit anderen Zellen des Immunsystems durch direkten Zellkontakt zu interagieren [73, 81–86].



**Abbildung 3: Funktionelle Effektormechanismen der Breg-Zellen (modifiziert nach Mauri und Rosser 2015 [74])**

Neben der Untersuchung immunregulatorischer Funktionen ist die Charakterisierung der Breg-Zellen eine besondere Herausforderung. So erschwert die Heterogenität der Zellpopulation die Identifizierung spezifischer Oberflächenmarker. Im Menschen wurden Breg-Zellen als CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B-Zellen, CD27<sup>int</sup>CD38<sup>hi</sup> Plasmablasten, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD147<sup>+</sup> B-Zellen und CD19<sup>+</sup>TIM-1<sup>+</sup> B-Zellen beschrieben [87–89]. In Mausstudien wurden CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>PC1<sup>high</sup> B-Zell-Populationen beschrieben, die in der Lage ist, IL-10 zu synthetisieren [75, 90, 91]. Auch die Stimuli und zugrundeliegenden Mechanismen für die Umwandlung von B-Zellen in Breg-Zellen sind bisher wenig verstanden. Grundsätzlich wird die Induktion von Breg-Zellen durch eine spezifische Umgebung, insbesondere eine Entzündung begünstigt [92]. Induktionssignale umfassen Entzündungsreize, die Toll-like-Rezeptoren oder membrangebundene Ak auf B-Zellen direkt aktivieren oder die Produktion kostimulatorischer Signale (darunter CD40) und relevanter Zytokine fördern [93]. Synthetische Immunstimulatoren wie CpG-Oligodesoxynukleotide können ebenfalls IL-10-produzierende B-Zellen induzieren [94]. In Gliomen wurde der Plazentawachstumsfaktor (PIGF) als Breg-induzierender Faktor identifiziert [95]. Wang und Kollegen berichteten, dass das

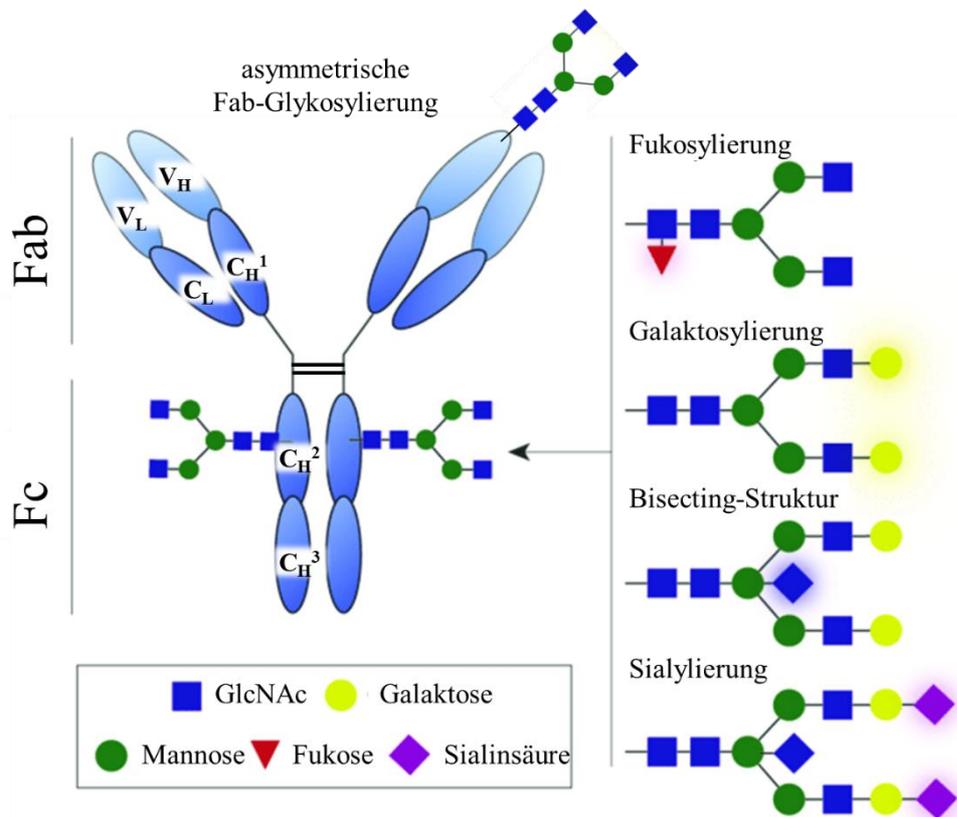
antiinflammatorische IL-35 die Differenzierung in Breg-Zellen einleitet. [82]. Die beiden letztgenannten Studien veranschaulichen, dass die Induktion von Breg-Zellen nicht nur auf Entzündungsreize beschränkt ist. Hervorzuheben ist, dass die Identifizierung von Breg-Zellen *in vitro* eine solide und kombinierte Stimulation mehrerer Signale erfordert [89]. Aktuelle Humanstudien zeigen, dass numerische und funktionelle Breg-Zell-Defekte zu immunologisch bedingten Pathologien beitragen können. Daien und Kollegen beobachteten, dass die Anzahl an CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) im Vergleich zu gesunden Kontrollen verringert war und die Häufigkeit IL-10-produzierender B-Zellen negativ mit der Krankheitsaktivität korrelierte [96]. Die CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Population war ebenfalls reduziert in Patienten mit RA im Vergleich zu gesunden Kontrollen [97]. Darüber hinaus konnten die wenigen CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B-Zellen der erkrankten Personen die T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) nicht in Treg-Zellen umwandeln. Blair und Kollegen zeigten, dass CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B-Zellen von Patienten mit systemischem *Lupus erythematoses* weniger IL-10 produzierten [88]. Obgleich eine Studie zur Autoimmundermatose einen numerischen Anstieg der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Population in Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnete, so war ihre supprimierende Wirkung ebenfalls signifikant vermindert [98].

## 1.6 Immunglobuline: Struktur und Subklassen

B-Zellen können sich, wie zuvor beschrieben, in Ak-produzierende Plasmazellen differenzieren. Ak dienen der Abwehr von Pathogenen; als Auto-Ak können sie jedoch körpereigene Strukturen angreifen und Erkrankungen verursachen. Ihre Struktur umfasst zwei identische schwere Ketten (H) und zwei identische leichte Ketten (L). Jede schwere Kette besteht aus einer variablen Region (VH) und drei (IgG, IgA) bzw. vier (IgM, IgE) konstanten Bereichen (CH1-4) [99]. Zwischen CH1 und CH2 liegt eine Gelenkregion. Die leichten Ketten besitzen je eine variable (VL) und eine konstante Region (CL). Die variable Region ermöglicht Ak unterschiedliche, spezifische Antigene zu binden. Die konstante Region besitzt Bindungsstellen, um mit Effektormolekülen interagieren zu können. Strukturelle Unterschiede ermöglichen die Unterteilung in fünf Klassen. IgM und IgG kommen vorwiegend im Serum vor. IgA ist in Körpersekreten und im Serum nachweisbar. IgD und IgE sind nur in geringen Mengen im Blut vorhanden [99]. Durch enzymatische Spaltung in der Gelenkregion kann der Ak in ein Rezeptor-bindendes Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmente gespalten werden. Sowohl die Fc-Domäne, die für die Auslösung der Effektorfunktionen verantwortlich ist, als auch die Fab-Arme, die für die Antigenbindung verantwortlich sind, können Glykane enthalten (Abbildung 4).

### 1.6.1 Immunglobulin G

Mit einem prozentualen Anteil von 80% aller Ig ist IgG dominierend im Serum. Es existieren vier IgG-Unterklassen (IgG1-4), die sich in der Induktion von Fc-abhängigen Effektormechanismen unterscheiden. IgG1 stellt mit ca. 70% des Gesamt-IgG die größte Fraktion dar. IgG ist plazentagängig und trägt so zur passiven Immunität des Fetus bei [100].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls inklusive der Fc-Glykosylierung und asymmetrischen Fab-Glykosylierung (modifiziert nach van Erp 2019 [101]).** Konstante Region (C), variable Region (V), leichte Kette (L), schwere Kette (H), Fc-Glykosylierungsmuster.

### 1.6.2 IgG-Fc-Glykosylierung

Die Fc-abhängigen Effektormechanismen von IgG beinhalten die Bindung an den Fc-Rezeptor (FcR) und Aktivierung von FcR-exprimierenden Zellen (z.B. Leukozyten, DZ und NK-Zellen) sowie die Komplementaktivierung. Die Effektormechanismen werden wesentlich durch das Glykosylierungsmuster an einer konservierten N-Glykosylierungsstelle in der CH<sub>2</sub>-Domäne (am Asparagin 297) der Fc-Region beeinflusst. Änderungen in ihrer Zusammensetzung wirken sich auf die Konformation und Funktionalität des Fc-Fragments aus. Die Kernstruktur, bestehend aus N-Acetylglukosamin (GlcNAc) und Mannose, kann durch weitere Bausteine wie Fukose, ein „bisecting“ GlcNAc, sowie durch terminale Galaktose und Sialinsäure verändert werden. Je nach Glykosylierungsmuster agieren die IgG-Moleküle pro- oder antiinflammatorisch [102]. Beispielsweise wirkt terminal sialyliertes und galaktosyliertes IgG eher antiinflammatorisch, wohingegen das Vorhandensein von bisecting GlcNAc am IgG proinflammatorisch wirkt. Der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen wurde bereits ein proinflammatorisches Glykosylierungsmuster zugeschrieben [103]. Patienten mit RA, Morbus Crohn und systemischem *Lupus erythematodes* wiesen eine geringere Anzahl an galaktosyliertem und sialyliertem IgG im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Es wird vermutet, dass der Anstieg der IgG Galaktosylierung innerhalb der Schwangerschaft mit der Verbesserung des RA-Krankheitsbildes korreliert [104].

### **1.6.3 IgG-Fab-Glykosylierung**

Margni und Binaghi entdeckten, dass die Antigen-bindenden Fab-Regionen ebenfalls Glykane binden können [105]. Etwa 20% der variablen IgG-Domänen besitzen dafür N-verknüpfte Glykosylierungsstellen, welche die Antigen-Bindungsaffinität dramatisch beeinflussen können. Spezifische Muster der Fab-Glykosylierung treten sowohl in physiologischen als auch pathologischen Situationen auf. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen für Fc-Glykane, zeigt sich das IgG-Fab-Glykosylierungsmuster in der Schwangerschaft antiinflammatorisch [106]. Es gibt eine Population von Fab-glykosylierten IgG-Ak, die auf nur einem Fab-Arm des Moleküls einen Kohlehydratrest trägt [107]. Diese asymmetrischen Ak (AAk) können aufgrund ihrer Asymmetrie keine immunologischen Mechanismen auslösen; sie können jedoch als blockierende Ak fungieren [108]. Es wird vermutet, dass der glykosylierte Fab-Arm das Antigen, auf das er trifft, nicht bindet. Somit wäre der Ak einwertig, was die Bildung von funktionell aktiven Immunkomplexen ausschließt. Eine unerwünschte Immunreaktion gegen den Fetus würde minimiert werden, indem AAk väterliche Antigene einseitig binden, ohne Effektormechanismen zu aktivieren.

## **1.7 Die Rolle von B-Zellen innerhalb der Schwangerschaft**

In der Schwangerschaft wurden B-Zellen zunächst über ihre Fähigkeit der Ak-Produktion definiert. Gustafsson und Kollegen zeigten, dass Ig-defiziente Mäuse allogene Schwangerschaften austragen konnten, wobei die Würfe signifikant geringere Geburtsgewichte besaßen [109]. Postnatal wiesen die Neugeborenen eine hohe Mortalitätsrate aufgrund der fehlenden Übertragung mütterlicher Ak über die Milch auf. Vor dem Hintergrund, dass B-Zellen exklusiv als Ak-produzierende Lieferanten gesehen wurden, wurde die Gegenwart von B-Zellen für den Schwangerschaftsverlauf anfänglich als nicht essenziell eingestuft. Gegenwärtige Hinweise aus Human- und Mausstudien zeigen, dass B-Zellen für den Schwangerschaftsverlauf von Vorteil oder von Nachteil sein können [27, 110, 111, 112]. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass B-Zellen entsprechend ihrer jeweiligen Subpopulation und der Produktion sowohl schützender als auch autoreaktiver und alloreaktiver Ak an schwangerschaftsförderlichen oder regressiven Veränderungen beteiligt sind.

### **1.7.1 Veränderungen des B-Zellkompartiments und die Bedeutung mütterlicher Antikörper**

Physiologisch wird die Schwangerschaft von einer peripheren B-Zell-Lymphopenie im Serum begleitet. [113]. Diese Beobachtung wurde mehrfach im Mausmodell [114] und beim Menschen [115–117] (in Vergleichsstudien mit nicht schwangeren Kontrollen) gemacht. Ursächlich ist eine progressive Abnahme der Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark trächtiger Mäuse, gefördert durch Östrogene [118]. Darüber hinaus zeigten Ait-Azzouzene und Kollegen in einem MHC-I-transgenen Mausmodell, dass mütterliche B-Zellen, die fetale Antigene erkennen können, während der Schwangerschaft ebenfalls eliminiert werden [119, 120]. Die biologische Bedeutung der schwangerschaftsassozierten B-Zell-

Lymphopenie und insbesondere die Abnahme potenziell schädlicher B-Zell-Populationen ist nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird eine physiologische Anpassung, um die fetale Immuntoleranz aufrechtzuerhalten. Während viele Studien die absolute Anzahl zirkulierender B-Zellen in der Schwangerschaft untersucht haben, beeinflusst die Suppression der B-Zell-Lymphopoese auch die Verteilung einzelner Subpopulationen im Serum [110, 116, 117, 121, 122]. Bhat und Watanabe haben gezeigt, dass die Anzahl zirkulierender B1-Zellen in der humanen Schwangerschaft abnimmt [116, 121]. Als Hauptquelle für natürliche und polyreaktive Ak wurden B1-Zellen mit der Entstehung bzw. dem Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen assoziiert. Wegweisende Studien lassen darauf schließen, dass die Präeklampsie eine Autoimmunerkrankung ist, die durch pathogene AT1-Auto-Ak (AT1-AA) gekennzeichnet ist [123, 124]. Agonistische Auto-Ak wurden 1999 von Wallukat und Kollegen im Serum schwangerer Frauen entdeckt, die eine Präeklampsie entwickelten [125]. Sie binden den in der Plazenta stark exprimierten AT1-Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors induziert die Produktion von anti-angiogenen Faktoren. Trächtige Tiere, die AT1-AA (gewonnen aus Ratten mit reduziertem uterinen Perfusionsdruck oder präeklampsischen Frauen) ausgesetzt waren, entwickelten Leitsymptome der Präeklampsie sowie erhöhte Konzentrationen des löslichen, klinisch relevanten Biomarkers und Antiangiogenesefaktors sFlt-1 [126–129]. LaMarca und Mitautoren zeigten, dass die Dezimierung von B-Zellen (mittels Rituximab) in einem Tiermodell für Präeklampsie mit niedrigeren AT1-AA-Spiegeln und signifikanten Blutdrucksenkungen korrelierte. Als Grund wird die Unterdrückung endogen erzeugter AT1-AA vermutet. *In-vitro*-Studien haben gezeigt, dass B1a-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), aus dem Serum nulliparer Frauen isoliert und mit Serum von präeklampsischen Frauen stimuliert, AT1-AA erzeugen können. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde ein erhöhter Anteil dieser Subpopulation im Serum und den Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie nachgewiesen (im Vergleich zu Patienten mit gesunden Schwangerschaften) [130]. Diese Daten stützen die Hypothese, dass B-Zell-Subpopulationen zur Pathophysiologie der Präeklampsie beitragen [131]. Schwangerschaftskomplikationen wie der RSA, die IUGR und die Frühgeburtlichkeit werden ebenfalls mit abweichenden B-Zell-Konzentrationen und Funktionsstörungen in Verbindung gebracht [132]. So ist der Anteil an CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> Lymphozyten bei Frauen mit RSA im Vergleich zur Kontrollgruppe gesunder Schwangerer signifikant höher [133–136]. In Bezug auf den Anteil endometrialer B-Zellen gibt es uneinheitliche Aussagen [137, 138]. Eine wichtige Erkenntnis ist jedoch, dass B-Zellen nicht, wie lange vermutet, im Uterus fehlen, sondern in geringen Mengen in der Dezidua vorhanden sind [114, 139]. Somit können sie peripher und lokal an der fetomaternalen Grenzfläche wirken.

Auf der anderen Seite ist nicht jede Exposition gegenüber B-Zellen und mütterlichen Ak schädlich für Schwangerschaft und Fetus. Bereits in den 1980er und 1990er Jahren erforschten mehrere Gruppen nicht-präzipitierende Ak, welche die Etablierung und den Erhalt der Schwangerschaft unterstützen können (zusammengefasst von Margni und Binaghi, 1988 [105]). Diese Population von IgG-Ak zeichnet sich durch eine Asymmetrie in einer der Fab-Regionen aus. AAK wurden in Seren von

Menschen und anderen Säugetieren identifiziert [105, 140, 141]. Der Prozentsatz an IgG-AAk im humanen Serum und im Plazentagewebe der Mutter ist während einer gesunden Schwangerschaft deutlich erhöht [140, 142]. Ihr Mangel wurde mit Spontanaborten in Verbindung gebracht [142]. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde zuvor berichtet, dass von der Mutter synthetisierte, antipaternale Ak in den meisten Fällen asymmetrisch sind und ein hoher Anteil an glykosylierten IgG-AAk an die Plazenta gebunden ist [140]. Ihre Synthese kann zum einen durch Th2-Interleukine reguliert werden [143, 144]. Darüber hinaus wird vermutet, dass hormonelle Einflüsse ihre Freisetzung steuern können [145, 146].

### **1.7.2 IL-10-produzierende B-Zellen als Regulatoren der Immuntoleranz**

Es wurde bereits gezeigt, dass Breg-Zellen akute Entzündungsreaktionen in Richtung eines Th2 Typs modifizieren können und so z.B. eine für Tumorzellen erforderliche Immuntoleranz aufbauen können [147]. Die potenzielle Bedeutung von Breg-Zellen für den Aufbau und Erhalt der Immuntoleranz während der Schwangerschaft wurde zunächst in Mausstudien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl peripherer und uteriner B10-Zellen während der Schwangerschaft zunahm und die Kapazität zur Produktion von IL-10 anstieg [139, 148]. In nicht schwangeren und abortanfälligen Tieren war diese Expansion nicht zu verzeichnen und die Fähigkeit zur IL-10-Produktion war beeinträchtigt. Die Übertragung von B10-Zellen gesunder trächtiger Mäuse in abortanfällige Tiere genügte, um die Abstoßung der Feten zu verhindern [148]. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf eine geringere Anzahl an reifen DZ und einen Anstieg an Treg-Zellen zurückzuführen. Eine Humanstudie konnte die bisherigen Beobachtungen am Mausmodell bestätigen. Patienten, die unter einem Spontanabort litten, besaßen im Vergleich zu gesunden Schwangeren im gleichen Gestationsalter einen geringeren Anteil an Breg-Zellen [149]. Ferner hemmten isolierte IL-10-produzierende B-Zellen von gesunden Schwangeren die TNF- $\alpha$ -Produktion von T-Zellen *in vitro* [149]. Die Daten unterstreichen nicht nur die potenzielle Bedeutung von Breg-Zellen in der Frühschwangerschaft, sondern auch die Notwendigkeit Mediatoren zu identifizieren, die für den Anstieg dieser Population verantwortlich sind. Eine potenzielle Rolle spielen hierbei Schwangerschaftshormone. Es wurde bereits gezeigt, dass B-Zellen Rezeptoren für hCG, P4 und E2 exprimieren. Innerhalb der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen exprimierten fast 95% der Zellen den LH/CG-Rezeptor [149].

## **1.8 Immunmodulierende Eigenschaften von Hormonen und AFP in der Schwangerschaft**

Anpassungen des mütterlichen Immunsystems zum Erhalt der Schwangerschaft werden nachweislich hormonell reguliert. hCG, P4 und E2 sind die Hauptakteure dieser Prozesse. Ihre Wirkung auf die Rekrutierung, Differenzierung und Funktion von Immunzellen unterstützt die Ausbildung immunologischer Toleranzmechanismen und hemmt destruktive Immunantworten [150–152]. Sie agieren über die Bindung spezifischer Rezeptoren, die von Immunzellen exprimiert werden, oder über

die Initiierung der Ausschüttung von Mediatoren. Eine jüngere Theorie zum Schwangerschaftsparadoxon stellt die immunologischen Prozesse der Schwangerschaft den Immunprozessen, die das Tumorwachstum begünstigen, gegenüber [1]. Hohe AFP-Serumspiegel liegen in Tumorerkrankungen und in der Schwangerschaft vor. Die AFP-vermittelte Regulierung des Immunsystems des Wirtes bzw. der Mutter zur Förderung von Tumorwachstum bzw. der fetalen Toleranz wurde schon vereinzelt untersucht. Im Weiteren wird auf die immunmodulierenden Eigenschaften von hCG, P4, E2 und AFP eingegangen.

### **1.8.1 hCG**

Die immunologischen Wirkungen des hCG erleichtern insbesondere die Implantation und die Trophoblastinvasion. Mehrere Studien haben die immunregulatorischen Kapazitäten von hCG auf uNK-Zellen, DZ und T-Zellen beschrieben. So erhöht hCG die Anzahl immunsuppressiver uNK-Zellen im Endometrium und beeinflusst das Th1/Th2 Gleichgewicht (zugunsten von Th2) [153, 154]. Ferner reguliert hCG verschiedene Aspekte der Treg-Zell-Biologie, speziell ihre Rekrutierung zur fetomaternalen Grenzfläche sowie ihre immunsuppressive Funktion (in Maus- und Humanstudien veranschaulicht) [9, 155]. Eine weitere Studie aus unserem Labor zeigte, dass hCG die Umwandlung von T-Zellen in Treg-Zellen hervorrufen kann [152]. hCG reguliert auch den Phänotyp bzw. Reifegrad peripherer und lokaler DZ. Während reife DZ das Immunsystem aktivieren, unterdrücken unreife DZ Immunantworten. Mit Hilfe von hCG können DZ in einem unreifen, tolerogenen Zustand gehalten werden, was die Aktivierung des Immunsystems hemmt, die Generierung von Treg-Zellen jedoch fördern kann [155, 156, 157]. Wenige Studien untersuchen den Effekt von hCG auf B-Zellen in der Schwangerschaft. Eine davon, fokussiert auf den Zusammenhang von B1-Zellen und Schwangerschaftskomplikationen, zeigte, dass die Anzahl der B1-Zellen im dritten Trimenon gesunder schwangerer Frauen signifikant abnahm. Bei Patienten mit Präeklampsie blieb die Anzahl der Zellen hoch. Ebenso wurden in dem Patientenkollektiv erhöhte Serum-hCG-Werte ermittelt [130]. Ein Zusammenhang zwischen hCG und der Präeklampsie wurde bereits 2012 erarbeitet [158, 159]. Ob die abweichenden Konzentrationen Ursache oder Folge der Störungen sind, ist unklar. Bewiesen ist, dass 95% der B1-Zellen den LH/CG Rezeptor exprimieren und mittels hCG-Stimulation *in vitro* expandieren. Die Daten unterstützen die Annahme, dass hCG die Generierung der B1-Zellen fördert [130].

### **1.8.2 Progesteron**

P4 dient der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, insbesondere durch die Hemmung myometrialer Kontraktionen. Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass P4 auch eine Reihe von immunologischen Veränderungen vermittelt, welche die mütterliche Toleranzentwicklung bereits in der frühen Schwangerschaft unterstützen. Dabei werden sowohl angeborene als auch erworbene Immunantworten beeinflusst. Die angeborene Immunantwort einschließlich der Makrophagen- und NK-Zellaktivität wird von P4 unterdrückt. Unter anderem beeinträchtigt P4 die Migration von Makrophagen zum Uterus und

die Produktion proinflammatorischer Moleküle [160, 161]. Tsai und Kollegen berichteten, dass P4 die Differenzierung in immuntolerante M2-Makrophagen fördern kann [162]. Die NK-Zellaktivität wird gestört indem P4 (über PIBF) die Freisetzung von Perforin und anderer zytotoxischer Substanzen blockiert und so ein vorteilhaftes Umfeld für den Embryo erschafft [11, 163]. DZ bilden die Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Als spezialisierte APZ initiieren sie antigenspezifische Immunantworten, vorwiegend über die Interaktion mit T-Zellen. Mehrere Studien zeigen, dass die Stimulation von naiven DZ (aus dem Knochenmark) mit P4 nicht ausgereifte DZ erzeugt und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-12) supprimiert. Beides hemmt die DZ-vermittelte Aktivierung von T-Zellen und fördert die immunologische Toleranz des Fetus [164–166]. In Übereinstimmung mit den immunsuppressiven Effekten von P4 auf das angeborene Immunsystem hemmt P4 die adaptiven Immunprozesse, insbesondere die Entwicklung von Th1-Immunantworten [167–169]. Raghupathy und Kollegen berichteten, dass mit P4 behandelte Lymphozyten, isoliert aus schwangeren RSA-Patientinnen, weniger Th1-Zytokine und mehr Th2-Zytokine produzierten im Vergleich zu Lymphozyten, die nur mit Phytohämagglutinin (T-Zell-Aktivator) stimuliert wurden [170]. Lissauer und Kollegen illustrierten, dass mütterliche (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) T-Zellen in Kultur mit P4 ihre potenziell schädliche IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Produktion einschränkten, hingegen die Produktion von IL-4 steigerten [171]. Untersuchungen der T-Zell-Subpopulation am Mausmodell haben ergeben, dass P4 in der Schwangerschaft konventionelle T-Zellen in Treg-Zellen umwandeln kann. Darüber hinaus erhöhte P4 die IL-10-Expression und verbesserte die supprimierende Funktion der Treg-Zellen [172, 173]. Auch die Produktion AAK kann durch P4 potenziert werden [174, 175].

### 1.8.3 Östradiol

Im Gegensatz zu P4, das überwiegend immunsuppressiv wirkt, hat E2 vielfältige und dosisabhängige immunregulierende Funktionen. In physiologischen Konzentrationen wirkt E2 stimulierend auf das Immunsystem. Mit Beginn der Schwangerschaft steigen die E2-Spiegel dramatisch an, wodurch proinflammatorische Immunantworten unterdrückt werden, was zu einer Th2-Verschiebung der mütterlichen Immunität führt [176]. Unter anderem fördert die Stimulation mit E2 in geringen Konzentrationen die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) aus murinen Makrophagen, während E2 hochdosiert die Zytokinproduktion hemmt [177, 178]. Studien an NK-Zellen zeigten, dass niedrige E2-Konzentrationen die Zytotoxizität von Maus-NK-Zellen *in vitro* verstärken, hohe E2-Konzentrationen die Zytotoxizität schwächen [179, 180]. In Übereinstimmung dokumentierten Gabrilovac und Kollegen eine signifikante negative Korrelation zwischen der NK-Zellaktivität und steigenden E2-Spiegeln in den Seren schwangerer Frauen [181]. Die zellvermittelten und humoralen Immunantworten des adaptiven Immunsystems lassen sich ebenfalls über E2 regulieren. E2-Konzentrationen, entsprechend denen in der Schwangerschaft, können die Generierung von Treg-Zellen induzieren und ihre Funktion verbessern, sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen [150, 182–184]. Für B-Zellen wurde beschrieben, dass die Schwangerschaft zu einer Suppression der frühen Stadien der B-Zell-Lymphopoese führt [185]. Dieser Prozess wird zum Teil über Steroidhormone realisiert. Eine

Folgestudie zeigte, dass die Behandlung von Mäusen mit E2 allein oder in Kombination mit P4 die Anzahl der Vorläufer B-Zellen im Knochenmark reduzierte (im Vergleich zu unbehandelten Mäusen) [186]. Vereinzelt wurde beschrieben, dass E2 eine Umverteilung innerhalb der B-Zell-Subgruppen bewirkt und die Zytokinproduktion von B-Zellen beeinflussen kann [187, 188]. Erkenntnisse aus dem Bereich der Autoimmunerkrankungen haben gezeigt, dass Krankheitssymptome von Frauen mit MS während der Schwangerschaft abnahmen, während postnatal vermehrt Krankheitsschübe auftraten [189, 190]. Der Umstand wird auf den schwangerschaftsbedingten Anstieg von E2 und die damit verbundene Th2-Dominanz zurückgeführt [191]. Neuere Studien dokumentieren, dass E2 die Generierung von Breg-Zellen und ihre entzündungshemmende Funktion in Mäusen mit EAE stimuliert [192, 193]. Beispielsweise zeigten Zang und Kollegen, dass der Transfer von Breg-Zellen in Mäuse mit induzierter EAE und B-Zell-Mangel in Kombination mit E2 den Schweregrad der EAE verbesserte (durch Reduzierung ZNS-lokalisierter Entzündungsprozesse) im Vergleich zu den Gruppen, in denen ausschließlich E2 oder Breg-Zellen verabreicht wurden [194].

#### **1.8.4 AFP**

Eine immunregulatorische Wirkung von AFP wurde ursprünglich unter der Annahme vorgeschlagen, dass hohe AFP-Werte im fetalen Serum den Embryo vor einem mütterlichen Immunangriff schützen könnten [195]. Eine Reihe von Humanstudien hat nachfolgend gezeigt, dass AFP den Phänotyp und die Funktion von DZ, NK-Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten beeinträchtigt [196–201]. Um und Kollegen zeigten, dass die *in vitro* AFP-Behandlung von DZ die Expression von Oberflächenmolekülen herabsetzte und die Produktion von IL-12 und TNF(- $\alpha$ ) verminderte [196]. In hoher Konzentration induzierte AFP zudem die Apoptose von DZ. Die Funktionsstörungen von DZ beeinträchtigen nachweisbar die Aktivierung von NK-Zellen und die Initiierung von T-Zell-Reaktionen [199, 202–204]. Beispielsweise stimuliert AFP die Induktion von tolerogenen DZ, die tumorspezifische, zytotoxische T-Zellen innerhalb des Tumors supprimieren [203]. Eine direkte Interaktion zwischen AFP und T-Zellen wurde von Alisa und Kollegen beschrieben. Sie zeigten, dass AFP (spezifische Epitope besitzt, die) die Generierung von Treg-Zellen fördert [201]. Eine potenzielle Wirkung von AFP auf B-Lymphozyten wurde bisher kaum untersucht. Beobachtungen aus Mausstudien sprechen dafür, dass AFP die humorale Immunantwort beeinflusst. Eine Studie von 1975 fand heraus, dass die Behandlung von Zellkulturen aus der Milz mit AFP die Ak-Synthese supprimierte [204]. Eine Studie von 2006 unterstützt diese Hypothese [205]. Hier supprimierte die Gabe von rhAFP die IgG-Sekretion aus Lymphozyten. Ferner zeigten AFP-injizierte Mäuse niedrigere IgG-Spiegel im Vergleich zu Mäusen denen Rinderserumalbumin (BSA) injiziert wurde. Zusammengefasst beeinflusst AFP verschiedene Komponenten des Immunsystems und induziert dabei ein Spektrum von immunmodulierenden Effekten, welche auch innerhalb der Schwangerschaft förderlich sein können.

## 1.9 Zielstellung

Bisherige Arbeiten zeigen, dass Breg-Zellen zur Entwicklung der mütterlichen Immuntoleranz in der Frühschwangerschaft beitragen. Mediatoren, die der Generierung der Breg-Zellen in der Schwangerschaft zugrunde liegen, sind weitgehend ungeklärt. hCG, P4, E2 und AFP sind in hoher Konzentration im Serum schwangerer Frauen vertreten und beeinflussen nachweislich Immunzellen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden potenzielle Mediatoren untersucht, die die Generierung und Funktion von Breg-Zellen in der Schwangerschaft beim Menschen und der Maus beeinflussen. In zwei Versuchskomplexen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- (1) Produzieren Trophoblastzellen der Maus Faktoren, die sich auf die Generierung von Breg-Zellen und ihre Funktion auswirken?
- (2) Beeinflussen Schwangerschaftshormone und AFP die Generierung und die Funktion von humanen B-Zellen *in vitro*?
  - a. Beeinflusst die Zugabe von hCG, P4, E2 und AFP die Differenzierungsfähigkeit von B-Zellen in Breg-Zellen?
  - b. Beeinflusst die Zugabe von hCG, P4, E2 und AFP die IL-10-Sekretion von B-Zellen?
  - c. Beeinflusst die Zugabe von hCG, P4, E2 und AFP die Ak-Produktion von B-Zellen, insbesondere die IgG Fc- und Fab-Glykosylierungen und die Synthese asymmetrisch glykosylierter IgG1 Moleküle?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Zusammensetzungen der hergestellten Medien und Pufferlösungen aufgelistet.

#### 2.1.1 Allgemeine Laborausstattung

Ausstattung	Hersteller
EDTA-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einwegskalpell	Feather®, Osaka, Japan
Einwegspritzen steril (30 ml)	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Eisbad	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank „Froster“	Kirsch, Offenburg, Deutschland
Glaswaren	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Kühlschrank Liebherr FKEX 3600	Rexel Deutschland, Hannover, Deutschland
Kühlschrank Liebherr KTP 1810-20	Unielektro, Eschborn, Deutschland
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Magnetrührer RH Basic 2 IKAM	WINLAB, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Mikrotestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mini Spin	Fisher Scientific, Nidderau, Deutschland
Multifunktionsplattenlesegerät Synergy	Bio Tek Instruments, Winooski, USA
Parafilm M	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage LA 620	Sartorius, Berlin, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reinigungsautomat	Omnilab-Laborzentrum, Bremen, Deutschland
Sicherheitsblutentnahmeset	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ultra-Tiefkühlschrank MDF-U53V	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Vortex-Schüttler MS 3 basic	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sülzetal, Deutschland
Zentrifuge 5810R / 5417R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

#### 2.1.2 Computerprogramme

Programm	Hersteller
Cell Quest Pro 4.bf4b	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACSDiva Software v 8.0.1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gen 5 TM Data Analysis Software	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 5.0 / 8.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
Microsoft Excel / PowerPoint / Word 2007 / 2010	Microsoft, Berlin, Deutschland

### 2.1.3 Geräte und Materialien für die Zellkultur

Produkte	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERACELL	ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Einfrierbehälter Mr. Frosti™	ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
KryoSystem 4000	Jutta Ohst German Cryo GmbH, Jüchen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spritzenfilter (0,2 µm)	Whatman, Dassel, Deutschland
Schüttelwasserbad SWB 25	WINLAB®, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank NU-437-400E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten Lumineszenz	ThermoFischer Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellsieb (Poren: 40 µm, 100 µm)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

### 2.1.4 Geräte und Materialien für die magnetische Zellsortierung (MACS®)

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

### 2.1.5 Geräte und Materialien für die Durchflusszytometrie

Produkte	Hersteller
BD FACS Calibur™ 4CA	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Aria™ III	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean / Flow / Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Falcon, Erembodegem, Belgien

### 2.1.6 Chemikalien und Lösungen

Chemikalie / Lösung	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Otto Fischer, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ficoll-Paque™ Research Grade	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Fixierungs- / Permeabilisierungsdiluent	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Fixierungs- / Permeabilisierungskonzentrat	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland

FBS Aktivkohle behandelt	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Biederitz, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma, Steinheim, Deutschland
TrisBase	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trishydrochlorid (TrisHCl)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Sigma, Steinheim, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland

### 2.1.7 Hormone, Proteine und andere biologisch aktive Substanzen

Substanz	Hersteller
AFP Human	Abnova, Walnut, CA, USA
CD40 Ligand Human	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CD40 Ligand Maus	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CpG ODN M362 Human / Maus	InvivoGen, San Diego, CA, USA
hCG (Ovitrelle)	Merck Serono, Darmstadt, Deutschland
Östradiol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Progesteron	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.8 Antikörper

Zellkultur	Hersteller	
anti-hCG Ak (polyklonal)	Santa Cruz, San Francisco, CA, USA	
anti-TGF-β Ak (polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland	
IgG-Kontroll-Ak (polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	

Durchflusszytometrie	Klon	Hersteller
Alexa Fluor® (AF) 647 anti-Human CD24	ML5	Biolegend, San Diego, CA, USA
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) anti-Human CD19	HIB19	Biolegend, San Diego, CA, USA
Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) anti-Human CD27	O323	Biolegend, San Diego, CA, USA
PerCP anti-Maus CD19	6D5	Biolegend, San Diego, CA, USA
Phycoerythrin (PE) anti-Human IL-10	JES3-19F1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

## 2.1.9 Kitsysteme

Kit	Hersteller
B-Zell-Isolationskit (Human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Caspase-Glo 3 / 7® Assay	Promega, Madison, WI, USA
FITC Annexin V Apoptose Detektionskit	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgM, IgA, IgG, IgE ELISA Set (Human)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
IL-10 OptEIA™ ELISA Kit (Human)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

## 2.1.10 Medien und Pufferlösungen

Medien	Zusammenstellung
Medium für B-Zellen	480 ml RPMI 15 ml Aktivkohle behandeltes FBS 5 ml P / S
Medium für JEG-3-Zellen	445 ml RPMI 50 ml FBS 5 ml P / S
Medium für SM9-2-Zellen	390 ml RPMI 100 ml FBS 5 ml P / S 5 ml Natriumpyruvat 1,75 µl 2-Mercaptoethanol
Einfriermedium für SM9-2- und JEG-3-Zellen	90 % FBS 10 % DMSO
<b>Allgemeine Pufferlösungen</b>	
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 10x) pH 7.4	80g NaCl 21,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 2 g KCL 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser
FACS-Puffer	10 g BSA (1%) 1 g NaN <sub>3</sub> (0,1%) Auffüllen auf 1 l mit PBS (1 x)
Lysis-Puffer (10x)	89 g NH <sub>4</sub> Cl 10 g KHCO <sub>3</sub> 0,38 g EDTA Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser
Trypsin/EDTA-Lösung	10% Trypsin EDTA in sterilem PBS
Pufferlösung für die magnetische Zellsortierung (MACS Puffer)	0,5 g BSA 0,074 g EDTA in 100 ml PBS
<b>Pufferlösungen für IL-10-ELISA</b>	
Beschichtungspuffer pH 9.5	0,713 g NaHCO <sub>3</sub> 0,159 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser
Blockierungspuffer	180 ml steriles PBS 20 ml steriles FBS
Waschpuffer	50 ml 20x PBS 0,5 ml Tween-20 Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser

Pufferlösungen für IgA, IgG, IgM- ELISA	
Beschichtungspuffer pH 9.6	0,42 g NaHCO <sub>3</sub> 0,53 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser
Blockierungspuffer pH 8.0	0,788 g TrisHCl 0,818 g NaCl 1 g BSA Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser
Waschpuffer pH 8.0	7,88 g TrisHCl 8,18 g NaCl 0,5 ml Tween-20 Auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser
Konjugatverdünnungspuffer	1,58 TrisHCl 1,64 g NaCl 2 g BSA 0,1 ml Tween-20 Auffüllen auf 200 ml mit destilliertem Wasser
Stop-Lösung	1 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96 %) Auffüllen auf 100 ml mit destilliertem Wasser

### 2.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
SM9-2 (murine Trophoblast-Zelllinie)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Joan Hunt und David Wheaton, University of Kansas Medical Center, Kansas City, MO, USA
JEG-3 (humane Chorionkarzinom-Zelllinie)	Käuflich erworben von CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland

### 2.1.12 Mausstämme

Mausstamm	Herkunft
Swiss Webster ♀ ♂	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
IL-10eGFP (C57BL/6J Hintergrund) ♀	Institutseigene Zucht. Ursprünglich zur Verfügung gestellt von Dr. Matthias Haury, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

## **2.2 Methoden**

Die in diesem Abschnitt dargestellten Methoden dienen der immunologischen Untersuchung von humanen und murinen B-Zellen und ihren Produkten. Dabei wurden Zellkulturen angelegt und anschließend Zellen und Zellkulturüberstände vermessen.

### **2.2.1 Zellkulturtechniken unter Verwendung von JEG-3- und SM9-2-Zellen**

Die humane Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 und die murine Trophoblast-Zelllinie SM9-2 wurden unter Nutzung einer sterilen Werkbank verwendet. All Zellkulturmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert und / oder mit Ethanol (70 %) desinfiziert. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhären wachsende Zellen.

#### **2.2.1.1 Auftauen und Kultivierung**

Kryoröhrchen der benötigten Zelllinie wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit 15 ml des entsprechenden Kulturmediums gegeben, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 21 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm<sup>2</sup>) mit 14 ml vorgewärmten Medium überführt. Nach mikroskopischer Sichtung der Zellen erfolgte die Kultivierung im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Das Zellwachstum wurde alle 1-3 Tage kontrolliert und das Medium entsprechend erneuert.

#### **2.2.1.2 Passagieren und Einfrieren**

Für das Passagieren und Einfrieren der Zellen sowie für die Kokultorexperimente wurden die adhären wachsenden Zellen zunächst schonend vom Flaschenboden getrennt. Hierfür wurde die Behandlung der Zellen mit Trypsin / EDTA durchgeführt [206]. Die Zelldichte der kultivierten Zellen wurde zunächst mikroskopisch untersucht. Bei erreichter Konfluenz erfolgte die Abnahme des Mediums und das Waschen der Zellen in 10 ml PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml warmer Trypsin / EDTA-Lösung 3 min bei 37 °C inkubiert. Das Lösen der Zellen wurde mikroskopisch bestätigt. Die Zellsuspension wurde in 10 ml warmes Kulturmedium gegeben und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 21 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden je nach Zielstellung folgende Schritte durchgeführt. Für das Einfrieren wurde das Zellpellet in ein Kryoröhrchen mit 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen, in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80°C für 24 h eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Für das Passagieren wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium aufgelöst. 1 / 10 der Zellsuspension wurde für nachfolgende Versuche subkultiviert. Für die Kokultorexperimente wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium aufgelöst, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die benötigte Anzahl an Zellen für die Versuche ausgesät.

### **2.2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Je nach Zelldichte wurde die Zellsuspension (zumeist 1 ml) direkt für die Zellzahlbestimmung genutzt oder wurde zunächst verdünnt (beispielsweise 1:100 oder 1:500). 10 µl der unverdünnten bzw. verdünnten Zellsuspension wurden in den Zwischenraum einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung der Zellen in vier Quadranten und die Berechnung der Zellzahl (pro 1 ml) wie folgt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert (aus 4 Quadranten)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 10^4$$

## **2.2.2 Tierexperimentelle Methoden**

CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen wurden aus naiven und trächtigen IL-10eGFP Mäusen isoliert, Plazenta-Explantate wurden aus trächtigen Swiss Webster Mäusen gewonnen. Die Zellen und Explantate wurden für die in 2.2.2.6 und 2.2.2.7 dargestellten Kokulturrexperimente verwendet.

### **2.2.2.1 Tierhaltung**

Die Tiere waren in der Tierhaltung der Experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe in Magdeburg artgerecht untergebracht. Männliche Tiere wurden einzeln gehalten, weibliche Tiere in Gruppen von zwei bis vier Tieren. Die Tierkäfige wurden einmal wöchentlich gereinigt. Nahrung und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Im Tierstall herrschte ein wechselnder 12-stündiger Hell-Dunkelrhythmus vor.

### **2.2.2.2 Verpaarung der Mäuse**

Die Verwendung transgener IL-10eGFP Mäuse ermöglicht die vereinfachte Auslese IL-10-produzierender Zellen über den Fluoreszenzfarbstoff GFP (grün fluoreszierendes Protein). Ein bis drei IL-10eGFP oder Swiss Webster Weibchen im Alter von etwa acht Wochen wurden in einen Käfig eines geschlechtsreifen Swiss Webster Männchens gesetzt. Die Weibchen wurden zweimal täglich auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfens untersucht, welcher eine stattgefundene Paarung belegt. Das Vorliegen des Vaginalpfropfens wurde als Gestationstag (GT) 0 der Trächtigkeit definiert. Anschließend wurden die trächtigen Weibchen von dem Männchen getrennt. Am GT 9 wurden die Weibchen getötet und Gewebeproben entnommen. Eine Meldung erfolgte unter der Rubrik „Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken“ gemäß §4 TierSchG. (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten). IL-10eGFP Weibchen wurde die Milz entnommen (für die Gewinnung CD19<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> Zellen), Swiss Webster Weibchen wurden die Plazenten entnommen.

### **2.2.2.3 Mauspräparation für die Isolierung von Lymphozyten aus der Milz**

Am GT 9 wurden IL-10eGFP Weibchen durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert und das Fell mit Ethanol (70 %) desinfiziert. Das Abdomen wurde durch einen Längsschnitt eröffnet und die Milz entnommen. Die Milz wurde in kaltem, sterilem PBS gewaschen

und in 1 ml sterilem RPMI auf Eis gelagert. Das Milzgewebe wurde unter Zugabe von 2 ml RPMI durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) in eine 6-Loch-Platte gedrückt, die Zellsuspension anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit Lysispuffer (1x) 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4°C) und Absaugen des Überstandes, wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 ml RPMI resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in Rundbodenröhrchen überführt.

#### **2.2.2.4 Durchflusszytometrische Zellsortierung von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen**

Die zuvor hergestellten Zellsuspensionen wurden durch 1 ml FACS-Puffer ergänzt, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Die Markierung der B-Zellen erfolgte über die extrazelluläre Färbung gegen CD19. Das Zellpellet wurde mit 100 µl Ak-Lösung (Verdünnung 1:100 in FACS-Puffer) pro Rundbodenröhrchen inkubiert (30 min bei 4°C, in Dunkelheit). Danach wurden die Proben in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, in 1,5 ml große Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 500 µl RPMI (ergänzt durch FBS und P / S) gelöst und auf Eis transportiert. Nach durchflusszytometrischer Zellsortierung (siehe 2.2.5.4) der CD19<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> (IL-10<sup>-</sup>) Zellen, wurden die CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in den jeweiligen Kulturansätzen verarbeitet.

#### **2.2.2.5 Mauspräparation zur Gewinnung von Plazentagewebe**

Trächtigen Swiss Webster Weibchen wurde am GT 9 der bikorneale Uterus entnommen, fixiert und die Uterushörner der Länge nach aufgeschnitten. Die Plazenten wurden aus dem Uterus freipräpariert und von ihren Embryonen getrennt. Die *Dezidua basalis* wurde mit Hilfe eines Skalpell entfernt und die Ränder einer jeden Plazenta getrimmt. Das verbleibende Plazentagewebe wurde in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) gegeben, unter Nutzung des Mikroskops in je vier gleich große Stücke geschnitten und für 1 h in den Inkubator gestellt.

#### **2.2.2.6 Kokultur von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen und SM9-2-Zellen**

Der vermutete Effekt der Trophoblastzellen auf die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen wurde anhand einer Kokultur von SM9-2-Zellen und CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen untersucht. Nach Trypsinierung wurden  $5 \times 10^4$  SM9-2-Zellen in 1 ml Kulturmedium pro Ansatz in 24-Loch-Platten in Doppelbestimmung ausplattiert und für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurden CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen aus der Milz naiver bzw. trächtiger IL-10eGFP Mäuse über durchflusszytometrisch-basierte Zellsortierung isoliert und gezählt (siehe 2.2.4.4). Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 21° C) und Absaugen des Überstandes wurden CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in Medium +/- CD40L/CpG auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. SM9-2-Zellen wurden mikroskopisch auf ihre Adhärenz geprüft und das alte Medium abgenommen.  $1 \times 10^5$  B-Zellen in 500 µl Medium +/- CD40L/CpG wurden zu den SM9-2-Zellen (Zellverhältnis 2:1) gegeben. Der Transfer der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Als Kontrollen dienten allein kultivierte B-Zellen in 500 µl Medium +/- CD40L/CpG. Nach 24 und 48 h wurde das B-

Zellen-enthaltende Medium abgenommen, in Rundbodenröhrchen überführt und mit 100 µl FACS-Puffer aufgefüllt. In einem zweiten Versuch wurden CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen aus naiven Weibchen isoliert und durch CD40L/CpG aktiviert. Hier wurde der Kokultur aus B-Zellen und SM9-2-Zellen (2:1) für 24 h ein anti-TGF-β-Ak oder IgG-Kontroll-Ak in der Konzentration von 30 µg/ml beigemischt. Die Konvertierung von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen wurde in beiden Ansätzen über die Messung von GFP am Durchflusszytometer bestimmt.

### 2.2.2.7 Kokultur von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen mit Plazenta-Explantaten

Plazenta-Explantate wurden aus Swiss Webster Weibchen gewonnen (siehe 2.2.2.5) und für 1 h in den Inkubator gestellt. Zeitgleich wurden CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen aus der Milz von naiven bzw. trächtigen IL-10eGFP-Mäusen isoliert. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 21° C) und Absaugen des Überstandes wurden CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in Reaktionsgefäße mit Kulturmedium +/- CD40L/CpG aufgeteilt. 5 x 10<sup>4</sup> B-Zellen in 250 µl Medium +/- CD40L/CpG wurden in eine 96-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurde je ¼ Plazenta pro Vertiefung den experimentellen Ansätzen hinzugefügt. Als Kontrolle dienten B-Zellen in 250 µl Medium +/- CD40L/CpG. Nach 24 bzw. 48 h wurden zunächst die Plazenta-Explantate in Reaktionsgefäße überführt, in 1 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4° C). Der Überstand wurde verworfen und das Plazentagewebe bei -80 °C eingefroren. Danach wurde das B-Zellen-enthaltende Medium aus den Vertiefungen entnommen, in Rundbodenröhrchen überführt und mit 100 µl FACS-Puffer aufgefüllt. Die Generierung CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

## 2.2.3 Humanexperimentelle Methoden

Im Folgenden wird die Gewinnung der CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus humanen Blutproben sowie die Behandlung dieser Zellen mit Hormonen und AFP erläutert.

### 2.2.3.1 Blutgewinnung

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Blutentnahmen erfolgten nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Probandinnen und wurden vor Studiebeginn durch die Ethikkommission der Otto-von-Guericke Universität (Studennummer 28/08) genehmigt. Venöses Blut wurde weiblichen Probanden (21-35 Jahre alt) entnommen, die noch kein Kind geboren hatten. Die Charakteristika der Probandinnen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Entnahme von etwa 60 ml Blut erfolgte aus einer peripheren Vene. Das Blut wurde in einem Eisbad abgekühlt und nach 15 min weiterverarbeitet.

**Tabelle 2: Charakteristika der weiblichen, nulliparen Studienteilnehmer.** Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

Anzahl	Alter	Raucher	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Diabetes, Hypertonie, Schilddrüsenerkrankung
25	26,4±0,56	1	21±0,5	0

### **2.2.3.2 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMZ)**

Nachfolgende Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Zentrifugation (4°C, 10 Min, 2200 rpm) der Blutproben zur Trennung der zellulären Bestandteile vom Blutplasma. Das Plasma wurde verworfen. Die Gewinnung der PBMZ erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque. Die zellulären Blutbestandteile wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt und auf 4 ml Ficoll-Paque in Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet. Nach Zentrifugation (4°C, 20 min, 1800 rpm, ohne Bremsenwirkung) hatten sich die verschiedenen Bestandteile in Schichten separiert. Oberhalb der Ficoll/PBS-Grenzschicht wurden PBMZ mit einer Pasteurpipette abgenommen. Es folgten zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte in PBS (1200 rpm, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden in 1 ml MACS Puffer resuspendiert, gezählt und CD19<sup>+</sup> B-Zellen magnetisch isoliert.

### **2.2.3.3 Isolierung von B-Zellen mittels MACS®**

B-Zellen wurden aus PBMZ über die Magnetsäulenaufreinigung mit Hilfe eines B-Zell-Isolationskits nach Angaben des Herstellers isoliert. Kurz zusammengefasst: Die Zellsuspension wird mit Ak inkubiert, die zellspezifische Oberflächenantigene binden. Magnetpartikel binden wiederum an die Ak-markierten Zellen. Lässt man die Zellsuspension durch eine Säule in einem starken Magnetfeld laufen, so werden die mit Magnetpartikeln versehenen Zellen in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule passieren können. Das verwendete B-Zell-Isolationskit enthält biotinylierte Ak gegen CD2, CD4, CD11b, CD36, anti-IgE und CD235a. Unmarkierte CD19<sup>+</sup> B-Zellen passierten die Säule und wurde aufgefangen. Die Anzahl der B-Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 2.2.1.3). Der prozentuale Anteil an B-Zellen lag bei etwa 2 % der isolierten PBMZ. Die Reinheit CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Sie lag bei > 95 %.

### **2.2.3.4 Behandlung von B-Zellen mit Stimulanzen, Hormonen und AFP**

$5 \times 10^4$  B-Zellen pro Vertiefung wurden auf 96-Loch-Platten in 150 µl Medium, ergänzt durch 3 % FBS (Aktivkohle behandelt, dadurch hormonreduziert) und 1 % P / S, in Doppelbestimmung ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 h im Inkubator gehalten (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>). Danach wurden die B-Zellen mit rekombinantem hCG (rhCG, 100 mIU/ml), P4 (30 ng/ml), E2 (1000 pg/ml), einer Kombination von P4 und E2, AFP in der mütterlichen Serumkonzentration (erstes Trimenon: 0,015 µg/ml, zweites Trimenon: 0,06 µg/ml und drittes Trimenon: 0,2 µg/ml) oder AFP in der fetalen Serumkonzentration (50 µg/ml) für 24 h behandelt. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen den physiologischen Werten innerhalb der Schwangerschaft (Tabelle 1). 100 µl Medium mit den jeweiligen Zusätzen wurden pro Vertiefung zu den B-Zellen gegeben. Zur Aktivierung der B-Zellen wurde dem Kulturmedium CD40L (1 µg/ml) und CpG (10 µg/ml) zugesetzt. In Vorversuchen mit 1, 5 und 10 µg/ml CpG wurde die optimale Konzentration für die B-Zell-Aktivierung ermittelt. Für eine gleichmäßige Verteilung der Zusätze wurde die Kulturplatte vorsichtig geschwenkt und für weitere 24 h in den Inkubator gestellt.

Als Kontrolle dienten unbehandelte und lediglich mit CD40L/CpG behandelte B-Zellen. Ein Schema veranschaulicht die Kulturbedingungen (Tabelle A.1, Anhang). Anschließend erfolgte die Abnahme der Zellkulturüberstände für die IL-10-Quantifizierung (siehe 2.2.5.2) und die Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie (siehe 2.2.4.2). Für die Bestimmung der Ig-Quantifizierung (siehe 2.2.5.3) und der IgG-Fc-Glykosylierungsprofile (siehe 2.2.6) im Zellkulturüberstand wurde die Behandlung über 12 Tage durchgeführt, um die Entwicklung von Plasmazellen gewährleisten zu können.

### **2.2.3.5 Kokultur von B-Zellen und JEG-3-Zellen**

Um zu untersuchen, ob hCG IL-10-produzierende B-Zellen induziert, wurden hCG-produzierende JEG-3-Zellen mit B-Zellen kokultiviert. Hierfür wurden JEG-3-Zellen trypsinisiert und  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Kulturmedium pro Ansatz in 24-Loch-Platten in Doppelbestimmung ausplattiert und für 24 h inkubiert. B-Zellen wurden aus humanem Blut isoliert (siehe 2.2.3.2 / 2.2.3.3), gezählt und in 2 ml Kulturmedium ebenfalls für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurden B-Zellen erneut gezählt und in hormonreduziertem B-Zell-Medium +/- CD40L/CpG resuspendiert. Die Adhärenz der JEG-3-Zellen wurde unter dem Mikroskop geprüft und das alte Medium abgenommen. Pro Vertiefung wurden  $5 \times 10^4$  B-Zellen in 500  $\mu$ l Medium +/- CD40L/CpG zu JEG-3-Zellen (Zellverhältnis 1:1) gegeben. Der erfolgreiche Transfer der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Als Kontrollen wurden B-Zellen und JEG-3-Zellen in alleiniger Kultur in Medium +/- CD40L/CpG mitgeführt. Nach 24 h wurde das B-Zellen-enthaltende Medium abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4° C). Je 400  $\mu$ l Zellkulturüberstand wurde zur Analyse für die Messung des IL-10-Gehalts bei -80 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden über CD19, CD24, CD27 und IL-10-Ak markiert (siehe 2.2.4.2) und mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.2.4.3) analysiert. Für die Blockierung des endogen produzierten hCGs wurde der Kokultur in einer zweiten Versuchsreihe ein anti-hCG-Ak (Verdünnung 1:50) hinzugefügt.

## **2.2.4 Durchflusszytometrie**

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung einzelner Zellen und Zellpartikel auf Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften [207]. Dabei können verschiedene Parameter wie die relative Zellgröße, Granularität, Oberflächeneigenschaften und die intrazelluläre Zusammensetzung jeder einzelnen Zelle erfasst werden.

### **2.2.4.1 Theoretische Grundlagen**

Über eine Stahlkapillare werden Zellen in eine Messküvette eingezogen und beschleunigt. Die Zellen werden einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Der Laser sendet Licht in einer bestimmten Wellenlänge aus. Dieses Licht wird durch die Zellen in Abhängigkeit von ihrer Größe und intrazellulären Granularität unterschiedlich stark gestreut. Über die nach vorne abgelenkten Strahlen (Vorwärtsstreulicht / Forwardscatter - FSC) wird die relative Zellgröße ermittelt. Das in einem 90°-Winkel reflektierte Seitwärtsstreulicht (Sidescatter - SSC) dient als Maß für die Granularität. Durch die Markierung der

Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. GFP) oder über den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Ak gegen spezifische Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Moleküle können weitere zellspezifische Eigenschaften analysiert werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt ebenfalls im 90°-Winkel zum Laserstrahl. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch das von den Lasern ausgesandte Licht angeregt und emittieren, je nach Fluorochrom Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Das durch das optische System geführte und entsprechend der Wellenlängen aufgeteilte Licht wird über Detektoren registriert, verarbeitet und vom Gerät digitalisiert. Da sich die Exzitations- und Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden, können mehrere Merkmale einer Zelle in einem Messvorgang ermittelt werden. Die Emissionsspektren bestimmen die Kombinierbarkeit der fluoreszenzgekoppelten Ak. Der spektrale Überlappungsbereich der genutzten Fluoreszenzfarbstoffe sollte möglichst gering sein. In Tabelle 3 sind die verwendeten Farbstoffe inklusive Exzitations- und Emissionsspektren der humanexperimentellen Analyse aufgeführt.

**Tabelle 3: Exzitations- und Emissionsmaxima (Exmax/Emmax) der Fluorochrome für die durchflusszytometrische Vermessung humaner B-Zellen (Quelle: BD Biosciences)**

Markierung	Farbstoff	Exmax (nm)	Emmax (nm)
CD19	FITC	494	519
IL-10	PE	496, 564	578
CD27	PerCP	482	678
CD24	AF 647	650	668

#### 2.2.4.2 Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung von humanen B-Zellen

Zellen können auf unterschiedliche Weise markiert bzw. gefärbt werden. Dabei wird die Markierung zellulärer Oberflächenantigene von der intrazellulären Markierung unterschieden. Für die Vermessung CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen sind beide Färbungen notwendig. Nach Abnahme der Zellkulturüberstände für die IL-10-Quantifizierung, wurde die Zellen (pro Vertiefung) in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und auf je zwei Rundbodenröhrchen zu 500 µl aufgeteilt. Das zweite Rundbodenröhrchen wird als ungefärbte Negativkontrolle für die durchflusszytometrische Messung mitgeführt. Die Zellen wurden auf die extrazellulären Zelloberflächenantigene CD19 (FITC), CD27 (PerCP) und CD24 (AF647) gefärbt. Hierfür wurden die Ak in FACS-Puffer (1:100) verdünnt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4° C), der Überstand abgesaugt und 100 µl der Ak-Lösung in die entsprechenden Röhrchen gegeben. Nach Inkubation (30 min, 4° C, in Dunkelheit) erfolgte die Entfernung nicht gebundener Ak. Hierzu wurden die Proben in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4° C) und der Überstand entfernt. Da es sich bei IL-10 um ein intrazellulär vorkommendes Molekül handelt, ist für die Bindung des Aks an IL-10 die Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich. Dafür wurden die Zellen zunächst in 100 µl Fixierungslösung über Nacht fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben in 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4° C) und der Überstand verworfen. Der intrazelluläre Ak (IL-10-PE) wurde in Permeabilisierungspuffer (1:100) verdünnt und 100 µl der Ak-Lösung in die entsprechenden Röhrchen gegeben. Die Proben wurden inkubiert (30 min,

4° C, in Dunkelheit) und dann in Permeabilisierungspuffer (1 ml) gewaschen. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen.

#### **2.2.4.3 Auswertung durchflusszytometrischer Daten für humane B-Zellen**

Die Zellsuspensionen wurden mit dem FACS Calibur™ Durchflusszytometer vermessen. Mit diesem Gerät ist eine Mehrfarbenanalyse möglich. Da sich die hier verwendeten Emissionsspektren der Fluorochrome stellenweise überlappen, musste eine Kompensation der Emissionsspektren durchgeführt werden. Die angepassten Messeinstellungen wurden für alle weiteren Messungen beibehalten. Zur Überprüfung unspezifischer Färbungen wurde die entsprechende Negativkontrolle mit ungefärbten Zellen vermessen. Insgesamt wurden  $1 \times 10^4$  Ereignisse gemessen, davon etwa 50-300 pro sek. Die Zellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität in einem „Dot plot“ dargestellt. Mithilfe der CellQuest Pro 4.bf4b Software wurden CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften durch das Setzen von Gates analysiert. So wurden zunächst CD27<sup>+</sup> und CD24<sup>hi</sup> Zellen ermittelt und innerhalb dieser Population die Koexpression von CD19 und IL-10.

#### **2.2.4.4 Durchflusszytometrisch-basierte Zellsortierung**

Einige Durchflusszytometer sind mit einer Zellsortierfunktion ausgestattet. Neben der optischen Vermessung der Zellen, können Zellsorter die Zellen je nach Fluoreszenzeigenschaft räumlich trennen. So können ausgewählte Zellen nach der Sortierung für weitere Experimente genutzt werden. Am Ende der Stahlkanüle, welche die Zellen am Laser vorbeileitet, wird die Probenflüssigkeit in einzelne Tröpfchen zerlegt. Tröpfchen, in denen sich eine Zelle mit den festgelegten Fluoreszenzeigenschaften befindet, werden je nach Eigenschaft elektrisch positiv oder negativ geladen und in einem elektrostatischen Feld ladungsabhängig abgeleitet [207]. Elektrisch geladene Zellen werden in verschiedenen Röhrchen gesammelt, ungeladene Tröpfchen werden ausrangiert. In dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Roland Hartig am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie murine B-Zellen über die extrazelluläre Färbung gegen CD19 (siehe 2.2.2.4) sortiert und IL-10-positive Zellen über GFP aussortiert. Nach Auslese der CD19<sup>+</sup>- und GFP<sup>-</sup> (IL-10<sup>-</sup>) Zellen, standen CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen für weitere Versuche zur Verfügung. Die Zellauslese ergab im Mittel  $2,9 \times 10^6$  Zellen.

#### **2.2.4.5 Auswertung durchflusszytometrischer Daten für murine B-Zellen**

Für die Auswertung der murinen Kokulturansätze (siehe 2.2.2.6 und 2.2.2.7) erfolgte keine weitere Färbung der Zellen. Hier wurden die aus IL-10eGFP Weibchen isolierten Zellen bereits im Vorfeld extrazellulär gegen CD19 markiert, um CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen zu isolieren (siehe 2.2.4.4). Nach Einsatz der CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in den entsprechenden Versuchen wurden  $1 \times 10^4$  Ereignisse über Größe, Granularität und die Expression von GFP am Durchflusszytometer detektiert und mithilfe der CellQuest Pro 4.bf4b Software analysiert.

#### **2.2.4.6 Apoptosebestimmung mittels Annexin V- / Propidiumiodid-Färbung**

Für die Ansätze von humanen B-Zellen mit AFP in der fetalen Serumkonzentration (siehe 2.2.3.4) erfolgte die Messung des Anteils apoptotischer Zellen über ein Apoptosedetektionskit. Hierfür wurden die Zellen nach Abnahme der Zellkulturüberstände, auf je zwei Rundbodenröhrchen aufgeteilt. Ein Röhrchen diente jeweils als ungefärbte Negativkontrolle. Es folgten zwei Waschschrte in PBS, Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4° C) und das Absaugen des Überstandes. Nach Zugabe von 25 µl Annexin V Bindungspuffer, wurden die entsprechenden Röhrchen mit Annexin-V-FITC (1,25 µl) und PI (1,25 µl) gefärbt und inkubiert (15 min, RT, in Dunkelheit). Abschließend wurden den Proben je 100 µl Annexin V Bindungspuffer hinzugefügt. 5000 Ereignisse wurden direkt am Durchflusszytometer vermessen. Drei Populationen ließen sich in einem Dot plot darstellen. Annexin V-negative und PI negative Zellen wurden als lebend identifiziert, Annexin V-positive und PI negative Zellen wurden als frühapoptotische Zellen identifiziert und Annexin V-positive und PI positive Zellen wurden als spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen identifiziert.

#### **2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Ein Immunoassay ist ein auf der Antigen-Ak-Reaktion basierendes Nachweisverfahren zur Konzentrationsbestimmung von Substanzen, wie z.B. Zytokinen, Ig und Hormonen. Die Quantifizierung der Substanz wird über entsprechende Marker ermöglicht. Der ELISA verwendet ein Enzym als Marker; die Enzymaktivität ist photometrisch nachweisbar. Die hier durchgeführte Konzentrationsbestimmung des IL-10-Gehaltes sowie die Ig-Quantifizierungen wurden anhand eines Sandwich-ELISA durchgeführt. Hierfür sind zwei Ak erforderlich. Zunächst werden die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem Erst-Ak beschichtet, der das zu untersuchende Antigen spezifisch in den Proben bindet. Im nächsten Schritt wird der Zweit-Ak, der ebenfalls das zu untersuchende Antigen spezifisch bindet, hinzugegeben. Ein Sandwichkomplex wird gebildet. Ungebundene Ak in der Probe werden durch Waschen entfernt. Der Zweit-Ak ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Eine Substratlösung mit Tetramethylbenzidin (TMB) als Chromogen wird hinzugegeben. Die Substratumsetzung durch die Meerrettich-Peroxidase bewirkt die Freisetzung des Farbstoffes (Blaufärbung der Probe). Nach einer festgelegten Zeit wird die Farbentwicklung durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt (Farbumschlag von blau zu gelb). Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration des untersuchten Antigens. Durch Anfertigung einer Standardreihe mit definierten Konzentrationen kann die Quantität des Antigens mithilfe eines Photometers ermittelt werden.

##### **2.2.5.1 ELISA zum Nachweis von IL-10**

Die Zellkulturüberstände der kultivierten B-Zellen wurden 24 h nach ihrer Behandlung mit Hormonen oder AFP bzw. 24 h nach der Kokultur mit JEG-3-Zellen abgenommen. Der IL-10-Gehalt wurde mithilfe des IL-10 OptEIA™ ELISA Kits nach Angaben des Herstellers bestimmt. Alle Proben sowie

die Ansätze der Standardreihe wurden als Doppelbestimmungen angelegt. Der Farbumschlag wurde binnen 15 min mit dem Multifunktionsplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm über die Gen 5 TM Data Analysis Software analysiert.

### **2.2.5.2 ELISA zum Nachweis von IgM, IgA und IgG**

Für die Ig-Quantifizierung wurden B-Zellen, wie in 2.2.3.4 dargestellt, behandelt und für 12 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände auf ihren IgM-, IgA- und IgG-Gehalt mithilfe eines Ig-ELISA Quantifizierungs-Kits nach Angaben des Herstellers bestimmt. Alle Proben und die Standardverdünnungen wurden als Doppelbestimmungen ermittelt. Die Messung der Absorption wurde bei 450 nm durchgeführt.

### **2.2.6 Bestimmung der IgG Fc-N-Glykosylierungsprofile**

Die Abnahme der Zellkulturüberstände für die Analyse der IgG-Fc-Glykosylierungsprofile erfolgte ebenfalls nach 12-tägiger Inkubation der B-Zellen mit Hormonen bzw. AFP. Die Proben wurden auf Trockeneis zu unserem Kooperationspartner Prof. Manfred Wuhrer, Abteilung Proteomik und Glykomik, Leiden Universität, Niederlande geschickt. Die IgG-Fc-N-Glykosylierungsprofile wurden über die Kopplung von Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Eine detaillierte Beschreibung der Methode kann der Publikation von Selman und Kollegen entnommen werden [208]. In der Analyse wurde die Häufigkeit der Bisecting-Struktur sowie die terminale Galaktosylierung, Sialylierung und Fukosylierung für IgG1 und kombiniert für IgG2 und IgG3 generiert. Die Auswertung der Daten und die graphische Darstellung erfolgte durch beide Partner.

### **2.2.7 hCG-Behandlung von Hybridomazellen und Bestimmung der asymmetrischen Fab-Glykosylierungen produzierter anti-DNP-Ak**

Die experimentelle Versuchsreihe zum Einfluss von hCG auf AAK führte Dr. Andrea Canellada, Fakultät für Pharmazie und Biochemie, Buenos Aires durch. Hybridomazellen, die symmetrisch und asymmetrisch glykosylierte Anti-Dinitrophenol-monoklonale Ak der IgG1-Unterkategorie sekretieren, wurden für den Versuch ausgewählt.  $5 \times 10^5$  Zellen / ml wurden in Medium (ergänzt mit 10 % FBS, 2 g/l NaHCO<sub>3</sub> und P / S) resuspendiert und in Gegenwart oder Abwesenheit von rhCG inkubiert (50 und 200 mIU / ml). Die Kulturen wurden als Dreifachbestimmungen in 96-Loch-Platten angelegt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Abnahme der Zellkulturüberstände. Der Prozentsatz asymmetrischer Fab-Glykosylierungen der anti-DNP-Ak wurde über die Bindung AAK an Concanavalin A und die ELISA Quantifizierungen von totalem und ungebundenem IgG realisiert. Die Auswertung der Ergebnisse und graphische Darstellung erfolgten durch Dr. Canellada und uns.

### **2.2.8 Caspase-Glo®-Analyseverfahren**

Zusätzlich zu der Identifizierung apoptotischer Zellen mittels Annexin V/PI-Färbung wurden die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 unter Anwendung eines Caspase-Glo 3/7 Lumineszenz-Kits analysiert.

B-Zellen wurden für 24 h mit AFP in fetaler Serumkonzentration kultiviert (siehe 2.2.3.4), mit der Abweichung, dass je  $2 \times 10^4$  Zellen in Lumineszenz kompatiblen 96-Loch-Platten doppelt ausplattiert wurden. Anschließend erfolgte die Entnahme der Platten aus dem Inkubator und eine 30-minütige Lagerung bei RT. Die Proben wurden mit jeweils 100  $\mu$ l des Caspase-Substrates versetzt und je nach Zeitpunkt für 1 h und 3 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte über das Multifunktionsplattenlesegerät Synergy HT (Gen 5 TM Data Analysis Software). Die detektierte Lumineszenz in relativen Lichteinheiten (RLE) ist proportional zur Caspase-Aktivität.

### **2.2.9 Statistik**

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5.0 und 8.0. Deskriptive Statistiken werden als Mittelwerte (mit Standardfehler des Mittelwertes - SEM) oder Mediane (mit Interquartilsabstand (IQR)) angegeben. Da für alle Versuche Doppelbestimmungen angelegt wurden, wurde hier zunächst der Mittelwert aus den Duplikaten gebildet. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Lag eine Normalverteilung der Daten vor, wurden parametrische Verfahren angewandt. In Abhängigkeit von der Anzahl der untersuchten Faktoren wurde eine einfaktorielle (One-Way-ANOVA) oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) zur Datenanalyse verwendet. Bei signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten von mindestens zwei Gruppen wurden paarweise t-Tests als Post-hoc Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Versuche mit Messwiederholung sind mit dem Zusatz „RM-“ (repeated measures) gekennzeichnet. Sie basieren darauf, dass die aus denselben Probanden bzw. Tieren isolierten Zellen alle Untersuchungsbedingungen durchlaufen und damit wiederholt gemessen werden. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Vergleich mehrerer Gruppen je nach Abhängigkeit der Daten mithilfe des Friedman-Tests bzw. des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Als Post-hoc Test wurde der Dunn's Test verwendet. Eine Signifikanz der Ergebnisse wurde bei  $p \leq 0,05$  angenommen. Das jeweils durchgeführte statistische Testverfahren und Signifikanzniveau ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $*** p \leq 0.001$ ) sind in den Abbildungslegenden aufgeführt.

### 3 Ergebnisse

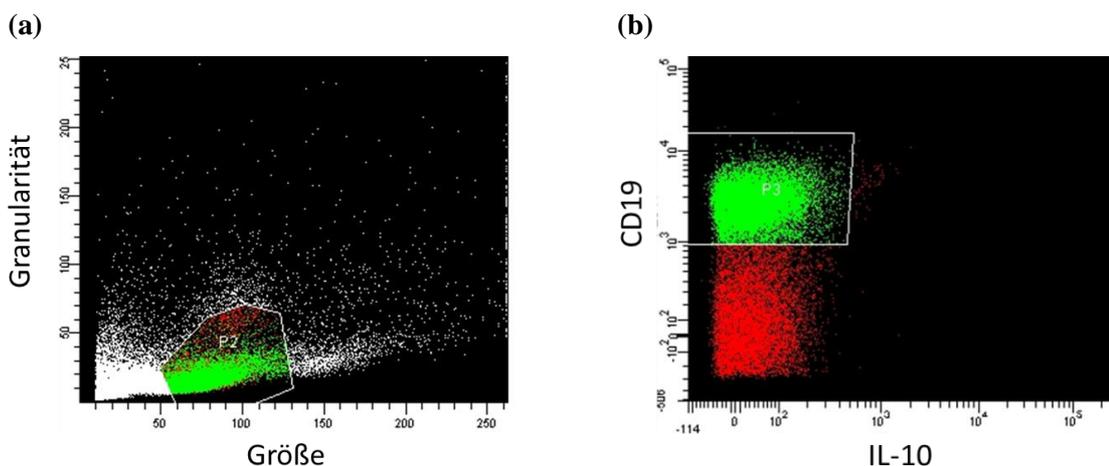
Fokus der Arbeit war die Identifizierung von Mediatoren für die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen im Rahmen der Frühschwangerschaft. Im Mausmodell wurde anhand der Kokultur von B-Zellen mit Trophoblastzellen die Umwandlung IL-10-negativer in IL-10-positive B-Zellen untersucht. In humanen *in-vitro*-Zellexperimenten wurde der Einfluss von hCG, P4, E2 und AFP auf B-Zellen analysiert. Die Bestimmung der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie, die Freisetzung von IL-10 mittels ELISA. Quantitative Messungen von IgG, IgM und IgA wurden durchgeführt und IgG Fc-Glykosylierungsprofile analysiert. Inwieweit hCG einen Effekt auf die Synthese der AAK ausübt, wurde mittels Hybridom-Technik in Zellkulturüberständen untersucht.

#### 3.1 Analyse der Mausproben

Eine Vergleichsstudie mit normal schwangeren und abortanfälligen Mäusen belegte, dass abortanfällige Mäuse eine reduzierte Anzahl der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen aufwiesen und der adoptive Zelltransfer die Schwangerschaften rettete [148]. Dieser Versuchskomplex widmete sich der Frage, inwieweit Mechanismen im Mausmodell die Generierung der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen fördern.

##### 3.1.1 Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Auslese CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen

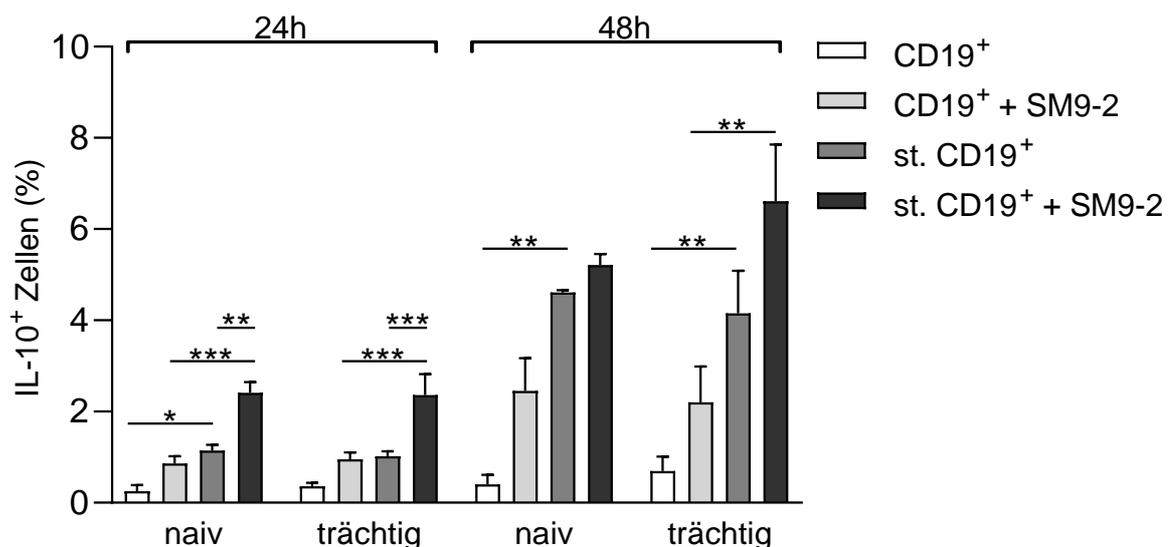
Um die gewünschte Subpopulation am Durchflusszytometer detektieren zu können, wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz naiver und trächtiger IL-10eGFP Mäuse hergestellt, deren IL-10-produzierende Zellen mittels GFP identifiziert werden können. Lymphozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität in der FSC/SSC-Darstellung identifiziert. CD19<sup>+</sup> wurden selektiert und IL-10<sup>+</sup> Zellen abgesondert, um CD19<sup>+</sup> und IL-10<sup>-</sup> B-Zellen für die experimentellen Ansätze zu isolieren. Abbildung 5 zeigt repräsentative Dot Plots der mittels Durchflusszytometrie vermessenen B-Zellen.



**Abbildung 5: Auslese der CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen.** Dargestellt ist (a) die gesamte Milzsuspension, (b) die Anzahl an CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in der Milzsuspension.

### 3.1.2 Die Kokultur von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen mit Trophoblastzellen fördert die Erzeugung von IL-10-produzierenden B-Zellen *in vitro*

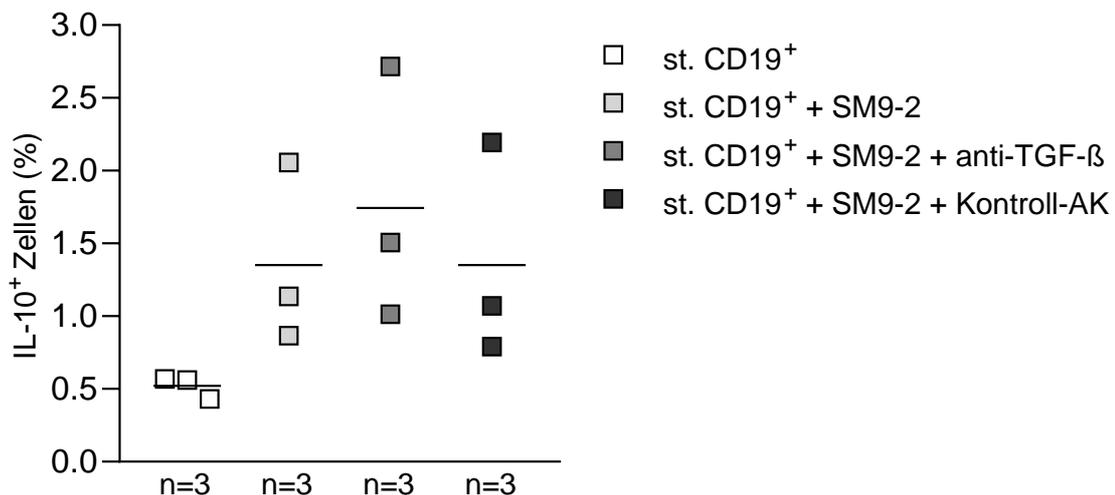
Da das fetale Gewebe selbst, insbesondere der Trophoblast immunmodulierende Moleküle produziert und ausschüttet [209], untersuchten wir, ob die Kokultur von Trophoblastzellen und IL-10<sup>-</sup> B-Zellen die Umwandlung in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen beeinflusst. Unstimulierte und stimulierte IL-10<sup>-</sup> B-Zellen wurden mit der murinen Trophoblastzelllinie SM9-2 in dem Verhältnis 2:1 für 24 und 48 h kokultiviert. IL-10<sup>+</sup> B-Zellen wurden mittels durchflusszytometrischen Nachweis von GFP quantifiziert. Die 24-stündige Kokultur von stimulierten B-Zellen mit SM9-2-Zellen zeigte eine signifikante Umwandlung IL-10<sup>-</sup> B-Zellen in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen verglichen mit nur stimulierten B-Zellen (Abbildung 6). Das Ergebnis wurde in beiden Untersuchungsansätzen erzielt, obgleich B-Zellen aus naiven ( $p=0.0017$ ) oder trächtigen ( $p=0.0009$ ) Weibchen verwendet wurden. Signifikant mehr IL-10<sup>+</sup> B-Zellen zeigten sich ebenfalls im Vergleich stimulanzzfreier (CD19<sup>+</sup>) und stimulierter (st. CD19<sup>+</sup>) Kulturansätze von B-Zellen allein und im Vergleich stimulanzzfreier (CD19<sup>+</sup> + SM9-2) und stimulierter (st. CD19<sup>+</sup> + SM9-2) Kokulturansätze, sowohl nach 24 als auch 48 h.



**Abbildung 6: Trophoblastzellen fördern die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen *in vitro*.** CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen wurden aus der Milz naiver (n=4) und trächtiger (n=4) IL-10eGFP Weibchen isoliert. Stimulierte (st.) und unstimulierte B-Zellen wurden für 24 und 48 h mit Trophoblastzellen (SM9-2) kokultiviert. Die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die 24-stündige Kokultur von stimulierten CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen mit Trophoblastzellen zeigte eine signifikante Umwandlung in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen verglichen mit ausschließlich stimulierten B-Zellen. Obgleich B-Zellen naiver oder trächtiger Mäuse für die Kultur genutzt wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied. Sekundär ist der signifikante Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich unstimulierter und stimulierter Kulturansätze dargestellt. Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mit einer zweifaktoriellen RM-Varianzanalyse pro Messzeitpunkt durchgeführt, gefolgt von paarweisen t-Tests mit Bonferroni-Korrektur (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

### 3.1.3 Die Blockade von TGF- $\beta$ hat keinen Einfluss auf die Trophoblast-vermittelte Konvertierung in CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen

Proteinanalysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass SM9-2-Zellen große Mengen TGF- $\beta$  exprimieren. TGF- $\beta$  ist ein multifunktionelles Zytokin mit dem Potenzial schwangerschaftsförderliche Treg-Zellen zu induzieren [35]. In Bezug auf B-Zellen sind primär inhibitorische Effekte bekannt [210]. Im Folgenden untersuchten wir, ob TGF- $\beta$  als Induktor für IL-10<sup>+</sup> B-Zellen fungiert und die Blockade von TGF- $\beta$  diesen Effekt aufhebt. Wir verwendeten den zuvor beschriebenen Kokulturanatz für 24 h mit der Einschränkung, dass ausschließlich naive Mäuse eingesetzt wurden. Stimulierte B-Zellen wurden mit SM9-2-Zellen unter Zugabe eines anti-TGF- $\beta$ -Ak bzw. eines Kontroll-Ak kokultiviert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 7). Die Gabe des anti-TGF- $\beta$ -Ak zu allein stimulierten B-Zellen zeigte ebenfalls keinen Unterschied hinsichtlich der Anzahl IL-10<sup>+</sup> B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung deutet darauf hin, dass vom Trophoblasten ausgeschüttetes TGF- $\beta$  kein Mediator für die Konvertierung in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen ist.

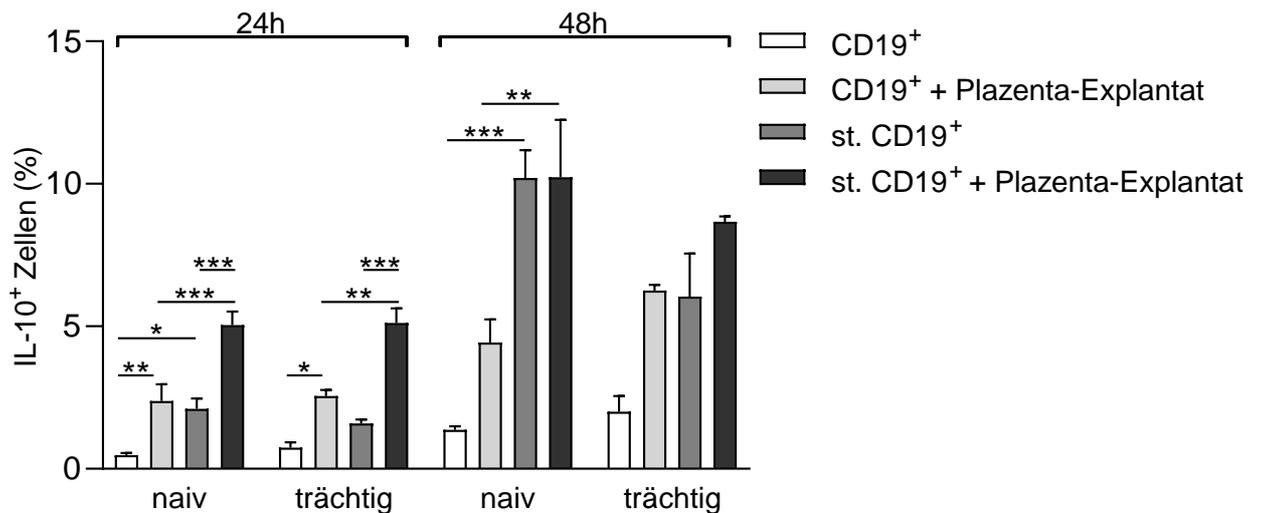


**Abbildung 7: Die Behandlung mit einem anti-TGF- $\beta$ -Ak hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung in CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen *in vitro*.** CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen wurden aus naiven IL-10eGFP Weibchen isoliert. Stimulierte (st.) B-Zellen wurden für 24 h mit SM9-2-Zellen unter Zugabe eines anti-TGF- $\beta$ -Ak (bzw. einer IgG Kontrolle) kokultiviert. Die Anzahl der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Jedes Quadrat repräsentiert ein einzelnes Tier. Die Daten sind als Mittelwerte dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller RM-Varianzanalyse, gefolgt von paarweisen Vergleichen zu st. CD19<sup>+</sup> + SM9-2 (t-Tests mit Bonferroni-Korrektur). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.1.4 Die Kokultur von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen mit Plazenta-Explantaten bewirkt eine signifikante Differenzierung in CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen

Für die Simulation physiologischer Bedingungen des intrauterinen Milieus verwendeten wir in einem zweiten Versuchsansatz Plazentagewebe von schwangeren Swiss Webster Mäusen anstelle der Trophoblastzelllinie, welche ebenfalls aus diesem Mausstamm generiert wurde. Am neunten Trächtigkeitstag angefertigte Plazenta-Explantate wurden unstimulierten und stimulierten CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup>

B-Zellen von naiven und trächtigen Mäusen zugefügt. Nach 24 und 48 h analysierten wir den Anteil IL-10<sup>+</sup> B-Zellen. Die 24-stündige Kultur von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen mit Plazenta-Explantaten induzierte eine signifikante Differenzierung in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen verglichen mit allein kultivierten B-Zellen (Abbildung 8). Der Effekt wurde in unstimulierten (naiv: p=0.0059; trächtig: p=0.0251) und stimulierten (naiv: p<0.0001; trächtig: p<0.0001) Kulturansätzen beobachtet, obgleich B-Zellen naiver oder trächtiger Mäuse verwendet wurden. Nachgeordnete signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich von stimulanzenfreien mit stimulierten Kulturansätzen für allein kultivierte B-Zellen und die Kokulturansätze, wobei dieser Effekt nach 48 h ausschließlich für die naive Gruppe signifikant war.



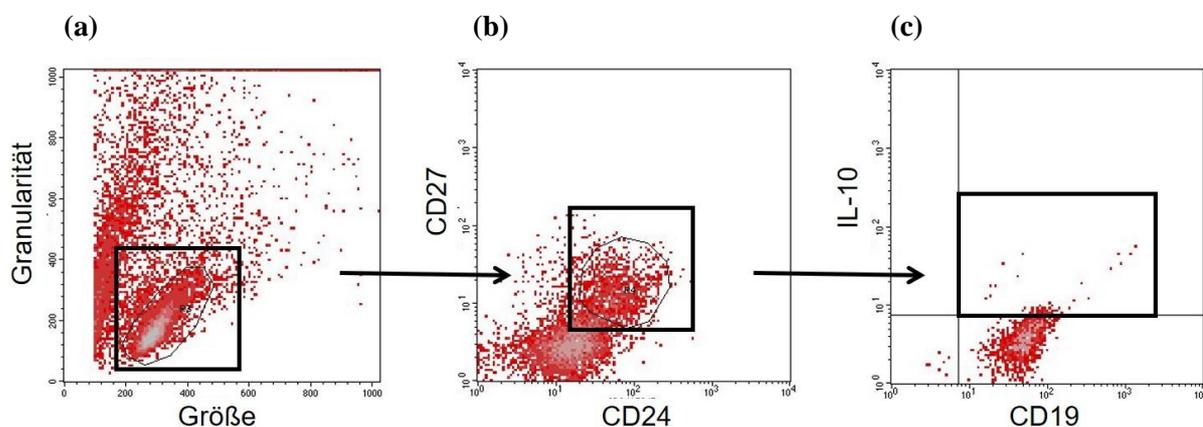
**Abbildung 8: Lösliche plazentare Faktoren förderten die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen *in vitro*.** CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen aus naiven (n=4) und trächtigen (n=3) IL-10eGFP Weibchen wurden mit Plazenta-Explantaten für 24 und 48 h kokultiviert. Die Induktion von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die 24-stündige Kokultur von CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen mit Plazenta-Explantaten zeigte eine signifikante Umwandlung in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen verglichen mit allein kultivierten CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup> B-Zellen. Der Effekt wurde in beiden Gruppen sowohl für stimulierte (st.) als auch nicht stimulierte Versuchsansätze beobachtet. Signifikante Unterschiede zeigten sich ebenfalls im Vergleich stimulanzenfreier und stimulierter Kulturansätze. Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels zweifaktorieller RM-Varianzanalyse pro Messzeitpunkt durchgeführt, gefolgt von paarweisen t-Tests mit Bonferroni-Korrektur (\*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001).

### 3.2 Analyse humaner Zelleexperimente

Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg humaner IL-10<sup>+</sup> B-Zellen und einem positiven Schwangerschaftsverlauf auf. So wiesen gesunde Schwangere im ersten Trimenon einen Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen im Blut auf verglichen zu nicht Schwangeren. Der Anstieg war im Kollektiv der Nullipara und Patienten, die im ersten Trimenon einen Spontanabort erlitten, nicht zu verzeichnen [149]. Der nachfolgende Versuchskomplex widmet sich der Fragestellung, welche humanen Faktoren die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen begünstigen.

### 3.2.1 Etablierung der B-Zell-Aktivierung und Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Messung von CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen

Der Zusatz von CpG/CD40L ist ein Aktivator für B-Zellen [93, 94]. In Vorversuchen wurde die optimale Konzentration von CpG für die Bestimmung von CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen ermittelt. Die *in-vitro*-Behandlung mit 1, 5 oder 10 µg/ml CpG und je 1 µg/ml CD40L stimulierte signifikant die Differenzierung in CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der gesamten B-Zell-Population (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Experimenten wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml CpG und 1 µg/ml CD40L gearbeitet. Für die Identifizierung der B-Zell-Subpopulation am Durchflusszytometer wurde das Vorliegen eines spezifischen Markerprofils genutzt. Abbildung 9 zeigt repräsentative Dot Plots der mittels Durchflusszytometrie vermessenen B-Zellen. Lymphozyten wurden anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität in der FSC/SSC-Darstellung identifiziert. Im nächsten Schritt wurden CD24<sup>hi</sup> und CD27<sup>+</sup> B-Zellen vorsortiert, um folgend CD19<sup>+</sup> und IL-10<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zell-Population auszuwerten.

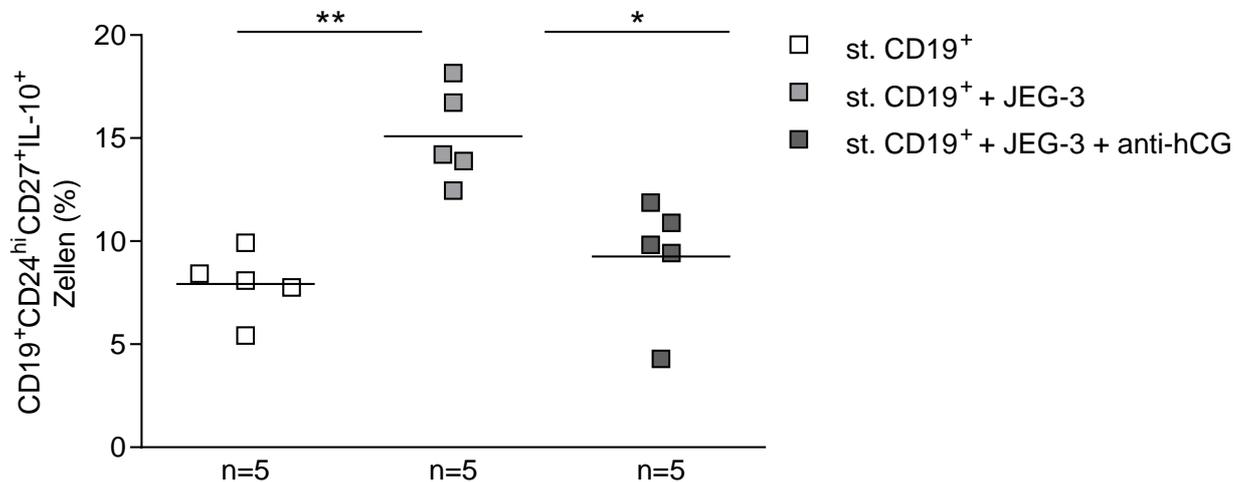


**Abbildung 9: Identifizierung der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb des B-Zellpools.** Die Zellen wurden entsprechend den angegebenen Parametern als CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen identifiziert. Dargestellt sind (a) Lymphozyten innerhalb der gesamten mononukleären Zellsuspension, (b) Anzahl an CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der Lymphozyten, (c) Anzahl an CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> Zellsuspension.

### 3.2.2 hCG-produzierende JEG-3-Zellen bewirken einen signifikanten Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen, der durch die Blockade von hCG signifikant beeinträchtigt wird

Der Synzytiotrophoblast ist ein Ort höchster endokriner Aktivität in der Plazenta und produziert zahlreiche Hormone [4]. Um zu testen, ob sich die Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen, haben wir den Einfluss von humanen Trophoblastzellen und insbesondere des Sekretionsproduktes hCG auf die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 als trophoblastisches Modellsystem ausgewählt. JEG-3-Zellen wurden mit stimulierten B-Zellen aus dem Blut von nulliparen Frauen in dem Verhältnis 1:1 für 24 h kokultiviert. Als Kontrolle dienten stimulierte, allein kultivierte B-Zellen. Die *in-vitro*-Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit JEG-3-Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg ( $p=0.0038$ ) IL-10-produzierender B-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 10). JEG-3-Zellen

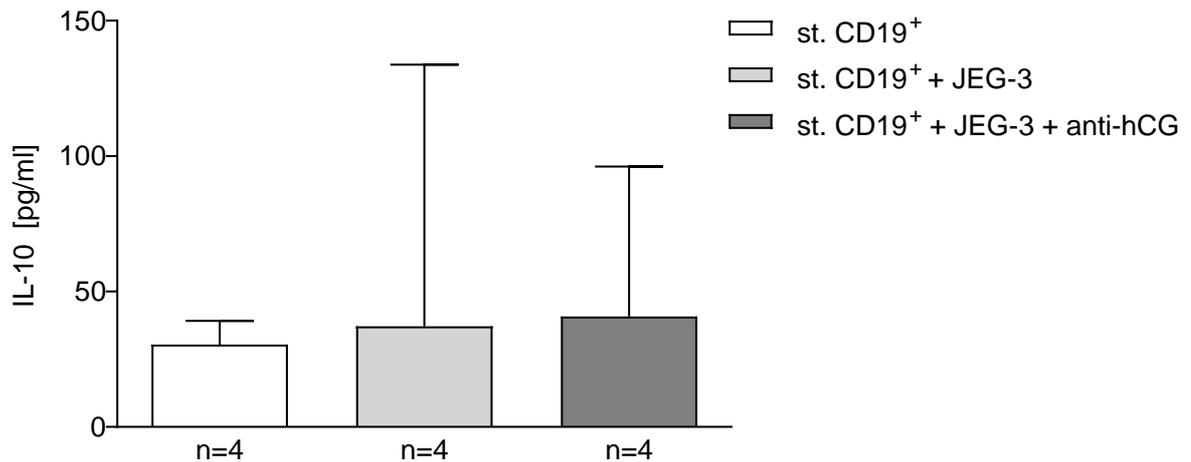
produzieren große Mengen hCG, ein Hormon mit immunregulierenden Eigenschaften [209]. Um zu untersuchen, ob hCG den Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen stimuliert, wurde der Kokultur ein anti-hCG-Ak hinzugefügt. Die Behandlung mit dem Ak verhinderte den Anstieg (p=0.0123) der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu der Kokultur von B-Zellen mit JEG-3-Zellen. Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass hCG ein Mediator für den Anstieg IL-10-produzierender B-Zellen ist.



**Abbildung 10: hCG-produzierende JEG-3-Zellen induzieren einen signifikanten Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen.** Stimulierte (st.) B-Zellen wurden mit JEG-3-Zellen und einem anti-hCG-Ak kokultiviert. Der prozentuale Anteil an CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der gesamten B-Zell-Population wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Die Kokultur von B-Zellen mit hCG-produzierenden JEG-3-Zellen provozierte einen signifikanten Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen, welcher durch die Blockade von hCG signifikant dezimiert wurde. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Spender. Die Daten sind als Mittelwerte dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorierlicher RM-Varianzanalyse, gefolgt von paarweisen Vergleichen zu st. CD19<sup>+</sup> + JEG-3 (t-Tests mit Bonferroni-Korrektur, \*p ≤ 0.05 und \*\*p ≤ 0.01).

### 3.2.3 Die Kultivierung der gesamten B-Zell-Population mit JEG-3-Zellen hat keine Auswirkung auf die IL-10-Sekretion der B-Zellen

Zusätzlich wollten wir untersuchen, ob die Trophoblast-vermittelte Induktion von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen mit der Sekretion des Zytokins einhergeht. Die Sezernierung von IL-10 in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA analysiert. Die Kokultivierung totaler stimulierter B-Zellen mit JEG-3-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der IL-10-Sekretion im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 11). Die Blockierung von hCG zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Eine IL-10-Sekretion nach Kultivierung von JEG-3-Zellen allein war nicht nachweisbar. Ebenfalls war IL-10 im Zellkulturüberstand unstimulierter B-Zellen allein und nach Kokultur mit JEG-3-Zellen nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). Unsere Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, die gezeigt haben, dass CpG/CD40L für die Produktion und Sezernierung von IL-10 erforderlich ist [87, 211, 212].



**Abbildung 11: Die Kokultur von stimulierten (st.) B-Zellen mit JEG-3-Zellen in An- oder Abwesenheit von hCG zeigte keine signifikante Auswirkung auf die IL-10-Sekretion.** Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf den IL-10-Gehalt getestet. Die Daten sind als Mediane  $\pm$  IQR dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Friedman Test, gefolgt vom Dunn's Test. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

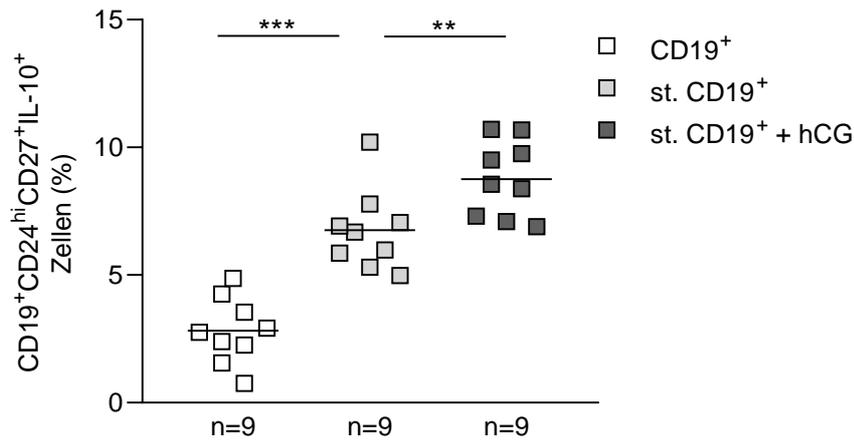
### 3.2.4 Der Einfluss von rhCG, Progesteron und Östradiol auf das Oberflächenrezeptorprofil und die IL-10-Sezernierung von B-Zellen

Der folgende Versuchskomplex konzentriert sich zum einen darauf, den Effekt des hCG auf die B-Zellen zu bestätigen und des Weiteren darauf, ob weitere plazentaassoziierte Hormone wie E2 und P4 IL-10<sup>+</sup> B-Zellen induzieren können.

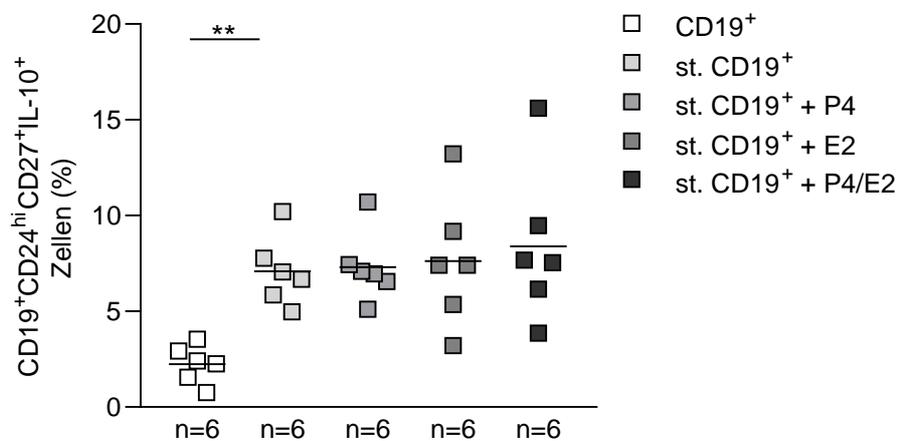
#### 3.2.4.1 hCG, jedoch nicht Progesteron oder Östradiol, erzeugt einen signifikanten Anstieg der IL-10-produzierenden B-Zellen *in vitro*

Hierfür wurden stimulierte totale B-Zellen nulliparer Frauen mit rhCG, P4, E2 oder einer Kombination aus P4 und E2 für 24 h inkubiert. Die Hormonkonzentrationen entsprachen den, in der Frühschwangerschaft auftretenden, physiologischen Werten im mütterlichen Serum. Nach Inkubation mit rhCG verzeichneten wir einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Zellpopulation ( $p=0.0049$ ) im Vergleich zu der lediglich mit Stimulanzen behandelten Kontrollgruppe (Abbildung 12a). Die Behandlungen mit P4, E2 oder der Kombination aus P4 und E2 zeigten keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 12b). In beiden Abbildungen ist ein signifikanter Anstieg der untersuchten Zellpopulation nach Stimulation zu verzeichnen, was mit unseren bisherigen Daten übereinstimmt.

(a)



(b)

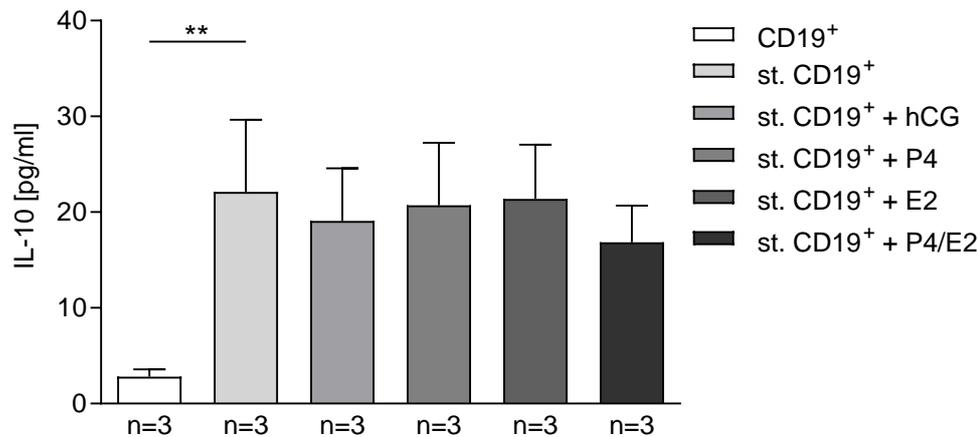


**Abbildung 12: hCG, jedoch nicht P4 oder E2 stimulierten die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen.** Dargestellt ist (a) die Auswertung unstimulierter und stimulierter (st.) B-Zellen sowie stimulierter B-Zellen in Gegenwart von rhCG (100 mIU/ml). (b) zeigt den experimentellen Ansatz unter Zugabe von P4 (30 ng/ml), E2 (1000 pg/ml) oder der Kombination beider Hormone. Der prozentuale Anteil der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Zellen wurde nach 24-stündiger Inkubation und anschließender extra- und intrazellulärer Markierung durchflusszytometrisch aus der gesamten B-Zell-Population bestimmt. Die Gabe von rhCG zu stimulierten B-Zellen erzeugte einen signifikanten Anstieg der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe. Für P4, E2 oder der Kombination aus P4 und E2 ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. In beiden Versuchen erwirkte die Stimulation mit CpG/CD40L einen signifikanten Anstieg der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Spender. Die Daten sind als Mittelwerte dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktorieller RM-ANOVA durchgeführt, gefolgt von paarweisen Vergleichen zu st. CD19<sup>+</sup> (t-Tests mit Bonferroni-Korrektur, \*\*  $p \leq 0.01$  und \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

### 3.2.4.2 Die *in-vitro*-Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit rhCG, Progesteron oder Östradiol hat keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion

Zudem wurde untersucht, inwieweit die Anwesenheit der Schwangerschaftshormone zu einer Veränderung der Menge an sekretiertem IL-10 beiträgt. Die Freisetzung des Zytokins wurde in den Zellkulturüberständen mit dem ELISA-Verfahren überprüft. Keines der Hormone hatte einen signifikanten Einfluss auf den IL-10-Gehalt in den Zellkulturüberständen im Vergleich zu der

stimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 13). Ein signifikanter Anstieg der IL-10-Sekretion war ausschließlich nach Stimulation der B-Zellen zu verzeichnen ( $p=0.0025$ ).



**Abbildung 13: Die *in-vitro*-Behandlung der magnetisch isolierten B-Zellen mit rhCG, P4 oder E2 hat keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion.** Die aus der Zellkultur gewonnenen Überstände wurden mittels ELISA auf den IL-10-Gehalt getestet. Die Inkubation von stimulierten (st.) B-Zellen mit Schwangerschaftshormonen zeigte keine signifikante Veränderung des IL-10-Gehaltes im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe. Ein signifikanter Anstieg der IL-10-Freisetzung nach Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen trat ein. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels einfaktorieller RM-ANOVA, gefolgt von paarweisen Vergleichen zu st. CD19<sup>+</sup> (t-Tests mit Bonferroni-Korrektur, \*\*  $p \leq 0.01$ ).

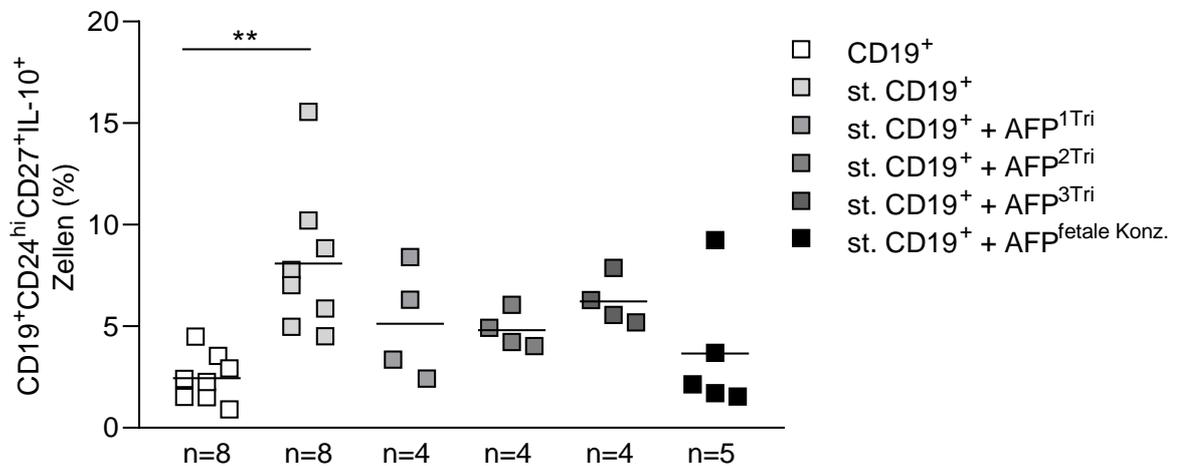
### 3.2.5 Der Einfluss von AFP auf B-Zellen

AFP ist ein Sekretionsprodukt des Fetus. Es ist in hoher Konzentration im fetalen Kreislauf vorhanden und in verhältnismäßig niedriger Konzentration im mütterlichen Serum nachweisbar. Schon vor 30 Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, dass der hohe AFP-Serumspiegel des Fetus diesen vor einem mütterlichen Immunangriff schützen könnte [195]. Jüngere Studien haben gezeigt, dass AFP den Phänotyp und die Funktion von Immunzellen modulieren kann [196–200, 201]. Der folgende Versuchskomplex untersucht den potenziellen Effekt von AFP auf die Induktion von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen sowie apoptotische Vorgänge innerhalb des B-Zell-Pools.

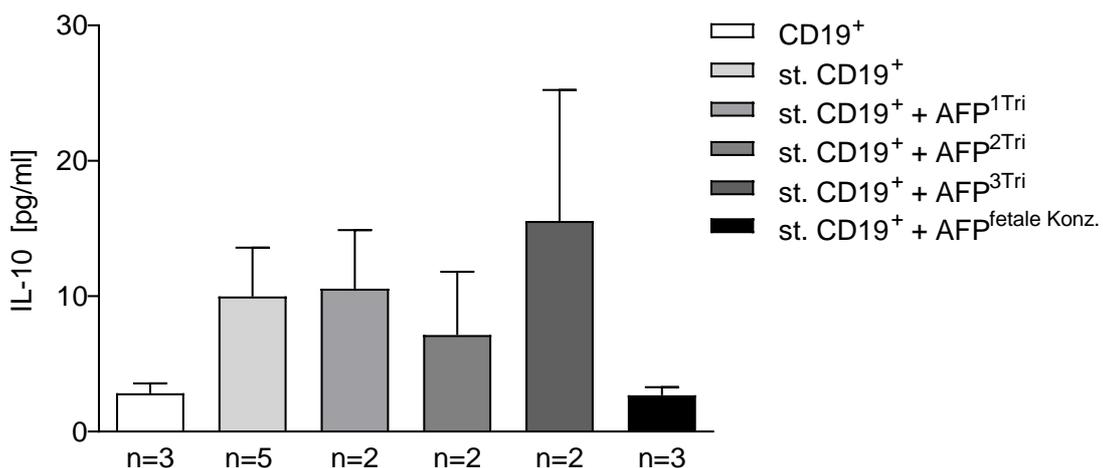
#### 3.2.5.1 Die *in-vitro*-Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP beeinflusst weder die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen noch die IL-10-Sezernierung

Zunächst prüften wir, ob AFP nach diaplazentarer Übertragung einen Einfluss auf B-Zellen, konkret die intrazelluläre Produktion sowie Freisetzung von IL-10, ausübt. Stimulierte B-Zellen aus dem Blut von nicht schwangeren Frauen wurden mit rAFP kultiviert. Die Konzentrationen entsprachen den physiologischen Werten im mütterlichen Serum in den Trimenen. Ferner wollten wir herausfinden, ob der Fetus mit semiallogenen Eindringlingen zurechtkommt, etwa mütterlichen B-Zellen. In einem zweiten *in-vitro*-Experiment wurden B-Zellen mit AFP in fetaler Serumkonzentration kultiviert. Weder die fetale noch die mütterlichen Konzentrationen von AFP zeigten einen signifikanten Effekt auf die

Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen (Abbildung 14). Der Vergleich von nicht stimulierten und stimulierten Ansätzen zeigte einen signifikanten Anstieg der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen nach Stimulation. Keine der AFP Konzentrationen hatte einen signifikanten Einfluss auf den IL-10-Gehalt in den Zellkulturüberständen im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 15).



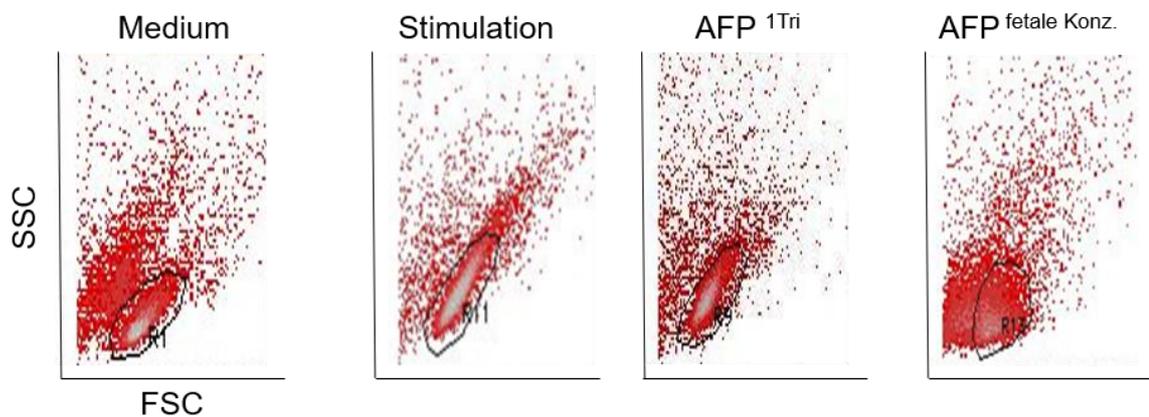
**Abbildung 14: Die *in-vitro*-Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP in mütterlicher oder fetaler Serumkonzentration zeigt keinen Effekt auf die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen.** CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden in Gegenwart von AFP entsprechend der Konzentration im 1. Trimenon (15 ng/ml), 2. Trimenon (60 ng/ml), 3. Trimenon (200 ng/ml) oder der fetalen Serumkonzentration (50 µg/ml) kultiviert. Unstimulierte oder stimulierte (st.) B-Zell-Kulturen dienten als Kontrolle. Extrazelluläre B-Zell-Marker und die intrazelluläre IL-10-Produktion wurden mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Anwendung von AFP auf die gesamte B-Zell-Population zeigte keine Unterschiede in der Anzahl an CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu der stimulierten Kontrolle. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Spender. Die Daten werden als Mediane dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunn's Test (\*\* p ≤ 0.01).



**Abbildung 15: Die *in-vitro*-Behandlung totaler stimulierter (st.) B-Zellen mit AFP in mütterlicher oder fetaler Serumkonzentration übt keinen Effekt auf die IL-10-Freisetzung aus.** Der IL-10-Gehalt in den Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe der ELISA Methode bestimmt. Die Daten sind als Mediane ± IQR dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunn's Test. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

### 3.2.5.2 Zellmorphologische Veränderungen der B-Zell-Population unter Zugabe von AFP in fetaler Serumkonzentration

Im Zuge der durchflusszytometrischen Analyse beobachteten wir eine Verschiebung der B-Zell-Population in der FSC/SSC-Darstellung, ausgelöst durch die fetale Serumkonzentration von AFP. Wohingegen sich die B-Zell-Population nach der Kultur im Medium sowie nach Applikation von Stimulanzien und AFP in mütterlicher Serumkonzentration gut abgegrenzt darstellen ließ, war es nicht möglich, die B-Zell-Population nach Zugabe der fetalen AFP Konzentration einwandfrei zu identifizieren (Abbildung 16). Aufgrund der Beobachtung mutmaßten wir, dass die *in-vitro*-Stimulation der B-Zellen mit AFP in fetaler Konzentration apoptotische Vorgänge einleitet.

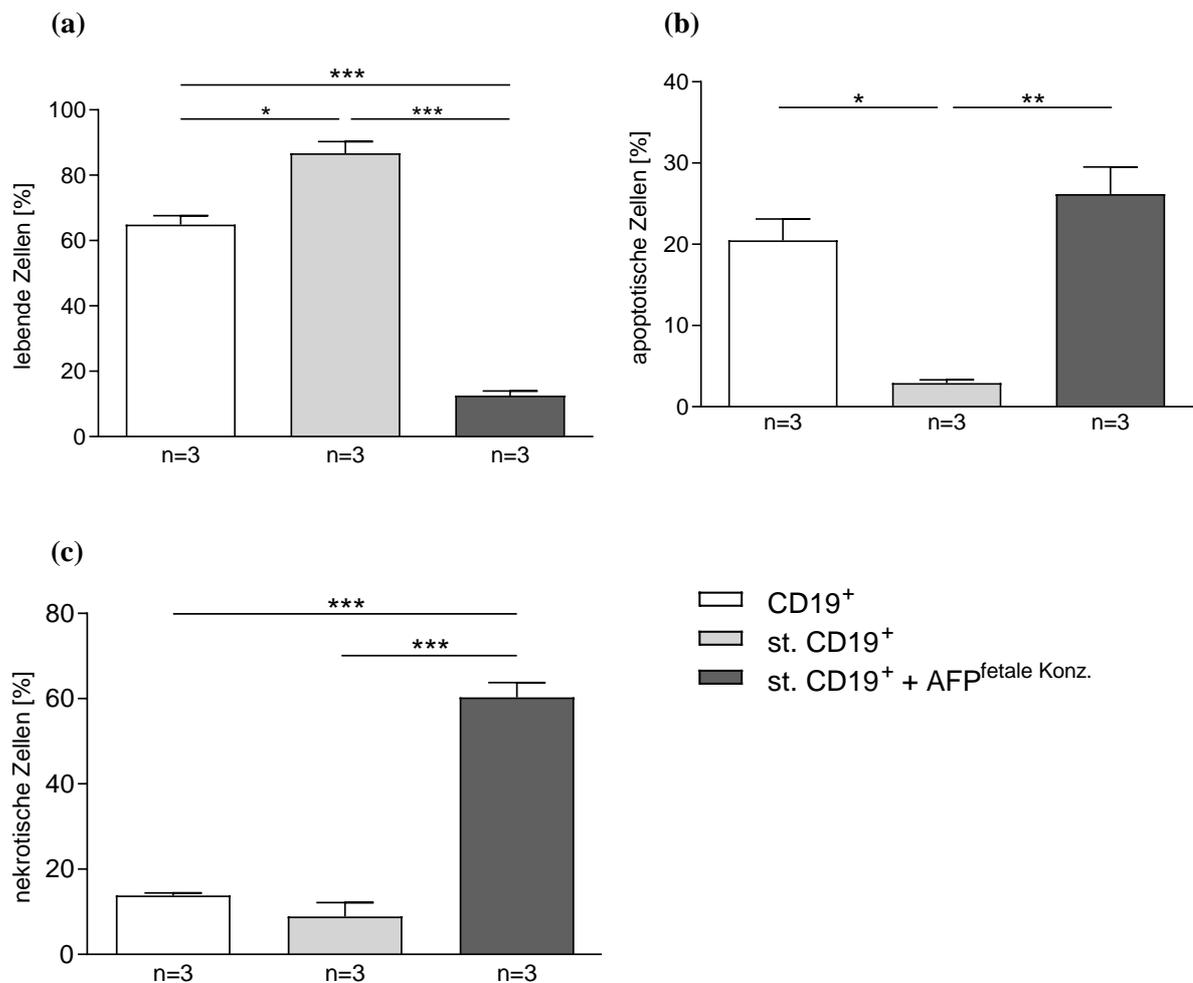


**Abbildung 16: AFP in fetaler Serumkonzentration führt zu zellmorphologischen Veränderungen innerhalb der gesamten B-Zell-Population.** Die Daten werden als FSC vs. SSC-Punktdiagramm unter Verwendung einer frei gezeichneten Region dargestellt. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mittels BD CellQuest Pro Software analysiert.

### 3.2.5.3 Die *in-vitro*-Stimulation der gesamten B-Zell-Population mit AFP in fetaler Serumkonzentration induziert apoptotische Vorgänge in B-Zellen

Für die Detektion und Quantifizierung von apoptotischen B-Zellen wurde eine Doppelfärbung mit Annexin-V und PI durchgeführt. Annexin-V ist ein Marker für früh apoptotische Zellen. In Kombination mit PI wurden apoptotische und nekrotische Zellen markiert und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Die gesamte B-Zell-Population wurde für 24 h mit AFP in der fetalen Serumkonzentration kultiviert und nachfolgend mit Annexin-V und PI angefärbt. Es konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Anteils lebender (Annexin<sup>-</sup>), früh apoptotischer (Annexin<sup>+</sup>PI) und nekrotischer Zellen (Annexin<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) aufgezeigt werden (Abbildung A.1 im Anhang).

Die Ergebnisse legen dar, dass die Kultivierung stimulierter B-Zellen unter Zugabe von AFP in fetaler Serumkonzentration den prozentualen Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe signifikant erhöhte (Abbildung 17). Zweitrangig wiesen unstimulierte Kulturansätze weniger lebende und mehr apoptotische Zellen im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe auf. Unsere Ergebnisse zeigen, dass AFP in hoher Konzentration die Apoptose von B-Zellen induziert.

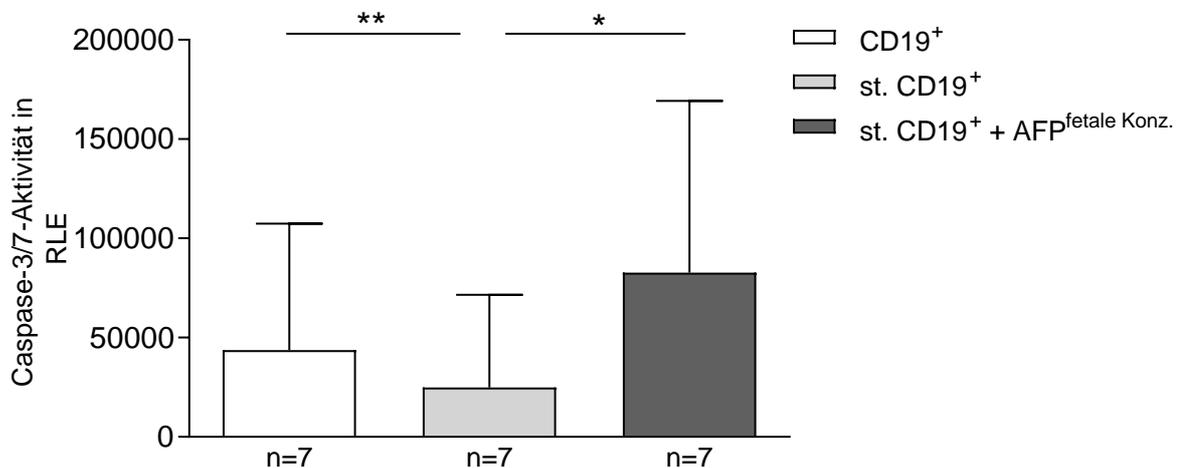


**Abbildung 17: Die fetale Serumkonzentration von AFP induzierte die Apoptose und Nekrose innerhalb der gesamten B-Zell-Population.** Dargestellt ist der Anteil (a) Annexin-, (b) Annexin+ (c) Annexin+PI+ B-Zellen in Prozent.  $5 \times 10^4$  isolierte B-Zellen wurden für 24 h in Standardmedium gehalten (weiße Balken), stimuliert (graue Balken) oder stimuliert und 50  $\mu\text{g/ml}$  AFP ausgesetzt (schwarze Balken). Die durchflusszytometrische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des FITC Annexin-V Apoptosenachweiskits. Die Applikation von AFP in fetaler Serumkonzentration demonstrierte einen signifikanten Abfall der lebenden Zellen und einen signifikanten Anstieg der apoptotischen und nekrotischen Zellen verglichen mit der alleinigen Applikation von Stimulanzen. Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozentwerten wiedergegeben. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktorieller RM-ANOVA, gefolgt von paarweisen t-Tests mit Bonferroni-Korrekturdurchgeführt (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , und \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

### 3.2.5.4 Die *in-vitro*-Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP in fetaler Serumkonzentration zeigt signifikant erhöhte Caspase-3 und -7 Aktivitäten

Apoptotische Vorgänge werden durch eine Kaskade von intrazellulären Faktoren, bekannt als Caspasen, vermittelt. Funktionell werden diese in Initiator- oder Effektorcaspasen eingeteilt. Die Effektorcaspasen, welche Caspase-3, -6 und -7 umfassen, lösen den programmierten Zelltod aus. Nachdem wir signifikante Unterschiede hinsichtlich der apoptotischen Aktivität der verglichenen Gruppen feststellten, erfolgte anhand eines Caspase-Analyseverfahren die Bestätigung unserer Ergebnisse. Hierzu verwendeten wir das Caspase-Glo 3/7 Lumineszenz-Kit. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Caspase-3- und -7-Aktivität in der Zellkultur stimulierter und mit AFP behandelter B-Zellen, während die alleinige

Stimulation diese Enzyme erwartungsgemäß hemmte ( $p=0.0226$ ). Sekundär zeigte der Vergleich zwischen nicht stimulierten und stimulierten Ansätzen eine signifikante Reduktion der Caspase-3- und -7-Aktivität nach Stimulation ( $p=0.0099$ ). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass AFP in mütterlicher Serumkonzentration keine zelltodinduzierende Wirkung auf B-Zellen hat, jedoch die fetale Konzentration von AFP die Apoptose von B-Zellen einleitet.



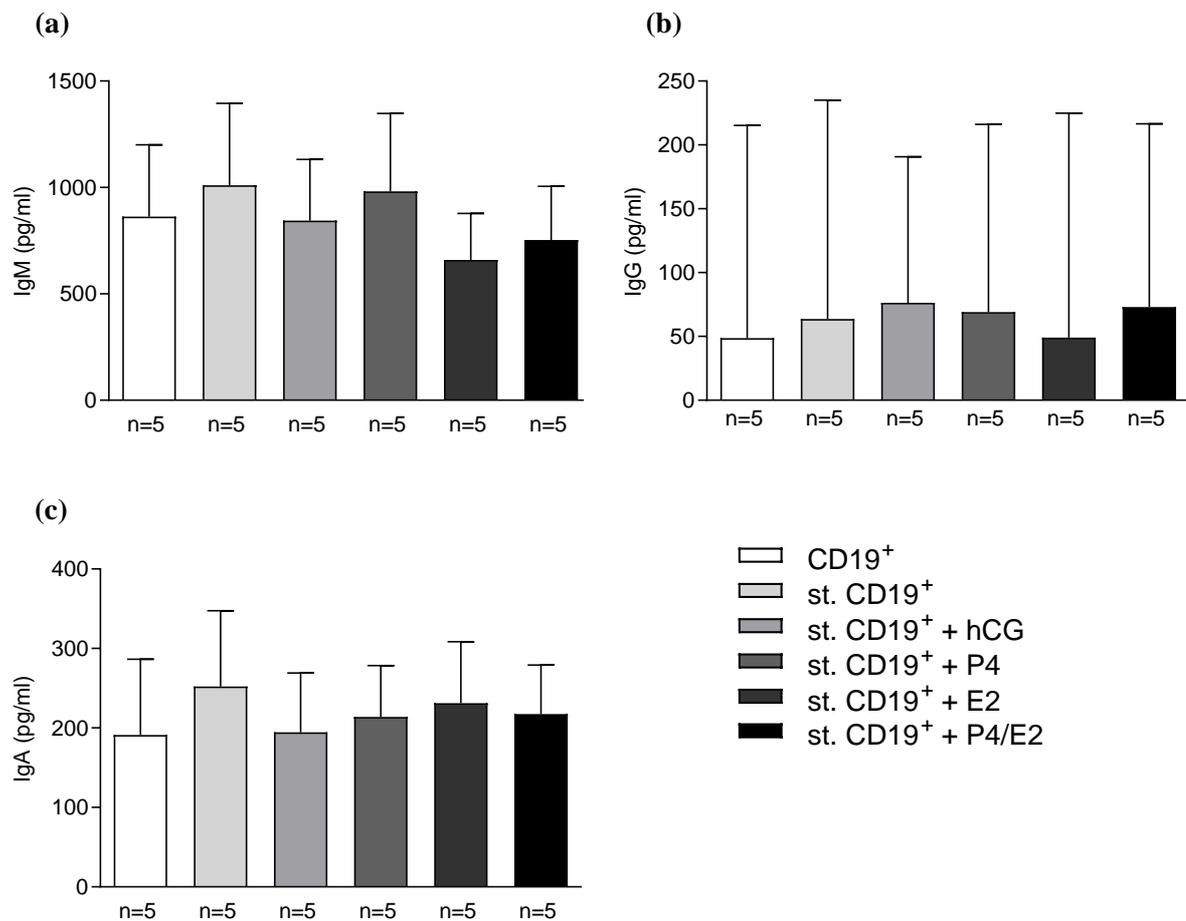
**Abbildung 18: Die *in vitro* Behandlung der gesamten B-Zell-Population mit AFP in fetaler Serumkonzentration erhöht die Caspase-3 und -7-Aktivität.** Nach 24-stündiger Inkubation unbehandelter B-Zellen und mit Stimulanzen behandelter B-Zellen mit bzw. ohne AFP, wurde das Caspase-Glo 3/7-Reagenz hinzugefügt. Die Messung der Caspase-Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLE) erfolgte nach 3 h. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Caspase-3 und -7-Aktivitäten nach AFP-Behandlung im Vergleich zu der stimulierten (st.) Kontrollgruppe. Der Vergleich von unstimulierten und stimulierten Ansätzen zeigte einen signifikanten Abfall der Caspase-3- und -7-Aktivität nach Stimulation. Die Daten sind als Mediane  $\pm$  IQR dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte nach Friedman, gefolgt von einem Dunn's Test ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ).

### 3.2.6 Der Einfluss von hCG, Progesteron, Östradiol und AFP auf die Antikörperbildung der B-Zellen

Ak werden von reifen B-Zellen nach Antigenkontakt produziert. IgG ist im Serum dominierend, gefolgt von IgM und IgA. Der folgende Versuchskomplex eruiert, ob hCG, P4, E2 oder AFP einen Einfluss auf die Ak-Produktion oder die IgG-Subklassen und deren Glykosylierungsprofil ausüben.

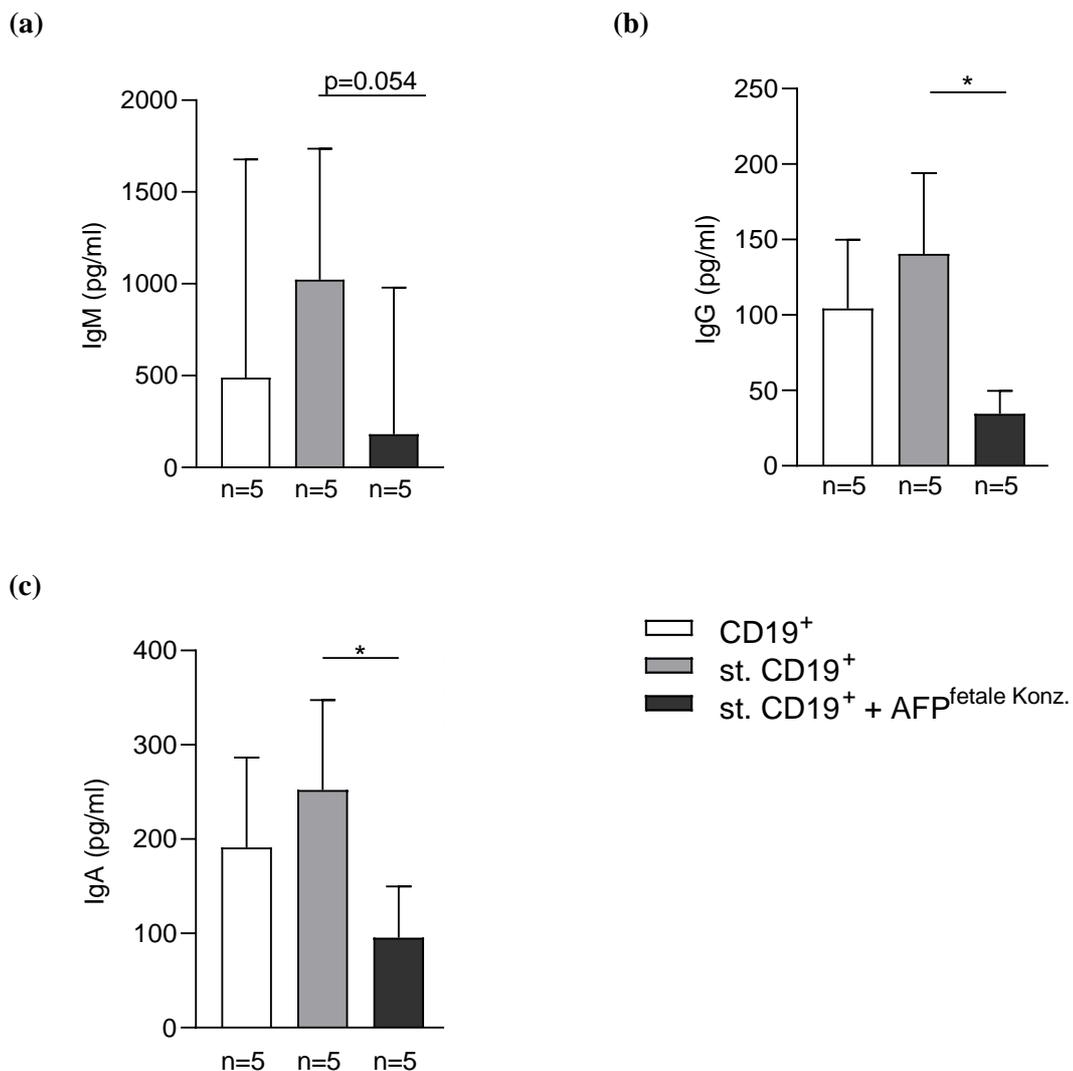
#### 3.2.6.1 Weder hCG, Progesteron, Östradiol noch AFP haben einen Einfluss auf die Konzentration von IgM, IgG und IgA

Um die Ak-Produktion untersuchen zu können, wurden B-Zellen über 12 Tage kultiviert. Unsere Vorversuche zeigten, dass lebende B-Zellen nach 12-tägiger Kultur nachweisbar und die Ig-Bestimmung in Zellkulturüberständen mittels ELISA Ig Quantifizierungskits möglich war (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von rhCG, P4, E2 oder der Kombination aus P4 und E2 zu B-Zellen beeinflusste nicht die Ausschüttung von humanem IgM, IgG, und IgA (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Die Behandlung mit rhCG, P4 oder E2 zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Quantifizierung von IgM, IgG und IgA.** B-Zellen wurden für 12 Tage in Gegenwart von rhCG, P4, E2 oder der Kombination aus P4 und E2 kultiviert. Die (a) IgM-, (b) IgG- und (c) IgA-Bestimmungen in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (a, c) bzw. Mediane  $\pm$  IQR (b) dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte bei Normalverteilung (a, c) mit einer einfaktoriellen RM-ANOVA, gefolgt von paarweisen t-Tests mit Bonferroni-Korrektur. Lag keine Normalverteilung vor (b), erfolgte die Auswertung nach Friedman, gefolgt von einem Dunn's Test. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

Indes führte die Kultivierung der B-Zellen mit AFP in der fetalen Serumkonzentration zu einer reduzierten Ausschüttung im Vergleich zu der stimulierten Kontrollgruppe, wobei die Ergebnisse für IgG ( $p=0.0479$ ) und IgA ( $p=0.0165$ ) signifikant waren (Abbildung 20). Die Beobachtung deckt sich mit unserer Erkenntnis, dass hohe Konzentrationen von AFP die Apoptose von B-Zellen fördern. Die Zugabe von AFP in den mütterlichen Serumkonzentrationen zeigte keine Wirkung auf die Ak-Bildung. Lediglich die Stimulation mit CpG/CD40L wies im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle eine vermehrte IgM-Sekretion auf (Daten nicht gezeigt).

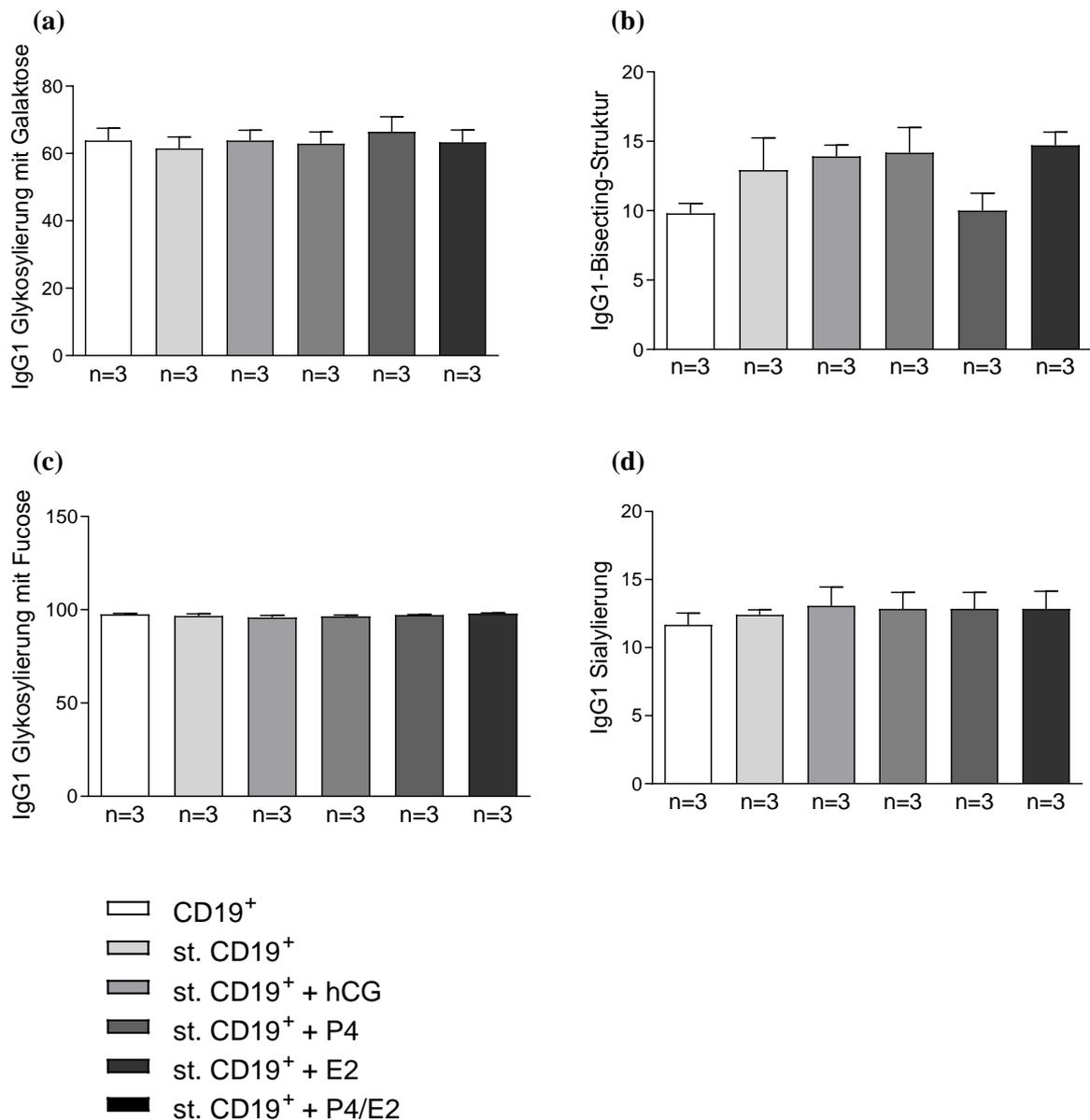


**Abbildung 20: Die IgM-, IgG- und IgA-Quantifizierung zeigte sich nach Kultivierung mit AFP in fetaler Serumkonzentration vermindert.** Dargestellt ist (a) die IgM-, (b) IgG- und (c) IgA-Bestimmung. Die Zugabe von AFP in fetaler Serumkonzentration zu der gesamten B-Zell-Population erzeugte eine signifikante Abnahme der IgG- und IgA-Sekretion. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (b, c) bzw. Mediane  $\pm$  IQR (a) dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte bei Normalverteilung (b, c) mit einfaktorierlicher RM-ANOVA, gefolgt von paarweisen Vergleichen zu stimulierten (st.) CD19<sup>+</sup> (t-Tests mit Bonferroni-Korrektur). Lag keine Normalverteilung vor (a), erfolgte die Auswertung nach Friedman, gefolgt von einem Dunn's Test (\* $p \leq 0.05$ ).

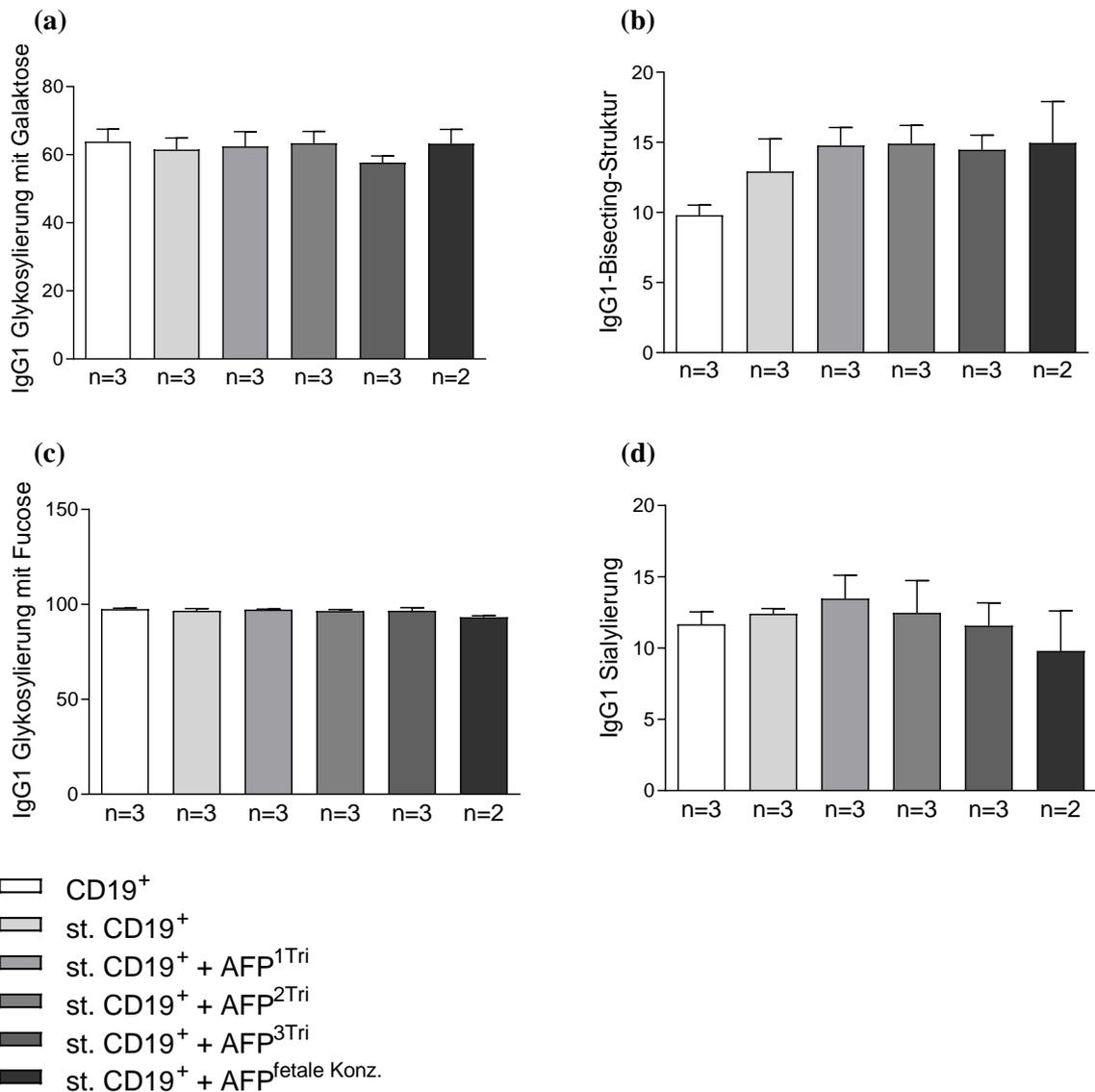
### 3.2.6.2 hCG, Progesteron, Östradiol und AFP haben keinen Einfluss auf das Fc-Glykosylierungsprofil der IgG1-Unterklasse

Obwohl die Gesamt-IgG-Konzentration keine Auffälligkeiten hinsichtlich der Gabe von hCG, P4 oder E2 aufzeigte, können Unterschiede in den IgG Subklassen, speziell innerhalb der Fc-N-Glykosylierung auftreten. Die terminale Glykosylierung in der Fc-N-Region beeinflusst die Funktionalität des Ak. So korreliert der schwangerschaftsbedingte Anstieg der IgG Galaktosylierung mit der Verbesserung der Symptomatik, die wir in der Schwangerschaft bei Patienten mit RA beobachten [104]. In Kooperation mit Professor Wuhrer aus der Universität Leiden (Niederlande) wurde IgG unter Verwendung von CaptureSelect-IgG-Fc-Kügelchen isoliert und aufgereinigtes IgG einer unterklassenspezifischen

Glykopeptidanalyse unterzogen. Ziel war die Bestimmung subklassenspezifischer Glykosylierungsprofile und möglicher Unterschiede basierend auf dem Zusatz der Schwangerschaftshormone sowie des AFP. In der Analyse wurden Informationen über die Häufigkeit der Bisecting-Struktur sowie die terminale Galaktosylierung, Sialylierung und Fukosylierung für IgG1 und kombiniert für IgG2 und IgG3 generiert (Glykosylierungsprofile für IgG2/3 nicht gezeigt). Die Auswertung ergab keine Unterschiede in der Fc-N-Glykosylierung nach Behandlung mit hCG, E2, P4 oder verschiedenen AFP-Konzentrationen verglichen mit der stimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 21 und Abbildung 22).



**Abbildung 21: IgG1 Fc-Glykosylierungsprozesse wurden nicht durch Schwangerschaftshormone beeinflusst.** Dargestellt ist (a) die IgG1-Galaktosylierung, (b) IgG1-Bisecting-Struktur, (c) IgG1-Fukosylierung und (d) IgG1-Sialylierung nach Inkubation totaler stimulierter (st.) B-Zellen mit rhCG, P4, E2 oder der Kombination beider Hormone. Die Bestimmung der Glykosylierungsprofile wurde in den Zellkulturüberständen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine einfaktorielle RM-ANOVA. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

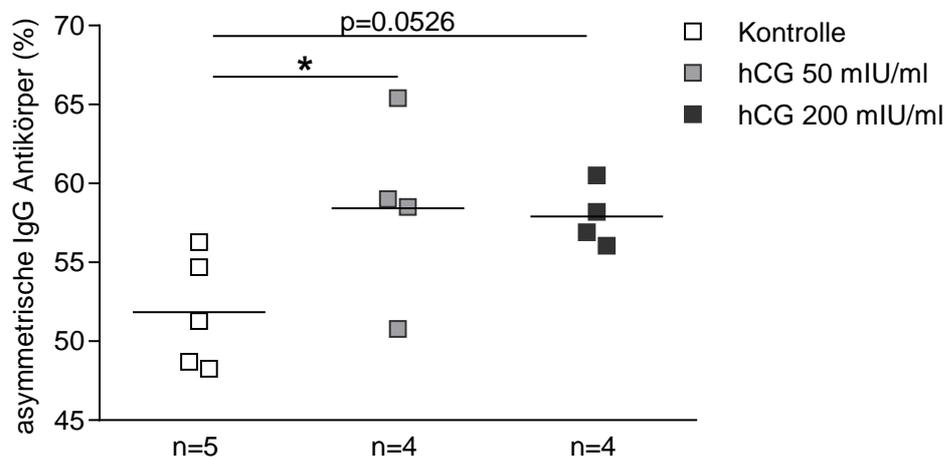


**Abbildung 22: IgG1 Fc-Glykosylierungsprozesse wurden nicht durch die Behandlung mit AFP beeinflusst.** Dargestellt ist (a) die IgG1-Galaktosylierung, (b) IgG1-Bisecting-Struktur, (c) IgG1-Fukosylierung und (d) IgG1-Sialylierung nach Inkubation totaler stimulierter (st.) B-Zellen mit verschiedenen fetalen und mütterlichen AFP-Konzentrationen. Die Ergebnisse werden als Mediane ± IQR dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Es konnten kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

### 3.2.6.3 hCG erhöht die F(ab)-asymmetrische Glykosylierung von IgG in Hybridom-112D5-Zellen

Ein weiterer Mechanismus zum Schutz des Fetus stützt sich auf die Gegenwart von asymmetrischen IgG Molekülen, welche innerhalb der Schwangerschaft dramatisch ansteigen. [142]. Durch die asymmetrische Glykosylierung des F(ab)-Fragments werden die Ak verändert, sodass sie väterliche Antigene binden, ohne Effektorfunktionen auszulösen. Um einen möglichen Effekt von hCG auf die Synthese von schwangerschaftsschützenden AAK zu bestimmen, nutzten wir ein Hybridom, welches symmetrisch und asymmetrisch glykosylierte anti-Dinitrophenol-Ak der IgG1-Subklasse sekretiert. Das Experiment wurde am Institut für Studien zur humoralen Immunität in Buenos Aires durchgeführt und

durch die Kooperation mit Dr. Andrea Canellada ermöglicht. Nach 24-stündiger Kultur von Hybridom 112D5-Zellen mit rhCG wurde die Synthese der AAK in den Zellkulturüberständen ermittelt. Wir konnten zeigen, dass die Zugabe von 50 mIU/ml hCG zu einer Erhöhung ( $p=0.0385$ ) an asymmetrisch glykosylierten IgG1-anti-DNP-Ak im Vergleich zu der Kontrollgruppe führte (Abbildung 23). Die Ergebnisse bestätigen die Fähigkeit von hCG, die Synthese von asymmetrischen IgG-Ak zu induzieren.



**Abbildung 23: Der Zusatz von hCG zu Hybridom-112D5-Zellen erhöhte den Anteil AAK.** Hybridom-Zellen wurden für 24 h in Gegenwart oder Abwesenheit von rhCG (50 mIU/ml und 200 mIU/ml) inkubiert. Die Prozentsätze der gesamten und symmetrischen monoklonalen IgG1-Ak in den Hybridom-Kulturüberständen wurden durch Con A-Bindungsanalyseverfahren gefolgt von ELISA beurteilt. Der Anteil an AAK wurde basierend auf der Differenz zwischen den gesamten und symmetrischen Ak berechnet und in Prozent angegeben. Die Zugabe von 50 mIU/ml hCG zu Hybridom-Zellen erhöhte signifikant den Anteil der AAK. Die Ergebnisse werden als Einzelwerte mit Darstellung der Mittelwerte gezeigt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA, gefolgt von paarweisen t-Tests ohne Adjustierung (\*  $p \leq 0,05$ ).

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass lösliche Faktoren aus der Mausplazenta die Generierung von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen förderten, wobei plazentares TGF- $\beta$  vermutlich keine führende Rolle spielt. Im Humanmodell ließen sich diese Daten unter Verwendung einer Plazentazelllinie bestätigen. hCG wurde im Humansystem als wichtiger Mediator für diesen Effekt identifiziert. P4, E2 oder AFP waren dagegen nicht in der Lage IL-10-produzierende B-Zellen zu generieren. Ferner konnte aufgezeigt werden, dass hCG die Synthese von asymmetrischen IgG-Ak induziert, während der Gesamtgehalt an Ig- und deren Glykosylierung nicht durch die verschiedenen Schwangerschaftshormone und AFP beeinflusst wurde. Darüber hinaus demonstrierten die Ergebnisse, dass AFP in fetaler Serumkonzentration die Apoptose von B-Zellen einleitet, assoziiert mit einer erhöhten Aktivität für die Caspasen 3 und 7.

## 4 Diskussion

Anpassungen der mütterlichen Immunantwort innerhalb der Schwangerschaft bestimmen maßgeblich den Schwangerschaftsausgang. Während die adäquate Induktion einer proinflammatorischen Immunreaktion eine Voraussetzung für die erfolgreiche Implantation ist, sind diverse Regulationsmechanismen erforderlich, um einen gegen fetale Trophoblastzellen gerichteten Angriff durch mütterliche Immunzellen zu verhindern. Fehlfunktionen können ein Reproduktionsversagen oder die Entwicklung von Schwangerschaftspathologien verursachen. Aktuelle Daten zeigen, dass B-Zellen, insbesondere die hier untersuchten IL-10-produzierenden B-Zellen, an der Entstehung und Aufrechterhaltung der fetalen Toleranz beteiligt sind [111]. Sowohl in der Humanschwangerschaft als auch in der murinen Schwangerschaft korrelierte der Anstieg IL-10-produzierender B-Zellen mit einem positiven Schwangerschaftsverlauf. Ihre Abwesenheit bzw. ein unzureichender Anstieg wurde mit dem Auftreten von Fehlgeburten assoziiert [149, 150]. Jüngst erfasste eine Untersuchung von Patientinnen mit wiederholtem Einnistungsversagen im Rahmen einer künstlichen Befruchtung eine verminderte Anzahl IL-10-produzierender B-Zellen verglichen mit Frauen, die eine erfolgreiche Schwangerschaft erlebten [213]. Ferner wurde eine negative Assoziation zwischen dem Prozentsatz IL-10-produzierender B-Zellen und der Konzentration von Auto-Ak im Serum der Patientinnen beobachtet. Die Suppression der Auto-Ak-Synthese durch IL-10-produzierende B-Zellen stellt einen potenziellen Mechanismus für die erfolgreiche Implantation dar. Demgegenüber wurden heterogene B-Zell-Subpopulationen mit Schwangerschaftspathologien, wie der Präeklampsie und der Frühgeburtlichkeit, in Verbindung gebracht, zum Teil über die Produktion von Auto-Ak [214, 215]. Die Mediatoren, die den Anstieg IL-10-produzierender B-Zellen in der Frühschwangerschaft bewirken, sind weitestgehend ungeklärt. Ausgehend von der Annahme, dass in der Schwangerschaft von der Mutter und dem Fetus freigesetzte Moleküle den Phänotyp der B-Zellen und die Synthese von IL-10 beeinflussen, wurde in dieser Arbeit der Effekt von hCG, P4, E2 und AFP auf B-Zellen untersucht.

### 4.1 Vom Trophoblasten sezernierte Faktoren induzieren die *de-novo*-Konvertierung IL-10-positiver B-Zellen aus IL-10-negativen B-Zellen

Die Identifizierung von Mediatoren, die zu der Erzeugung IL-10-produzierender B-Zellen beitragen, ist entscheidend zur Beurteilung einer möglichen therapeutischen Anwendung. Hier stellten wir die Hypothese auf, dass vom Trophoblasten freigesetzte Moleküle, den Phänotyp der B-Zellen und ihre Fähigkeit IL-10 zu produzieren, regulieren können. In unserem ersten Versuchskomplex am Mausmodell wurden B-Zellen mit der SM9-2 Trophoblastzelllinie kultiviert. Die SM9-Zelllinie wurde bereits in anderen *in-vitro*-Studien erfolgreich verwendet [43, 216–218]. Für die Gewinnung von IL-10-negativen B-Zellen nutzten wir einen Mausstamm, der es uns ermöglichte, an GFP gekoppelte IL-10-produzierende Zellen zu erkennen und auszuschließen. Die *de-novo*-Synthese des Zytokins IL-10 aus IL-10<sup>-</sup> B-Zellen wurde im Anschluss an die Versuche anhand der Messung von GFP nachgewiesen. Auf

diese Weise konnten wir nach der *in-vitro*-Kokultur mit allogenen Trophoblastzellen eine signifikante Umwandlung von IL-10<sup>-</sup> in IL-10<sup>+</sup> B-Zellen nachweisen, verglichen mit allein kultivierten B-Zellen. Das gleiche Ergebnis konnte durch die Verwendung von semiallogenen Plazenta-Explantaten erzielt werden. Die Ergebnisse bestätigen, dass vom Trophoblasten freigesetzte Faktoren die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen stimulieren.

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde der Transport trophoblastärer extrazellulärer Vesikel in die mütterliche Blutbahn beschrieben [30]. Schmorl konnte damals trophoblastäre Partikel in den Lungen von Frauen, die an einer Puerperal-Eklampsie verstarben, nachweisen. Die Präeklampsie ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Plazentationsstörung zurückzuführen, die zu einer systemischen Entzündungsreaktion der Mutter sowie Schädigung von Endothelzellen führt. Mehrere Studien demonstrierten, dass extrazelluläre Vesikel im mütterlichen Blut von Schwangeren mit einer Präeklampsie in höherer Konzentration auftreten im Vergleich zu gesunden Schwangeren [219, 220]. Die vermehrte Freisetzung der Vesikel und vermutlich auch deren spezifische Komposition kann Funktionsstörungen in den Empfängerzellen auslösen [221]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass trächtige Mäuse, denen prokoagulatorische extrazelluläre Vesikel injiziert wurden, typische Symptome einer Präeklampsie entwickelten [222]. Kohli und Kollegen stellten zudem fest, dass extrazelluläre Vesikel die Aktivierung mütterlicher Thrombozyten fördern, welche über den Kontakt zu Trophoblastzellen Entzündungsprozesse verursachen.

Ebenso dienen extrazelluläre Vesikel der Kommunikation zwischen fetalen Trophoblastzellen und mütterlichen Immunzellen. Sie werden kontinuierlich vom Synzytiotrophoblasten in das mütterliche Serum abgegeben und können demnach lokal (an der fetomaternalen Grenzfläche) und peripher (im mütterlichen Organismus) immunmodulatorisch wirken. Die Arbeitsgruppe um Professor Mincheva-Nilsson hat in einer Reihe von Studien die immunsuppressiven Eigenschaften extrazellulärer Vesikel in der Schwangerschaft nachgewiesen [223]. Unter anderem beeinträchtigen sie die Zytotoxizität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen und induzieren die Apoptose aktivierter PBMZ [224]. Southcombe und Kollegen zeigten, dass extrazelluläre Vesikel an Monozyten und B-Zellen binden und die Freisetzung von Zytokinen induzieren können [225]. In dieser Arbeit wurde untersucht ob die B-Zellen schwangerer Mäuse (potenziell durch fetale Partikel im mütterlichen Serum auf die Schwangerschaft vorbereitet) sich in ihrer Reaktion gegenüber naiven B-Zellen unterscheiden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied, obgleich B-Zellen aus naiven oder trächtigen Mäusen isoliert wurden. Ein vorausgegangener Kontakt peripherer B-Zellen mit trophoblastären extrazellulären Vesikeln scheint keinen Einfluss auf die Generierung IL-produzierender B-Zellen zu haben. Einschränkend muss hier angemerkt werden, dass extrazelluläre Vesikel in Mäusen zwar nachgewiesen wurden, ihr Konzentrationsmaximum im Serum jedoch um den 16. Schwangerschaftstag lag [226]. Es ist möglich, dass die Anzahl extrazellulärer Vesikel im mütterlichen Serum zum Zeitpunkt der Entnahme von B-Zellen am Tag 9 der Schwangerschaft für einen Effekt zu niedrig war.

Die SM9-2-Trophoblastzelllinie exprimiert großen Mengen an TGF- $\beta$  mRNA [227]. Zudem bestätigte unsere Arbeitsgruppe die Expression von TGF- $\beta$  in SM9-2-Zellen auf Protein-Ebene [228]. Entsprechend eruierten wir, ob das von SM9-2-Zellen produzierte TGF- $\beta$  die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen fördert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass der von uns eingesetzte anti-TGF- $\beta$ -Ak keinen Einfluss auf die Generierung der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen hatte. Im Gegensatz dazu zeigten Ramhorst und Kollegen, dass Trophoblastzellen über die Ausschüttung von TGF- $\beta$  Treg-Zellen induzieren können [229, 230]. Die Proliferation der Treg-Zellen konnte über die Zugabe eines anti-TGF- $\beta$ -Ak teilweise gehemmt werden [231]. In der Schwangerschaft ist TGF- $\beta$  wesentlich am Erfolg der Implantation beteiligt. Es reguliert die Trophoblastinvasion, Angiogeneseprozesse und mütterliche Immunantworten [232, 233]. Der Mangel an TGF- $\beta$  wird mit einem ungünstigen Mikromilieu an der fetomütterlichen Grenzfläche und dem Auftreten von Fehlgeburten assoziiert [234]. Obgleich unsere Daten TGF- $\beta$  als Induktor IL-10-produzierender B-Zellen entkräften, konnten verschiedene Studien zeigen, dass B-Zellen ihre immunregulierenden Fähigkeiten zum Teil über die Sekretion von TGF- $\beta$  vermitteln [235, 236].

#### **4.2 hCG induziert einen Anstieg IL-10-produzierender B-Zellen in der frühen Schwangerschaft, nicht jedoch Progesteron und Östradiol**

Schwangerschaftshormone weisen zahlreiche immunregulierende Eigenschaften auf, die dem Implantationsprozess des Fetus dienen und Abstoßungsreaktionen abwehren [150]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die in der Schwangerschaft in großen Mengen vom Trophoblasten gebildeten Hormone, speziell hCG, P4 und E2, eine positive Wirkung auf die Generierung von Breg-Zellen, nämlich der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen, haben. Unter Zuhilfenahme von B-Zellen, isoliert aus dem Serum nicht schwangerer Spenderinnen, konnten wir bestätigen, dass ausschließlich der Zusatz von rhCG den Anteil der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen erhöhte. Die Steroidhormone P4 und E2 hatten keine Auswirkung auf die untersuchte Zellpopulation. Die Ergebnisse konnten *in vitro* unter Verwendung der hCG-produzierenden JEG-3-Zelllinie bestätigt werden. Die Blockierung von hCG durch einen anti-hCG-Ak hemmte den Effekt. Diese Beobachtung untermauert, dass das von den JEG-3-Zellen neben anderen Faktoren gebildete hCG für den Anstieg der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> B-Zellen verantwortlich ist. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte eine zuvor veröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe, dass 95% der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen den LH/CG Rezeptor exprimieren, sodass hCG effektiv an B-Zellen binden kann [149].

Die Zuordnung der Breg-Zellen zu einer bestimmten Subpopulation ist unklar, weshalb eine Vielzahl von Markerprofilen für deren Identifizierung existiert [74]. Alternativ könnte die Heterogenität der Zellpopulation darauf zurückgeführt werden, dass Breg-Zellen nicht einer spezifischen Zelllinie entstammen, sondern als Reaktion auf eine Entzündung aus einem großen Pool an B-Zellen hervortreten [74]. Das Fehlen einer einheitlichen phänotypischen Beschreibung erschwert die Untersuchung der Subpopulation sowie den Vergleich mit anderen Studien. Dennoch wurden unsere Beobachtungen

kürzlich von einer chinesischen Arbeitsgruppe bestätigt. Liu und Kollegen demonstrierten, dass der Zusatz von Serum, gespendet von Frauen in der Frühschwangerschaft, zu PBMZ, isoliert aus nicht schwangeren Frauen, eine Zunahme der CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen induzierte (im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die autologes Serum erhielt). Darüber hinaus zeigten sie im Mausmodell, dass der Zusatz von hCG aber nicht E2 einen signifikanten Anstieg der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen in der Frühschwangerschaft bewirkte [237]. hCG ist physiologisch in Menschen nicht jedoch in Mäusen nachweisbar. Bei Mäusen werden vergleichbare Funktionen durch das homologe LH ausgeführt. Beide Hormone sind hinsichtlich ihrer Struktur und biologischen Aktivität sehr ähnlich und binden den gleichen Rezeptor, den LH/CG-Rezeptor [4]. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Infertilität von LH $\beta$ -Knockout-Mäusen durch Zugabe von hCG, über die Aktivierung des LH/CG-Rezeptors, behoben wurde [238]. Untersuchungen zum immunmodulatorischen Potenzial von hCG zeigten, dass die Behandlung von NOD-Mäusen (Tiermodell für Typ-1-Diabetes) mit hCG die Manifestation der Typ-1-Diabetes hemmte [239]. Die genannten Studien sind nur ein Auszug zahlreicher Publikationen, welche die Untersuchungen des hCG im Maussystem und die Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen unterstützen. hCG wird nahezu ausschließlich im Rahmen der Schwangerschaft produziert und ist bereits am Ende des ersten Trimenons in höchster Konzentration im mütterlichen Serum nachweisbar. Im Gegensatz dazu steigen die Serumkonzentrationen von P4 und E2 im weiteren Verlauf der Schwangerschaft an. In dieser Arbeit wurden die physiologischen Konzentrationen entsprechend des ersten Trimenons für alle Hormone verwendet. Ein Effekt von P4 und E2 auf IL-10<sup>+</sup> B-Zellen unter Verwendung von Konzentrationen entsprechend der anderen Trimenona kann nicht ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen, ob hCG die Sekretion von IL-10 fördert, wurden die Zellkulturüberstände der Proben untersucht. Ein Einfluss auf die IL-10-Sezernierung nach Behandlung von B-Zellen mit hCG, P4 oder E2 ließ sich nicht bestätigen. Demzufolge fördert hCG den Anteil der Breg-Zellen, erhöht aber nicht die IL-10-Freisetzung.

Fortlaufende Studien unserer Arbeitsgruppe haben jüngst Analysen zur Funktionalität von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen in der Schwangerschaft durchgeführt [240]. Hier waren trächtige  $\mu$ MT-Mäuse, denen reife B-Zellen fehlten, deutlich anfälliger für den LPS-induzierten intrauterinen Fruchttod im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Behandlung mit IL-10 oder der Transfer IL-10-produzierender B-Zellen verringerte die intrauterine Fruchttodrate. Der Transfer von IL-10<sup>-</sup> B-Zellen oder aller B-Zellen aus IL-10-defizienten Mäusen führte nicht zu diesem Effekt. Die Erforschung zugrundeliegender Mechanismen zeigte, dass das von B-Zellen stammende IL-10 die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-6) durch T-Zellen unterdrückte und die Umwandlung naiver T-Zellen in Treg-Zellen förderte. Die Beobachtungen unterstreichen, dass IL-10<sup>+</sup> B-Zellen erforderlich sind, um das Immungleichgewicht in der Schwangerschaft wiederherzustellen, wenn es durch entzündliche Prozesse kompromittiert wird. hCG könnte diesen Prozess beim Menschen aktiv unterstützen.

### 4.3 Die Gabe von AFP induziert apoptotische Vorgänge in kultivierten B-Zellen

Studien am Mausmodell, in denen der Effekt von AFP auf Autoimmunerkrankungen untersucht wurde, haben gezeigt, dass AFP entzündliche Prozesse hemmen kann [205, 241]. Da AFP, physiologisch gleich dem hCG, vorrangig in der Schwangerschaft vorkommt, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht, inwieweit AFP Auswirkungen auf den Phänotyp und die Funktion von B-Zellen hat. Zunächst konnte gezeigt werden, dass AFP keinen Effekt auf die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen ausübte. Dabei ließ sich kein Unterschied feststellen, unabhängig davon, ob B-Zellen dem AFP in der fetalen Serumkonzentration oder in der mütterlichen Serumkonzentration entsprechend der Trimenen ausgesetzt waren. Interessanterweise konnten die Daten eindrucksvoll zeigen, dass die *in-vitro*-Stimulation von B-Zellen mit AFP in fetaler Serumkonzentration (50 µg/ml) apoptotische Vorgänge innerhalb der gesamten B-Zell-Population induzierte. Der hohe Anteil apoptotischer Zellen ließ sich anhand der Doppelfärbung mit Annexin-V und PI bestätigen. In einem weiterführenden Experiment konnte unter Verwendung eines Caspase-Glo 3/7 Lumineszenzkits die erhöhte Aktivität der Apoptose-ausführenden Caspasen in den entsprechenden Kultursätzen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der verminderten Lebensfähigkeit der Zellen zeigte sich die Ak-Produktion unter Zugabe von AFP in fetaler Konzentration ebenfalls signifikant vermindert.

Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen zum Einfluss von AFP auf humane APZ in Patienten mit Leberzellkarzinomen. Um und Kollegen zeigten anhand von *in-vitro*-Experimenten, dass der Zusatz von AFP die Funktionalität von DZ einschränkt und AFP in hoher Konzentration die Apoptose der Zellen induziert [196]. Nachstehend inkubierten Setiyono und Kollegen DZ mit aufgereinigtem AFP (aus Nabelschnurblut) in einer Konzentrationsspanne von 1,56 - 25 µg/ml. Basierend auf einer PI-Färbung beobachteten sie, dass der Zusatz von AFP in der Konzentration von 12,50 µg/ml und darüber signifikant den Zelltod einleitete [197]. Die Autoren vermuten, dass eine Beeinträchtigung der DZ durch erhöhte AFP Konzentrationen, vor allem in der Proximität des Tumors, mit einer erhöhten Immunsuppression und folglich Tumorprogression verbunden sein könnte. Die Mechanismen, die der AFP-induzierten Apoptose zugrunde liegen, sind nicht aufgeklärt. Eine Studie von Irony-Tur-Sinai und Kollegen behandelte Mäuse nach aktiv induzierter EAE mit rekombinantem AFP (10µg tgl.) oder Placebo. Sie beobachteten, dass AFP eine signifikante Überexpression proapoptotischer Gene der Bcl-2-Familie induzierte [241]. Analog zu unseren Daten zeigten die ZNS-Präparate nach AFP-Behandlung eine erhöhte Caspase 3-Aktivität verglichen mit der Placebo-Gruppe. Vergleichbare Studien, die AFP-abhängige apoptotische Vorgänge in B-Zellen untersuchen, liegen bisher nicht vor.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass mütterliche B-Zellen, bei Übertritt in den fetalen Kreislauf, hohen AFP Konzentrationen ausgesetzt sind und ihre Anzahl durch Apoptose reduziert wird. Bewiesen ist, dass ein bidirektionaler Zelltransfer von mütterlichen und fetalen Zellen

im Rahmen der Schwangerschaft erfolgt [242]. Aktuelle Studien haben mütterliche B-Lymphozyten in fetalem Serum von Menschen und Mäusen identifiziert [243, 244]. Diese Zellen werden trotz Expression von nicht-vererbten mütterlichen Antigenen (non-inherited mütterlich antigens (NIMA)) vom rezipierenden Nachwuchs nicht abgestoßen und sind bis in das Erwachsenenalter nachweisbar [245]. Daten aus dem Bereich der Transplantationsimmunologie lassen vermuten, dass mütterliche mikrochimäre Zellen im Nachwuchs eine Toleranz gegenüber NIMA induzieren können. Eine Studie von Andrassy und Kollegen zeigte, dass H-2<sup>b/b</sup> Mäuse, die dem NIMA „H-2<sup>d/d</sup>“ durch H-2<sup>b/d</sup> Muttertiere ausgesetzt waren, H-2<sup>d/d</sup>-Herztransplantate länger tolerierten als Kontrolltiere, die NIMA nicht ausgesetzt waren [246]. Beim Menschen wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von mütterlichen Zellen im Nachwuchs Treg-Zellen gegen NIMA induziert [247]. Demgegenüber könnte die Gegenwart der teils genetisch fremden Immunzellen im Nachwuchs eine Autoimmunreaktion auslösen. Beispielsweise wurde die Übertragung von mütterlichen Zellen mit der Pathogenese juveniler entzündlicher Myopathie bzw. Autoimmundiabetes assoziiert [248, 249]. Unsere Daten stärken die Annahme, dass AFP eine für den Fetus protektive Rolle in der Schwangerschaft ausübt.

#### **4.4 Die Wirkung der Schwangerschaftshormone und des AFP auf Antikörper, speziell deren Fc- und Fab-Glykosylierungen**

Strukturelle Variationen der Ak innerhalb der Fab- und Fc-Region in Form von abweichenden Glykosylierungsprofilen beeinflussen deren Funktionalität. So wird die Fc-N-Glykosylierung mit Sialinsäure oder Galaktose einer suppressiven Immunantwort zugeordnet [102, 103]. In der Schwangerschaft nimmt die Sialylierung und die Galaktosylierung der IgG-Fc-Region zu, sowohl in gesunden Kontrollpersonen als auch in Patienten mit RA [250, 251]. In letzterem Patientenkollektiv wurden die schwangerschaftsbedingten Veränderungen der Glykosylierung mit der reduzierten Symptomatik der Patienten während der Schwangerschaft verknüpft [104, 250, 251].

Um herauszufinden, ob die Veränderungen der Glykosylierungsprofile auf Schwangerschaftshormone oder AFP zurückzuführen sind, wurden IgG-Glykosylierungsprofile nach 12-tägiger Kultur von B-Zellen mit hCG, P4, E2, der Kombination aus P4 und E2 oder AFP bestimmt. Darüber hinaus ermittelten wir die Gesamtkonzentrationen von IgA, IgG und IgM in den Zellkulturüberständen. Dabei zeigten sich weder für die getesteten Hormone noch für AFP in den mütterlichen Serumkonzentrationen quantitative Unterschiede in der Ig-Ausschüttung. Der Zusatz der fetalen AFP Konzentration zu B-Zellen bewirkte eine reduzierte Ig-Ausschüttung, was auf die Apoptose der B-Zellen zurückzuführen ist. Die Glykopeptidanalyse von aufgereinigtem IgG aus den gleichen Proben ergab ebenfalls keine Veränderung der terminalen Glykosylierung in der Fc-Region. Einschränkend wird hier auf das kleine Probandenkollektiv und den damit verbundenen interindividuellen IgG-Schwankungen hingewiesen.

Während der Schwangerschaft wurden auch Veränderungen in der IgG-Fab-Glykosylierung beobachtet [106]. Speziell die Asymmetrie der IgG-Fab-Glykosylierungen veranschaulicht einen weiteren Mechanismus, der zur Unterstützung des Fetus durch das mütterliche Immunsystem beiträgt, indem

alloreaktive Immunantworten reduziert werden [142]. Canellada und Kollegen haben bereits gezeigt, dass die Produktion der AAK durch P4 stimuliert werden kann [174, 175]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass hCG *in vitro* die AAK-Synthese induziert. Gutiérrez und Kollegen identifizierten das vom Trophoblasten abgeleitete IL-6 als einen weiteren Mediator der AAK-Produktion [143]. Die Freisetzung von hCG wird ebenfalls durch IL-6 induziert [252]. Ein potenziertes Effekt von hCG und IL-6, wie bereits für die Kombination aus IL-4, IL-6 und IL-10 beobachtet, kann vermutet werden [144]. Während diese und ältere Studien die Ak-Synthese von B-Zellen untersuchten, richtet eine aktuelle Studie die Aufmerksamkeit auf die Plazenta selbst als AAK-Produzenten [253]. Die Autoren dokumentierten die Existenz von IgG in Trophoblastzellen B-Zell-defizienter schwangerer Mäuse und zeigten, dass humane Trophoblastzellen und Endothelzellen *in vitro* in der Lage sind, asymmetrisch glykosylierte IgG-Moleküle zu produzieren. Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen neuartigen Mechanismus in der Reproduktionsimmunologie hin und rücken den Fetus erneut als wesentlichen Initiator der Schwangerschaftstoleranz in den Vordergrund.

#### **4.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Zusammenfassend betrachtet konnte in dieser Arbeit die Bedeutung von dem Schwangerschaftshormon hCG für die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen und fetalprotektiver asymmetrischer Antikörper aufgezeigt werden. Unsere Ergebnisse unterstützen die Rolle von hCG als zentralen Regulator der Toleranz in der Schwangerschaft [152]. Darüber hinaus liefert die Arbeit erste Hinweise für eine mögliche fetalprotektive Rolle des AFP. Eine Limitierung dieser Arbeit sind die ausschließlich *in vitro* durchgeführten Versuche sowie die fehlende Untersuchung weiterführender Mechanismen, z.B. die potenzielle Interaktion IL-10-produzierender B-Zellen mit anderen Immunzellen. *In vivo* Studien sind notwendig, um die erfassten Effekte des hCG im Menschen zu bestätigen.

Das Verständnis immunologischer Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft kann präventiv und therapeutisch genutzt werden. Beispielsweise müssen Frauen, die von Autoimmunerkrankungen betroffen sind oder ein Organtransplantat erhalten haben, oft die Einnahme von Immunsuppressiva (darunter das B-Zell-depletierende Rituximab) während der Schwangerschaft fortsetzen oder sind unter der Therapie schwanger geworden [254, 255]. Das Wissen über die Sicherheit dieser Therapien im Rahmen der Schwangerschaft und Richtlinien sind erforderlich, um mütterlichen Komplikationen vorzubeugen und fetale Risiken und Spätfolgen für das Neugeborene zu minimieren [256]. Ähnliches gilt für einen therapeutischen Einsatz von hCG, z.B. in Patienten mit Implantationsversagen. Aufgrund der Pionierarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde hCG in klinischen Studien auf das therapeutische Potential zur Verbesserung der Implantations- und Schwangerschaftsrate für Paare, die einen IVF- und ICSI-Zyklus absolvierten, untersucht [9, 155, 257, 258]. In einer Metaanalyse bestehend aus 15 randomisierten Studien konnte gezeigt werden, dass intrauterine Injektionen von hCG die Schwangerschaftsrate von IVF-Patientinnen verbessern konnte [259]. Für welche Patientin, zu welchem Zeitpunkt der Schwangerschaft und in welcher Konzentration hCG sicher angewendet werden kann,

muss klar definiert werden. Zu hohe hCG-Werte im zweiten und dritten Trimenon können möglicherweise die Auto-Ak-Produktion von B1-Zellen und damit verbunden die Ausbildung der Präeklampsie fördern [130, 158]. Diese Korrelation beweist nicht die Kausalität, zeigt aber, dass weitere Studien erforderlich sind, um die Mechanismen der Immunregulation durch Hormone besser verstehen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die menschliche Schwangerschaft stellt das mütterliche Immunsystem vor eine besondere Herausforderung, die in der aktiven Akzeptanz des zum Teil fremden Fetus und der konstanten Reaktionsfähigkeit gegenüber Krankheitserregern besteht. Störungen des immunologischen Gleichgewichts beeinträchtigen die Fertilität und können Schwangerschaftskomplikationen, wie eine Präeklampsie, intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) und Frühgeburtlichkeit zur Folge haben. Vorausgehende Studien unserer Arbeitsgruppe konnten nachweisen, dass IL-10-produzierende B-Zellen in der frühen Schwangerschaft ansteigen und wesentlich an den Mechanismen der fetalen Toleranz der Mutter beteiligt sind.

Mit dem Ziel, physiologische Auslöser der Expansion von IL-10-produzierenden B-Zellen zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss Trophoblast-abgeleiteter Faktoren auf die Fähigkeit von B-Zellen IL-10 zu produzieren, untersucht. Untersuchungen im Maussystem bestätigten, dass die Kultur von B-Zellen mit Trophoblastzellen bzw. Plazentagewebe die Generierung IL-10-produzierender B-Zellen unterstützt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde anhand humaner Proben der Einfluss Trophoblast-abgeleiteter Hormone, speziell hCG, P4 und E2, auf IL-10-produzierende B-Zellen untersucht. Die *in-vitro*-Versuche haben gezeigt, dass nur hCG die Expansion IL-10-produzierender B-Zellen induziert. Erstmals konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass hCG die Produktion schwangerschaftsprotektiver Ak unterstützt. Die erzielten Ergebnisse deuten stark auf eine Schlüsselrolle des hCG bei der Entwicklung der Toleranzmechanismen während der Schwangerschaft hin. Weiterführende Versuche zum Einfluss des vom Fetus selbst produzierten AFP konnten zudem zeigen, dass die Behandlung von B-Zellen mit AFP in hoher Konzentration, gleich der fetalen Serumkonzentration, die Apoptose der B-Zellen bewirkt. Die Ergebnisse deuten auf die Existenz fetaler Mechanismen hin, die den Eintritt potenziell schädlicher B-Zellen regulieren.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der mütterlichen und fetalen Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft bei, welche letztendlich einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Spontanaborten aufgrund einer immunvermittelten Abstoßung des Fetus bieten.

## Literaturverzeichnis

1. Mor G, ed. *Immunology of Pregnancy*, 1st ed. New York, NY: Springer New York, 2006
2. Schoenwolf GC, Larsen WJ. *Larsen's human embryology*, 4th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Churchill Livingstone, 2009
3. Schneider H, ed. *Die Geburtshilfe. Mit 193 Tabellen ; [Facharztwissen und mehr]*, 4th ed. Heidelberg: Springer Medizin, 2011
4. Huppertz B, Schleußner E, eds. *Die Plazenta. Grundlagen und klinische Bedeutung*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018
5. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JCP. Apoptosis and its role in the trophoblast. *American journal of obstetrics and gynecology* 2006; 195:29–39
6. Pschyrembel W. *Praktische Geburtshilfe. Mit geburtshilflichen Operationen*, 20th ed. Berlin, New York: de Gruyter, 2008
7. Costa MA. The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive biomedicine online* 2016; 32:14–43
8. Nwabuobi C, Arlier S, Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Lockwood CJ, Kayisli UA. hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *International journal of molecular sciences* 2017; 18
9. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2009; 182:5488–5497
10. Toth B, ed. *Fehlgeburten Totgeburten Frühgeburten. Ursachen, Prävention und Therapie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017
11. Szekeres-Bartho J. The Role of Progesterone in Feto-Maternal Immunological Cross Talk. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 2018; 27:301–307
12. Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M, Taggart MJ. Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17 $\beta$ -estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Molecular human reproduction* 2014; 20:433–441
13. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology* 2015; 294:63–69
14. Korevaar TIM, Steegers EAP, Rijke YB de, et al. Reference ranges and determinants of total hCG levels during pregnancy: the Generation R Study. *European journal of epidemiology* 2015; 30:1057–1066
15. Schock H, Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, et al. Hormone concentrations throughout uncomplicated pregnancies: a longitudinal study. *BMC pregnancy and childbirth* 2016; 16:146
16. Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstetrics and gynecology* 2009; 114:1326–1331

17. González-Bugatto F, Foncubierta E, Bailén MdlA, Illanes S, Hervías-Vivancos B, Bartha JL. Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2009; 35:271–276
18. Leidenberger F, Strowitzki T, Ortmann O, eds. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*, 5th ed. Berlin: Springer, 2014
19. Gressner AM. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Band 1 Klinische Chemie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007
20. Bühling KJ, Friedmann W, eds. *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2nd ed. München: Elsevier Urban & Fischer, 2009
21. Wang X, Wang Q. Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology* 2018; 2018:9049252
22. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nature reviews. Genetics* 2001; 2:538–548
23. Schenkel J. *Transgene Tiere*, 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006
24. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. *Frontiers in endocrinology* 2018; 9:570
25. Soncin F, Natale D, Parast MM. Signaling pathways in mouse and human trophoblast differentiation: a comparative review. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2015; 72:1291–1302
26. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reproduction, nutrition, developpement* 1988; 28:1599–1613
27. Zenclussen AC. Adaptive immune responses during pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2013; 69:291–303
28. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *The American journal of pathology* 2005; 166:811–822
29. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine* 2006; 12:1065–1074
30. Schmorl G. *Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puerperal-Eklampsie*, 1893rd ed. Norderstedt: Hansebooks GmbH, 2017
31. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature reviews. Immunology* 2017; 17:469–482
32. Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou CL, Zhou Y, Huang L, Fisher SJ. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *The Journal of experimental medicine* 2001; 193:1199–1212
33. Aldo PB, Racicot K, Craviero V, Guller S, Romero R, Mor G. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2014; 72:270–284

34. Svensson-Arvelund J, Mehta RB, Lindau R, et al. The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2015; 194:1534–1544
35. Oettel A, Lorenz M, Stangl V, Costa S-D, Zenclussen AC, Schumacher A. Human Umbilical Vein Endothelial Cells foster conversion of CD4+CD25-Foxp3- T cells into CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells via Transforming Growth Factor- $\beta$ . *Scientific reports* 2016; 6:23278
36. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *The International journal of developmental biology* 2010; 54:281–294
37. Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biology of reproduction* 2003; 69:1438–1446
38. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:3121–3126
39. Vacca P, Mingari MC, Moretta L. Natural killer cells in human pregnancy. *Journal of reproductive immunology* 2013; 97:14–19
40. Faas MM, Vos P de. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* 2017; 56:44–52
41. Ning F, Liu H, Lash GE. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2016; 75:298–309
42. Plaks V, Birnberg T, Berkutski T, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *The Journal of clinical investigation* 2008; 118:3954–3965
43. Woidacki K, Popovic M, Metz M, et al. Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency. *Cell death & disease* 2013; 4:e462
44. Meyer N, Woidacki K, Maurer M, Zenclussen AC. Safeguarding of Fetal Growth by Mast Cells and Natural Killer Cells: Deficiency of One Is Counterbalanced by the Other. *Frontiers in immunology* 2017; 8:711
45. Meyer N, Woidacki K, Knöfler M, et al. Chymase-producing cells of the innate immune system are required for decidual vascular remodeling and fetal growth. *Scientific reports* 2017; 7:45106
46. Jiang TT, Chaturvedi V, Ertelt JM, et al. Regulatory T cells: new keys for further unlocking the enigma of fetal tolerance and pregnancy complications. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2014; 192:4949–4956
47. Sharma S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. *The International journal of developmental biology* 2014; 58:219–229
48. Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2010; 63:445–459
49. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Human reproduction update* 2009; 15:517–535
50. Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 2007; 110:1137–1145

51. 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. *Molecular human reproduction* 2004; 10:347–353
52. Toth, B., Tempfer, C. *S2k-Leitlinie: Diagnostik und Therapie von Frauen mit wiederholten Spontanaborten. AWMF Registernummer 015/050.*  
[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/015-050l\\_S2k\\_Spontanabort\\_Diagnostik\\_Therapie\\_2018-12.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-050l_S2k_Spontanabort_Diagnostik_Therapie_2018-12.pdf)
53. Regan L., Backos M., Rai R. *The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First-trimester and Second-trimester Miscarriage. Green-top Guideline No. 17.*  
[http://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg\\_17.pdf](http://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg_17.pdf)
54. Wacker J, Bastert G, Beckmann MW, Sillem M. *Therapiehandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe.* Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007
55. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AIF, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Human reproduction update* 2003; 9:163–174
56. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update* 2014; 20:429–438
57. Banerjee P, Jana SK, Pasricha P, Ghosh S, Chakravarty B, Chaudhury K. Proinflammatory cytokines induced altered expression of cyclooxygenase-2 gene results in unreceptive endometrium in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Fertility and sterility* 2013; 99:179-187.e2
58. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llorba E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2017; 53:40–53
59. Winger EE, Reed JL. Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2008; 60:8–16
60. Pathak S, Palan U. *Immunology. Essential and fundamental / by Sulabha Pathak, Urmi Palan, 3rd ed.* Tunbridge Wells: Anshan, 2012
61. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131:959–971
62. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature reviews. Immunology* 2017; 17:281–294
63. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112:1570–1580
64. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nature reviews. Immunology* 2015; 15:441–451
65. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology* 2008; 20:149–157
66. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *Journal of clinical medicine* 2017; 6

67. Fillatreau S. Regulatory roles of B cells in infectious diseases. *Clinical and experimental rheumatology* 2016; 34:1–5
68. Shen M, Sun Q, Wang J, Pan W, Ren X. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget* 2016; 7:55828–55839
69. Chong AS, Khiew SH. Transplantation tolerance: don't forget about the B cells. *Clinical and experimental immunology* 2017; 189:171–180
70. Karahan GE, Claas FHJ, Heidt S. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in immunology* 2016; 7:686
71. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 1996; 184:2271–2278
72. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *International immunology* 2000; 12:597–605
73. Floudas A, Amu S, Fallon PG. New Insights into IL-10 Dependent and IL-10 Independent Mechanisms of Regulatory B Cell Immune Suppression. *Journal of clinical immunology* 2016; 36 Suppl 1:25–33
74. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015; 42:607–612
75. Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28:639–650
76. Lykken JM, Candando KM, Tedder TF. Regulatory B10 cell development and function. *International immunology* 2015; 27:471–477
77. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *The Journal of experimental medicine* 2003; 197:489–501
78. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2011; 186:5569–5579
79. Carter NA, Rosser EC, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy* 2012; 14:R32
80. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 2014; 41:1040–1051
81. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 2014; 507:366–370
82. Wang R-X, Yu C-R, Dambuza IM, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature medicine* 2014; 20:633–641
83. Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *International immunology* 2015; 27:531–536

84. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, Hillion S. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- $\beta$ /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of autoimmunity* 2015; 59:53–60
85. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nature communications* 2015; 6:5997
86. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, Toubi E. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity reviews* 2012; 11:670–677
87. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117:530–541
88. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010; 32:129–140
89. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation* 2017; 127:772–779
90. Wang H, Shin D-M, Abbasi S, et al. Expression of plasma cell alloantigen 1 defines layered development of B-1a B-cell subsets with distinct innate-like functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109:20077–20082
91. Schumacher A, Ehrentraut S, Scharm M, Wang H, Hartig R, Morse HC, Zenclussen AC. Plasma Cell Alloantigen 1 and IL-10 Secretion Define Two Distinct Peritoneal B1a B Cell Subsets With Opposite Functions, PC1high Cells Being Protective and PC1low Cells Harmful for the Growing Fetus. *Frontiers in immunology* 2018; 9:1045
92. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 production. *Nature medicine* 2014; 20:1334–1339
93. Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *International immunology* 2015; 27:487–493
94. Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *Journal of clinical immunology* 2005; 25:29–40
95. Han S, Feng S, Ren M, Ma E, Wang X, Xu L, Xu M. Glioma cell-derived placental growth factor induces regulatory B cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2014; 57:63–68
96. Daien CI, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, Morel J. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2014; 66:2037–2046
97. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine* 2013; 5:173ra23
98. Zhu H-Q, Xu R-C, Chen Y-Y, et al. Impaired function of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in patients with pemphigus. *The British journal of dermatology* 2015; 172:101–110
99. Schütt C, Bröker B, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie*, 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019

100. Ben-Hur H, Gurevich P, Elhayany A, Avinoach I, Schneider DF, Zusman I. Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *International journal of molecular medicine* 2005; 16:401–407
101. van Erp EA, Luytjes W, Ferwerda G, van Kasteren PB. Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Frontiers in immunology* 2019; 10:548
102. Krumbholz M. *Das ZNS als B-Zell-permissives Milieu bei der Multiplen Sklerose. Molekulare Mechanismen und pharmakologische Beeinflussung*. München: Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität, 2017
103. Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, et al. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of neuroinflammation* 2015; 12:235
104. Bondt A, Selman MHJ, Deelder AM, Hazes JMW, Willemsen SP, Wuhrer M, Dolhain RJEM. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *Journal of proteome research* 2013; 12:4522–4531
105. Margni RA, Binaghi RA. Nonprecipitating asymmetric antibodies. *Annual review of immunology* 1988; 6:535–554
106. Bondt A, Rombouts Y, Selman MHJ, et al. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2014; 13:3029–3039
107. Borel IM, Gentile T, Angelucci J, Margni RA, Binaghi RA. Asymmetrically glycosylated IgG isolated from non-immune human sera. *Biochimica et biophysica acta* 1989; 990:162–164
108. Gutierrez G, Gentile T, Miranda S, Margni RA. Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy. *Chemical immunology and allergy* 2005; 89:158–168
109. Gustafsson E, Mattsson A, Holmdahl R, Mattsson R. Pregnancy in B-cell-deficient mice: postpartum transfer of immunoglobulins prevents neonatal runting and death. *Biology of reproduction* 1994; 51:1173–1180
110. Nguyen TG, Ward CM, Morris JM. To B or not to B cells-mediate a healthy start to life. *Clinical and experimental immunology* 2013; 171:124–134
111. Fettke F, Schumacher A, Costa S-D, Zenclussen AC. B cells: the old new players in reproductive immunology. *Frontiers in immunology* 2014; 5:285
112. Muzzio D, Zenclussen AC, Jensen F. The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2013; 69:408–412
113. Lima J, Martins C, Leandro MJ, Nunes G, Sousa M-J, Branco JC, Borrego L-M. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC pregnancy and childbirth* 2016; 16:139
114. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, et al. B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biology of reproduction* 2014; 91:115
115. Valdimarsson H, Mulholland C, Fridriksdottir V, Coleman DV. A longitudinal study of leucocyte blood counts and lymphocyte responses in pregnancy: a marked early increase of monocyte-lymphocyte ratio. *Clinical and experimental immunology* 1983; 53:437–443

116. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 1997; 37:368–377
117. Mahmoud F, Abul H, Omu A, Al-Rayes S, Haines D, Whaley K. Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women. *Gynecologic and obstetric investigation* 2001; 52:232–236
118. Medina KL, Kincade PW. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:5382–5386
119. Aït-Azzouzene D, Gendron MC, Houdayer M, Langkopf A, Bürki K, Nemazee D, Kanellopoulos-Langevin C. Maternal B lymphocytes specific for paternal histocompatibility antigens are partially deleted during pregnancy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1998; 161:2677–2683
120. Aït-Azzouzene D, Caucheteux S, Tchang F, et al. Transgenic major histocompatibility complex class I antigen expressed in mouse trophoblast affects maternal immature B cells. *Biology of reproduction* 2001; 65:337–344
121. Bhat NM, Mithal A, Bieber MM, Herzenberg LA, Teng NN. Human CD5+ B lymphocytes (B-1 cells) decrease in peripheral blood during pregnancy. *Journal of reproductive immunology* 1995; 28:53–60
122. Kühnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 1998; 76:147–151
123. LaMarca B, Wallace K, Granger J. Role of angiotensin II type I receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA) in preeclampsia. *Current opinion in pharmacology* 2011; 11:175–179
124. Aggarwal S, Makris A, Hennessy A. Linking the old and new -- do angiotensin II type 1 receptor antibodies provide the missing link in the pathophysiology of preeclampsia? *Hypertension in pregnancy* 2015; 34:369–382
125. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *The Journal of clinical investigation* 1999; 103:945–952
126. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce preeclampsia in pregnant mice. *Nature medicine* 2008; 14:855–862
127. Zhou CC, Ahmad S, Mi T, et al. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2008; 51:1010–1019
128. LaMarca B, Parrish M, Ray LF, et al. Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2009; 54:905–909
129. Parrish MR, Murphy SR, Rutland S, et al. The effect of immune factors, tumor necrosis factor-alpha, and agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy. *American journal of hypertension* 2010; 23:911–916

130. Jensen F, Wallukat G, Herse F, et al. CD19+CD5+ cells as indicators of preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2012; 59:861–868
131. LaMarca B, Wallace K, Herse F, Wallukat G, Martin JN, Weimer A, Dechend R. Hypertension in response to placental ischemia during pregnancy: role of B lymphocytes. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2011; 57:865–871
132. Bartha JL, Comino-Delgado R. Lymphocyte subpopulations in intrauterine growth retardation in women with or without previous pregnancies. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 1999; 82:23–27
133. Darmochwal-Kolarz D, Leszczynska-Gorzela B, Rolinski J, Oleszczuk J. The immunophenotype of patients with recurrent pregnancy loss. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2002; 103:53–57
134. Jablonowska B, Palfi M, Matthiesen L, Selbing A, Kjellberg S, Emerudh J. T and B lymphocyte subsets in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion: IVIG versus placebo treatment. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2002; 48:312–318
135. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 1995; 34:93–99
136. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 1996; 35:376–382
137. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1996; 156:4027–4034
138. Michimata T, Ogasawara MS, Tsuda H, et al. Distributions of endometrial NK cells, B cells, T cells, and Th2/Tc2 cells fail to predict pregnancy outcome following recurrent abortion. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2002; 47:196–202
139. Guzman-Genuino RM, Eldi P, Garcia-Valtanen P, Hayball JD, Diener KR. Uterine B Cells Exhibit Regulatory Properties During the Peri-Implantation Stage of Murine Pregnancy. *Frontiers in immunology* 2019; 10:2899
140. Malan Borel I, Gentile T, Angelucci J, Pividori J, Guala MC, Binaghi RA, Margni RA. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *Journal of reproductive immunology* 1991; 20:129–140
141. Margni RA, Parma EA, Cerone S, Erpelding A, Perdigón G. Agglutinating and non-agglutinating antibodies in rabbits inoculated with a particulate antigen (*Salmonella typhimurium*). *Immunology* 1983; 48:351–359
142. Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R. Asymmetric antibodies and pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2001; 45:289–294
143. Gutiérrez G, Malan Borel I, Margni RA. The placental regulatory factor involved in the asymmetric IgG antibody synthesis responds to IL-6 features. *Journal of reproductive immunology* 2001; 49:21–32

144. Canellada A, Färber A, Zenclussen AC, et al. Interleukin regulation of asymmetric antibody synthesized by isolated placental B cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2002; 48:275–282
145. Malan Borel I, Miranda S, Menezes Freire S, Canellada A, Eslave Bueno M, Binaghi R, Margni RA. Modulation of the humoral immune response by placental secretory factors. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 1996; 35:529–533
146. Canellada A, Alvarez I, Berod L, Gentile T. Estrogen and progesterone regulate the IL-6 signal transduction pathway in antibody secreting cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2008; 111:255–261
147. Guzman-Genuino RM, Diener KR. Regulatory B Cells in Pregnancy: Lessons from Autoimmunity, Graft Tolerance, and Cancer. *Frontiers in immunology* 2017; 8:172
148. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biology of reproduction* 2013; 89:90
149. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, et al. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2013; 70:448–453
150. Schumacher A, Costa S-D, Zenclussen AC. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Frontiers in immunology* 2014; 5:196
151. Nair RR, Verma P, Singh K. Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *General and comparative endocrinology* 2017; 242:18–23
152. Schumacher A. Human Chorionic Gonadotropin as a Pivotal Endocrine Immune Regulator Initiating and Preserving Fetal Tolerance. *International journal of molecular sciences* 2017; 18
153. Kane N, Kelly R, Saunders PTK, Critchley HOD. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 2009; 150:2882–2888
154. Koldehoff M, Katzorke T, Wisbrun NC, et al. Modulating impact of human chorionic gonadotropin hormone on the maturation and function of hematopoietic cells. *Journal of leukocyte biology* 2011; 90:1017–1026
155. Schumacher A, Heinze K, Witte J, Poloski E, Linzke N, Woidacki K, Zenclussen AC. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 190:2650–2658
156. Wan H, Versnel MA, Leijten LME, et al. Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. *Journal of leukocyte biology* 2008; 83:894–901
157. Dauven D, Ehrentraut S, Langwisch S, Zenclussen AC, Schumacher A. Immune Modulatory Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Dendritic Cells Supporting Fetal Survival in Murine Pregnancy. *Frontiers in endocrinology* 2016; 7:146
158. Chen JZ-J, Sheehan PM, Brennecke SP, Keogh RJ. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Molecular and cellular endocrinology* 2012; 349:138–144
159. Kaur G, Jain V, Mehta S, Himani S. Prediction of PIH by Maternal Serum Beta HCG Levels in the Second Trimester (13-20 Weeks) of Pregnancy. *Journal of obstetrics and gynaecology of India* 2012; 62:32–34

160. Hunt JS, Miller L, Platt JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Developmental immunology* 1998; 6:105–110
161. Shah NM, Lai PF, Imami N, Johnson MR. Progesterone-Related Immune Modulation of Pregnancy and Labor. *Frontiers in endocrinology* 2019; 10:198
162. Tsai Y-C, Tseng JT, Wang C-Y, Su M-T, Huang J-Y, Kuo P-L. Medroxyprogesterone acetate drives M2 macrophage differentiation toward a phenotype of decidual macrophage. *Molecular and cellular endocrinology* 2017; 452:74–83
163. Laskarin G, Tokmadzić VS, Strbo N, et al. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2002; 48:201–209
164. Xu Y, He H, Li C, Shi Y, Wang Q, Li W, Song W. Immunosuppressive effect of progesterone on dendritic cells in mice. *Journal of reproductive immunology* 2011; 91:17–23
165. Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, et al. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *International immunology* 2007; 19:287–296
166. Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev SD. New target cells of the immunomodulatory effects of progesterone. *Reproductive biomedicine online* 2010; 21:304–311
167. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Journal of reproductive immunology* 1996; 31:81–95
168. Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2002; 168:1087–1094
169. Edey LF, Georgiou H, O'Dea KP, et al. Progesterone, the maternal immune system and the onset of parturition in the mouse. *Biology of reproduction* 2018; 98:376–395
170. Raghupathy R, Al Mutawa E, Makhseed M'a, Azizieh F, Szekeres-Bartho J. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2005; 112:1096–1101
171. Lissauer D, Eldershaw SA, Inman CF, Coomarasamy A, Moss PAH, Kilby MD. Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *European journal of immunology* 2015; 45:2858–2872
172. Mao G, Wang J, Kang Y, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology* 2010; 151:5477–5488
173. Schumacher A, Dauven D, Zenclussen AC. Progesterone-driven local regulatory T cell induction does not prevent fetal loss in the CBA/J×DBA/2J abortion-prone model. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2017; 77
174. Canellada A, Blois S, Gentile T, Margni Idehu RA. In vitro modulation of protective antibody responses by estrogen, progesterone and interleukin-6. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2002; 48:334–343
175. Kelemen K, Bogнар I, Paal M, Szekeres-Bartho J. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cellular immunology* 1996; 167:129–134
176. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine reviews* 2007; 28:521–574

177. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology* 2009; 150:3877–3884
178. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update* 2005; 11:411–423
179. Nakaya M, Tachibana H, Yamada K. Effect of estrogens on the interferon-gamma producing cell population of mouse splenocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2006; 70:47–53
180. Hao S, Zhao J, Zhou J, Zhao S, Hu Y, Hou Y. Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *International immunopharmacology* 2007; 7:1765–1775
181. Gabrilovac J, Zadjelović J, Osmak M, Suchanek E, Zupanović Z, Boranić M. NK cell activity and estrogen hormone levels during normal human pregnancy. *Gynecologic and obstetric investigation* 1988; 25:165–172
182. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandenberg AA, Ziegler SF, Offner H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2004; 173:2227–2230
183. Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology* 2006; 118:58–65
184. Lin X-g, Zhou Q, Wang L, et al. Pregnancy estrogen drives the changes of T-lymphocyte subsets and cytokines and prolongs the survival of H-Y skin graft in murine model. *Chinese medical journal* 2010; 123:2593–2599
185. Medina KL, Smithson G, Kincade PW. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *The Journal of experimental medicine* 1993; 178:1507–1515
186. Kincade PW, Medina KL, Smithson G. Sex hormones as negative regulators of lymphopoiesis. *Immunological reviews* 1994; 137:119–134
187. Bommer I, Muzzio DO, Zygmunt M, Jensen F. Progesterone and estradiol exert an inhibitory effect on the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 by activated MZ B cells. *Journal of reproductive immunology* 2016; 116:113–116
188. Grimaldi CM, Michael DJ, Diamond B. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2001; 167:1886–1890
189. Offner H, Polanczyk M. A potential role for estrogen in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1089:343–372
190. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *The New England journal of medicine* 1998; 339:285–291
191. Jansson L, Olsson T, Holmdahl R. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *Journal of neuroimmunology* 1994; 53:203–207
192. Polanczyk M, Zamora A, Subramanian S, et al. The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *The American journal of pathology* 2003; 163:1599–1605

193. Subramanian S, Yates M, Vandembark AA, Offner H. Oestrogen-mediated protection of experimental autoimmune encephalomyelitis in the absence of Foxp3+ regulatory T cells implicates compensatory pathways including regulatory B cells. *Immunology* 2011; 132:340–347
194. Zhang J, Lapato A, Bodhankar S, Vandembark AA, Offner H. Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E2 ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice. *Metabolic brain disease* 2015; 30:1117–1127
195. Murgita RA. The immunosuppressive role of alpha-fetoprotein during pregnancy. *Scandinavian journal of immunology* 1976; 5:1003–1014
196. Um SH, Mulhall C, Alisa A, et al. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2004; 173:1772–1778
197. Setiyono A, Budiyati AD, Purwantomo S, et al. Immunoregulatory effects of AFP domains on monocyte-derived dendritic cell function. *BMC immunology* 2011; 12:4
198. Yamamoto M, Tatsumi T, Miyagi T, et al.  $\alpha$ -Fetoprotein impairs activation of natural killer cells by inhibiting the function of dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* 2011; 165:211–219
199. Laan-Pütsep K, Wigzell H, Cotran P, Gidlund M. Human alpha-fetoprotein (AFP) causes a selective down regulation of monocyte MHC class II molecules without altering other induced or noninduced monocyte markers or functions in monocytoid cell lines. *Cellular immunology* 1991; 133:506–518
200. Wang W, Alpert E. Downregulation of phorbol 12-myristate 13-acetate-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$  production and gene expression in human monocytic cells by human alpha-fetoprotein. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1995; 22:921–928
201. Alisa A, Boswell S, Pathan AA, Ayaru L, Williams R, Behboudi S. Human CD4(+) T cells recognize an epitope within alpha-fetoprotein sequence and develop into TGF- $\beta$ -producing CD4(+) T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2008; 180:5109–5117
202. Pardee AD, Shi J, Butterfield LH. Tumor-derived  $\alpha$ -fetoprotein impairs the differentiation and T cell stimulatory activity of human dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2014; 193:5723–5732
203. Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, Nakatsuka K, Wakabayashi A, Sakamoto C, Takahashi H. Inactivation of tumor-specific CD8+ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* 2013; 91:545–555
204. Murgita RA, Tomasi TB. Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *The Journal of experimental medicine* 1975; 141:269–286
205. Irony-Tur-Sinai M, Grigoriadis N, Loubopoulos A, Pinto-Maaravi F, Abramsky O, Brenner T. Amelioration of autoimmune neuroinflammation by recombinant human alpha-fetoprotein. *Experimental neurology* 2006; 198:136–144
206. Trypsinierung von Zellkulturzellen. *Biol. Unserer Zeit* 2009; 39:234
207. *Der Experimentator: Immunologie*, 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2014
208. Selman MHJ, Derks RJE, Bondt A, et al. Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *Journal of proteomics* 2012; 75:1318–1329

209. Poloski E, Oettel A, Ehrentraut S, Luley L, Costa SD, Zenclussen AC, Schumacher A. JEG-3 Trophoblast Cells Producing Human Chorionic Gonadotropin Promote Conversion of Human CD4+FOXP3- T Cells into CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and Foster T Cell Suppressive Activity. *Biology of reproduction* 2016; 94:106
210. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 2006; 24:99–146
211. Bankó Z, Pozsgay J, Szili D, et al. Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2017; 198:1512–1520
212. Wang K, Tao L, Su J, Zhang Y, Zou B, Wang Y, Li X. Regulatory B cells activated by CpG-ODN combined with anti-CD40 monoclonal antibody inhibit CD4(+)T cell proliferation. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 2016; 32:1164–1167
213. Koushaeian L, Ghorbani F, Ahmadi M, et al. The role of IL-10-producing B cells in repeated implantation failure patients with cellular immune abnormalities. *Immunology letters* 2019; 214:16–22
214. Marron K, Harrity C. Endometrial lymphocyte concentrations in adverse reproductive outcome populations. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2019; 36:837–846
215. Leng Y, Romero R, Xu Y, et al. Are B cells altered in the decidua of women with preterm or term labor? *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2019; 81:e13102
216. Li W, Chang Y, Liang S, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to Listeria monocytogenes-induced animal pregnancy failure. *BMC veterinary research* 2016; 12:36
217. Ahmed A, Singh J, Khan Y, Seshan SV, Girardi G. A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PloS one* 2010; 5:e13663
218. Bowen JA, Hunt JS. Expression of cell adhesion molecules in murine placentas and a placental cell line. *Biology of reproduction* 1999; 60:428–434
219. VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JAM, VanBavel E, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *American journal of obstetrics and gynecology* 2002; 187:450–456
220. Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. *Human reproduction update* 2002; 8:501–508
221. Shomer E, Katzenell S, Zipori Y, Sammour RN, Isermann B, Brenner B, Aharon A. Microvesicles of women with gestational hypertension and preeclampsia affect human trophoblast fate and endothelial function. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2013; 62:893–898
222. Kohli S, Ranjan S, Hoffmann J, et al. Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts. *Blood* 2016; 128:2153–2164
223. Mincheva-Nilsson L. Placental exosome-mediated immune protection of the fetus: feeling groovy in a cloud of exosomes. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2010; 5:619–634

224. Stenqvist A-C, Nagaeva O, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 191:5515–5523
225. Southcombe J, Tannetta D, Redman C, Sargent I. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PloS one* 2011; 6:e20245
226. Nguyen SL, Greenberg JW, Wang H, Collaer BW, Wang J, Petroff MG. Quantifying murine placental extracellular vesicles across gestation and in preterm birth data with tidyNano: A computational framework for analyzing and visualizing nanoparticle data in R. *PloS one* 2019; 14:e0218270
227. Sharma RK. Mouse trophoblastic cell lines: I--Relationship between invasive potential and TGF-beta 1. *In vivo (Athens, Greece)* 1998; 12:431–440
228. Woidacki K, Zenclussen AC. *Der Einfluss von Mastzellen auf reproduktive Prozesse und die zugrunde liegenden Mechanismen*. Magdeburg: Universitätsbibl
229. Ramhorst R, Fraccaroli L, Aldo P, Alvero AB, Cardenas I, Leirós CP, Mor G. Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2012; 67:17–27
230. Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 2008; 453:236–240
231. Teles A, Schumacher A, Kühnle M-C, et al. Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Frontiers in immunology* 2013; 4:158
232. Ingman WV, Robertson SA. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2002; 24:904–914
233. Yoshinaga K. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Seminars in cell & developmental biology* 2008; 19:161–169
234. Toth B, Zhu L, Karakizlis H, et al. NK cell subsets in idiopathic recurrent miscarriage and renal transplant patients. *Journal of reproductive immunology* 2020; 138:103098
235. Lee KM, Stott RT, Zhao G, et al. TGF- $\beta$ -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *European journal of immunology* 2014; 44:1728–1736
236. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, Hillion S. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- $\beta$ /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *Journal of autoimmunity* 2015; 59:53–60
237. Liu J, Chen X, Hao S, et al. Human chorionic gonadotropin and IL-35 contribute to the maintenance of peripheral immune tolerance during pregnancy through mediating the generation of IL-10+ or IL-35+ Breg cells. *Experimental cell research* 2019; 383:111513
238. Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101:17294–17299
239. Khan NA, Khan A, Savelkoul HFJ, Benner R. Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Human Immunology* 2001; 62:1315–1323

240. Busse M, Campe K-NJ, Nowak D, et al. IL-10 producing B cells rescue mouse fetuses from inflammation-driven fetal death and are able to modulate T cell immune responses. *Scientific reports* 2019; 9:9335
241. Irony-Tur-Sinai M, Grigoriadis N, Tsiantoulas D, Touloumi O, Abramsky O, Brenner T. Immunomodulation of EAE by alpha-fetoprotein involves elevation of immune cell apoptosis markers and the transcription factor FoxP3. *Journal of the neurological sciences* 2009; 279:80–87
242. Jeanty C, Derderian SC, Mackenzie TC. Maternal-fetal cellular trafficking: clinical implications and consequences. *Current opinion in pediatrics* 2014; 26:377–382
243. Nijagal A, Wegorzewska M, Jarvis E, Le T, Tang Q, Mackenzie TC. Maternal T cells limit engraftment after in utero hematopoietic cell transplantation in mice. *The Journal of clinical investigation* 2011; 121:582–592
244. Vernochet C, Caucheteux SM, Gendron M-C, Wantyghem J, Kanellopoulos-Langevin C. Affinity-dependent alterations of mouse B cell development by noninherited maternal antigen. *Biology of reproduction* 2005; 72:460–469
245. Maloney S, Smith A, Furst DE, Myerson D, Rupert K, Evans PC, Nelson JL. Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *The Journal of clinical investigation* 1999; 104:41–47
246. Andrassy J, Kusaka S, Jankowska-Gan E, et al. Tolerance to noninherited maternal MHC antigens in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2003; 171:5554–5561
247. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science (New York, N.Y.)* 2008; 322:1562–1565
248. Roy E, Leduc M, Guegan S, et al. Specific maternal microchimeric T cells targeting fetal antigens in  $\beta$  cells predispose to auto-immune diabetes in the child. *Journal of autoimmunity* 2011; 36:253–262
249. Artlett CM, Ramos R, Jiminez SA, Patterson K, Miller FW, Rider LG. Chimeric cells of maternal origin in juvenile idiopathic inflammatory myopathies. Childhood Myositis Heterogeneity Collaborative Group. *Lancet (London, England)* 2000; 356:2155–2156
250. Alavi A, Arden N, Spector TD, Axford JS. Immunoglobulin G glycosylation and clinical outcome in rheumatoid arthritis during pregnancy. *The Journal of rheumatology* 2000; 27:1379–1385
251. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, et al. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis research & therapy* 2009; 11:R193
252. Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, et al. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1990; 71:436–441
253. Gu J, Lei Y, Huang Y, et al. Fab fragment glycosylated IgG may play a central role in placental immune evasion. *Human reproduction (Oxford, England)* 2015; 30:380–391
254. Castillo-Trivino T, Braithwaite D, Bacchetti P, Waubant E. Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. *PLoS one* 2013; 8:e66308

255. Scotti B, Disanto G, Sacco R, Guigli M, Zecca C, Gobbi C. Effectiveness and safety of Rituximab in multiple sclerosis: an observational study from Southern Switzerland. *PloS one* 2018; 13:e0197415
256. Ponticelli C, Moroni G. Fetal Toxicity of Immunosuppressive Drugs in Pregnancy. *Journal of clinical medicine* 2018; 7
257. Mostajeran F, Godazandeh F, Ahmadi SM, Movahedi M, Jabalamelian SA. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on pregnancy rate: A prospective randomized study. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2017; 22:6
258. Zarei A, Parsanezhad ME, Younesi M, et al. Intrauterine administration of recombinant human chorionic gonadotropin before embryo transfer on outcome of in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection: A randomized clinical trial. *Iranian journal of reproductive medicine* 2014; 12:1–6
259. Gao M, Jiang X, Li B, et al. Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer can improve in vitro fertilization-embryo transfer outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and sterility* 2019; 112:89-97.e1

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Ana Zenclussen dafür, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation zu diesem sehr interessanten Forschungsthema an ihrem Institut auszuarbeiten. Insbesondere möchte ich ihr für die professionelle Unterstützung, den Ausbau von nationalen und internationalen Kooperationen, die Unterstützung für die Teilnahme an zahlreichen Kongressen und die Möglichkeit zur Erstellung eines Review Papers danken.

Bei Prof. Dr. Costa möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er mir die wissenschaftliche Tätigkeit in der Abteilung der Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe ermöglichte und stets großes Interesse am Fortschritt der Arbeit zeigte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Anne Schumacher bedanken. Sie hat mich mit Begeisterung und viel Engagement während meines Jahres am Institut und darüber hinaus betreut. Als Mentorin stand sie mir stets methodisch und inhaltlich zur Seite. Die Zusammenarbeit mit ihr hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Zudem möchte ich mich bei allen Probandinnen bedanken, die an der Studie teilgenommen haben.

Den Kooperationspartnern Prof. Bekeredjian-Ding (damals Universität Bonn, jetzt Leiterin Abteilung Mikrobiologie, Paul-Ehrlich-Institut, Langen), Dr. Canellada (Fakultät für Pharmazie und Biochemie, Buenos Aires), Dr. Hartig (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universitätsklinik Magdeburg), Prof. Wuhrer und PD Bondt (Abteilung Proteomik und Glykomik, Leiden Universität, Niederlande) danke ich für die produktive Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe für die angenehme Atmosphäre im Forschungslabor, die Einarbeitung zur Durchführung der praktischen Arbeiten und die vielen schönen Erinnerungen. Insbesondere danke ich Dr. Nicole Meyer, Stefanie Langwisch und Markus Scharm.

Ich danke allen Mitgliedern meiner Familie und meinen Freunden dafür, dass sie mich stets liebevoll unterstützen, zum Lachen bringen und ein offenes Ohr für mich haben. Insbesondere möchte ich meiner Mama dafür danken, dass Sie immer für mich da ist, mich von Herzen darin unterstützt meine Träume zu verwirklichen und in meiner Elternzeit Tag um Tag den Kinderwagen durch jeden Winkel Reforms geschoben hat. Meiner Freundin Charlotte danke ich für ihre Zeit und Mühe mir die unendlichen Weiten der Statistik näher zu bringen, die Motivationsschübe und die vorübergehende Opferung ihres Sprunggelenkes. Meinem Freund Marsl danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit. Für seine unermüdliche Geduld, Hilfe wann immer ich sie brauchte, das Tanzen im Wohnzimmer und das Verständnis für und Ermöglichen von zahlreichen Arbeitsabenden danke ich meinem Mann Martin Schulze.

## **Ehrenerklärung**

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

*Untersuchungen zum Einfluss von Schwangerschaftshormonen und Alpha-Fetoprotein auf IL-10-produzierende B-Zellen in der Schwangerschaft*

in der Abteilung für Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe

mit Unterstützung durch Prof. Ana Zenclussen

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 04.02.2021

Unterschrift

# Darstellung des Bildungsweges

## Persönliche Angaben

---

Name	Franziska Fettke
E-Mail	franziska.fettke@med.ovgu.de
Geboren am	19/08/1985
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	verheiratet

## Bildungsweg

---

Juni 2010 – Juni 2012	<b>MBChB, Bachelor of Medicine and Bachelor of Surgery</b> Universität Dundee, UK
Sep 2007 – Juni 2010	<b>Bachelor of Science (Honours) Medicine</b> Universität St Andrews, UK; BSc (hons) First Class
Sep 1996 – Apr 2005	<b>Wilhelm-Raabe-Gymnasium, Magdeburg, Deutschland</b> Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote 1.2)

## Beruflicher Werdegang

---

Jan 2015 – laufend	<b>Assistenzärztin in Weiterbildung im Fachgebiet Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsfrauenklinik, Magdeburg</b>
Jan 2014 – Dez 2014	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsfrauenklinik, Magdeburg</b>
Juli 2012 – Dez 2013	<b>Foundation Doctor, Central Manchester University Hospital</b> NHS Foundation Trust, Manchester, UK
Aug 2013 – Dez 2013	<b>Allgemeinpädiatrie, Royal Manchester Children's Hospital</b>
Apr 2013 – Aug 2013	<b>Allgemeinchirurgie, Trafford General Hospital</b>
Dez 2012 – Apr 2013	<b>Innere Medizin, Schwerpunkt Diabetes, Trafford General Hospital</b>
Aug 2012 – Dez 2012	<b>Geburtshilfe und Gynäkologie, Trafford General Hospital</b>

# Wissenschaftliche Leistungen

## Publikationen

---

Ehrentraut S, Sauss K, Neumeister R, Luley L, Oettel A, Fettke F et al. **Human Miscarriage is associated with dysregulation in peripheral blood-derived myeloid dendritic cell subsets** Frontiers in Immunology. 2019; 10: 2440. doi: 10.3389/fimmu.2019.02440

Fettke F, Schumacher A, Canellada A, Toledo N, Bekeredjian-Ding I, Bondt A, Wuhrer M, Costa S D, Zenclussen A C. **Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy: Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis.** Front Immunol. 2016 Dec 8;7:495. doi: 10.3389/fimmu.2016.00495

Eggemann H, Ignatov T, Burger E, Kantelhardt J, Fettke F, Thomssen C, Costa S D, Ignatov A **Moderate HER2 expression as a prognostic factor in hormone receptor positive breast cancer.** Endocr Relat Cancer. 2015 Oct;22(5):725-33. doi: 10.1530/ERC-15-0335. Epub 2015 Jul 17.

Eggemann H, Ehrlicke J, Ignatov T, Fettke F, Semczuk A, Costa S D, Ignatov A, **Platelet Count After Chemotherapy is a Predictor for Outcome for Ovarian Cancer Patients.** Cancer Invest. 2015 May ;33(5):193-6. doi: 10.3109/07357907.2015.1020384

Ignatov T, Eggemann H, Burger E, Fettke F, Costa S D, Ignatov A. **Moderate level of HER2 expression and its prognostic significance in breast cancer with intermediate grade.** Breast Cancer Res Treat. 2015 Jun;151(2):357-64. doi: 10.1007/s10549-015-3407-2

Fettke F, Schumacher A, Costa S.D, Zenclussen A C. **B cells: the old new players in reproductive immunology.** Frontiers in Immunology 2014; Jun 23;5:285. doi: 10.3389/fimmu.2014.00285

Campbell E, Fettke F, Bhat S, Morley K D, Powis S J. **Expression of MHC class I dimers and ERAP1 in an ankylosing spondylitis patient cohort.** Immunology Jul;133(3):379-85. 2011 May. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03453.x

## Konferenzen / Präsentationen

---

Mai 2020

Abstrakt angenommen für einen mündlichen Vortrag **“A comparison of the Obstetric and Gynaecology Training Programmes in the UK and Germany”** EBCOG, Bergen, Norwegen

- Nov 2018 Posterpräsentation „**Unterschätzte Gefahr: Frühsyphilis während der Schwangerschaft**“ MIPETA, Leipzig, Deutschland
- Okt 2018 Posterpräsentation „**Die Koexistenz von Schwangerschaft und Krebs – ein Fallbericht**“ DGGG, Berlin, Deutschland
- Mai 2018 Posterpräsentation „**Das Chorionkarzinom nach einer Terminalschwangerschaft**“ MGFG, Magdeburg, Deutschland
- März 2015 mündlicher Vortrag „**The effect of pregnancy hormones and trophoblast-derived factors on IL-10 producing B cells**“ 16th World Congress on human reproduction, Berlin, Deutschland
- Nov 2014 mündlicher Vortrag „**Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss von Schwangerschaftshormonen und Trophoblast - assoziierten Faktoren auf regulatorische B-Zellen in der Schwangerschaft**“ MIPETA, Magdeburg, Deutschland
- Okt 2014 Posterpräsentation „**Humanes Choriongonadotropin induziert IL-10-produzierende regulatorische B-Zellen**“, Kongress der DGGG, München, Deutschland
- Nov 2009 mündlicher Vortrag „**A mixed methods analysis of young gang members’ experiences of interacting with a multi-agency initiative to reduce violence in Glasgow’s East End**“, Jahreskonferenz der Gesundheitswissenschaften, Schottland

### **Preise und Auszeichnungen**

---

- 2014 1. Preis Freie Vorträge, MIPETA, Magdeburg
- 2009 **Wellcome trust - Biomedical vacation scholarship**

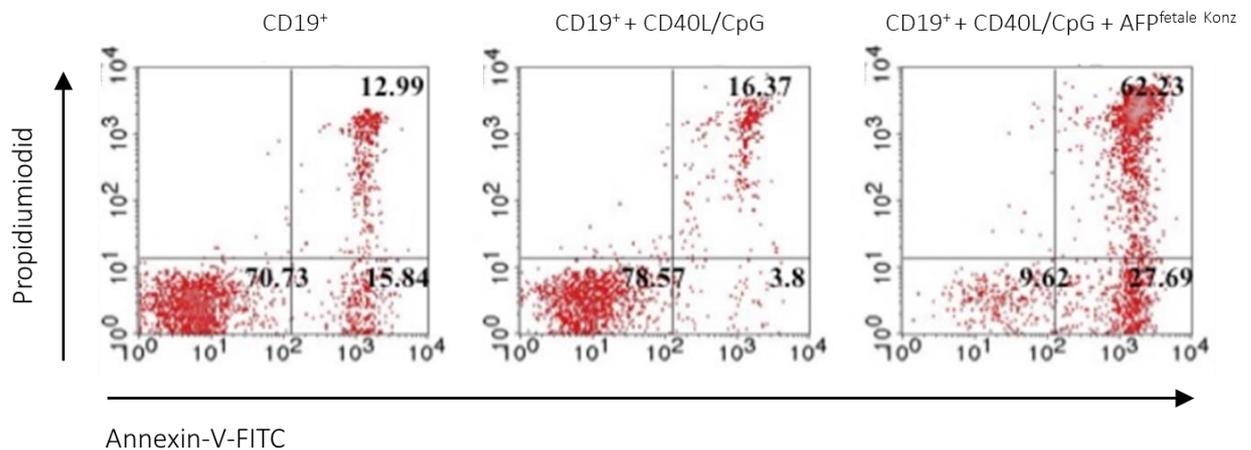
Magdeburg, den 04.02.2021

Unterschrift

## Anhang

**Tabelle A.1: Behandlungsschema für humane B-Zellen.** B-Zellen wurden für 24 h in 150 µl Medium im Inkubator kultiviert und anschließend in verschiedenen Ansätzen behandelt

Ansatz	CpG /CD40L	Behandlung	Konzentration
B-Zellen			
1	Nein	Keine	Entfällt
2	Ja	Keine	Entfällt
3	Ja	hCG	100 mIU/ml
4	Ja	P4	30 ng/ml
5	Ja	E2	1000 pg/ml
6	Ja	P4 und E2	30 ng/ml (P4), 1000 pg/ml (E2)
7	Ja	AFP (1. Trimenon)	0,015 µg/ml
8	Ja	AFP (2. Trimenon)	0,06 µg/ml
9	Ja	AFP (3. Trimenon)	0,2 µg/ml
10	Ja	AFP (fetale Serumkonzentration)	50 µg/ml



**Abbildung A.1: Die *in vitro* Stimulation von B-Zellen mit AFP in fetaler Serumkonzentration induzierte apoptotische Vorgänge in B-Lymphozyten.** Exemplarische Darstellung der Annexin-V und PI-positiven CD19<sup>+</sup> Zellen ohne bzw. mit dem Zusatz von Stimulanzen sowie der Behandlung mit Stimulanzen und AFP. Die Zellen wurden gegen Annexin-V und PI gefärbt. Lebende Zellen (Annexin<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), frühe apoptotische Zellen (Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) und nekrotische Zellen (Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) sind dargestellt.