

Die Bedeutung von HLA-G/Qa2 für die
MDSC-Akkumulation während der Schwangerschaft
und für den Schwangerschaftserfolg

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaft

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefanie Dietz (M. Sc.)

aus Karlsruhe

Tübingen

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Verteidigung: 23.07.2021

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Gille

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	7
III. Zusammenfassung	14
IV. Summary	16
1. Einleitung.....	18
1.1 Aborte.....	18
1.2 Das Immunsystem.....	19
1.3 Myeloide Suppressorzellen	23
1.4 Der weibliche Zyklus und die normale Schwangerschaft.....	25
1.5 Das Immunsystem während der Schwangerschaft	29
1.6 MHC-Moleküle.....	31
1.6.1 HLA-G.....	32
1.6.2 Qa2	35
1.7 Zielsetzung.....	37
2. Material und Methoden.....	38
2.1 Materialien.....	38
2.1.1 Versuchstiere.....	38
2.1.2 Genehmigungen Tierexperimente	40
2.1.3 Patientenproben.....	40
2.1.4 Antikörper.....	41
2.1.5 Kits	42
2.1.6 Chemikalien und Reagenzien.....	42
2.1.7 Kulturmedien und Puffer.....	44
2.1.8 Geräte.....	46
2.1.9 Software.....	46
2.2 Methoden.....	47
2.2.1 Terminierte Verpaarung.....	47

2.2.2	Bestimmung der Embryonen-Resorptionsrate	49
2.2.3	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen der Maus	49
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	50
2.2.5	Histologie Plazenta.....	50
2.2.6	Zelllyse.....	50
2.2.7	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA.....	51
2.2.8	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Page und Coomassiefärbung.....	51
2.2.9	Proteomanalysen mittels NanoLC-MS/MS.....	52
2.2.10	RNA Isolation und Transkriptomanalysen.....	53
2.2.11	Oberflächenfärbung für die Durchflusszytometrie.....	54
2.2.12	Foxp3-Expression auf CD4 ⁺ T-Zellen	54
2.2.13	MDSC-Generierung aus Knochenmark.....	55
2.2.14	Magnetische Zellsortierung (MACS)	55
2.2.15	T-Zell-Proliferationsversuch	57
2.2.16	Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Blut (PBMC).....	57
2.2.17	Zyklusbestimmung bei Mäusen mittels Vaginalabstrich.....	58
2.2.18	Ansetzen einer Bakterienkultur.....	59
2.2.19	Stimulation Splenozyten mit Anoxie/ <i>E. coli</i> /Östrogen	59
2.2.20	HLA-G Tetramerisierung.....	60
2.2.21	Applikation von humanem HLA-G in Mäuse.....	60
2.3	Statistische Auswertung	62
3.	Ergebnisse.....	63
	Das Fehlen von Qa2 führte bei Mäusen zu einer verringerten Wurfgröße und einer Wachstumsretardierung der Feten	63
	Das Fehlen von Qa2 führte bei Mäusen zu einer erhöhten Abortrate in der zweiten Trächtigkeitshälfte.....	64
	Das Fehlen von Qa2 führte zu einer veränderten Trophoblasten-Morphologie und zu einer veränderten Protein-Expression in der Plazenta	65

Das Fehlen von Qa2 führte zu Veränderungen im Genexpressionsprofil des Uterus.....	69
Die Akkumulation von MDSC während der Trächtigkeit ist bei Qa2-defizienten Mäusen gestört.....	71
Das Fehlen von Qa2 führte zu einem veränderten Lymphozyten-Profil	74
Das Fehlen von Qa2 führte zu einer verringerten Funktionalität von MDSC.....	79
Die Expression von Qa2 auf MDSC wird durch Östrogen über HIF1- α reguliert.....	80
<i>In-vivo</i> Applikation von sHLA-G führte bei Qa2-Mäusen zu einer verminderten Abortrate und erhöhter MDSC-Akkumulation	86
4. Diskussion.....	90
Das Fehlen von Qa2 führte zu einer veränderten strukturellen Anpassung an die Schwangerschaft und zu einer erhöhten Abortrate.....	92
Das Fehlen von Qa2 führte zu einer veränderten immunologischen Anpassung an die Schwangerschaft.....	95
Das Fehlen von Qa2 führte zu einer verringerten Funktionalität von MDSC.....	97
Die Expression von Qa2 auf MDSC wird durch Östrogen über HIF1- α reguliert.....	99
<i>In-vivo</i> Applikation von sHLA-G führte zu erhöhten MDSC-Zahlen und einer reduzierten Abortrate	101
V. Schlussfolgerung und Ausblick	103
VI. Reflexion der Methodik	104
VII. Literaturverzeichnis	106
VIII. Abbildungsverzeichnis.....	124
IX. Tabellenverzeichnis.....	127
X. Erklärung	128
XI. Beteiligungen.....	129
XII. Veröffentlichungen.....	130
XIII. Vorträge/Posterpräsentationen.....	131
XIV. Danksagung.....	132

XV. Anhang	133
Gating-Strategie Immunzellprofil.....	133
Proteomanalysen	134
Transkriptomanalysen.....	136

II. Abkürzungsverzeichnis

-	fehlend oder negativ
+	zusätzlich oder positiv
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
1-MT	1-Methyltryptophan
2-ME	2-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Aryl hydrocarbon receptor)
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanine
APCs	Antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	lat. <i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
Arg1	Arginase-1
Art.#	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
BB515/700	Brilliant Blue 515/700
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-6	B-Zell-Lymphom-6-Protein (B-cell lymphoma 6 protein)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV421/510	Brilliant Violet 421/510
BZR	B-Zell-Rezeptor
ca.	circa/zirka
CBMC	mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut (cord blood mononuclear cell)

CCL2	CC-Chemoki-Ligand-2 (CC-chemokine ligand 2)
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
CTL	zytotoxische T-Zelle (cytotoxic T-lymphocyte)
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12 (C-X-C motiv chemokine 12)
DC	Dendritische Zellen (dendritic cells)
DMEM	Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
doi	digitaler Objektbezeichner (document object identifier)
E	Embryonaltag (embryonic day)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al	<i>lat. et alia</i> (und andere)
EVs	extrazellulären Vesikeln
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescent activated cell sorting)
Fc	Membranrezeptor (fragment crystallisable)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Gauge (Größe von Kanülen für Spritzen)
GATA3	Transkriptionsfaktor GATA3-bindendes Protein

G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte colony stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte macrophage colony stimulating factor)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Gr-MDSC	granulozytäre MDSC
h	Stunde (hour)
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure (hydrochlorid acid)
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg	Quecksilber (lat. <i>hydrargyrum</i>)
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)
HLA-G	humanes Leukozytenantigen G (human leukocyte antigen G)
HSA	Humanalbumin (human serum albumin)
IDO	Indolamin-2,3-diosygenase
IFN γ	Interferon γ
IL-2/4/5/6/12/22	Interleukin 2/4/5/6/12/22
ILT-2	Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor 2 (Ig-like transcript 2)
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (inducible nitric oxide synthases)
i.p.	intraperitoneal
IRF4	Interferon-Regulations-Faktor 4 (Interferon regulatory factor 4)
I.U.	international Einheit (international unit)
i.v.	intravenös
IVC	individuell ventilierte Käfige (individually ventilated cage)
IVF	<i>in-vitro</i> Fertilisation
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat

KIR	killerzellenimmunglobulinähnliche Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptor)
KO	Knockout
KM	Knochenmark
LB-Medium	Nährmedium (lysogeny broth medium)
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LH	Luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
m	Masse
M	molare Masse
MACS	magnetische Zellseparation (magnetic activated cell sorting)
MDSC	myeloide Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)
MG	Molekulargewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
mg	Milligramm
min	Minute
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
Mo-MDSC	monozytäre MDSC
MOI	Multiplizität der Infection (multiplicity of infection)
MS	Massenspektrometrie (mass spectrometry)
n	Stoffmenge
N/A	nicht verfügbar (not available)
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NCCT	Next-Generation-Sequencing (NGS) Competence Center Tübingen
NEB	Next Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Modules

ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation-Sequencing
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
ns	nicht signifikant
NSB	Nabelschnurblut
OD	optische Dichte (optical density)
p.A.	für analytische Zwecke (pro analysis = for analytical purposes)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (pathogen-associated molecular patterns)
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion (periodic acid-Schiff reaction)
PAS-D	PAS-Diastase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cell)
PE	Phycoerythrin
<i>Ped</i>	Präimplantations-Embryonalentwicklung (preimplantation embryo development)
PerCp	Peridinin chlorophyll protein
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIR-B	murinen gepaarten immunglobulinähnlichen Hemmrezeptor Rezeptor (paired-immunoglobulin like transcript B)
PGF	Plazentawachstumsfaktor (placental growth factor)
pM	Pikomolar
PMN	polymorphkernige Leukozyten (polymorphnuclear cells)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PRR	Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (pathogen recognition receptors)

P/S	Penicillin/Streptomycin
p-Wert	Signifikanzwert (lat. <i>probabilitas</i> = Wahrscheinlichkeit)
Qa2-	Qa2-Defizienz
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROR γ t	Retinoid-verwandter Orphan-Rezeptor gamma t (retinoid-related orphan receptor gamma t)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPM	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RSA	Rezidivierende Spontanaborte (recurrent spontaneous abortion)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
sFlt-1	lösliche Fms-ähnliche Tyrosinkinase-1 (soluble Fms-like tyrosinkinase-1)
sHLA-G	lösliches humanes Leukozytenantigen G (soluble human leukocyte antigen G)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SSW	Schwangerschaftswochen
STRING	Datenbank (search tool for the retrieval of interacting genes/proteins)
T-bet	T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21 (T-box transcription factor TBX21)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tfh	follikuläre T-Helferzelle
TGF β	Transforming growth factor β
Th1/2/9/17/22/0	T-Helfer-Zellen 1/2/9/17/22/0
TNF α	Tumornekrosefaktor α
T _{regs}	regulatorische T-Zelle

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
U	Enzymeinheit (= ein Mikromol Substratumsatz pro Minute)
VEGF R1	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor (vascular endothelial growth factor receptor)
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vs.	lat. <i>versus</i> = gegen(übergestellt)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

III. Zusammenfassung

Seit vielen Jahren wird nach möglichen Ursachen und Risikofaktoren geforscht, die zu einer Fehlgeburt führen, um effektive Behandlungsstrategien zu entwickeln. Zahlreiche Studien fokussieren sich auf die immunologischen Ursachen, die zu einer Abstoßung des Feten führen. Trotz intensiver Forschung sind die genauen Mechanismen, die hierbei von Bedeutung sind, noch weitgehend ungeklärt.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass myeloide Suppressorzellen (engl. myeloid-derived suppressor cells, MDSC) eine wichtige Bedeutung für die Vermittlung der feto-maternalen Toleranz haben. MDSC sind myeloide Vorläuferzellen mit suppressiver Aktivität auf Zellen des Immunsystems. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass MDSC sowohl im Nabelschnurblut als auch im peripheren Blut gesunder Schwangerer und in der Plazenta in erhöhter Zahl vorkommen. Wohingegen bei Patientinnen mit Aborten die Anzahl von MDSC verringert ist.

Ein für die immunologischen Vorgänge während der Schwangerschaft gut untersuchter Faktor ist das nicht-klassische MHC-Ib-Molekül HLA-G. Im gesunden Organismus wird es hauptsächlich von Trophoblastzellen exprimiert und hat ausschließlich immunregulatorische Funktionen. HLA-G gilt somit als wesentlicher Vermittler der feto-maternalen Toleranz. Das MHC-I-Molekül Qa2 gilt als murines Korrelat zum humanen HLA-G. Qa2-negative Mäuse haben laut Literatur kleinere Feten und geringere Wurfgrößen im Vergleich zu Qa2-positiven Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass auch die Expression von Qa2 bei Mäusen wichtig für einen komplikationslosen Trächtigkeitsverlauf ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Qa2 für den Trächtigkeitsverlauf und auf die MDSC-Akkumulation während der Trächtigkeit bei Mäusen zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Qa2 zu einer veränderten immunologischen Anpassung an die Trächtigkeit und insbesondere zu einer gestörten MDSC-Akkumulation während der Trächtigkeit sowie zu einer erhöhten Abortrate in der späten Trächtigkeit führte. Das Fehlen von Qa2 führte außerdem zu tiefgreifenden Veränderungen im Protein- und Genexpressionsprofil von Plazenta und Uterus. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Expression von Qa2 auf MDSC relevant für deren immunregulatorische Funktion ist und dass diese über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α und über Östrogen reguliert ist. Durch die Applikation von sHLA-G an trächtige Qa2-Mäuse konnten sowohl die MDSC-Zahlen im Uterus der Tiere erhöht werden, als auch die erhöhte Abortrate reduziert und die veränderte Trophoblasten-Morphologie wiederhergestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf eine Interaktion zwischen MDSC und HLA-G/Qa2 als möglichen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz hindeuten und damit als Grundlage für neue zellbasierte Therapien zur Behandlung von immunologischen Schwangerschaftskomplikationen dienen könnten.

IV. Summary

Abortions are one of the most common pregnancy complications and are defined as spontaneous pregnancy loss. There are different reasons for abortions, but impaired immunological adaptation to pregnancy seems to play an important role in the pathogenesis. During pregnancy, there is a close contact between maternal and fetal immune cells. Fetal survival requires suppression of the maternal immune system to induce tolerance. The mechanisms facilitating maternal-fetal tolerance are incompletely understood.

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are myeloid progenitor cells with suppressive activity on T-cells and are expanded during pregnancy. It has become evident that MDSC also play a physiological role during pregnancy modulating maternal immune response and protecting the fetus from rejection. Our research group was able to show that MDSC are present in increased numbers in the umbilical cord blood as well as in the peripheral blood of healthy pregnant women and in the placenta. In patients with miscarriages, MDSC are decreased.

A well-studied factor for the immunological processes during pregnancy is the non-classical MHC-Ib molecule HLA-G. In the healthy organism, it is strongly expressed by trophoblast cells during pregnancy and in contrast to the classical MHC-I molecules HLA-A and HLA-B, HLA-G has exclusively immunoregulatory functions. The MHC-I molecule Qa2 is considered a murine correlate for the human HLA-G. Lack of HLA-G/Qa2 seems to be related with gestational complications like spontaneous abortion and preeclampsia. Until now, no *in-vivo* studies exist that demonstrate a beneficial role of HLA-G/Qa2 for pregnancy success. According to literature, Qa2-negative mice have smaller fetuses and smaller litter sizes compared to Qa2-positive mice. This suggests that the expression of Qa2 in mice is also important for a complication-free pregnancy.

The aim of the present study was to investigate the role of HLA-G and Qa2 for MDSC accumulation during pregnancy and for pregnancy outcome.

In this work, we demonstrated that the absence of Qa2 led to an imbalanced immunological adaptation to pregnancy, an abrogated MDSC accumulation and function during pregnancy and an increased abortion rate during the second half of pregnancy. Furthermore, it led to profound changes in placental and uterine protein and gene expression profile. The regulation of Qa2 expression of MDSC during pregnancy was regulated by the transcription factor HIF-1 α , which in turn could be stimulated by estrogen. Application of sHLA-G to pregnant Qa2-negative mice we could increase MDSC counts in the uterus, reduced the increased abortion rate and restored the altered trophoblast morphology.

In conclusion, these results suggest an interaction between MDSC and HLA-G/Qa2 in mice as a potential mechanism for maintaining maternal-fetal tolerance.

1. Einleitung

1.1 Aborte

Aborte (Fehlgeburten) sind eine der häufigsten Schwangerschaftskomplikationen und nicht selten der Grund für ungewollte Kinderlosigkeit. Neben dem Tod des Feten können diese in wenigen Fällen auch zum Tod der Mutter führen.

Aborte werden laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) als spontaner, nicht beabsichtigter Verlust der Schwangerschaft vor der vollendeten 24. Schwangerschaftswoche definiert [1]. Sie betreffen zwischen 25 % und 50 % aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter [2-4].

Man geht davon aus, dass es nur etwa jede dritte befruchtete Eizelle in die Implantationsphase schafft und somit zu einer normalen Schwangerschaft führt [3, 5].

Habituelle Aborte oder rezidivierende Spontanaborte (RSA) sind weitaus seltener und ereignen sich mit einer Häufigkeit von 1-3 %. RSA bedeuten per Definition den Verlust von drei oder mehr aufeinander folgenden Schwangerschaften [6].

In den ersten Schwangerschaftswochen (SSW) äußert sich ein Abort meist subklinisch als verspätete und eventuell verstärkte vaginale Blutung. In späteren Schwangerschaftsstadien werden Aborte erst dann klinisch auffällig, wenn es zu vaginalen Blutungen, Unterleibsschmerzen, später auch zu Gewebeabgang oder Abgang von Fruchtwasser und vorzeitiger Wehentätigkeit kommt [7].

Die Ursachen für Aborte sind vielfältig und können sowohl auf mütterlicher, als auch auf fetaler Seite liegen. Zu den möglichen Ursachen zählen Fehlbildungen oder chromosomale Veränderungen des Feten, akute Infektionen der Fruchthöhle, sowie chronische Erkrankungen oder endokrinologische Veränderungen bei der Mutter [7]. Auch einige Umweltfaktoren [8] und der Lebensstil der Mutter können den Schwangerschaftsverlauf negativ beeinflussen [9, 10]. In bis zu 50 % aller Aborte bleibt die Ursache allerdings ungeklärt.

Ein weiterer Faktor, der eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Aborten spielt, ist eine Fehlregulationen des mütterlichen Immunsystems [11, 12]. Dieses Thema steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Die genauen immunologischen Mechanismen und mögliche weitere Aspekte, die zu einem Abort führen, sind bisher nur teilweise verstanden. Trotz ständiger Weiterentwicklung der Reproduktionsmedizin bleibt jedes zehnte Paar mit Kinderwunsch kinderlos [13]. Für mögliche Therapieansätze bedarf es weitere Studien.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein körpereigenes Abwehrsystem gegen Krankheitserreger (Pathogene), Giftstoffe und körpereigene aber schädliche Zellen (z.B. Tumorzellen). Die Hauptaufgabe des Immunsystems besteht darin, das Eindringen von Pathogenen zu erkennen, Infektionen einzudämmen und bestenfalls vollständig abzuwehren, ohne dem eigenen Körper dabei Schaden zuzufügen [14].

Das Immunsystem wird in zwei funktionelle Komponenten unterteilt, das schnelle aber unspezifische angeborene Immunsystem und das spezifische adaptive bzw. erworbene Immunsystem (Abbildung 1).

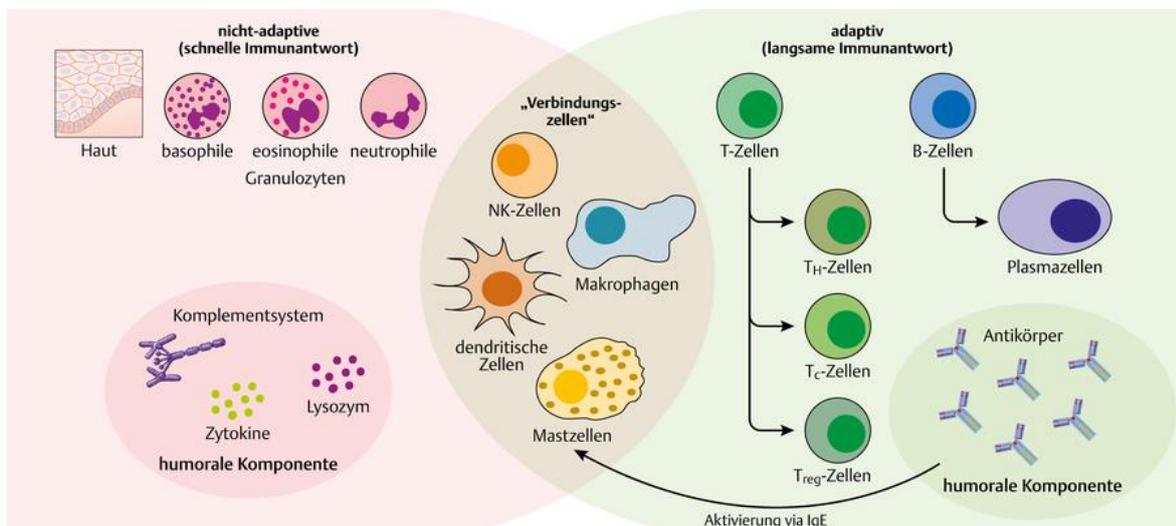


Abbildung 1: Bestandteile des menschlichen Immunsystems [15].

Das Immunsystem ist in zwei Komponenten unterteilt, das angeborene (links) und das erworbene Immunsystem (rechts). Das schnelle angeborene Immunsystem besteht aus löslichen Proteinen und zellulären Bestandteilen wie Granulozyten, Monozyten, Dendritische Zellen (DC) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Das erworbene oder adaptive Immunsystem agiert langsamer aber spezifisch und umfasst B- und T-Zellen, sowie Antikörper und NK-Zellen. (Bildquelle: Taschenatlas Biochemie des Menschen, Thieme, 2009)

Dringen Pathogene in den Körper ein, reagiert zuerst das angeborene Immunsystem. Neben anatomischen Barrieren wie Haut und Schleimhäuten, mechanischen Schutzmechanismen wie Zilien und Zell-Zell-Kontakten als auch löslichen Komponenten wie Enzyme, Peptide und Zytokine spielen vor allem Immunzellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen (DC) eine wichtige Rolle. Sie erkennen mittels ihrer speziellen Mustererkennungrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR), typische, aber unspezifische Strukturen von Pathogenen, die Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pattern-associated molecular patterns, PAMPs) und eliminieren Pathogene entweder direkt oder dämmen die Infektion ein, bis die spezifische, adaptive Immunantwort reagiert.

Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Zellen und richtet sich gegen spezifische Merkmale von Pathogenen, die Antigene. Diese werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs), den Monozyten, Makrophagen, B-Zellen oder Dendritische Zellen, durch Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert (Abbildung 2).

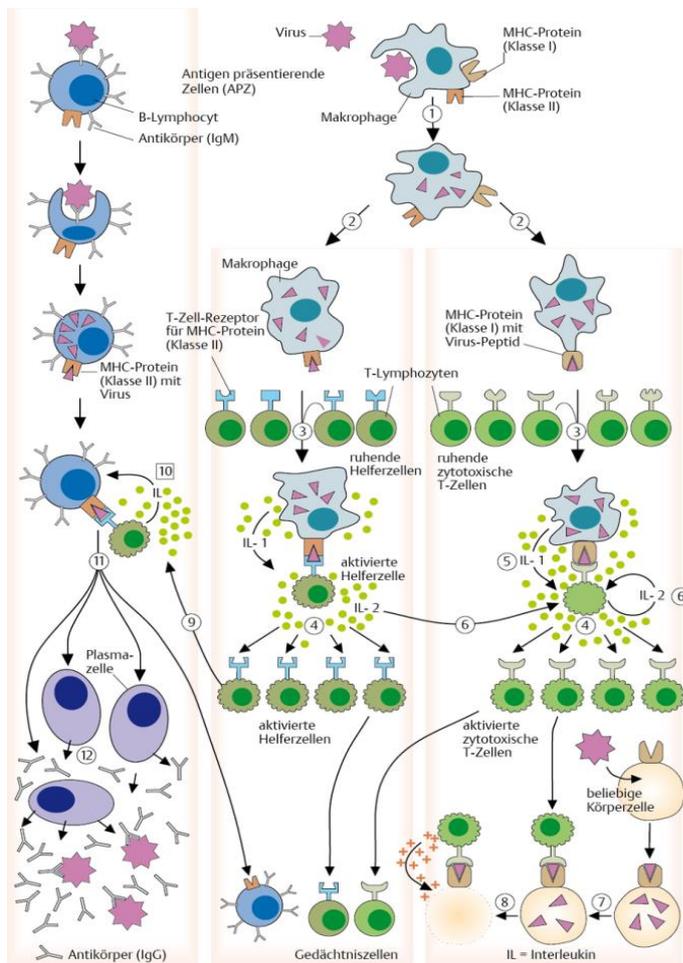


Abbildung 2: Die adaptive Immunantwort erkennt durch B- und T-Zellen hoch spezifische Oberflächenmerkmale von Pathogenen [15].

Antigenpräsentierende Zellen phagozytieren Pathogene (1) und präsentieren Bruchstücke davon mit MHC-I- oder MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche (2). Diese Antigenfragmente werden von zytotoxischen T-Zellen oder T-Helferzellen erkannt (3) und binden an den T-Zell-Rezeptor. Dadurch kommt es zur Aktivierung und Expansion der T-Zellen (4). Die zytotoxischen T-Zellen erkennen Pathogene (7) und bringen diese durch ihre zytotoxischen Granula in die Apoptose (8).

B-Zellen können mit ihrem B-Zell-Rezeptor Antigene direkt erkennen und präsentieren diese mit MHC-II-Molekülen. Mit Hilfe aktivierter T-Helferzellen differenzieren die B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen heran (11, 12).

(Bildquelle: Taschenatlas Biochemie des Menschen, Thieme, 2009)

Die Rezeptoren von B- und T-Zellen (B-Zell-Rezeptor (BZR) und T-Zell-Rezeptor (TZR)) erkennen die präsentierten Bruchstücke und eine spezifische Immunreaktion wird ausgelöst. Dies stimuliert auch die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die wiederum phagozytotische Zellen anlocken.

B-Zellen werden im Knochenmark gebildet und reifen dort zu spezialisierten Abwehrzellen heran. Sie bilden als einzige Zellen Antikörper und sind somit für die humorale Immunantwort im Körper verantwortlich. Die naiven B-Zellen, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatten, zirkulieren im peripheren Blut und in lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark.

Erst nach Bindung eines fremden Antigens an den B-Zell-Rezeptors (BZR) wandern die B-Zellen zur Reifung in ein Keimzentrum, wie z. B. in Lymphknoten oder Milz.

Mit Hilfe von CD4⁺ T-Helferzellen erfolgt dann die Aktivierung der B-Zellen. Das an den BZR gebundene Antigen wird intrazellulär aufgenommen, zu Peptidfragmenten verarbeitet und mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC-Komplex) an der Oberfläche präsentiert. Es folgt eine Vermehrung der B-Zellen sowie die Differenzierung zu Plasmazellen. Diese sezernieren Antikörper, welche spezifisch an das Antigen binden können. Antikörper sind Y-förmige Moleküle mit zwei identischen Antigenbindungsstellen und einer konstanten Fc-Region. Die konstante Region bestimmt die funktionellen Eigenschaften eines Antikörpers. Antikörper können durch Neutralisierung, Opsonisierung und Aktivierung des Komplementsystems an der Immunabwehr beteiligt sein [14].

T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und wandern über das Blut in den Thymus, wo die weitere Ausreifung stattfindet. T-Zellen können mit ihrem T-Zell-Rezeptors (TZR) nur Antigenfragmente erkennen, die von APCs durch MHC-Moleküle präsentiert werden. Bindet ein Antigen an den TZR, werden durch Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen antigenspezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen gebildet.

Die CD4⁺ T-Helferzellen erkennen Peptide von Pathogenen, die ihnen von APCs mithilfe von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden und unterstützen das Immunsystem bei der Bekämpfung von Pathogenen durch die Aktivierung weiterer Immunzellen und der Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Anhand ihrer Funktion und Induktion, der Expression von Transkriptionsfaktoren und ihres Zytokinmusters können T-Helferzellen weiter unterteilt werden (Tabelle 1). Die naiven Th0-Zellen können sich entweder in T-Helferzellen 1 (Th1-Zellen), Th2-Zellen, Th17-Zellen, regulatorische T-Zellen (T_{regs}) oder aber auch in die erst später beschriebenen Th9-Zellen, Th22-Zellen oder die folliculäre T-Helferzellen (Tfh-Zellen) differenzieren [16, 17].

Tabelle 1: Subtypen von T-Helferzellen

Naive Th0-Zellen können sich je nach Stimulation in sieben verschiedene T-Helferzell-Subtypen differenzieren, die sich durch ihre Induktion, die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, die Sekretion von Zytokinen und in ihrer Funktion unterscheiden lassen.

	Induktion durch	Transkriptionsfaktoren	Zytokine	Funktionen
Th1	IL-12, IFN γ	T-bet	IFN γ , IL-2, TNF α	Aktivieren andere T-Zellen und APCs, Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, Kontrolle Makrophagenaktivierung → führt zu Entzündungsreaktion → führt zu Abstoßungsreaktionen

Th2	IL-4	GATA3	IL-4, IL-13, IL-5	Binden und aktivieren B-Zellen, die zu Plasmazellen weiter differenzieren und Antikörper produzieren, Bekämpfung extrazellulärer Pathogene v.a. Parasiten, Einfluss bei allergischen Reaktionen
Th17	IL-6, IL-23, TGFβ, IL1β	RORγt	IL-17A, IL-22	Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze, Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen zum Infektionsherd [18] → führen zu Entzündungs- und Autoimmunreaktionen [19]
T_{reg}	TGFβ, IL-2	Foxp3	TGFβ, IL-35, IL-10	Regulation T-Zellen, Gegenspieler der proinflammatorischen Zellen, Kontrolle der Immunantwort → schützen vor überschießender Immunreaktion und erhöhen Selbsttoleranz
Th22	IL-6, TNFα	AhR	IL-22	Schützen vor Entzündungen und fördern die Wundheilung [20]
Th9	IL-4, TGFβ	IRF4	IL-9	Rolle bei allergischen Reaktionen [21], Infektionen mit Helminthen [22] und Autoimmunerkrankungen [23]
Tfh	IL6, IL-21	Bcl-6	IL-21	Steuern die Selektion und das Überleben von B-Zellen, die sich zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen weiter differenzieren [24]

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen Peptide von Krankheitserregern, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden und töten durch direkten Kontakt virusinfizierte oder entartete Körperzellen. Sie agieren im Allgemeinen sehr schnell und schütten eine Vielzahl von lytischen Substanzen wie Granzyme B und Perforin aus. Diese führen die infizierten Zellen zum programmierten Zelltod (Apoptose). Während die Zielzelle getötet wird, füllen sich die Granulaspeicher wieder auf, so dass auch die nächsten infizierten Zellen direkt angegriffen werden können. Zytotoxische T-Zellen schütten zusätzlich auch Zytokine wie IFN γ oder TNF α aus, wodurch beispielsweise die Ausbreitung von Viren verlangsamt und der Aufbau von MHC-Klasse-I-Molekülen unterstützt wird [14].

Das adaptive Immunsystem kann außerdem ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, indem einige der durch Antigene aktivierten B- und T-Zellen sich zu Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Dadurch wird bei einem zweiten Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen, eine schnellere und intensivere Reaktion ausgelöst [14]. Bei den Gedächtnis-T-Zellen unterscheidet man zwischen CD4- bzw. CD8-positiven Zellen. Diese können wiederum in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen unterteilt werden, den Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen [14].

1.3 Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind angeborene Immunzellen, welche aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen und suppressiv auf andere Immunzellen wirken. Erstmals beschrieben wurden sie im Rahmen von Krebserkrankungen [25-28], bei denen es durch vom Tumor sezernierte Stoffe, zu einer Akkumulation von MDSC kommt, welche dann die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort supprimieren, wodurch Wachstum und Metastasierung des Tumors begünstigt werden.

In der Zwischenzeit wurde eine Akkumulation von MDSC auch bei einer Vielzahl weiterer pathologischer Zustände [29] beschrieben. Sowohl bei Transplantationen [30-32] als auch bei Autoimmunerkrankungen [33], bakteriellen und parasitären Infektionen [34, 35], akuten und chronischen Entzündungen [36] und Traumata [37, 38] konnten erhöhte MDSC-Zahlen beschrieben werden.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in den letzten Jahren erstmals zeigen, dass es auch während der normalen Schwangerschaft im peripheren Blut gesunder Schwangerer [39], in der Plazenta [40] und im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener [41] zu einer Akkumulation von MDSC kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von MDSC bei Patientinnen mit Aborten im Vergleich zu Schwangeren mit elektivem Schwangerschaftsabbruch deutlich verringert war [40].

Bei Patientinnen mit *in-vitro* Fertilisation (IVF) konnten hohe MDSC-Level mit einem erfolgreichen Verlauf der Behandlung assoziiert werden [42, 43], was vermuten lässt, dass MDSC bereits zum Zeitpunkt der Implantation eine wichtige Rolle spielen könnten. Neueste Ergebnisse zeigen, dass MDSC auch in der Muttermilch enthalten sind und so während der Stillzeit an das Neugeborene übertragen werden [44, 45]. Insgesamt scheinen MDSC unter Bedingungen, die zum Überleben eine Immuntoleranz erfordern, vorteilhaft für den Wirt zu sein.

Auch bei Mäusen konnte während der Trächtigkeit eine Zunahme von MDSC in Blut, Milz und Uterus beobachtet werden. Bei Mäusen mit verstärkter Abortneigung konnte eine gestörte MDSC-Akkumulation beobachtet werden und eine Depletion von MDSC ab dem Trächtigkeitstag

E0.5 führte zu einer gestörten Implantation und erhöhten Abortraten [46-48]. Umgekehrt reduzierte ein adoptiver Transfer von MDSC das Auftreten von Fehlgeburten bei Mäusen [49].

MDSC können anhand ihrer Oberflächenmarker in zwei große Subpopulationen unterteilt werden, die monozytären (Mo-MDSC) und die granulozytären (Gr-MDSC) MDSC.

Beim Menschen sind Mo-MDSC charakterisiert durch die Expression des monozytären Oberflächenmarker CD14, jedoch mit geringerer Expression von HLA-DR als Monozyten [50]. Gr-MDSC exprimieren Marker granulozytärer Zellen wie CD66, CD11b und CD15, sind dabei aber negativ für CD14. Sie lassen sich von Granulozyten nur anhand ihrer Sedimentation in einem Dichtegradienten unterscheiden; MDSC befinden sich in der Fraktion der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und nicht in der Fraktion der Granulozyten [51]. Gemeinsam sind beiden MDSC-Subpopulationen die Expression des myeloiden Markers CD33.

In Mäusen können MDSC durch die Co-Expression der myeloiden Oberflächenantigene CD11b und Gr1 identifiziert werden [52]. Mo-MDSC und Gr-MDSC werden in Mäusen durch die Expression der beiden Epitope von Gr1, Ly6G und Ly6C, weiter unterschieden. Mo-MDSC sind charakterisiert als CD11b⁺/Ly6G⁻/Ly6C^{hi} und Gr-MDSC als CD11b⁺/Ly6G^{hi}/Ly6C^{lo/-} [53].

Aufgrund fehlender spezifischer Oberflächenmarker, die MDSC sicher von anderen myeloiden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, DC und Neutrophilen differenzieren, können sie jedoch nur durch den Nachweis einer suppressiven Wirkung auf andere Immunzellen, insbesondere T-Zellen, identifiziert werden [27]. MDSC üben ihre suppressive Aktivität über eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen aus. Zu den am häufigsten beschriebenen zählen die Depletion der essentiellen Aminosäure L-Arginin über die Expression der Effektor-Enzyme Arginase 1 (Arg1) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) und der Abbau von Zystein über die Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) [27, 38].

Neben ihrer suppressiven Wirkung auf andere Immunzellen können MDSC auch Immunantworten modulieren. Es wurde gezeigt, dass Gr-MDSC eine Th2-Antwort induzieren, die Th1-Antwort unterdrücken [40] und eine Induktion von T_{regs} bewirken [47]. Auch die NK-Zell-Funktionen werden durch verminderte Perforin-vermittelte Zytotoxizität und Herunterregulation des NK-Zell-Rezeptors NKG2D beeinflusst [54] (Abbildung 3). Weiterhin haben MDSC einen direkten Einfluss auf Monozyten. In Anwesenheit von MDSC wird die co-stimulatorische Aktivität, die Phagozytosekapazität und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Monozyten verringert [55].

Hinsichtlich der Faktoren, die unter den physiologischen Bedingungen einer Schwangerschaft zu einer Expansion von MDSC führen, konnte gezeigt werden, dass das MHC-Molekül HLA-G durch

den Rezeptor ILT4 [56] sowie die humane Throphoblastzelllinie JEG-3 durch den Rezeptor CXCR4 und dessen Ligand CXCL12 zu einer Induktion von MDSC führen können [40].

Zhang et al. beschrieben das Chemokin CCL2 als möglichen Induktionsfaktor [57] und Ostrand-Rosenberg et al. zeigten, dass der IDO-Inhibitor 1-Methyltryptophan (1-MT) eine MDSC-Expansion während der Trächtigkeit bei Mäusen verhindert, während der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) eine MDSC-Induktion bewirkte [48] (Abbildung 3).

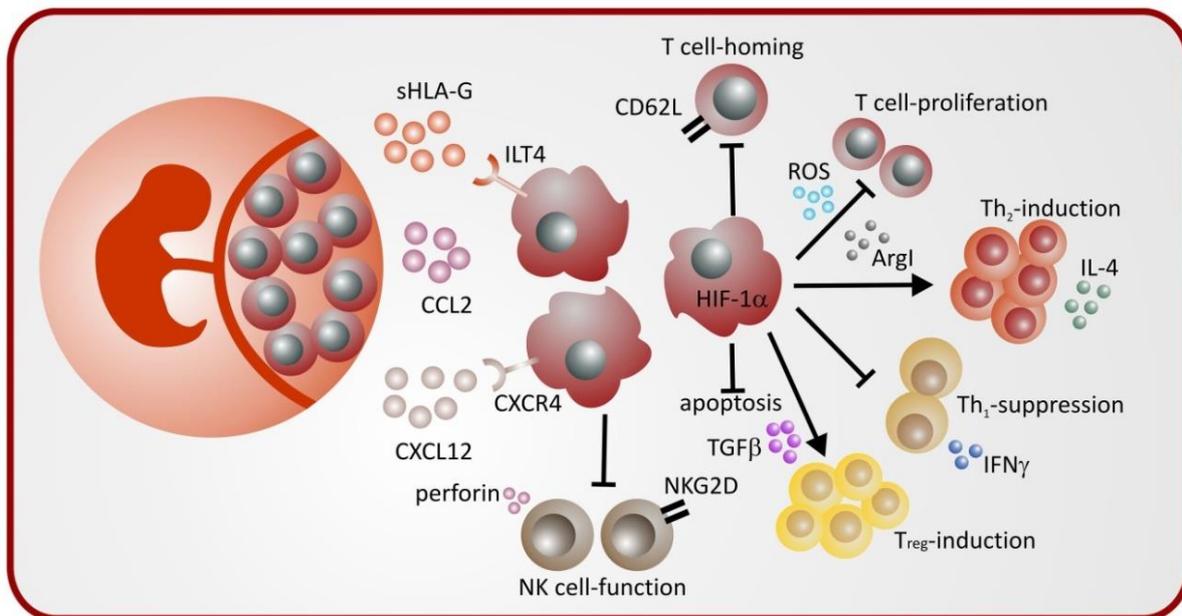


Abbildung 3: Mechanismen der MDSC-Induktion und der MDSC-vermittelten Immunmodulation während einer komplikationslosen Schwangerschaft [58].

MDSC liegen während der Schwangerschaft in vermehrter Anzahl vor und üben zur Immunmodulation verschiedene Effektormechanismen aus. Sie hemmen durch zahlreiche lösliche Faktoren (z.B. Arg1, Perforin, ROS) die T-Zell-Proliferation, die NK-Zell-Funktionen, die Th1-Immunantwort und das T-Zell-Homing. Aber sie führen auch zu einer Induktion von T_{regs} und Th2-Zellen. MDSC können durch lösliche Faktoren wie sHLA-G, CCL2 und CXCL12 induziert werden und auf transkriptioneller Ebene spielt HIF-1α eine Rolle für die Funktion und Aktivität von MDSC. (Bildquelle: Köstlin-Gille et al., 2020)

1.4 Der weibliche Zyklus und die normale Schwangerschaft

Unter dem weiblichen Zyklus versteht man die periodisch wiederkehrenden Veränderungen der Uterusschleimhaut und die gleichzeitig stattfindende Heranreifeung einer Eizelle im Eierstock. Die zyklischen Veränderungen der Uterusschleimhaut werden bei Mäusen nach den vier Phasen des vaginalen Zyklus benannt: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus [59]. Beim Menschen sind es die Follikelphase, die Ovulation und die frühe bzw. späte Lutealphase.

Die Veränderungen während eines Zyklus unterliegen bei geschlechtsreifen Säugetieren einer direkten hormonellen Steuerung. Besonders die Hormone Östrogen, Progesteron (auch Gelbkörperhormon genannt), Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) spielen im weiblichen Zyklus eine Rolle (Abbildung 4) [60].

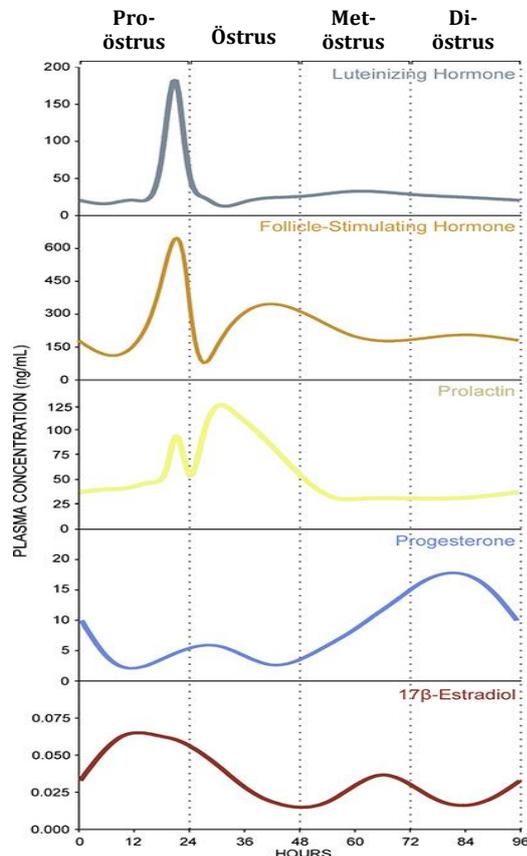


Abbildung 4: Die zyklusabhängigen Veränderungen während des weiblichen Zyklus bei Mäusen sind durch endokrine Ereignisse gesteuert [60].

Der weibliche Zyklus lässt sich in vier Phasen einteilen:

Proöstrus = Follikelphase

Östrus = Ovulation/Eisprung

Metöstrus = frühe Lutealphase/Sekretionsphase

Diöstrus = späte Lutealphase

Während dieser Phasen kommt es zu Schwankungen im Hormonhaushalt. Im Proöstrus ist das Luteinisierende Hormon (LH), das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und die Östrogenkonzentration am höchsten, im Östrus die Prolaktinkonzentration und während des Metöstrus/Diöstrus das Progesteron.

(Bildquelle: McLean et al., 2012)

Während des Proöstrus, der beim Menschen als Follikelphase bezeichnet wird, kommt es im Eierstock durch das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH) zum Heranreifen eines oder mehrerer Follikel und der in ihnen enthaltenen Eizellen. Die Uterusschleimhaut verdickt sich und Schleimdrüsen wachsen. FSH und LH fördern den Eisprung und die Follikel erzeugen Östrogen, welches dann im Blut als 17β-Estradiol erhöht vorkommt. Auch der Prolaktinspiegel ist erhöht. Während des Östrus kommt es zum Eisprung (Ovulation). Dies stellt etwa die Mitte eines Zyklus dar. Der Östrogenspiegel sinkt, die Uterusschleimhaut verdickt sich und die Eizelle wird ausgestoßen. Diese kann nun durch den Fimbrientrichter des Eileiters aufgenommen werden. Kommt es zu keiner Befruchtung, stirbt die Eizelle ab und löst sich auf. Wird sie befruchtet, wandert sie während den nächsten Tagen durch den Eileiter in die Gebärmutter. Im Metöstrus, der menschlichen Lutealphase, bilden sich aus Zellen des Follikels der Gelbkörper (*Corpus luteum*). Die Spiegel des FSH und LH sinken, der Progesteronwert steigt und die Drüsen beginnen mit der Abgabe ihres nährstoffhaltigen Sekrets. Im Diöstrus, der späten Lutealphase beim Menschen, bildet sich der Gelbkörper komplett aus. Kommt es nicht zu einer

Schwangerschaft, geht der Gelbkörper im Eierstock zugrunde und die Schleimhaut bildet sich wieder zurück [59, 60]. Bei der Frau werden die Schleimhäute durch Kontraktionen der Uterusmuskulatur abgestoßen und es kommt zur Blutung, was gleichzeitig der Beginn eines neuen Zyklus ist.

Frauen haben eine durchschnittliche Zykluslänge von 28 Tagen. Die Follikelphase beträgt ca. 12 Tage, der Eisprung nur zwei Tage und die letzten beiden Phasen zusammen 14 Tage. Mäuse haben eine Zykluslänge von nur vier bis sechs Tagen. Der Proöstrus dauert 12-24 Stunden, der Östrus 10-20 Stunden, der Metöstrus 24-48 Stunden und am längsten dauert der Diöstrus mit durchschnittlich 48 Stunden [61, 62].

Während eines Zyklus kommt es in der Vagina zu charakteristischen Veränderungen des Epithels und der *Lamina propria*. Diese morphologischen Veränderungen werden bei Nagern zur Zyklusdiagnostik herangezogen. Ein mikroskopisches Bild eines Vaginalabstriches im Proöstrus enthält eine mäßige Anzahl an Epithelzellen mit großen Kernen, die meist als Zellhaufen sichtbar sind. Ein Abstrich im Östrus ist durch viele große verhornte Epithelzellen gekennzeichnet. Im Metöstrus sind polymorphkernige Zellen mit einigen verhornten Epithelzellen im Abstrich sichtbar. Der Abstrich des Diöstrus ist hauptsächlich durch polymorphkernige Zellen sowie wenige degenerierte, irregulär geformte Epithelzellen gekennzeichnet [59, 60, 62] (Abbildung 5).

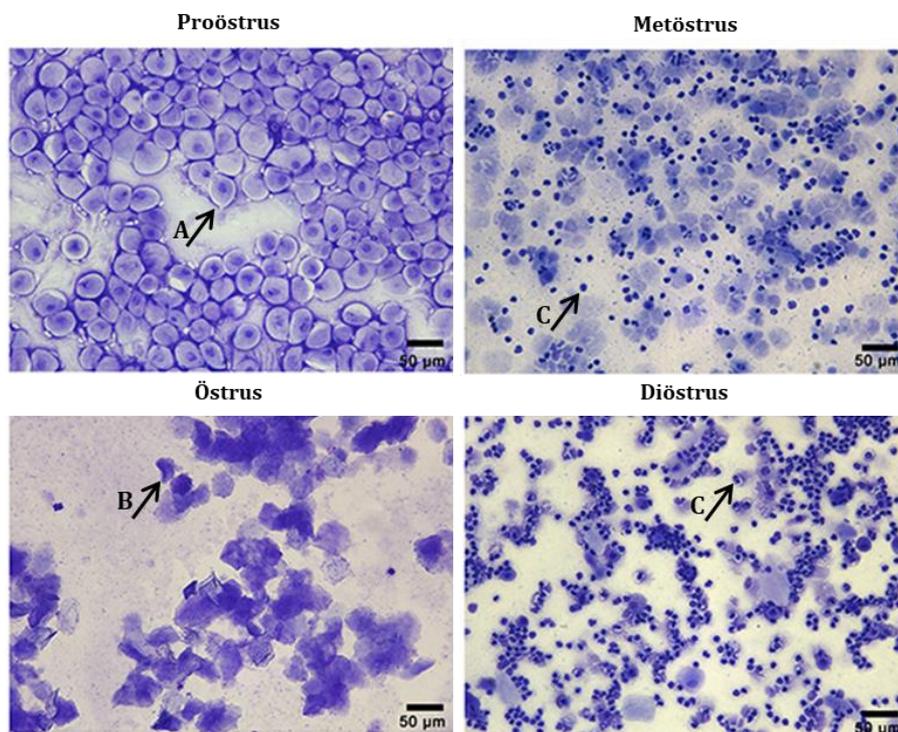


Abbildung 5: Vaginalabstriche erlauben die Bestimmung des Zykluspunktes bei Mäusen [60]

In vaginalen Abstrichen von Mäusen lassen sich drei Zelltypen nachweisen: kernhaltige Epithelzellen (A), verhornte Plattenepithelzellen (B) und Leukozyten (C). Die Veränderungen der Uterusschleimhaut werden nach den vier Phasen des vaginalen Zyklus benannt: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus. (Bildquelle: McLean et al., 2012)

Diese zyklusbedingten Veränderungen schaffen die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Implantation. Nach Befruchtung der Eizelle kommt es zur Reifeteilung (2-Zellen-Stadium), worauf durch weitere Zellteilung das 16-Zellen-Stadium (Morula) erreicht wird. Durch die Differenzierung in eine Blastozyste und die Ausbildung von Trophoblasten kommt es zur Anlagerung an das Uterusepithel (Abbildung 6 A). Die Trophoblasten üben eine Reihe von Funktionen aus, wie den Nährstofftransport von der Mutter zum Fetus und die Synthese verschiedener Hormone und Wachstumsfaktoren. Sie differenzieren sich in eine innere und eine äußere Zellschicht, die Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten. Letztere wachsen invasiv in die Uterusschleimhaut ein, es kommt zur Einnistung (Implantation) (Abbildung 6 B). Aus den Trophoblasten und der mütterlichen Uterusschleimhaut bildet sich die Plazenta. Dabei werden die Spiralarterien der Uterusschleimhaut von den Trophoblasten aktiv umgebaut und erweitert, um so eine höhere Durchblutung zu gewährleisten (das sogenannte Spiralarterienremodelling, Abbildung 6 C) [63].

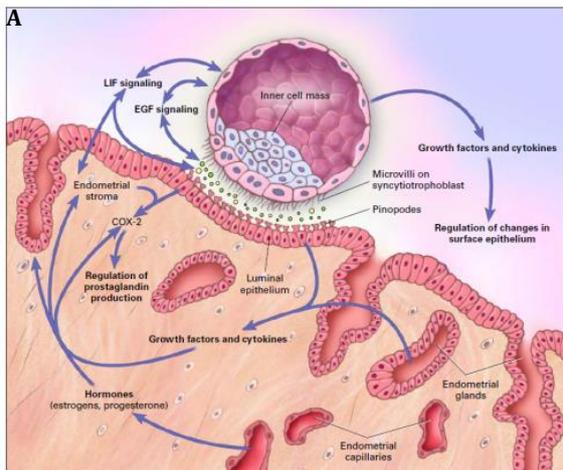
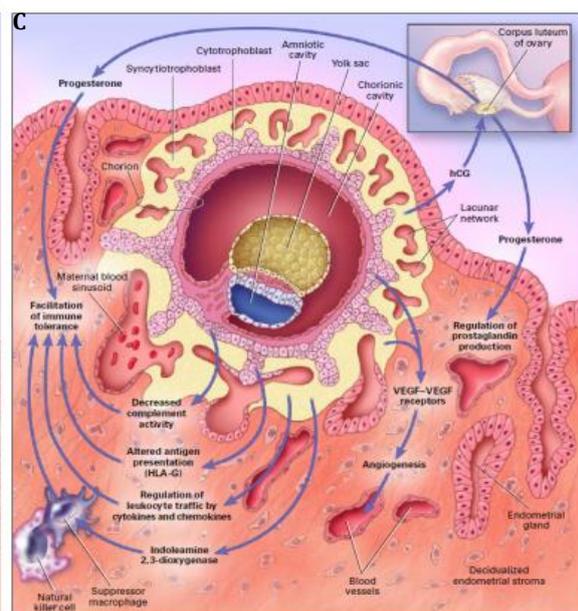
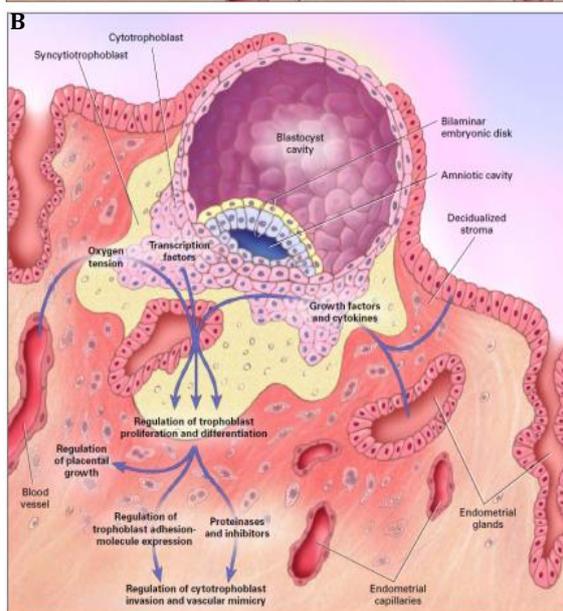


Abbildung 6: Schematische Abbildungen der Blastozystenanklebung, Implantation und Aufrechterhaltung der Frühschwangerschaft [63]

Die Abbildungen zeigen eine Blastozyste im Präimplantationsstadium (A), eine eindringende Blastozyste mit Invasion der Trophoblasten (B) und eine eingenistete Blastozyste (C) sowie die dazugehörigen komplexen molekularen Interaktionen, die für die Vorgänge von Bedeutung sind.

(Bildquelle: Norwitz et al., 2001)



Die Zellen der Plazenta produzieren das humane Choriongonadotropin (hCG), welches über die Blutbahn dem Körper signalisiert, dass die Implantation erfolgreich war und eine Schwangerschaft vorliegt. Die Ausschüttung dieses Hormons bewirkt, dass kein neuer Eisprung mehr erfolgt und die Gebärmutter schleimhaut erhalten bleibt und wächst. Anschließend kommt es im Uterus zur Ausbildung von Blutgefäßen und beim Embryo zur Bildung der Herzanlage. Während der Entwicklung vom Embryo zum Fetus finden die Ausreifung und das Wachstum von Organen und verschiedener Gewebetypen statt [64].

Die Schwangerschaft beim Menschen dauert von der Befruchtung bis zur Geburt des Kindes durchschnittlich 267 Tage (9 Monate) [64]. Die Trächtigkeit der Maus dauert durchschnittlich nur 19-22 Tage. Jedoch ähnelt die erste Hälfte der Trächtigkeitsperiode bei Mäusen dem ersten Trimester der menschlichen Schwangerschaft, in dem es zur Befruchtung, Implantation und Dezidualisierung kommt.

Die Trächtigkeitsentwicklung wird ab dem Tag post Koitus (nach dem Geschlechtsakt) gezählt und in embryonalen (E) Tagen angegeben. Mäuse tragen je nach Stamm durchschnittlich sechs bis neun Feten aus [65].

Aufgrund der hohen Feten-Zahl bei Mäusen kommt es bei einem Abort im Vergleich zum Menschen nicht zum Abbruch der Schwangerschaft/Trächtigkeit, sondern meist zur Resorption der abortierten Feten. Die verbliebenen und gesunden Feten werden weiter ausgetragen [65].

1.5 Das Immunsystem während der Schwangerschaft

Die erfolgreiche Befruchtung und die Implantation der Eizelle stellen die Grundvoraussetzungen für die Reproduktion von Vertebraten dar. Während dieser Zeit besteht enger Kontakt zwischen dem fetalen Immunsystem und dem Immunsystem der Mutter. Das Immunsystem der Mutter muss sich mit dem sich entwickelnden Feten, der zu 50 % paternal und somit fremd für das eigene Immunsystem ist, auseinandersetzen [66, 67]. Daher muss das mütterliche Immunsystem so reguliert werden, dass es zu keiner Abstoßungsreaktion kommt und der semi-allogene Organismus „toleriert“ wird. Gleichzeitig muss aber die Fähigkeit zur Infekt-Abwehr weiterhin erhalten bleiben [68].

Welche Mechanismen diese feto-maternale Toleranz regulieren ist bisher noch unvollständig verstanden.

Die Implantationsphase stellt ein sehr kritisches Stadium einer Schwangerschaft dar; nur ein kleiner Teil aller entstehenden Schwangerschaften des Menschen entwickeln sich erfolgreich weiter [5]. Schon früh in einer Schwangerschaft herrscht an der feto-maternalen Grenzschicht ein Zusammenspiel von mütterlichen Immunzellen und fetalen Trophoblastzellen. Die Plazenta stellt

eine Art Filtermembran dar, die mütterliches und fetales Blut voneinander trennt, aber dennoch einen umfassenden Stoff- und Gasaustausch ermöglicht [64]. An dieser Grenzschicht müssen immunologische Toleranzmechanismen entwickelt werden um eine Abstoßung des Feten zu verhindern.

Lange Zeit wurde die Schwangerschaft als ein hauptsächlich durch eine Veränderung der T-Zell-Antwort getragenes immunologisches Phänomen betrachtet [69]. T-Zellen stellen während der Schwangerschaft durch die Unterscheidung von Selbst und Nicht-Selbst einen wichtigen Schalt- und Kontrollpunkt im Immunsystem dar [69-71]. Während einer komplikationslosen Schwangerschaft scheinen besonders die regulatorische T-Zellen bei der immunologischen Toleranz gegenüber dem Feten eine wichtige Rolle zu spielen, indem sie eine Immunreaktion gegen fetale Antigene unterdrücken. Sie akkumulieren an der feto-maternalen Grenzschicht und können durch den Oberflächenrezeptor CTLA-4 hemmende Signale auf andere Immunzellen vermitteln [72]. Bei Patientinnen mit Aborten oder Präeklampsie (Schwangerschaftsvergiftung), einer ebenfalls immunologischen Schwangerschaftskomplikation, die mit intrauteriner Wachstumsretardierung und mütterlichem Bluthochdruck einhergeht und im Extremfall bis zum Tod der Mutter führen kann, sind T_{regs} in verminderter Zahl nachweisbar [73-75].

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass es durch Depletion von $CD25^+$ regulatorischen T-Zellen zu einer erhöhten Resorptionsrate kommt [76] und dass die erhöhte Abortrate im immunologischen Abortmodell ($\text{♀CBA/J} \times \text{♂DBA/2J}$) durch Transfer von T_{regs} gesenkt werden konnte [77]. Neben der Akkumulation von T_{regs} kommt es während einer Schwangerschaft zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von proinflammatorischen T-Helfer-Zellen 1 (Th1) und antiinflammatorischen T-Helfer-Zellen 2 (Th2) in Richtung von Th2-Zellen und einer damit verbundenen Überproduktion von Th2-Zytokinen. Die Produktion von antiinflammatorischen IL-4 und IL-10 an der feto-maternalen Grenzschicht begünstigt die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft [70, 74, 78, 79]. Bei Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie und Aborten ist dieses Gleichgewicht gestört, und es kommt häufiger zu einer Aktivierung von Th1-Zellen und einer damit verbundenen Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) [80-82]. Lange Zeit galt diese Th1-Th2-Balance als maßgebend und eine erfolgreiche Schwangerschaft wurde als „Th2-Phänomen“ postuliert [69]. Neue Forschungsergebnisse legen nahe, dass dies nur ein Teil der tatsächlichen Vorgänge, die sich während einer Schwangerschaft abspielen, widerspiegelt.

Außerdem wurde beschrieben, dass T-Helfer-Zellen-17 (Th17) im Rahmen von Aborten vermehrt akkumulieren und durch die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 mit Schwangerschaftskomplikationen und Frühgeburtlichkeit assoziiert werden [83-85].

Eine weitere, für den Schwangerschaftserhalt, wichtige Zellpopulation sind NK-Zellen. Uterine NK-Zellen (CD16⁺CD56^{hi}) unterscheiden sich von NK-Zellen aus dem peripheren Blut (CD16⁺CD56^{lo}) in Morphologie und Funktion und tragen in dieser speziellen Form durch Enzym- und Zytokinsekretion zum Erhalt der Schleimhaut und der Blutgefäße bei [86]. Uterine NK-Zellen sind nicht zytotoxisch, sondern für den strukturellen Umbau der Spiralarterien und der Implantation des Embryos mitverantwortlich. Sie induzieren durch die Expression von VEGF die Angiogenese [87]. In zahlreichen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von NK-Zellen und dem Auftreten von Fehlgeburten belegt [86, 88, 89].

1.6 MHC-Moleküle

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex, MHC-Komplex) wurde 1936 in England von Peter Gorer bei Studien zur Gewebsverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Mäusen erstmalig beschrieben [90]. Ein paar Jahre später wurde der MHC-Komplex auch beim Menschen nachgewiesen [91]. Seitdem wird angenommen, dass alle Vertebraten, welche ein lymphatisches System besitzen, einen MHC-Komplex tragen [92]. Beim Menschen liegt der MHC-Komplex auf dem Chromosom 6. Bei der Maus ist der MHC-Komplex auch unter dem Namen H-2-Komplex bekannt und befindet sich auf Chromosom 17, einem der kürzesten Maus-Chromosomen [93].

MHC-Moleküle sind heterodimere Transmembran-Glykoproteine, welche beim Menschen erstmals auf der Oberfläche von Leukozyten entdeckt wurden und daher auch als Humane Leukozyten Antigene (HLA) bezeichnet werden [94]. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Immuntoleranz und der Entstehung von Immunantworten. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, die sich in ihrer Struktur, ihrer Funktion und dem Vorkommen unterscheiden.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden in klassische MHC-Ia-Moleküle (HLA-A, -B und -C) und nicht-klassische MHC-Ib-Moleküle (HLA-E, -F und -G) eingeteilt. MHC-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer schweren α -Kette (44 kDa), die im MHC-Locus auf Chromosom 6 codiert ist und einer leichten, nichtkovalent angelagerten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (12 kDa), die bei Menschen auf Chromosom 15 codiert ist.

Die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und sind innerhalb der menschlichen Population hoch polymorph. Sie sind Bestandteil der Immunantworten und präsentieren körpereigene und körperfremde Peptidstücke, die von intrazellulären Proteinen stammen und im Proteasomen zerlegt wurden, auf der Membranoberfläche. Verschiedene Toleranzmechanismen verhindern, dass körpereigene Peptide eine Immunantwort auslösen. Treten fremde Peptide auf, interagieren die

MHC-I-exprimierende Zellen mit CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und führen durch Apoptose und Lyse zur Eliminierung von z. B. virusinfizierten oder entarteten Zellen.

Die nicht-klassischen MHC-Ib-Moleküle sind weniger polymorph und unterscheiden sich auch in ihrer Funktion von den klassischen MHC-Molekülen. Das in dieser Arbeit untersuchte nicht-klassische MHC-Molekül HLA-G wird hauptsächlich von Stammzellen und Trophoblastzellen exprimiert und vermittelt hemmende Signale an NK-Zellen oder T-Zellen. Es dient vermutlich der Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz und hat auch bei pathologischen Tumor- und Infektionserkrankungen eine hemmende Wirkung auf immunologische Prozesse [14].

MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DP und -DQ) werden hauptsächlich von Immunzellen exprimiert, darunter B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen. Sie bestehen aus zwei nahezu gleich großen Ketten (α -Kette: 33 kDa, β -Kette: 30 kDa), die beide in der Membran verankert sind. Sie präsentieren Peptide von Pathogenen, die durch Phagozytose oder Endozytose in die Zelle aufgenommen und proteolytisch fragmentiert wurden. Der MHC-Antigen-Komplex bindet an den T-Zell-Rezeptor von CD4⁺ T-Helferzellen. Durch diese Interaktion vermehren sich die T-Helferzellen und werden aktiviert. Die aktivierten T-Helferzellen unterstützen mittels der Produktion von Zytokinen die Antikörper-produzierenden B-Zellen und die zytotoxischen T-Zellen bei der Abwehr von Pathogenen [95]. Sie dienen der Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd durch das Immunsystem und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen im Thymus, der Antigenerkennung durch T-Zellen, der Abstoßung von Transplantaten und der Entwicklung von immunologischen Erkrankungen [14].

1.6.1 HLA-G

Das nicht-klassische MHC-Ib-Molekül HLA-G wird anders als die klassischen MHC-Ia-Moleküle nicht ubiquitär exprimiert, sondern spielt vor allem während der Schwangerschaft eine Rolle, wo es von Trophoblastzellen an der feto-maternalen Grenzschicht exprimiert wird [96].

Es unterscheidet sich von anderen HLA-Klasse-I-Molekülen durch (i) einen geringeren Polymorphismus [97], (ii) eine eingeschränkte Gewebeverteilung, (iii) ein durch alternatives Spleißen erzeugtes besonderes Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen und (iv) besondere biologische Eigenschaften, die Immuntoleranz vermitteln [98, 99].

Das Gen für HLA-G liegt beim Menschen, wie alle HLA-Gene, im MHC-Komplex auf dem Chromosom 6. Durch alternatives Spleißen existieren vier membrangebundene Isoformen (HLA-G 1, HLA-G 2, HLA-G 3 und HLA-G 4) und drei lösliche Isoformen (HLA-G 5, HLA-G 6 und HLA-G 7) [100, 101] (Abbildung 7).

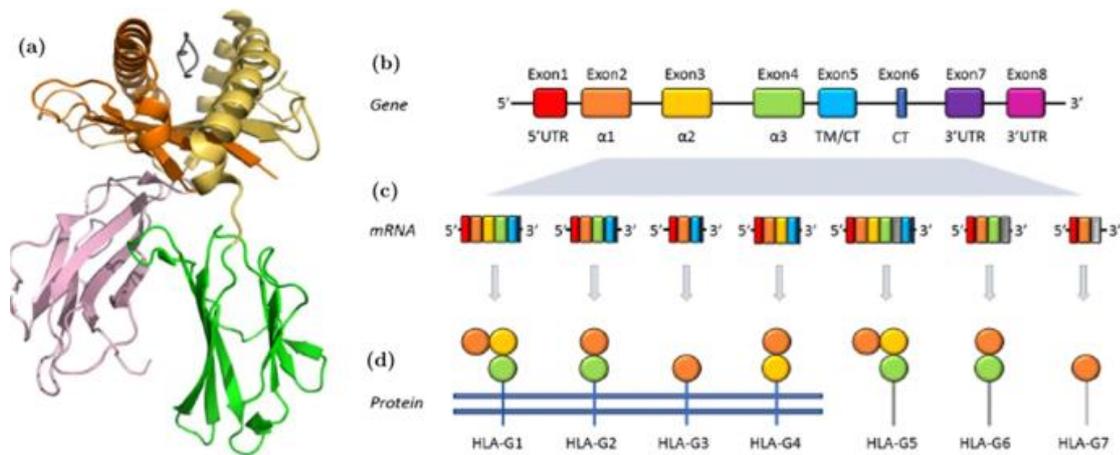


Abbildung 7: HLA-G und seine sieben Isoformen [101]

Struktur des extrazellulären HLA-G-Komplex (a), das Gen für HLA-G (b), die mRNA-Transkripte (c) sowie die daraus resultierenden Proteine (d). Durch alternatives Spleißen entstehen die vier membrangebundene Isoformen (HLA-G 1-HLA-G 4) und drei löslichen Isoformen (HLA-G 5-HLA-G 7) (Bildquelle: Scarabel et al., 2020).

Im Gegensatz zu den klassischen MHC-I-Molekülen dient HLA-G nicht der Antigenpräsentation, sondern hat ausschließlich immunregulatorische Funktionen. Neben seiner membrangebundenen Expression auf Trophoblastzellen an der feto-maternalen Grenzschicht der Plazenta [96] wird es während der Schwangerschaft auch ins Blut der Schwangeren sezerniert und ist hier im Vergleich zu nicht schwangeren Individuen in deutlich erhöhter Menge zu finden [102, 103]. Die HLA-G-Expression korreliert dabei mit der Invasivität der extravillösen Trophoblasten [104]. Bei Patientinnen mit Aborten und Frauen mit Präeklampsie sind die Serumspiegel von HLA-G deutlich vermindert [105-107]. HLA-G scheint auch in der Frühschwangerschaft während der Embryonalentwicklung eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei *in-vitro* Fertilisation (IVF) die Expression von HLA-G auf dem embryonalen Gewebe mit dem IVF-Erfolg korreliert [108]. Ein weiteres Indiz für einen Zusammenhang einer HLA-G-Expression und der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ist die Assoziation von einigen HLA-G-Allelen mit Fehlgeburten. Der HLA-G Genotyp beeinflusst die Serumkonzentration von löslichem HLA-G [109].

Die immunregulatorischen Funktionen von HLA-G werden durch Bindung an die Rezeptoren Immunglobulin-like Transkript (ILT) 2 und 4 und den Killerzell-Immunglobulin-like Rezeptor (KIR) 2DL4 vermittelt [110-114]. Die Rezeptoren ILT2 und ILT4 sind auf Monozyten, Makrophagen, DCs, B- und T-Zellen [115] und auf MDSC [56] exprimiert, KIR2DL4 auf NK-Zellen. Bindet HLA-G an diese Rezeptoren, werden die Immunzellen direkt funktionell beeinflusst. Zu den Effekten gehören eine Hemmung der T-Zell-Proliferation [116], eine Hemmung der Zytotoxizität von NK-Zellen [117] sowie eine Hemmung von antigenspezifischer T-Zell-Zytotoxizität [118]. Das, von Trophoblasten exprimierende HLA-G bindet an den hemmenden NK-Zell-Rezeptor KIR2DL,

verhindert dadurch die Aktivierung mütterlicher NK-Zellen und der Fetus wird von einem Angriff des mütterlichen Immunsystems geschützt [119]. Aufgrund seiner spezifischen Expression und der immunmodulatorischen Funktionen gilt HLA-G als ein wesentlicher Vermittler der feto-maternalen Toleranz [102].

Neben der physiologischen Bedeutung während der Schwangerschaft wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften von HLA-G auch unter pathologischen Zuständen wie viralen Infektionen [120], Autoimmunerkrankungen (z.B. Psoriasis) [121], Entzündungsreaktionen [122], Transplantationen [123] und Tumorerkrankungen [100] beschrieben. In pathologischen Geweben wird HLA-G durch den Tumor, virusinfizierte oder transplantierte Zellen und auch durch die Infiltration von Immunzellen exprimiert. Beispielsweise führt im Rahmen von Transplantationen eine erhöhte HLA-G Expression im Transplantat und im Plasma zu einer besseren Akzeptanz und einer verlangsamten Abstoßung des Transplantats [124, 125]. Bei Tumoren vermittelt die Expression von HLA-G einen Schutz vor NK-Zell- und zytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelte Zytolyse [126], wodurch das Tumorstadium gefördert wird. Carosella et al. haben HLA-G als eine Art Schutzschild für Tumore bezeichnet [127].

Einige wenige Arbeiten untersuchten bisher die Wechselwirkungen von HLA-G mit MDSC. Im Tumormodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von HLA-G zu einer Akkumulation von MDSC, zum Verlust von peripheren T-Zellen und der Verschiebung der Th1/Th2-Balance zugunsten von Th2 führt, wodurch der Tumor vor einem Angriff des Immunsystems geschützt ist [32, 126, 128-130]. Darüber hinaus konnte in einem murinen Transplantationsmodell gezeigt werden, dass die Injektion von HLA-G die Abstoßung des Transplantats verzögert [131].

Die Untersuchung der Wirkung von HLA-G im Mausmodell ist deshalb möglich, weil HLA-G auch an den murinen gepaarten immunoglobulinähnlichen Hemmrezeptor Rezeptor (engl. paired-immunoglobulin like transcript B, PIR-B) bindet [129]. Unsere Arbeitsgruppe konnte *in-vitro* zeigen, dass lösliches HLA-G während der Schwangerschaft zu einer Expansion und funktionellen Aktivierung von MDSC führt und dass dieser Effekt über den Rezeptor ILT4 vermittelt wird [56].

HLA-G ist auch in extrazellulären Vesikeln (EVs) enthalten. Dies wurde erstmals in einer Melanom-Zelllinie beschrieben [132]. Extrazelluläre Vesikel sind Membranvesikel, die Cytosolfragmente enthalten und von nahezu jeder Zelle sezerniert wird. Man unterscheidet zwischen Mikrovesikeln (100-1000 nm) und Exosomen (50-150 nm). Extrazelluläre Vesikel enthalten Lipide, mRNA, microRNA, Oberflächenproteine und viele weitere Moleküle wie Zytokine, Transkriptionsfaktoren etc. Sie vermitteln dadurch komplexe Informationen von einer Zelle zur anderen [133]. Kshirsagar et al. beschrieben Exosomen, die HLA-G enthalten und von der Plazenta abgegeben werden [134].

1.6.2 Qa2

Das murine MHC-I-Molekül Qa2 gilt als Korrelat zum humanen HLA-G [135, 136]. Qa2 hat eine ähnliche Struktur und seine Funktionen bei der Immunregulation von Tumorerkrankungen [137] und der Embryonalentwicklung [138] sind mit denen des humanen HLA-G-Moleküls vergleichbar. Sowohl HLA-G- als auch Qa2-Moleküle haben membrangebundene und lösliche Formen, die durch alternatives Spleißen entstehen [98]. Ein Unterschied besteht darin, dass Qa2 über eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Verknüpfung an die Zellmembran gebunden ist [139], während HLA-G mit einer kurzen Aminosäurekette in die Zellmembran ragt [140]. Es gibt vier Qa2-Loci (Q6, Q7, Q8 und Q9), die sich in verschiedenen Kombinationen in der Qa2-Region auf Chromosom 17 befinden [141].

Die Qa2-Moleküle sind Produkte des *Ped*-Gens (preimplantation embryo development), welche 1981 von Verbanac und Warner entdeckt wurden, als sie beobachteten, dass die Rate der Präimplantationsentwicklung unter den Inzuchtstämmen von Mäusen variierte [142]. Das *Ped*-Gen hat zwei funktionelle Allele, *Ped fast* und *Ped slow*. Es beeinflusst die präimplantationelle Embryonalentwicklung und das spätere embryonale Überleben [143, 144]. Mäuse, die das Qa2-Protein exprimieren, weisen eine schnellere Rate der Präimplantations-Entwicklung (*Ped fast*, Qa2-positiv, B6.K2) im Vergleich zu Mäusen auf, denen das Qa2-Protein fehlt (*Ped slow*, Qa2-negativ, B6.K1) [144], was wiederum eine Trächtigkeit positiv beeinflusst [145]. Wird das Qa2-Protein enzymatisch von der embryonalen Zelloberfläche von Qa2-positiven Mäusen entfernt, entwickeln diese einen Qa2-negativen Phänotyp [146]. Umgekehrt erhöht eine Injektion des Q9-Gens, das das Qa2-Antigen kodiert, in Qa2-negativen Mäusen die Rate der Präimplantations-Entwicklung signifikant [147].

In Bezug auf die Trächtigkeit wurde bisher beschrieben, dass Qa2-defiziente Mäuse kleinere Feten und eine geringere Wurfgröße [148] sowie eine zu Beginn des Lebens schlechtere Überlebensrate haben [142] als Qa2-positive Tiere. Die Ursache hierfür ist bisher nicht bekannt. Außerdem führt die Expression von Qa2 auf Embryonen zu einem besseren intrauterinen Überleben [145] und bei Fehlen des Qa2-Moleküls kommt es erst in der Spätschwangerschaft zu einem erhöhten Verlust an Feten [149]. Es wird vermutet, dass das Qa2-Protein den sich entwickelnden Feten vor dem Angriff der mütterlichen NK-Zellen und/oder Makrophagen schützt und dass es beim Fehlen des Qa2-Proteins zu einer höheren Resorptionsrate kommt [142]. Dies deutet darauf hin, dass ebenso wie HLA-G bei Menschen, Qa2 bei der Maus eine Bedeutung für einen erfolgreichen Trächtigkeitsverlauf haben könnte [148]. Neben dem Vorteil während der Embryonalentwicklung wird dem Qa2-Protein auch postnatal eine Bedeutung zugeschrieben; es soll positiv zum Wachstum der Tiere und zur Entwicklung der Herzfunktion beitragen [138]. Qa2-defiziente Tiere entwickeln im späteren Leben häufiger eine arterielle Hypertonie [150].

Der Rezeptor für Qa2 ist bisher nicht bekannt. Ein potenzieller Kandidat ist der gepaarte Immunglobulinähnliche Hemmrezeptor (PIR-B), das murine Ortholog der humanen ILT-Familie [151, 152]. Für PIR-B konnte gezeigt werden, dass es mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagiert [153]. Außerdem bindet humanes HLA-G an PIR-B, wodurch die Möglichkeit entsteht, die Wirkung von HLA-G im Mausmodell zu untersuchen [130, 131]. Es wird auch beschrieben, dass Qa2 an den Rezeptor Ly49C auf NK-Zellen bindet, welcher bei Mäusen als funktionelles Gegenstück zu dem humanen KIR-Rezeptor gilt und sowohl hemmende als auch aktivierende Funktionen ausübt [154].

Hinsichtlich pathologischer Zustände, bei denen die Expression von Qa2 eine Bedeutung haben könnte, konnte in einem murinen Hauttransplantationsmodell gezeigt werden, dass eine erhöhte Qa2-Expression mit einem verlängerten Transplantationsüberleben einhergeht und dass während einer Abstoßung des Transplantates die Qa2-Expression abnahm [155].

Trotz der Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion während der Embryogenese, der Autoimmunität und bei Transplantationen verhalten sich Qa2 und HLA-G im Zusammenhang mit Tumoren entgegengesetzt. Während HLA-G den Tumorzellen hilft, sich der Immunüberwachung zu entziehen, indem es direkt mit inhibitorischen Rezeptoren interagiert, die angeborene und adaptive Immunzellen in ihrer Funktion einschränken, scheint Qa2 NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen zu aktivieren und ermöglicht so eine effektivere Bekämpfung des Tumors [156].

1.7 Zielsetzung

Die immunologischen Mechanismen, die eine komplikationslose Schwangerschaft ermöglichen, wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Jedoch ist bis heute nicht abschließend geklärt, wie der Fetus vor einer Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem geschützt ist und durch welche Mechanismen es in einigen Fällen trotzdem zu einer Abstoßung kommt.

Ein bisher gut untersuchter Faktor während der Schwangerschaft ist das nicht-klassische MHC-Ib-Molekül HLA-G. Es gilt als Vermittler der feto-maternalen Toleranz. Qa2 ist das murine Korrelat zu HLA-G. Außerdem ist bereits beschrieben, dass myeloide Suppressorzellen (MDSC) eine wichtige Rolle für den Schwangerschaftserhalt spielen.

Die Bedeutung von Qa2, für die MDSC-Akkumulation während der Trächtigkeit bei Mäusen und für den Verlauf der Trächtigkeit war bisher nicht untersucht. In der hier vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Hypothesen untersucht werden:

- 1) Ein Fehlen von Qa2 führt zu einer verminderten Akkumulation von MDSC während der Trächtigkeit bei Mäusen und damit zu einem vermehrten Auftreten von Aborten.
- 2) Die Gabe von löslichem HLA-G (sHLA-G) während der Trächtigkeit führt zu einer vermehrten MDSC-Akkumulation und verhindert das Auftreten von Aborten.

Ziel war es, die Interaktion von MDSC und HLA-G bzw. Qa2 während der Schwangerschaft/Trächtigkeit und damit die Pathogenese von immunologischen Schwangerschaftskomplikationen besser zu verstehen und zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden ausschließlich Mäuse als Versuchstiere verwendet. Die verschiedenen Mauslinien stammten von Charles River oder dem Jackson Laboratory (Tabelle 2). Geliefert wurden sie in einem Alter von sechs bis acht Wochen. Die Adaptionszeit bis zum Versuchsbeginn betrug mindestens zwei Wochen. Die Tiere wurden sowohl in individuell ventilierten Käfigen (IVC), als auch in einer offenen Käfighaltung in Typ II-Käfigen mit einer Nutzfläche von 530 cm² gehalten. Der Hell-Dunkel-Zyklus betrug jeweils 12 Stunden.

Die weitere Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in enger Zusammenarbeit mit den zuständigen Tierpflegern bis Mai 2019 in der Einrichtung für Tierhygiene (EtH), Silcherstr. 7/2 und ab Juni 2019 in der Tierhaltung HNO/Augenklinik, Elfriede-Aulhorn-Str. 5-7 in Tübingen.

Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien

Mausstamm	Stock	Herkunft
C57BL/6J	000664	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
B6.Cg-H2 ^{b3} /FlaCmwJ (B6.K1)	007958	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
CBA/J	000656	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
HIF-KO (B6.129-Hif1a ^{tm3Rsjo} /J gekreuzt mit B6.129P2-Lyz2 ^{tm1^(cre)lfo} /J)	007561 & 004781	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

C57BL/6J (Wildtyp, WT)

C57BL/6J ist einer der ältesten und weltweit verbreitetsten Inzuchtstämme und wird sowohl in der Neurologie, Entwicklungsbiologie als auch in der immunologischen Forschung als Kontrollstamm eingesetzt. Inzuchtstämme werden in der Forschung bevorzugt eingesetzt um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Tierversuchen zu gewährleisten [157].

B6.Cg-H2^{b3}/FlaCmwJ (Qa2-)

Die Qa2-Defizienz des B6.Cg-H2^{b3}/FlaCmwJ Mausstamms ist durch das Fehlen des Qa2-Proteins aufgrund einer Spontanmutation im *Ped*-Gen vom C57BL/6J-Stamm gegeben. Das *Ped*-Gen und dessen Produkt, das Qa2-Protein, sind vor allem in der embryonalen und postnatalen Entwicklung von Bedeutung [148].

Durch die Spontanmutation kommt es bei Qa2-Mäusen (B6.Cg-H2^{b3}/FlaCmwJ) im Vergleich zu WT-Mäusen (C57BL/6J) auch zu keiner Qa2-Expression auf Zelloberflächen (Abbildung 8).

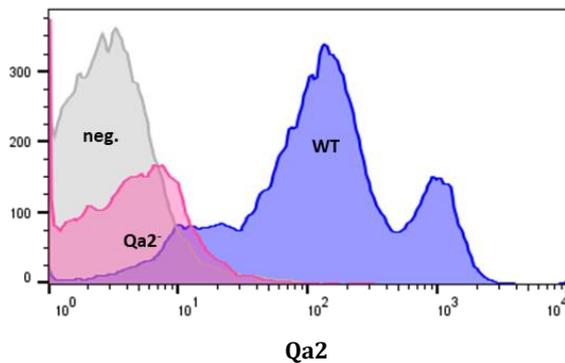


Abbildung 8: Qa2-defiziente Mäuse exprimierten auf der Oberfläche von Milzzellen kein Qa2.

Nicht trüchtige Mäuse wurden getötet und die Organe entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die Qa2-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen, die die Expressionsstärke von Qa2 auf der Oberfläche von Milzzellen von WT- (blau) und Qa2-Mäusen (pink) zeigt. Als Kontrolle diente eine Negativfärbung ohne Antikörper (grau).

CBA/J

Dieser Inzuchtstamm wird ebenfalls als Kontrollstamm in den verschiedensten Forschungsbereichen (z. B. Embryonalentwicklung, Immunologie, Stoffwechsel- und Infektionserkrankungen) eingesetzt. Der Mausstamm wurde für die intraperitoneale Applikation von sHLA-G zur Induktion von MDSC gewählt, da diese Versuche als Pilotstudie für weitere Versuche in einem immunologischen Abortmodell (♀CBA/J x ♂DBA/2J) [158, 159] geplant waren.

HIF-KO

HIF-1 α^{lox} - (B6.129-Hif1a^{tm3Rsj}/J) und LysMcre-Mäuse (B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)}/J) wurden gekreuzt um doppelt homozygote Tiere für die Allele HIF-1 α^{lox} und LysMcre zu erhalten. Diese Tiere tragen dann einen Knockout (KO) von HIF-1 α in myeloischen Zellen. Die Mäuse wurden verwendet um die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α für die Expression von Qa2 auf MDSC besser zu untersuchen [160].

2.1.2 Genehmigungen Tierexperimente

Die Planung der Tierexperimente erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Tierärzten der Einrichtung für Tierschutz/Tierärztlicher Dienst und Labortierkunde unter der Leitung von Dr. med. vet. F. Iglauer. Die Genehmigungen erfolgten im Vorhinein durch das Regierungspräsidium Tübingen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Liste der für diese Arbeit genehmigten Tierversuche

Genehmigung	Titel	Mauslinie
K2/17	Pilotstudie: Die Wirkung von löslichem HLA-G (sHLA-G) auf die Akkumulation von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) <i>in-vivo</i>	CBA/J
K09/18 G	Untersuchung einer zyklusabhängigen Regulation von Qa2 bei weiblichen C57BL/6J-Mäusen	C57BL/6J
K02/19G	Analyse des Schwangerschaftsverlaufs nach adoptivem Transfer von MDSC und Applikation von löslichem HLA-G in bzw. an Qa2-defiziente Mäusen	B6.Cg-H2 ^{b3} /FlaCmwJ & C57BL/6J
§4-Mitteilung vom 06.10.16	Expression und Funktion von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) in der trächtigen Qa2-defizienten Maus	B6.Cg-H2 ^{b3} /FlaCmwJ & C57BL/6J
K05/19M	Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung der Expression von Qa2 für den Verlauf der Trächtigkeit	C57BL/6J
K09/19M	Untersuchungen der Qa2-Expression nach Östrogen-Stimulation bei HIF-KO-Mäusen	HIF-KO

2.1.3 Patientenproben

Die verwendeten Vollblutproben stammten von gesunden Erwachsenen und Schwangeren mit bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme komplikationslosem Schwangerschaftsverlauf. Ausgeschlossen wurden Probandinnen mit akuten oder chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder unter immunmodulatorischer Therapie. Die Sammlung der Blutproben erfolgte von August bis Oktober 2019.

Die Blutentnahmen bei zufällig gewählten Erwachsenen erfolgten im Labor für Neonatale Immunologie und Immuntoleranz durch perkutane Venenpunktion in mit 2 ml Heparin (100 I.U./ml) präparierten 50 ml-Spritzen.

Die Blutentnahmen bei Schwangeren erfolgten nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung durch den niedergelassenen Gynäkologen Dr. med. Alexander Marmé in Tübingen. Eine entsprechende Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Tübingen

(Ethikvotum 682/2016B01) lag vor. Alle entnommenen Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme ohne jegliche Identifizierungskennzeichnungen weiterverarbeitet.

2.1.4 Antikörper

Die benötigten Antikörpermengen wurden in Vorversuchen durch Titration bestimmt.

2.1.4.1 humane Antikörper

Bei den folgenden Antikörpern handelte es sich um „Mouse Anti-Human“-Antikörper (Tabelle 4).

Tabelle 4: Liste der verwendeten humanen Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
CD66b FITC	G10F5	BD Bioscience, Art.#: 555724
HLA-G PE	MEM-G/9	Exbio, Art.#: 1P-292-C025

2.1.4.2 murine Antikörper

Soweit nicht anders angegeben handelte es sich bei den folgenden Antikörpern um „Rat Anti-Mouse“-Antikörper (Tabelle 5).

Tabelle 5: Liste der verwendeten murinen Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
CD3 FITC	145-2C11	BD Bioscience, Art.#: 553061
CD3 PE	17A2	BD Bioscience, Art.#: 555275
CD4 APC	RM4-5	BD Bioscience, Art.#: 561091
CD8a APC-H7	53-6.7	BD Bioscience, Art.#: 560182
CD8a PE	53-6.7	BD Bioscience, Art.#: 553032
CD11b AlexaFluor647	M1/70	BD Bioscience, Art.#: 557686
CD19 PE	1D3	BD Bioscience, Art.#: 557399
CD25 BB515	PC61	BD Bioscience, Art.#: 564424
CD39 PE	Duha59	BioLegend, Art.#: 143803
CD44 BB700	IM7	BD Bioscience, Art.#: 566506
CD45 BV510	30-F11	BD Bioscience, Art.#: 563891
CD45 PerCp	30-F11	BD Bioscience, Art.#: 550994
CD62L BV421	MEL-14	BD Bioscience, Art.#: 562910
CD73 PE	TY/23	BD Bioscience, Art.#: 550741
CD183 BB700 (CXCR3)	CXCR3-173	BD Bioscience, Art.#: 742274, Hamster Anti-Mouse
CD196 BV421 (CCR6)	140706	BD Bioscience, Art.#: 564736

Foxp3 PE	FJK-16s	eBioscience, Art.#: 12-5773-80
FSV700 AlexaFluor700		BD Bioscience, Art.#: 564997
Gr1 FITC	RB6-8C5	BD Bioscience, Art.#: 553126
Gr1 PerCp	RB6-8C5	BD Bioscience, Art.#: 552093
Ly6C FITC	AL-21	BD Bioscience, Art.#: 553104
Ly6G PE	1A8	BD Bioscience, Art.#: 551461
NK1.1 APC	PK136	BD Bioscience, Art.#: 561117
PIR-A/B PE	6C1	BD Bioscience, Art.#: 550349
Qa2 PE	REA523	Miltenyi, Art.#: 130-107-907

2.1.5 Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Kits nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits

KIT	Herstellerangaben
BCA Protein Assay Kit [161]	Thermo Fisher Scientific, Art.#: 23225
CD4 ⁺ T-Zell Isolation Kit mouse [162]	Miltenyi, Art.#: 130-104-454
MDSC Isolation Kit mouse [163]	Miltenyi, Art.#: 130-094-538
RNeasy Mini Kit [164]	Qiagen, Art.#: 74104

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Herstellerangaben
17 β -Estradiol	Millipore by Merck, 1GM, Art.#: 3301-1GM
Acrylamid	ROTIPHORESE®Gel 30, Carl Roth GmbH, Art.#: 3029.1
Anoxiebeutel	AnaeroGen 2,5l, ThermoFisher, Art.#: AN0025A
Anti-human CD3 purified (Clone: OKT3)	BioLegend, Conc. 1 mg/ml; Art.#: 317304
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, 250 g, Art.#: 09718-250G
Ampuwa ® Spüllösung	Fresenius, Plastipur Aqua ad injectabilia, Art.#: B23067A
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, \geq 98 %, p.a., ACS, 50 g, Art.#: 9592.3
β -Mercaptoethanol	Merck, Art.#: M3148-25ML
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Art.#: B5525-10G

Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, density: 1,077 g/ml, Art.#: L6115
BSA	Pan Biotech, Art.#: P06-1402500
CFSE	Invitrogen, Vybrant® CFDA-SE Cell Tracer Kit, Art.#: 864067
Coomassie Blau R-250	ThermoFisher, Art.#: 20278
DMEM-Medium	Gibco by ThermoFisher, 500ml, Art.#: 41966-029
Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28	Gibco by ThermoFisher, 2ml, Art.#: 11452D
EDTA	Roth, 250 g, Art.#: 8043.1
Ethanol absolute p.A.	AppliChem GmbH, 2500PE/UN1170, Art.#: A1613
Eosin	Merck KGaA, Art.#: 102439
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Art.#: 45754
FACS-Flow	BD Bioscience, 20 l, Ref#: 342003
FCS	Biochrom GmbH, 500 ml, Art.#: S0115
Flow Cytometry Staining Buffer	ThermoFisher, Art.#: 00-4222-57
Formaldehyd (4,5 %ig)	SigmaAldrich, Art.#: 100496
Foxp3/Transkriptionfaktor Staining Set	ThermoFisher, Art.#: 00-5523-00
G-CSF	PeptoTech, Art.#: 250-05
GM-CSF	PeptoTech, Art.#: 315-03
Glycerol	SigmaAldrich, Art.#: G9012-100ML
Glycin	SigmaAldrich, Art.#: G8898-500G
Hämalaunlösung, Mayers	Merck KGaA, 2,5 l, Art.#: 1092492500
Heparin-Natrium-5000	Ratiopharm, Injektionslösung, 5×0,2 ml (5000 I.E./0,2 ml)
HSA	Pan Biotech, Art.#: P06-27100
IL-2	R&D, recombinant mouse, Art.#: 402-ML-020
Isofluran	CP-Pharma, 250 ml, Art.#: 798-932
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius, Infusionslösung-Natriumchlorid
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	SigmaAldrich, Art.#: 60339-500G
LB-Medium	Invitrogen, Lennox L Broth Base, Art.#: 12780-052
L-Glutamin	SigmaAldrich, concentration: 200mM, Art.#: G7513
Methanol	AppliChem GmbH, Art.#: 131091.1211
Natriumazid (NaN ₃)	SigmaAldrich; 20 %ig, Art.#: 609374-500MG
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Art.#: 1064040500

Proteinmarker 10-180 kDa	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher, Art.#: 26617
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, 500 ml, Art.#: L1825
Penicilin/Streptomycin	Biochrom, 50 ml, Art.#: A2212
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche, Tabletten, Art.#: 11697498001
PMSF	Thermo Fisher, Art.#: 36978
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom GmbH, 500 ml, Art.#: F1215
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich, Art.#: H1758-100ML
SDS	Sigma Aldrich, Art.#: L3771-100G
sHLA-G	Fred Hutchinson Cancer Research Center, Class-I-monomer (1 mg)
Streptavidin	BioLegend, Art.#: 280302
TEMED	Carl Roth, ≥99 %, p.a., Art.#: 2367.3
TrisBase	Sigma Aldrich, Art.#: 93362-250G
Triton X 100	Sigma Aldrich, Art.#: X100-100ML
Trypanblau 0,4 %	Sigma Aldrich, Art.#: T8154-100ML
Trypsin-EDTA	Pan Biotech, Trypsin 0.5 %/EDTA 0.2 %, Art.#: P10-024100

2.1.7 Kulturmedien und Puffer

Tabelle 8: Liste der verwendeten Kulturmedien und Puffer mit ihrer Zusammensetzung

Kulturmedium/Puffer	Verwendung	Zusammensetzung
Ammoniumchlorid	Erythrozyten-Lyse	83 g NH ₄ Cl 10 g KHCO ₃ 0,3772 g EDTA (292,25g/ml) 900-950 ml VE-Wasser
Coomassie-Färbelösung	Einfärbung von Gelen	0,05 % Coomassie Blau R-250 10 % Essigsäure 50 % Methanol
DMEM-Medium	Zellkultur murin	DMEM Medium 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % P/S
FACS-Puffer	Waschen von Antikörperfärbungen	FACS-Flow 0,1 % NaN ₃

LB-Medium	Bakterienkulturen	5 g LB Broth Base 250 ml Ampuwa
Ladepuffer	Probenvorbereitung für Western Blot	1,25 ml Tris Base pH 6,8 1 M 4 ml SDS 10 % 2 ml Glycerol 1,75 ml Ampuwa 1 mg Bromphenolblau 100 µl Mercaptoethanol 14,3M
Laufpuffer	Elektrophorese	30 g Tris Base 144 g Glycin 10 g SDS mit VE-Wasser auf 1 L auffüllen
Lysepuffer	Westernblot und SDS-Page	4,3 ml Ampuwa 250 µl Tris/HCl pH 7,4 1 M 100 µl NaCl 5 M 50 µl 10%-Triton x 100 200 µl PIC 50 µl PMSF 100 mM
MACS-Puffer	MACS	PBS 0,5 % BSA/HSA 2 mM EDTA
RPMI-Medium	Zellkultur human und murin	RPMI 1640 Medium 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % P/S
Sammelgel (10 %ig)	SDS-Page	5,86 ml Ampuwa 990 µl Acrylamid 30 % 450 µl Tris/HCl pH 6,8 1 M 32,6 µl APS 10 % 7,6 µl TEMED
Trenngel (10 %ig)	SDS-Page	8 ml Ampuwa 6,6 ml Acrylamid 30 % 5 ml Tris/HCL pH 8,8 1,5 M 200 µl SDS 10 % 100 µl APS 10 % 10µl TEMED

2.1.8 Geräte

Tabelle 9: Liste der verwendeten Großgeräte

Geräte	Herstellerangaben
autoMACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Calibur	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS LSR	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Hämozytometer SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland
Mikroplatten-Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Spektrophotometer Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Power Supply Consort E831	Consort bvba, Turnhout, Belgien

2.1.9 Software

Tabelle 10: Liste der verwendeten Softwares für Messungen und Auswertungen der Daten

Software	Herstellerangaben
CellQuestPro (2011)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
EndNote x9 (2019)	Thomas Reuters, New York City, USA
FACSDiva 8	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo V10	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 8.1.0 (2018)	GraphPad Software, San Diego, USA
Magellan 6	STÜBER SYSTEMS GmbH, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 14	Microsoft Office, Albuquerque, USA
Nanodrop2000	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
String Datenbank (2019)	European Molecular Biology Laboratory (EMBL) & Universität Zürich

2.2 Methoden

Alle Experimente wurden in einem vollausgestatteten Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

2.2.1 Terminierte Verpaarung

Mäuse erreichen ihre Geschlechtsreife im Alter von sechs bis sieben Wochen. Sie sind polyöstrisch, d.h. sie besitzen mehrere Zyklen pro Jahr und zeigen unter den Bedingungen einer Labortierhaltung keine jahreszeitliche Abhängigkeit [62]. Für die terminierten Verpaarungen wurden daher Mäuse ab einem Alter von etwa acht bis zehn Wochen verwendet. Um eine Synchronisation des sexuellen Zyklus der Weibchen zu erreichen, wurden für die Plug-Verpaarungen immer zwei Weibchen für mindestens zwei Tage in vorbereiteten Käfigen vergesellschaftet, die erst zur Verpaarung zu einem benachbarten Männchen gesetzt wurden (Whitten-Effekt) [165, 166].

Die Verpaarungen erfolgten am späten Nachmittag und am darauffolgenden Morgen wurde direkt eine Plug-Kontrolle durchgeführt. Der Vaginal-Plug enthält Bestandteile des männlichen Ejakulats und ist nach erfolgreicher Verpaarung für 8-14 h an der Vaginalöffnung des Weibchens sichtbar (Abbildung 9) [167, 168]. Nach positiver Plug-Kontrolle werden die Weibchen wieder separiert. Die Plug-Kontrollen erfolgten durch erfahrene Tierpfleger, vor allem um mögliche Fehler bei der Plug-Bestimmung zu vermeiden.



Abbildung 9: Vaginal-Plug eines C57BL/6J-Weibchens nach erfolgreicher Verpaarung

Die Weibchen wurden über Nacht zu einem Männchen gesetzt und am darauffolgenden Morgen wurde eine Plug-Kontrolle durchgeführt. Waren Bestandteile des männlichen Ejakulats in Form eines Vaginal-Plug (roter Pfeil) sichtbar, wurden die Weibchen als Plug-positiv bezeichnet.

(Bildquelle: Tierpflegerin Alisha Huff)

Der Tag des Auftretens des Vaginal-Plug wurde als Trächtigkeits- oder Embryonaltag E0.5 festgelegt. Häufig trat jedoch trotz positiven Vaginal-Plug keine Trächtigkeit ein. Falsche Plug-Positivität kann je nach Mauslinie in 30-50 % auftreten [169]. Gründe hierfür können vielfältig sein, aber häufig ist Stress die Ursache für geringe Trächtigkeitsraten [170]. Mögliche Stressfaktoren wären beispielsweise Pheromone von einem bisher unbekanntem Männchen (Bruce-Effekt) [171]. Jedoch kann dies in einer offenen Käfighaltung nicht immer vollständig vermieden werden.

Bei den, in dieser Arbeit, verwendeten Mauslinien kam es zu einer falschen Plug-Positivität von 36 % (WT) und 40 % (Qa2⁻) (Abbildung 10).

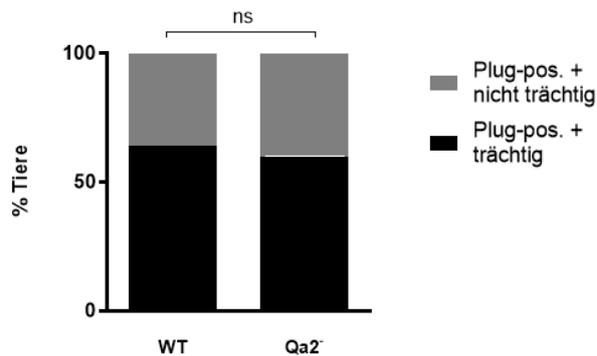


Abbildung 10: Falsche Plug-Positivität

In bis zu 40 % aller Verpaarungen trat trotz Vorliegen eines Vaginal-Plug keine Trächtigkeit ein. Dargestellt ist die Verteilung von Plug-positiven Tieren, die tatsächlich trächtig waren und von Plug-positiven Tieren, die nicht trächtig waren. Fishers-Exakt Test, ns = nicht signifikant, n = 76.

Aufgrund der hohen Rate an falsch Plug-positiven Tieren wurden zusätzlich zur Plug-Kontrolle mehrmalige Gewichtskontrollen durchgeführt, um mit größerer Wahrscheinlichkeit das Vorliegen einer Trächtigkeit zu erfassen. Die Weibchen wurden nach Plug-Positivität alle zwei bis drei Tage gewogen. Laut Literatur kann ab einer Gewichtszunahme von mindestens 1,75 g bis zum Trächtigkeitstag E10.5 davon ausgegangen werden, dass das Weibchen tatsächlich trächtig ist [169].

Im Rahmen dieser Arbeit hatten die Plug-positiven WT-Mäuse an Tag E10.5 eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 3,7 g und an Tag E18.5 eine Gewichtszunahme von 15,4 g, die Plug-positiven Qa2⁻-Mäuse hatten an Tag E10.5 eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 2,6 g und an Tag E18.5 eine Gewichtszunahme von 11,5 g (Abbildung 11).

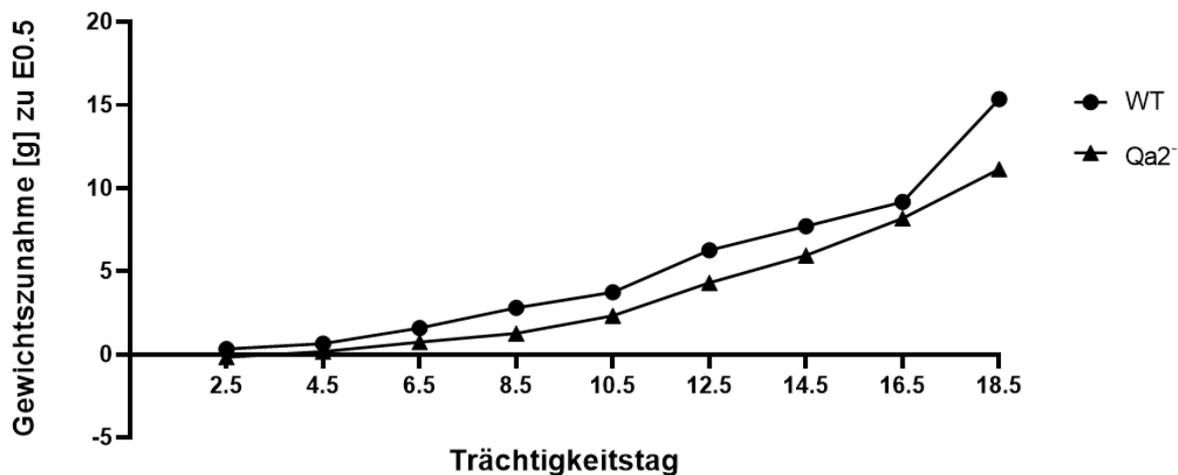


Abbildung 11: Gewichtsverlauf Plug-positiver Tiere

An E0.5 wurde das Ausgangsgewicht der Plug-positiven Mäuse bestimmt. Alle 2-3 Tage erfolgten dann Gewichtskontrollen. Dargestellt ist die mittlere Gewichtszunahme von Plug-positiven WT- und Qa2⁻-Mäuse berechnet zum Ausgangsgewicht an E0.5, n = 95.

2.2.2 Bestimmung der Embryonen-Resorptionsrate

Zur Bestimmung der Embryonen-Resorptionsrate (Abortrate) bei trächtigen Mäusen wurden die Tiere an Tag E10.5 oder E18.5 der Trächtigkeit durch CO₂-Einleitung in den Heimatkäfig und anschließende zervikale Dislokation getötet und der Uterus entnommen. Die Anzahl der intakten Feten und die Anzahl abortierter Feten wurden visuell bestimmt. Ein Abort wurde definiert als eingebluteter oder blasser und deutlich retardierter Embryo (Abbildung 12). Die Abortrate wurde als Quotient aus abortierten Feten und abortierten + intakten Feten berechnet.

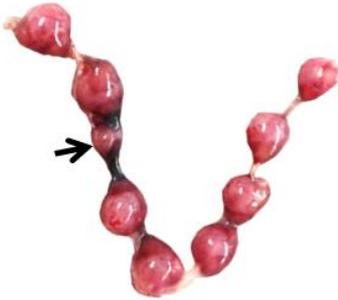


Abbildung 12: Uterus mit neun angelegten Feten und einem Abort an Trächtigkeitstag E10.5

Die Uteri wurden postmortal entnommen und die Anzahl der intakten und abortierten Feten wurde visuell bestimmt. Der Pfeil zeigt auf einen Abort. Die Abortrate wurde als Quotient aus abortierten Feten und abortierten + intakten Feten berechnet und beträgt hier 11 %.

2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen der Maus

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch CO₂-Einleitung in den Heimatkäfig und anschließende zervikale Dislokation. Die Blut- und Organentnahme erfolgte postmortal. Die Blutentnahme erfolgte durch intrakardiale Punktion mit einer mit Heparin (ca. 10 µl) gefüllten 1 ml-Spritze. Für die Organentnahme wurde die Bauchhöhle entlang der *Linea alba* geöffnet und die benötigten Organe (Milz und Uterus) entnommen. Außerdem wurden die Femur- und Tibia-Knochen zur Isolation von Knochenmark entnommen. Zur Weiterverarbeitung der Uteri trächtiger Mäuse wurden die Fruchthöhlen unmittelbar nach Entnahme eröffnet und die Feten entwickelt und sofort dekapitiert. Die Plazenten wurden vorsichtig vom Uterus gelöst und Bindegewebe wurde entfernt.

Die Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung in PBS aufbewahrt. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen von Milz und Plazenta wurden diese direkt mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm-Zellsieb gedrückt und mit PBS nachgespült. Die Uteri wurden vorher mit einer feinen Schere zerkleinert und ebenfalls durch ein 100 µm-Zellsieb gedrückt und mit PBS nachgespült. Die dadurch entstandenen Zellsuspensionen wurden 8 min bei 310 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet von Milz und Plazenta, sowie das entnommene Blut wurden in Ammoniumchlorid resuspendiert. Hierdurch kommt es zur Lyse der Erythrozyten, die ein Hindernis für weitere Analysen von Leukozyten darstellen würden, da der rote Blutfarbstoff Hämoglobin eine charakteristische Autofluoreszenz in der Durchflusszytometrie aufweist [172]. Nach 6-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden

die Zellsuspensionen von Milz, Plazenta und Uterus erneut durch ein Zellsieb (40 µm) gefiltert und zusammen mit dem lysierten Blut 8 min bei 310 rcf und 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde das Zellpellet in Medium oder PBS aufgenommen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl sowie die Zellvitalität wurden mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellvitalität wird mit Hilfe von Trypanblau analysiert, welches die Membran toter Zellen passieren kann, und die dadurch in der Zählkammer als blau-violette Zellen sichtbar werden. Die ungefärbten und somit lebenden Zellen wurden gezählt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl Quadranten}} * 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^4 (\text{Zählkammerfaktor})$$

2.2.5 Histologie Plazenta

Für histologische Untersuchungen von Mäuse-Plazenten wurden das postmortal entnommene Gewebe in Einbettkassetten gelegt und bis zur Paraffin-Einbettung (max. 24 h) in 4,5 %igem Formaldehyd bei Raumtemperatur gelagert. Die Einbettung in Paraffin sowie die weitere Verarbeitung der Proben und Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen erfolgten durch erfahrene Pathologen im Institut für Pathologie Tübingen, Mauspathologie als Core Facility unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend.

Für die Histologie wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E), PAS und PAS-Diastase gefärbt. Die Immunhistochemie wurde mit einem Färbeautomat (Ventana Medical Systems, Inc.) nach den Protokollen des Unternehmens mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die Bilder wurden mit einem Axioskop 2 plus Zeiss-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen, das mit einer Jenoptik (Laser Optik System, Jena, Deutschland) ProgRes C10 plus Kamera und Software ausgestattet war.

2.2.6 Zellyse

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Plazenten wurden aus den postmortal entnommenen Plazenten Zellen aufgereinigt (s. 2.2.3) und das trockene Zell-Pellet in Lyse-Puffer (s. 2.1.7) aufgenommen. Die Proben wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach vorsichtigem Auftauen wurden die Proben bei 3000 rcf bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteinlysate enthielt, wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test [161]. Beim BCA-Test reagieren zweiwertige Kupferionen mit den zu bestimmenden Proteinen zu einwertigen Kupferionen und geben der zugefügten Bicinchoninsäure eine violette Färbung, welche dann photometrisch bestimmt werden kann [173]. Für die Proteinbestimmung wurde eine BSA-Standardreihe auf einer 96 Well-Platte in Triplets mit 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 µg/ml BSA pro 10 µl pipettiert und anschließend die Proteinproben in einer Verdünnungsreihe (10 µl, 7 µl, 5 µl, 2 µl) aufgetragen. Das BCA-Reagenzgemisch (Reagenz A + Reagenz B) wurde angesetzt und den Wells 200 µl zugefügt. Die Platte wurde dann 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Anhand der BSA-Standardkurve und den gemessenen OD-Werten wurde berechnet wieviel Protein in den einzelnen Zellysaten vorhanden war.

2.2.8 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Page und Coomassiefärbung

Die SDS-Page (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Bei der Probenvorbereitung wird SDS zu den Proteinproben hinzugegeben und auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen. Zur Auftrennung werden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen und an eine elektrische Spannung angelegt. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb, sodass kleine Proteine relativ leicht durch die Maschen wandern können, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern [174].

Für die SDS-Page wurde zunächst ein 10 %iges Trenngel (s. 2.1.7) zwischen zwei Glasplatten gegossen und durch Aufschichten von 1 ml H₂O die Oberfläche geglättet. Nach Polymerisation des Trenngels und Entfernen des Wassers wurde das Sammelgel (s. 2.1.7) aufgeschichtet und ein Probenkamm eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde es mit den Glasplatten in feuchte Tücher gewickelt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel vertikal in eine Elektrophoresekammer geklemmt, der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Das Probenvolumen mit der gewünschten Proteinmenge (25 µg) wurde mit Lysepuffer auf 32 µl aufgefüllt und dann mit 5× Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und in die Geltaschen pipettiert. Um Aussagen über die Proteingröße treffen zu können wurde zusätzlich ein Proteinmarker (10-180 kDa) geladen. Die Elektrophoresekammer wurde an einen Stromkreislauf angeschlossen, bei dem eine

Spannung von 300 V als obere Grenze gesetzt wurde. Im Sammelgel erfolgte zunächst die Konzentration der Proteine bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel und im Trenngel die Auftrennung der Proteine bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel. Nach Durchlaufen des Gels wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und über Nacht in Coomassie-Färbelösung gelegt. Das Entfärben erfolgte am darauffolgenden Morgen in reinem H₂O bis die einzelnen Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

2.2.9 Proteomanalysen mittels NanoLC-MS/MS

Das Proteom bezeichnet quantitativ die Gesamtheit aller durch ein Genom exprimierter und modifizierter Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder von Zellkompartimenten. Das Proteom ist im Gegensatz zum Genom ein hochdynamisches Netzwerk und unterliegt ständigen Veränderungen. Die Proteinbiosynthese ist zell- und gewebespezifisch und äußere Einflüsse wie Umweltfaktoren haben einen direkten Einfluss auf die Qualität und Quantität der translatierten Proteine [175].

Die Datenanalyse sowie funktionelle Charakterisierung der Plazentaprobe auf der SDS-Page von vier Wildtyp-Mäusen und vier Qa2-defizienten Mäusen erfolgte mit der LTQ-Orbitrap Massenspektrometrie durch Kollegen des Proteome Center in Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Boris Maček.

Die zu analysierenden Proteinlysate wurden für den Verdau mit einer Trypsin-Lösung bedeckt. Nach Entsalzen wurden die extrahierten Peptide auf einem Easy-nLC 1200-System (Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt, welches an ein Q Exactive HFX-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war [176]. Die erfassten MS-Spektren wurden mit dem MaxQuant-Softwarepaket (Version 1.6.7.0) mit integrierter Andromeda-Suchmaschine verarbeitet. Die Datenbanksuche wurde gegen eine von Uniprot erhaltene *Mus-Musculus*-Datenbank durchgeführt, die 63.686 Proteineinträge enthielt.

Die Protein-Netzwerkanalysen wurden über die online-verfügbare Bioinformatik-Datenbank STRING (engl. search tool for the retrieval of interacting genes/proteins) erstellt. Neben der Visualisierung der direkten (physikalischen) und indirekten (funktionellen) Zusammenhänge und Interaktionen zwischen Proteinen, lieferte die Datenbank eine Liste an biologischen Funktionen und Signalwegen, welche durch die in der Netzwerkanalyse verwendeten Proteine repräsentiert werden [177]. Die Zugehörigkeit von mehreren Proteinen zu einer bestimmten biologischen Funktion oder einem Signalweg kann Rückschlüsse auf das biologische Verhalten einer Zelle oder eines Gewebes zulassen.

2.2.10 RNA Isolation und Transkriptomanalysen

Das Transkriptom bezeichnet die Gesamtheit aller zu einem gegebenen Zeitpunkt in einer Zelle in RNA umgeschriebenen Gene. Eine wesentliche Funktion der RNA ist die Umsetzung der genetischen Information, d.h. die Umwandlung der DNA in den Phänotyp eines Organismus [178].

Für die Transkriptomanalysen wurden Uteri trächtiger Mäuse postmortal entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Aufreinigung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Ein Teil des gefrorenen Gewebes (20-30 mg) wurde mit Hilfe von Micro Pestles und Flüssigstickstoff zu Pulver zerstoßen. Das Pulver wurde in $600\text{ }\mu\text{l}$ RLT-Lysepuffer aufgenommen und bei 8000 rcf abzentrifugiert. Der Überstand wurde im gleichen Verhältnis mit Ethanol gemischt und die weitere RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit [164]. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe eines Nanodrop ermittelt. Die Qualitätskontrolle von RNA sowie die Datenanalysen zur Identifikation unterschiedlicher exprimierter Transkripte erfolgten auf etablierten Bioinformatik-Pipelines durch die Kollegen des Next-Generation-Sequencing (NGS) Competence Center Tübingen (NCCT) als CoreFacility des Universitätsklinikums unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Rieß und in Kooperation mit Dr. Nicolas Casadei.

Die RNA-Qualität wurde durch Messung des Absorptionsverhältnisses 260/280 und 230/260 mit einem Spektrophotometer (Nanodrop ND-1000; Peqlab), die RNA-Konzentration mit dem Qubit Fluorometric Quantitation und dem RNA Broad-Range Assay (Thermo Fisher Scientific) und die RNA-Integritätszahl RIN mit dem Fragment Analyzer 5300 und dem Fragment Analyzer RNA-Kit (Agilent Technologies) bestimmt. Die mRNA-Fraktion wurde mittels PolyA-Capture aus 200 ng Gesamt-RNA unter Verwendung des Next Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Modules (NEB) angereichert. Anschließend wurden die mRNA-Bibliotheken mit dem NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet. Die Bibliotheksmolarität wurde durch Messung der Bibliotheksgröße (ca. 400 bp) mit dem Fragment Analyzer 5300 und dem Fragment Analyzer DNA HS NGS-Fragmentkit (Agilent Technologies) und der Bibliothekskonzentration ($> 0,5\text{ ng}/\mu\text{l}$) unter Verwendung der Qubit Fluorometric Quantitation und des dsDNA High sensitivity assay (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Im ersten Experiment wurden die Bibliotheken gemäß den Herstelleranweisungen denaturiert, auf 270 pM verdünnt und als gepaarte 100 bp Reads auf einem Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) mit einer Sequenzierungstiefe von > 25 Millionen Clustern pro Probe sequenziert. In den vier Proben wurden 55.421 Gene sequenziert. Die Rohdaten wurden gefiltert, indem ein minimaler Expressionswert von 1 cpm (counts per million) in mindestens 2 Proben gefordert wurde. Die gefilterten Daten enthalten Expressionswerte für 17.210 Gene. Die Netzwerkanalysen wurden über die online-verfügbare Bioinformatik-Datenbank STRING erstellt [177].

2.2.11 Oberflächenfärbung für die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Oberflächen-Antigenexpression. Die zu untersuchenden Zellen treffen in einem Flüssigkeitssystem auf eine Messzelle, in der sie fokussiert werden, so dass der Laserstrahl auf immer nur eine Zelle treffen kann. Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird in einem optischen System mittels Spiegel und Filter zu verschiedenen Detektoren geleitet, die die Signale in Messwerte umwandeln. Die Messwerte können dann mit entsprechender Software bildlich dargestellt werden. Neben Größe und Granularität der Zellen, welche im sogenannten Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) bestimmt werden, kann durch an Fluorochrome gekoppelte Antikörper das Vorhandensein bestimmter Oberflächen-Antigene detektiert werden [179]. Spektrale Überschneidungen verschiedener Fluorochrome müssen mittels einer Kompensation (elektrische Subtraktion) beseitigt werden.

Für die durchflusszytometrischen Färbungen wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen mit einer in Vorversuchen titrierten Antikörpermengung für 10 min bei 4 °C inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper erfolgte die Inkubation stets im Dunklen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Flow gewaschen und analysiert. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten je nach Versuch am FACSCalibur™, LSR II™ oder Canto II™. Die Auswertungen erfolgten mittels CellQuestPro oder FlowJo V10.

2.2.12 Foxp3-Expression auf CD4⁺ T-Zellen

Zur Quantifizierung und zur Untersuchung der funktionellen Wirkung von generierten MDSC von Wildtyp- und Qa2-defizienten Mäusen wurde die Expression von Foxp3 auf CD4⁺CD25^{high} T-Zellen bestimmt. Hierzu wurden CD4⁺ T-Zellen aus Splenozyten nicht trächtiger Wildtyp-Mäuse isoliert und mit *in-vitro* generierten MDSC in einer 24 Well-Mikrotiterplatte im Verhältnis 2:1 co-kultiviert. Als Kontrolle diente eine Monokultur von CD4⁺ T-Zellen.

Nach drei Tagen wurden die Zellen aus der Platte entnommen und abzentrifugiert. Die durchflusszytometrische Färbung erfolgte mithilfe des Foxp3 Staining Kits. Dabei erfolgte zunächst eine Extrazellulärfärbung mit CD4 APC und CD25 FITC für 30 min bei 4 °C. Die überschüssigen Antikörper wurden mit 1 ml PBS + 1 % FCS abgewaschen, 1 ml „Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution“ (concentrate 1:3 diluent) hinzugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 1 ml 1× „Permeabilization Buffer“ gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl 1× „Permeabilization Buffer“ resuspendiert, der Intrazellulärantikörper Foxp3 PE hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation mit 1× „Permeabilization Buffer“ wurde das Pellet in „Flow Cytometry Staining Buffer“ aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.13 MDSC-Generierung aus Knochenmark

Zur Generierung von MDSC bei Mäusen wurden Tibia und Femur postmortal entnommen, die Epiphysen abgeschnitten und das Knochenmark mit PBS und einer 25 G-Kanüle (0,50 × 25 mm) durchgespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde 8 min bei 310 rcf und 4 °C zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf 5×10^5 Zellen/ml in DMEM-Medium + 10 % FCS + 1 % P/S + 1 % Glutamin eingestellt und nach etablierten Protokollen unter Zugabe von 100 ng/ml G-CSF und 250 U/ml GM-CSF für vier Tage in einer 6 Well-Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert [31, 180]. Dann wurden nicht adhärenente Zellen vorsichtig abgesaugt und die adhärenenten MDSC mithilfe von 500 µl Trypsin/EDTA von der Kulturplatte mit einem Zellschaber abgelöst. Hierdurch wurde eine Reinheit der MDSC (Gr-1⁺/CD11b⁺) von > 92 % erreicht (Abbildung 13).

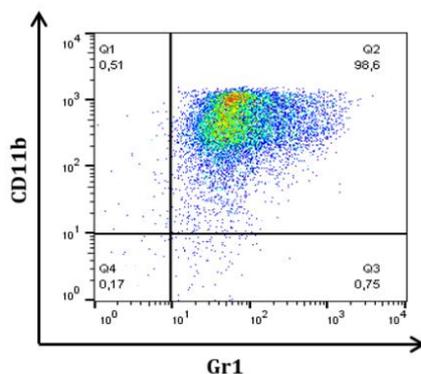


Abbildung 13: Reinheit der aus Knochenmark generierten MDSC

Das Knochenmark wurde aus Tibia und Femur gespült und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden unter Zugabe von G-CSF und GM-CSF für vier Tage kultiviert. Die adhärenenten MDSC wurden vorsichtig von der Platte gelöst und die Reinheit durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenmarker Gr1 und CD11b bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer DotPlot der durchflusszytometrischen Messung mit einer Reinheit von 98,6 %.

2.2.14 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die Magnetische Zellsortierung (MACS, magnetic activated cell sorting) ermöglicht es, Zellen aus einem Zellgemisch anhand ihrer Oberflächenstrukturen und mit Hilfe eines magnetischen Felds anzureichern. Dazu werden Zellen mit sogenannten MicroBeads inkubiert. Diese magnetischen Nanopartikel mit einer Größe von 50 nm sind bzw. werden an spezifische Antikörper gekoppelt, welche an spezifische Strukturen auf der Zelloberfläche binden und damit die MicroBeads an die gewünschte Zellpopulation koppeln. Beim Durchfluss der Zellsuspension durch eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, werden die mit den MicroBeads markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule passieren (Negativselektion). Nach Entfernen des Magnetfeldes kann dann die markierte Zellpopulation aus der Säule gespült werden (Positivselektion) [181].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zu selektierenden Zellen, soweit nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben mit Antikörpern und dazugehörigen MicroBeads markiert und entweder im autoMACS-Separator oder manuell mithilfe von speziellen LS-Säulen in einem magnetischen Feld angereichert. Die dadurch gewonnenen Zellen wurden in weiteren Versuchen eingesetzt.

2.2.14.1 MDSC-Isolation aus Splenozyten

Isolierte Splenozyten (s. 2.2.3) wurden auf 10^8 Zellen pro 350 μ l in MACS-Puffer aufgenommen und MDSC wurden mittels dem „Myeloid-derived suppressor cell Isolation Kit“ [163] isoliert. Das Herstellerprotokoll wurde insofern modifiziert, dass die Zellen zuerst mit dem Anti-Gr-1-Biotin Antikörper und den Streptavidin MicroBeads gelabelt wurden (laut Protokoll Schritt 2) und erst anschließend mit dem Anti-Ly6G-Biotin Antikörper und den Anti-Biotin MicroBeads (laut Protokoll Schritt 1). Hierdurch wurde eine bessere Reinheit von Gr-MDSC ($\text{Gr1}^{\text{high}}\text{Ly6G}^+$) erreicht, jedoch mit Verlust der Mo-MDSC ($\text{Gr1}^{\text{dim}}\text{Ly6G}^-$), welche jedoch für die hier durchgeführten Versuche nicht benötigt wurden. Die Reinheit der MDSC ($\text{Gr1}^+/\text{CD11b}^+$) lag nach unserer Methode bei $> 90\%$ (Abbildung 14).

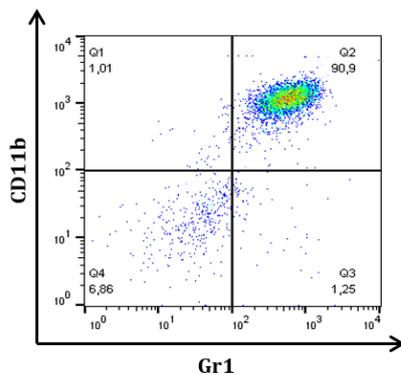


Abbildung 14: Reinheit der aus der Milz isolierten MDSC

Die Milz wurde postmortal entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Mit Hilfe des „Myeloid-derived suppressor cell Isolation Kit“ wurden die MDSC isoliert. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenmarker Gr1 und CD11b bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer DotPlot der durchflusszytometrischen Messung mit einer Reinheit von 90,9 %.

2.2.14.2 CD4⁺ T-Zell-Isolation aus Splenozyten

Isolierte Splenozyten (s. 2.2.3) wurden auf 10^7 Zellen pro 40 μ l in MACS-Puffer aufgenommen und die T-Zellen wurden mittels „CD4⁺ T Cell Isolation Kit“ [162] nach Herstellerangaben isoliert. Die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen betrug $> 90\%$ (Abbildung 15).

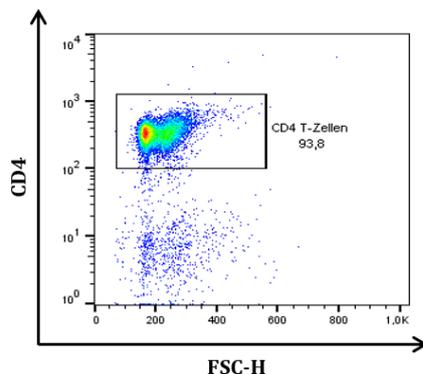


Abbildung 15: Reinheit von aus der Milz isolierten CD4⁺ T-Zellen

Die Milz wurde postmortal entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Mit Hilfe des „CD4⁺ T Cell Isolation Kit“ wurden die T-Zellen isoliert. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer DotPlot der durchflusszytometrischen Messung mit einer Reinheit von 93,8 %.

2.2.15 T-Zell-Proliferationsversuch

Die Untersuchung der suppressiven Aktivität von MDSC auf die T-Zell-Proliferation erfolgte anhand eines CFSE-Proliferationsversuchs.

Hierzu werden T-Zellen mit dem Farbstoff Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFDA-SE) gefärbt. Dieser passiert die Zellmembranen und wird durch intrazelluläre Esterasen durch Abspaltung der beiden Acetat-Gruppen in das fluoreszierende Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) umgewandelt. CFSE geht in der Zelle eine kovalente Bindung mit Lysinresten und anderen Aminosäureresten zytoplasmatischer Proteine ein und verbleibt so in der Zelle, ohne dabei Zellfunktionen zu beeinflussen. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff jeweils zur Hälfte an die beiden entstehenden Tochterzellen weitergegeben. Insgesamt können ca. sieben bis acht Generationen von Tochterzellen dargestellt werden, bis das Fluoreszenzsignal zu sehr abgeschwächt ist [182].

CD4⁺ T-Zellen wurden aus Splenozyten nicht trächtiger Wildtyp-Mäuse isoliert (s. 2.2.14.2) und maximal 1×10^7 Zellen wurden für 15 min mit 5 mM CFDA-SE, verdünnt in 1 ml PBS + 5 % FCS, gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS gestoppt und nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml in RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S + 1 % Glutamin eingestellt. Je 2×10^5 T-Zellen wurden in 100 μ l mit 2×10^5 aktivierenden CD3/CD28 Dynabeads und 50 ng murinem rekombinantem IL2 stimuliert. Den stimulierten Zellen wurden 1 μ l Mercaptoethanol (2-ME; $c_{\text{end}} = 50$ mM) hinzugefügt. *In-vitro* generierte MDSC (s. 2.2.13) oder aus der Milz isolierte MDSC (s. 2.2.14.1) wurden in einer 96 Well-Platte in verschiedenen Verhältnissen (T-Zellen : MDSC; 2:1, 4:1, 8:1) zu CFSE-gefärbten CD4⁺ T-Zellen gegeben und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte T-Zellen (Negativkontrolle) und T-Zellen ohne Zugabe von MDSC (Positivkontrolle). Die T-Zell-Proliferation wurde dann durch Abnahme der CFSE-Intensität durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.16 Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Blut (PBMC)

Die Isolation von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde das Blut im Verhältnis 2:1 mit PBS verdünnt, im Verhältnis Blut : Biocoll 2:1 auf Biocoll aufgeschichtet und 25 min bei 310 rcf und 20 °C mit reduzierter Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Die Biocoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) besitzt eine höhere Dichte als Immunzellen (Lymphozyten, Monozyten) und daher reichern sich nach der Zentrifugation die mononukleären Zellen aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen Biocoll und Plasma an. Dieser Zellring wurde vorsichtig abgenommen und zwei Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 10 min, 400 rcf und 4 °C).

Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines Hämozytometers wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl in RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S + 1 % Glutamin eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.17 Zyklusbestimmung bei Mäusen mittels Vaginalabstrich

Zur Bestimmung der Zyklusphase von weiblichen Mäusen erfolgten ein Vaginalabstrich und eine anschließende Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung der gewonnenen Zellen. Die HE-Färbung ist eine Routinefärbung in der Histologie, wodurch man einen Überblick über die Gewebestruktur bekommt [183]. Dabei färbt die basische Mayers Hämalaun-Lösung die Zellkerne blau, violett bis schwarz und das saure Eosin das Zytoplasma leicht rötlich.

Für den Vaginalabstrich wurden weibliche Mäuse mit Isofluran über einen Vernebler betäubt. Es wurde dann ein Abstrichtupfer in 0,9 %iger NaCl-Lösung getränkt und bis kurz vor die Zervix in die Vagina der Maus eingeführt. Der Tupfer wurde kurz gedreht, um zelluläre Bestandteile der Vaginalschleimhaut zu gewinnen. Anschließend wurde der Tupfer entfernt und auf einem Objektträger ausgestrichen.

Nach der ersten Begutachtung der nativen Vaginalabstriche unter dem Mikroskop erfolgte die HE-Färbung in einer Färbestraße (Tabelle 11). Dazu wurde der Objektträger zur Fixation kurz in 100 %igen Ethanol getaucht. Nach gründlichem Abspülen mit Aqua dest. wurde der Objektträger für 1 min in die Hämalaun-Lösung gelegt und anschließend mit warmem Leitungswasser abgespült. Nach 5 sekundiger Färbung in Eosin und direktem Abspülen mit Aqua dest. wurde die Färbung durch aufsteigende Alkoholkonzentrationen fixiert.

Tabelle 11: HE-Färbereihe

Substanz	Zeit
100 %iger Ethanol	3 sec
Aqua dest.	Ethanol gründlich abspülen
Hämalaun	1 min
warmes Leitungswasser	30-60 sec
Eosin	5 sec
Aqua dest.	3 sec
70 %iger Ethanol	3 sec
96 %iger Ethanol	3 sec
100 %iger Ethanol	3 sec
100 %iger Ethanol	3 sec
100 %iger Ethanol	30 sec

2.2.18 Ansetzen einer Bakterienkultur

In den Versuchen wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterienstamm DH5 α verwendet. Die Bakterien wurden aus der Gefrierkultur bei -80 °C in 5ml Nährmedium (LB-Medium) überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 200 μ l der Bakteriensuspension in 5 ml frisches LB-Medium überführt und für weitere 60-90 min unter gleichen Bedingungen inkubiert, um das Bakterienwachstum in die logarithmische Wachstumsphase zu bringen.

Mit Hilfe eines Photometers wurde die optische Dichte (Extinktion) der Bakterienkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Als Referenz diente reines LB-Medium. Die logarithmische Wachstumsphase der Bakterienkultur liegt im Extinktionsbereich zwischen $OD_{600} = 0,4$ und $0,7$. Die Bakterienkultur wurde auf Eis gestellt, um weiteres Wachstum der Bakterien zu verhindern. Anhand der ermittelten OD-Werte konnte die Bakterienkonzentration errechnet werden. Eine OD_{600} von $0,5$ entspricht dabei einer Bakterienkonzentration von 1×10^9 Zellen/ml, eine OD_{600} von 1 einer Bakterienkonzentration von 2×10^9 Zellen/ml. Dazwischen nimmt die Bakterienkonzentration entsprechend steigender OD_{600} linear zu. Bei der Stimulation von Zellen mit *E. coli*-Bakterien wird die eingesetzte Bakterienkonzentration über die MOI (= multiplicity of infection) angegeben. In den hier durchgeführten Versuchen wurde mit einer MOI von 1:50 (Zellen zu *E. coli*) gearbeitet.

Berechnungsbeispiel für eine gemessene OD_{600} von $0,6$:

- Errechnete Bakterienkonzentration: $0,6 \times 2 \times 10^9 / \text{ml} = 1,2 \times 10^6$ Bakterien/ μ l
- Einzusetzende Bakterienzahl für MOI von 1:50 bei einer zu stimulierenden Zellzahl von 2×10^6 Zellen: $50 \times 2 \times 10^6 = 100 \times 10^6$ Bakterien
- Einzusetzendes Volumen der Bakteriensuspension: $100 \times 10^6 / 1,2 \times 10^6 = 83 \mu$ l

2.2.19 Stimulation Splenozyten mit Anoxie/*E. coli*/Östrogen

Für die Analyse der Wirkung von Anoxie (Sauerstoffmangel), bakterieller Stimulation mit *E. coli* oder Stimulation mit Östrogen auf die Qa2-Expression auf MDSC wurden Splenozyten von trächtigen WT-Mäusen oder HIF-KO-Mäusen an E10.5 isoliert (s. 2.2.3) und über Nacht in DMEM-Medium mit 10 % FCS + 1 % P/S + 1 % Glutamin in 24 Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für vier Stunden entweder mit Anoxie stimuliert, indem sie in eine hermetisch verschlossene Kammer mit einem Anoxiebeutel zur Erzeugung anaerober Gase gegeben wurden, mit *E. coli* in einer MOI von 1:50 oder mit Östrogen in Konzentrationen von 1 nM, 10 nM und 100 nM. Nach vier Stunden wurden die Zellen aus der Platte genommen, abzentrifugiert und eine Extrazellulärfärbung durchgeführt. Die Qa2-Expression auf MDSC wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.20 HLA-G Tetramerisierung

Die HLA-G Tetramerisierung erfolgte nach Protokollen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Stevanović, Department of Immunology, Tübingen. HLA-G1 Monomere, gebunden an das Peptid KGPPAALT, wurden hergestellt und bezogen von Jianhong Cao, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA.

Die Tetramerisierung erfolgte über eine Streptavidin-Biotin-Bindung. Streptavidin ist ein Homotetramer, welches mit hoher Affinität Biotinmoleküle binden kann. Diese Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten, nicht-kovalenten biologischen Bindungen [184]. Für die Tetramerisierung musste die molare Masse von HLA-G Monomeren und Streptavidin in einem Verhältnis von 4:1 stehen.

Für beispielsweise 25 µl HLA-G (MG: 46 kDa) wurde die benötigte Menge an Streptavidin (MG: 52,8 kDa) folgenderweise berechnet:

$$n \text{ [Stoffmenge]} = \frac{m \text{ [Masse]}}{M \text{ [molare Masse]}}$$

$$= \frac{0,000025 \text{ g}}{46000 \text{ g/mol}} = 0,543 \text{ nmol}$$

$$m = n * M = 0,136 \text{ nmol} * 52800 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,0000072 \text{ g} = 7,2 \text{ µg}$$

Bei einer Streptavidin-Konzentration von 1 µg/µl und einer benötigten Menge von 7,2 µg ergeben sich 7,2 µl, die den HLA-G Monomeren zur Tetramerisierung zugefügt werden müssen.

Die Tetramerisierung erfolgte, indem die Gesamtmenge an benötigtem HLA-G-Monomer mit jeweils 10 % der benötigten Streptavidin-Menge für 30 min auf einen Rotationsschüttler bei 4 °C gelegt wurde. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die komplette Streptavidin-Menge (100 %) hinzugefügt war. HLA-G-Tetramere wurden für jede Applikation frisch hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.21 Applikation von humanem HLA-G in Mäuse

Die Verwendung von HLA-G ist im murinen Modell möglich, da humanes HLA-G trotz fehlendem murinen Korrelat an den murinen Rezeptor paired-immunoglobuline-receptor B (PIR-B) auf myeloiden Zellen bindet und so tolerogene Effekte vermittelt [131]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl MDSC von WT-Mäusen als auch MDSC von Qa2-defizienten Mäuse PIR-B exprimieren (Abbildung 16). In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von sHLA-G auf die MDSC-Akkumulation untersucht werden.

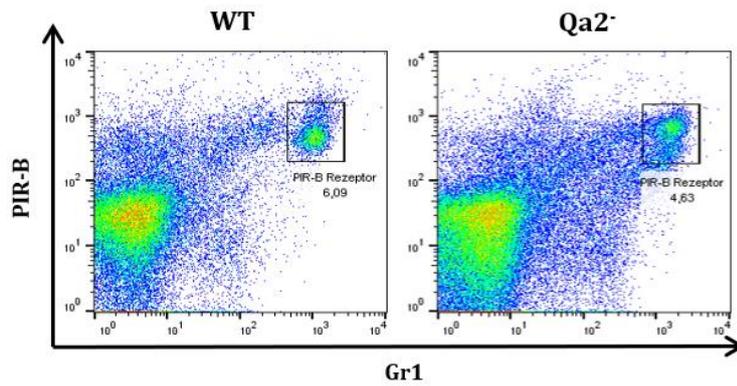


Abbildung 16: PIR-B Rezeptor auf Gr1-exprimierenden Zellen von WT- und Qa2-defizienten Mäusen

Die Milz wurde postmortal entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Expression des PIR-B Rezeptors auf Gr1-exprimierenden Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind repräsentative DotPlots der durchflusszytometrischen Messung von WT-Mäusen (links) und Qa2-defizienten Mäusen (rechts).

Der Effekt von löslichem HLA-G auf die Akkumulation von MDSC *in-vivo* wurde zunächst durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von sHLA-G an nicht trächtigen CBA/J-Mäusen untersucht. Dieser Mausstamm wurde gewählt, da im Anschluss an eine Pilotstudie die Applikation von sHLA-G im Rahmen eines immunologischen Abortmodells untersucht hätte werden sollen. Orientiert wurde sich an der *in-vitro* wirksamen Dosis von 1 µg/ml [56, 185]. Es wurden zwei unterschiedliche Dosen von sHLA-G (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) getestet und intraperitoneal mit einer 27 G-Kanüle (0,40 × 19 mm) in nicht trächtige CBA/J-Weibchen injiziert. Das zu injizierende HLA-G wurde in maximal 0,05 ml PBS pro 10 g Körpergewicht gelöst. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS.

Der Effekt von löslichem HLA-G auf die Abortrate und MDSC-Akkumulation *in-vivo* wurde weiter in Qa2-defizienten Mäusen untersucht. In dieser zweiten Versuchsreihe wurde der intravenöse (i.v.) Applikationsweg gewählt und anstelle von Monomeren Tetramere verabreicht. Es wurde sich erneut an der *in-vitro* wirksamen Dosis von 1 µg/ml HLA-G orientiert. Die HLA-G-Tetramere wurden in maximal 0,05 ml PBS pro 10 g Körpergewicht gelöst. Die sHLA-G Applikation erfolgte an Tag E10.5 und E14.5 in die Schwanzvene. Dazu wurden die Versuchstiere in eine Fixationshilfe gesetzt und der Schwanz mit lauwarmem Wasser erwärmt, um die Schwanzvene deutlich sichtbar zu machen. Das in PBS gelöste HLA-G wurde in eine 1 ml-Spritze gezogen und mit einer 27 G-Kanüle intravenös in die Schwanzvene injiziert. Als Kontrolle diente auch hier die Injektion von PBS.

2.3 Statistische Auswertung

Die Daten der durchflusszytometrischen Messungen wurden mit GraphPad Prism 8.1 verarbeitet. Ebenso wurden die statistischen Tests mit GraphPad Prism 8.1 durchgeführt, wobei das α -Level auf 0,05 gesetzt wurde (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Mit Hilfe dem D'Agostino-Pearson Omnibus Normalverteilungstest wurde auf Normalverteilung getestet. Bei einer Normalverteilung und beim Vergleich von mehreren Gruppen wurde eine OneWayANOVA angewendet; bei nicht normalverteilten ungepaarten Daten der Kruskal-Wallis Test und bei nicht normalverteilten gepaarten Daten der Friedman Test.

Im Vergleich von zwei ungepaarten Gruppen, wurde bei einer Normalverteilung der ungepaarte t-Test verwendet und bei nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney Test. Im Vergleich von zwei gepaarten Gruppen, wurde bei einer Normalverteilung der gepaarte t-Test verwendet; bei nicht normalverteilten Daten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Im Text sind, falls nicht anders beschrieben, die Einzelwerte und Mittelwerte oder Mittelwerte \pm Standardabweichung genannt.

3. Ergebnisse

Aborte sind eine der häufigsten Schwangerschaftskomplikationen, wobei die Ursachen für einen Abort vielfältig sein können. Welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen, ist bisher nur sehr wenig untersucht. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MDSC eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz zwischen Mutter und Fetus spielen [39, 40]. Weiter konnte gezeigt werden, dass das MHC-I-Molekül HLA-G, das als ein wesentlicher Vermittler der materno-fetalen Toleranz gilt [102], *in-vitro* eine Induktion von MDSC bewirkte [56]. Daher sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Bedeutung des MHC-I-Moleküls HLA-G für die Akkumulation und Funktion von MDSC während der Schwangerschaft und für den Schwangerschaftserhalt anhand eines Mausmodells mit Fehlen von Qa2, dem murinen Korrelat zu HLA-G, untersucht werden.

Das Fehlen von Qa2 führte bei Mäusen zu einer verringerten Wurfgröße und einer Wachstumsretardierung der Feten

In der Literatur war bereits beschrieben, dass Qa2-defiziente (Qa2⁻) Mäuse kleinere Wurfgrößen und kleinere Feten aufwiesen als Wildtyp (WT)-Tiere. Diese Beobachtungen bestätigten sich in unserer Zucht. Qa2⁻-Mäuse hatten durchschnittlich nur fünf Jungtiere im Vergleich zu WT-Mäusen mit durchschnittlich acht Jungtieren ($p = < 0,0001$; Abbildung 17 A).

Außerdem waren die Feten von Qa2⁻-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen leichter (WT: 1,12 g; Qa2⁻: 1,07 g; $p = 0,049$; Abbildung 17 B + C).

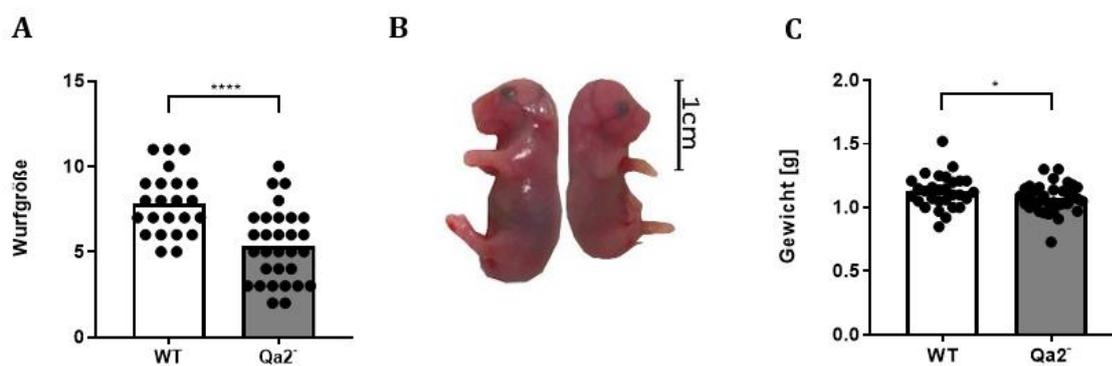


Abbildung 17: Qa2-defiziente Mäuse hatten eine geringere Wurfgröße und die Feten waren leichter.

(A) Die Wurfgrößen von Qa2⁻- und WT-Zuchtmäusen wurden überwacht und verglichen. (B + C) Qa2⁻- und WT-Mäuse wurden an Trächtigkeitstag E18.5 getötet. Die Uteri wurden entnommen und die Feten vorsichtig aus der Fruchthöhle und von der Plazenta entfernt und direkt gewogen und gemessen. (B) Fetus einer WT-Maus (links) und Fetus einer Qa2⁻-Maus (rechts) an Trächtigkeitstag E18.5. (C) Gewicht der Feten von WT- und Qa2⁻-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie der Mittelwert von WT- (weißer Balken) und Qa2⁻-Mäusen (grauer Balken). Mann-Whitney Test, **** $p = < 0,0001$, * $p = < 0,05$, $n = 19-35$.

Das Fehlen von Qa2 führte bei Mäusen zu einer erhöhten Abortrate in der zweiten Trächtigkeitshälfte

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die geringere Wurfgröße der Qa2-Mäuse durch eine erhöhte Zahl an Aborten verursacht ist, wurden trächtige Tiere zunächst an Tag E10.5 getötet und die Uteri entnommen. Die Anzahl der intakten Feten und die Anzahl abortierter Feten wurden visuell bestimmt. Ein Abort wurde definiert als ein kleinerer, deutlich retardierter Embryo mit eingebluteter Implantationsstelle (Abbildung 18 B). Die Abortrate wurde als Quotient aus abortierten Feten und abortierten + intakten Feten berechnet.

Sowohl der Anteil an Tieren, die mindestens einen Abort an Trächtigkeitstag E10.5 hatten (WT: 37 %; Qa2: 67 %; $p = < 0,0001$; Abbildung 17 A + B), als auch die Abortrate war bei Qa2-Mäusen tendenziell höher als bei WT-Mäusen (WT: 4,9 %; Qa2: 12,8 %; Abbildung 18 B + C). Der Unterschied bei der Abortrate war jedoch statistisch nicht signifikant. Interessanterweise hatten Qa2-Mütter gleich viele intakte Feten an E10.5 wie WT-Mütter (WT: 9 Feten; Qa2: 9 Feten; Abbildung 18 D).

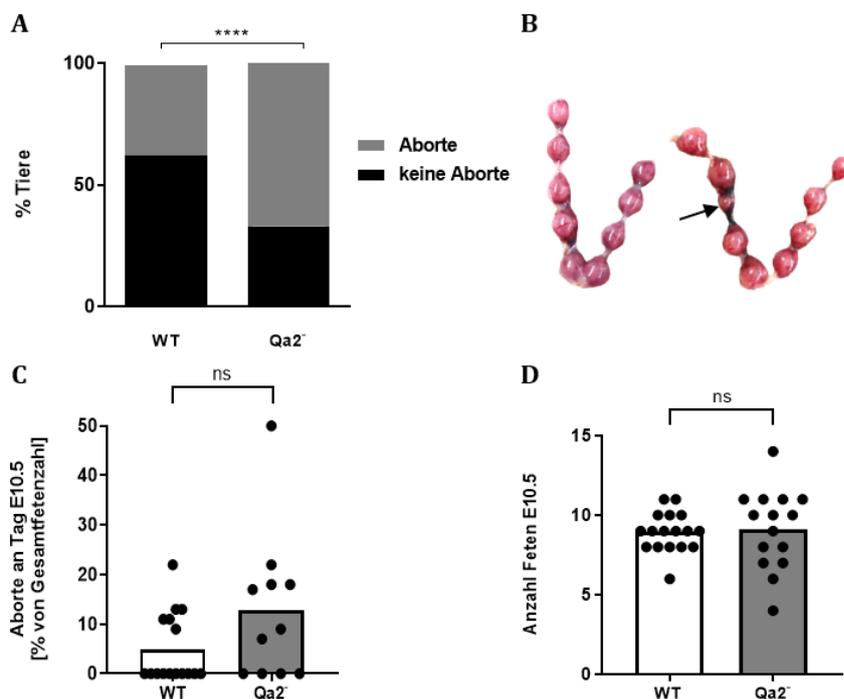


Abbildung 18: Die Anzahl an Feten von WT- und Qa2-Mäusen an Trächtigkeitstag E10.5 unterschied sich nicht, aber die Abortrate war bei Qa2-Mäusen leicht erhöht.

Trächtige Qa2- und WT-Mäuse wurden an E10.5 getötet. Die Uteri wurden entnommen und die Anzahl der Feten sowie die Abortrate wurde visuell bestimmt. (A) Anteil an Mäusen mit mindestens einem Abort. (B) Uteri von WT-Mäusen mit neun angelegten Feten (links) und Qa2-Mäusen mit neun angelegten Feten (rechts) an Trächtigkeitstag E10.5. Der Pfeil zeigt auf einen Abort. (C) Abortrate und (D) Anzahl intakter Feten von WT- und Qa2-Mäusen an Trächtigkeitstag E10.5. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie der Mittelwert von WT- (weißer Balken) und Qa2-Mäusen (grauer Balken). Mann-Whitney Test, **** $p = < 0,0001$, ns = nicht signifikant, $n = 16$.

An Tag E18.5 hingegen war die Anzahl intakter Feten bei Qa2⁻-Mäusen mit sieben Feten deutlich geringer als bei WT-Mäusen mit durchschnittlich neun Feten ($p = 0,0007$; Abbildung 19 A). Die Abortrate an E18.5 lag bei WT-Mäusen bei 6,5 % und bei Qa2⁻-Mäusen bei 16,8 % ($p = 0,0001$; Abbildung 19 B + C).

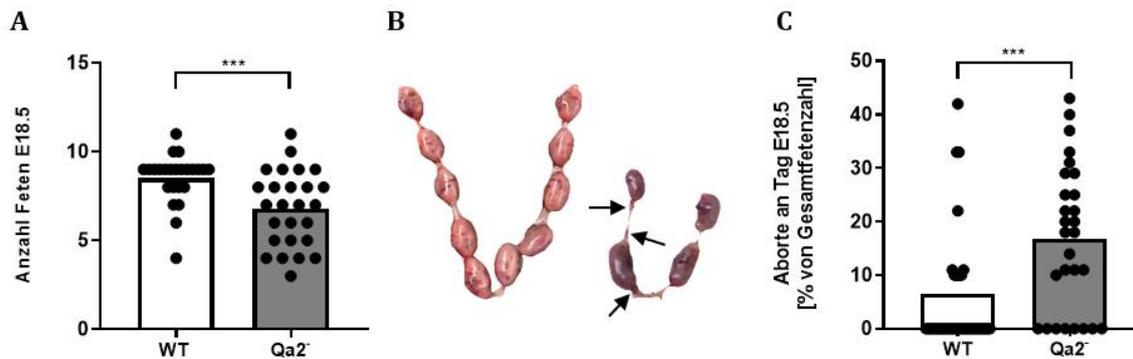


Abbildung 19: Qa2⁻-Mäuse hatten im Vergleich zu WT-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5 eine geringe Feten-Anzahl und eine höhere Abortrate.

Trächtige Qa2⁻- und WT-Mäuse wurden an E18.5 getötet. Die Uteri wurden entnommen und die Anzahl der Feten sowie die Abortrate wurde visuell bestimmt. (A) Anzahl der Feten von WT- und Qa2⁻-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5. (B) Uteri von WT-Mäusen mit 10 angelegten Feten (links) und Qa2⁻-Mäusen mit 7 angelegten Feten (rechts) an Trächtigkeitstag E18.5. Die Pfeile zeigen auf jeweils einen Abort. (C) Abortrate von WT- und Qa2⁻-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie der Mittelwert von WT- (weißer Balken) und Qa2⁻-Mäusen (grauer Balken). Mann-Whitney Test, *** $p < 0.001$, $n = 28-39$.

Das Fehlen von Qa2 führte zu einer veränderten Trophoblasten-Morphologie und zu einer veränderten Protein-Expression in der Plazenta

Zur Analyse von möglichen histologischen Veränderungen in der Plazenta, wurden Plazenten von WT- und Qa2⁻-Mäusen in Paraffin eingebettet, 3-5 μm dicke Schnitte angefertigt und diese immunhistochemisch gefärbt. Die histologischen Färbungen sowie die Analysen erfolgten durch erfahrene Pathologen im Institut für Pathologie, Mauspathologie als Core Facility unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend.

Makroskopisch zeigte sich kein Unterschied zwischen Plazenten von WT- und Qa2⁻-Feten. Die Plazenten beider Genotypen zeigten ähnliche Querschnittsflächen (Abbildung 20 A). In der HE-Färbung zeigten die Plazenten von WT-Mäusen lange und dünne Zotten mit korrekter Zotten-Morphologie. Im Gegensatz dazu zeigten Plazenten von Qa2⁻-Mäusen unregelmäßige und kurze Zotten und eine abnormale Vakuolisierung der Trophoblasten mit zahlreichen eosinophilen Aggregaten (Abbildung 20 B). Diese Aggregate waren auch in der PAS-Diastasefärbung vorhanden. Dies zeigte, dass es sich nicht um eine Glykogen-Speicherung handelte (Abbildung 20 C).

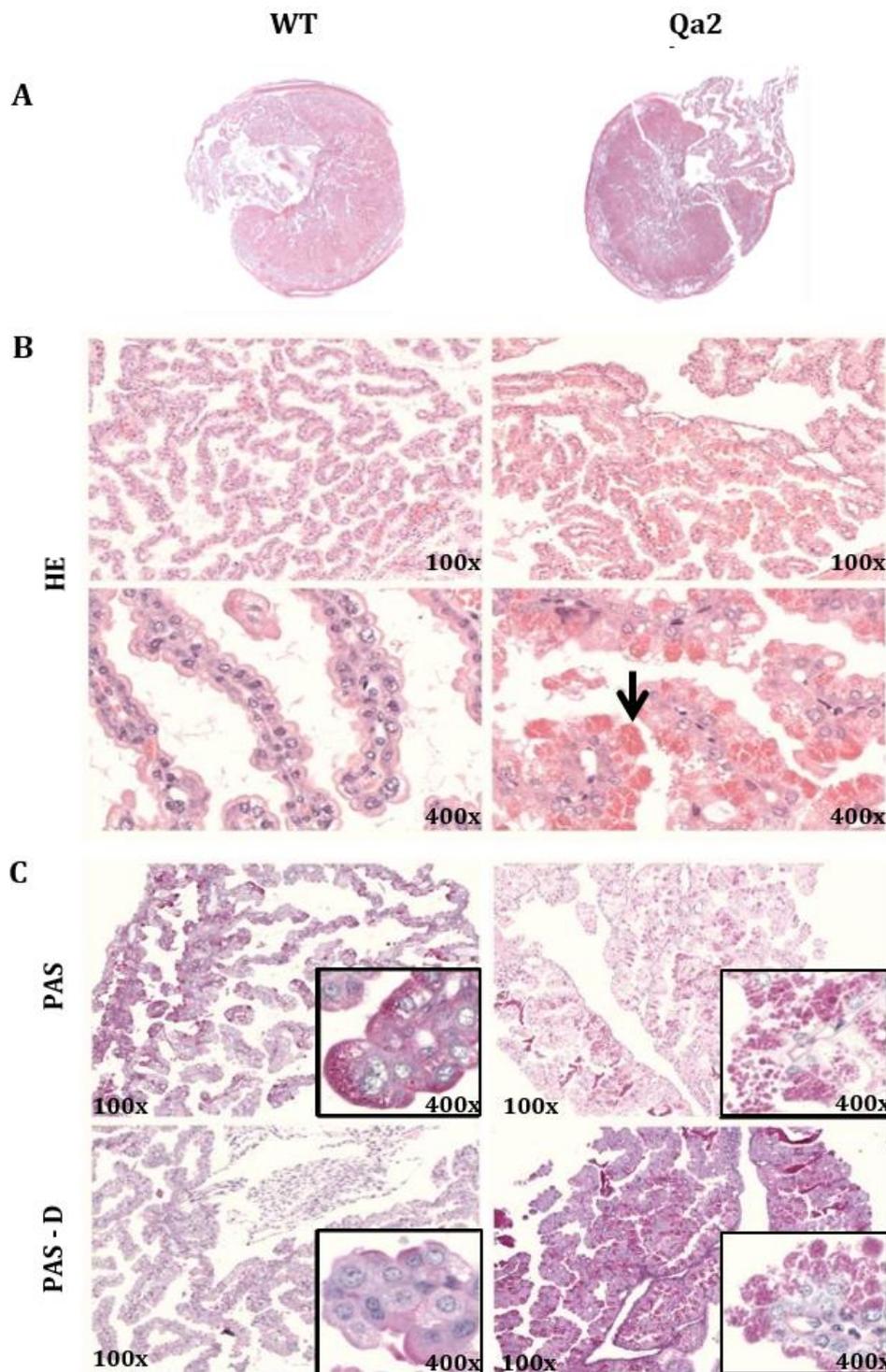


Abbildung 20: Placenten von Qa2-Mäusen zeigten eine unregelmäßige Zottenstruktur mit unbekanntem eosinophilen Aggregaten.

Placenten von WT- und Qa2-Mäusen wurden in Paraffin eingebettet und 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die immunhistochemischen Färbungen sowie die Analysen erfolgten durch Pathologen im Institut für Pathologie in Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend. (A) HE-gefärbte Überblicks-Querschnitte der Placenten von WT- (links) und Qa2-Mäusen (rechts). (B) HE-Färbung zur Darstellung der Chorionzotten in 100- und 400-facher mikroskopischer Vergrößerung. Der Pfeil zeigt auf die eosinophilen Aggregate. (C) PAS- und PAS-Diastase-Färbung zur Darstellung von Glykogen in 100- und 400-facher Vergrößerung.

Um Hinweise auf potentielle Proteine zu erhalten, die in den Trophoblasten von Qa2-Mäusen verstärkt akkumulieren, wurde eine 2D-Gelelektrophorese ganzer Plazenta-Proteinlysate von Qa2-Mäusen und WT-Mäusen durchgeführt. Makroskopisch konnten keine verstärkten Proteinexpressionen der Plazenta-Lysate von Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen entdeckt werden (Abbildung 21).

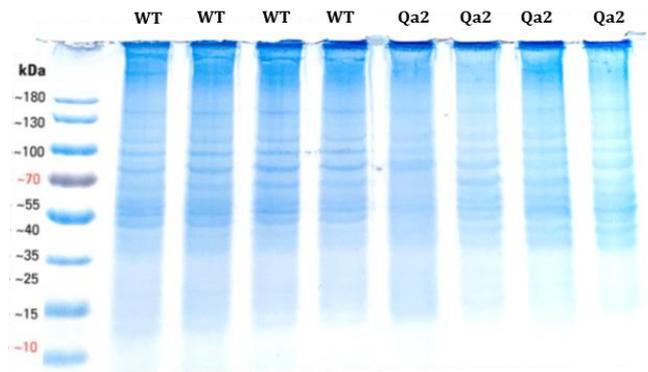


Abbildung 21: Proteinexpression der Plazenta-Lysate von Qa2- Mäusen und WT Mäusen zeigten auf der SDS Page keine Unterschiede.

Trächtige Mäuse wurden an E18.5 getötet und die Plazenten entnommen. Proteine ganzer Plazenta-Lysate von WT und Qa2--Mäusen wurden auf einer SDS-Page ihrer Größe nach aufgetrennt. Mittels Comassie-Färbung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht und visuell analysiert.

Daraufhin erfolgte eine Proteomanalyse ganzer Plazenta-Lysate mit Hilfe der LTQ-Orbitrap Massenspektrometrie durch Kollegen des Proteome Center in Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Boris Macek.

Von insgesamt 5.042 nachgewiesenen Proteinen wurden 654 Proteine nur in Plazenta-Lysaten von Qa2-Mäusen und 144 Proteine nur in Plazenta-Lysaten von WT-Mäusen nachgewiesen (Abbildung 22 A). Die Heatmap lässt eine solch große Datenmenge schnell überblicken, indem die Daten in einem Raster dargestellt werden, wobei jede Zeile ein Protein und jede Spalte eine Probe repräsentiert. Die Farbskala wird verwendet, um Veränderungen der Proteinexpression darzustellen. In Abbildung 22 steht rot/braun für eine starke Proteinexpression und gelb für eine schwache oder keine Expression.

Proteine, die nur in Qa2-Plazenten nachgewiesen wurden, zeigten eine Anreicherung an Proteinen, die vor allem an der Proteinbiosynthese und an Immunfunktionen beteiligt sind. Innerhalb der Proteine, die an Immunfunktionen beteiligt sind, zeigte die Netzwerkanalyse eine deutliche Clusterbildung zwischen Proteinen, die an der Degranulation von Neutrophilen, des Zytokin-Signallings und der Präsentation von Antigenen über MHC-I- und MHC-II-Moleküle beteiligt sind (Abbildung 22 B + Anhang Abbildung 46).

Die Proteininteraktionsnetzwerk-Analysen ermöglichen die Identifizierung der in einem biologischen Organismus vorhandenen hochkomplexen Verbindungen und Zusammenhänge zwischen einzelnen Proteinen.

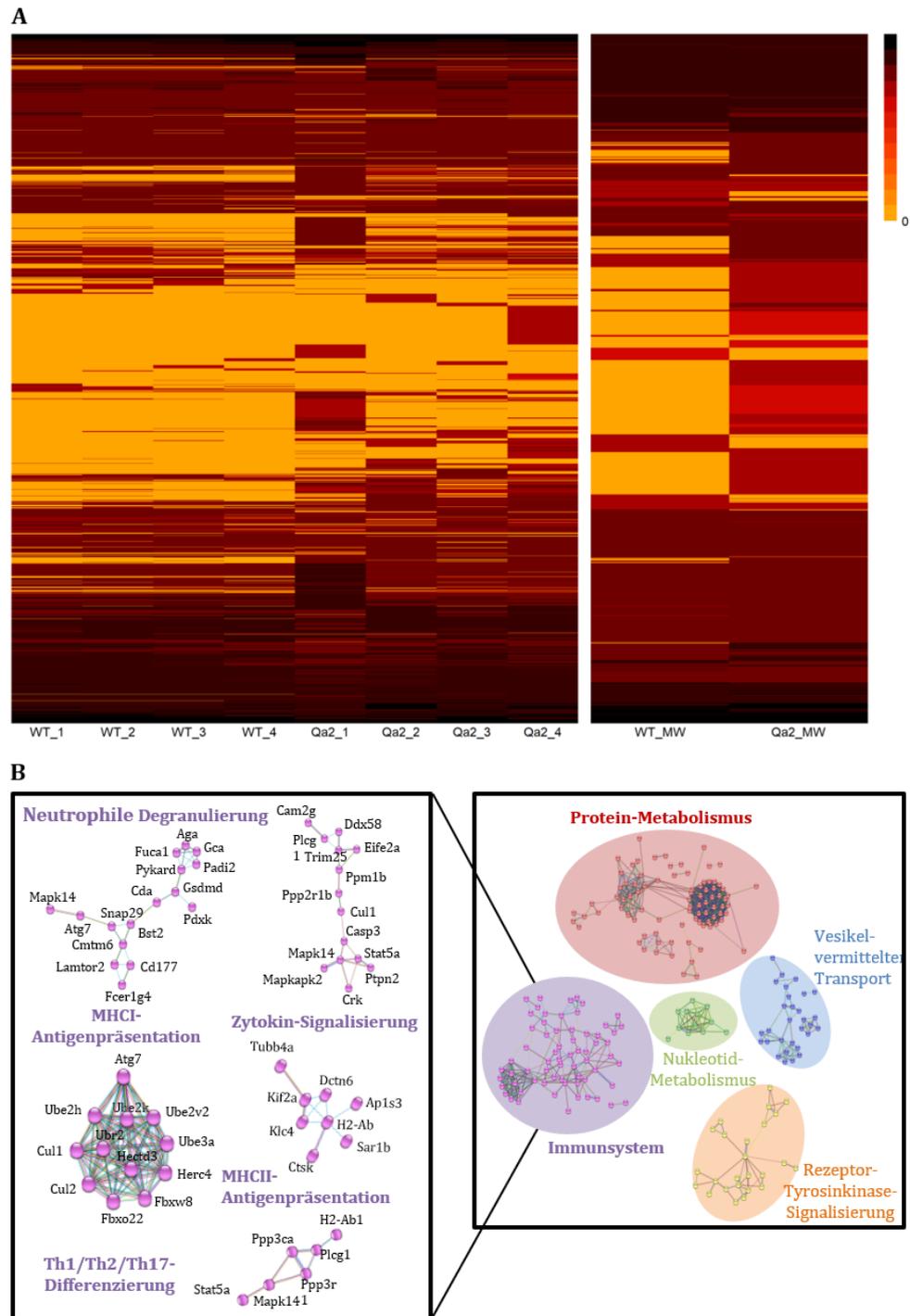


Abbildung 22: Proteine, die nur in Plazenten von Qa2--Mäusen nachgewiesen wurden, waren hauptsächlich an der Proteinbiosynthese und bei Immunfunktionen beteiligt.

Trächtige Mäuse wurden an E18.5 getötet und die Plazenten entnommen. Das Gewebe wurde manuell zerkleinert, Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellen lysiert. Die Lysate wurden mit Hilfe der LTQ-Orbitrap Massenspektrometrie analysiert. (A) Heatmap aller exprimierten Proteine bei vier WT- und vier Qa2-Mäusen (links) und zusammengefasst die Mittelwerte (MW) der Expressionsstärken aller exprimierten Proteine bei WT- und Qa2-Mäusen (rechts). Der Farbverlauf stellt die Expressionsstärke dar. (B) Die Proteininteraktionen wurden mit Hilfe der STRING-Datenbank veranschaulicht. Die schematischen Abbildungen mit Proteinnetzwerken zeigen die nur bei Qa2-Mäusen exprimierten Proteine.

Das Fehlen von Qa2 führte zu Veränderungen im Genexpressionsprofil des Uterus

Um Hinweise auf eine unterschiedliche Genexpression in den Uteri von Qa2-Mäusen und WT-Mäusen zu erhalten, wurden Transkriptomanalysen von Uterus-Lysaten durchgeführt. Es wurden insgesamt 17.210 Gene identifiziert und davon waren 610 sowohl bei WT- als auch bei Qa2-Mäusen reguliert. Hierbei zeigte sich, dass es bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen zu einer Runterregulierung von 380 Genen kam, die in Netzwerkanalysen eine deutliche Clusterbildung zeigten (Abbildung 23 A). Die Netzwerkanalysen ermöglichen die Identifizierung von Verbindungen und Zusammenhänge einzelner Gene. Eine Clusterbildung zeigt die Zusammengehörigkeit von Genen bezüglich ihrer biologischen Funktionen.

Die 230 Gene, welche bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen hochreguliert waren, zeigten kein Clustering, welches zu bestimmten biologischen Prozessen zugeordnet werden konnten (Abbildung 23 B).

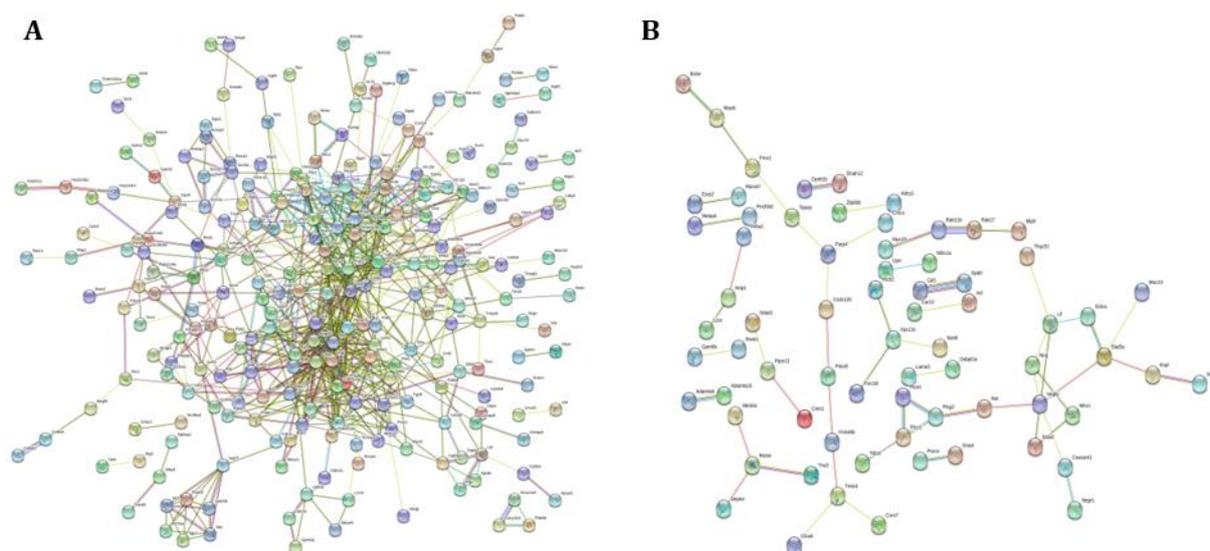


Abbildung 23: Bei Qa2-Mäusen kam es im Vergleich zu WT-Mäusen vermehrt zu Runterregulierung bestimmter Gene

Für die Transkriptomanalysen durch die Kollegen des Next-Generation-Sequencing (NGS) Competence Center Tübingen (NCCT) wurden zwei trächtige WT- und zwei trächtige Qa2-Mäuse an E18.5 getötet und der Uterus postmortal entnommen. Die RNA wurde isoliert und sequenziert. Dargestellt sind Netzwerkanalysen von Genen, die bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (A) runter- bzw. (B) hochreguliert waren. Die Gene werden durch farbige Kreise symbolisiert und die Interaktionen sind durch Verbindungslinien dargestellt.

Bei WT-Mäusen waren im Vergleich zu Qa2-Mäusen insbesondere Gene exprimiert, die bei der Vaskulogenese, der Neurogenese und bei immunologischen Prozessen von Bedeutung sind. Diese Gene spielen besonders bei der Bildung neuer Blutgefäße und Nervenzellen, der Signalweiterleitung durch Zytokine/Chemokine, der Differenzierung von myeloiden Zellen, der

Apoptose, der Migration von Leukozyten und der Aktivierung von Lymphozyten eine Rolle (Abbildung 24).

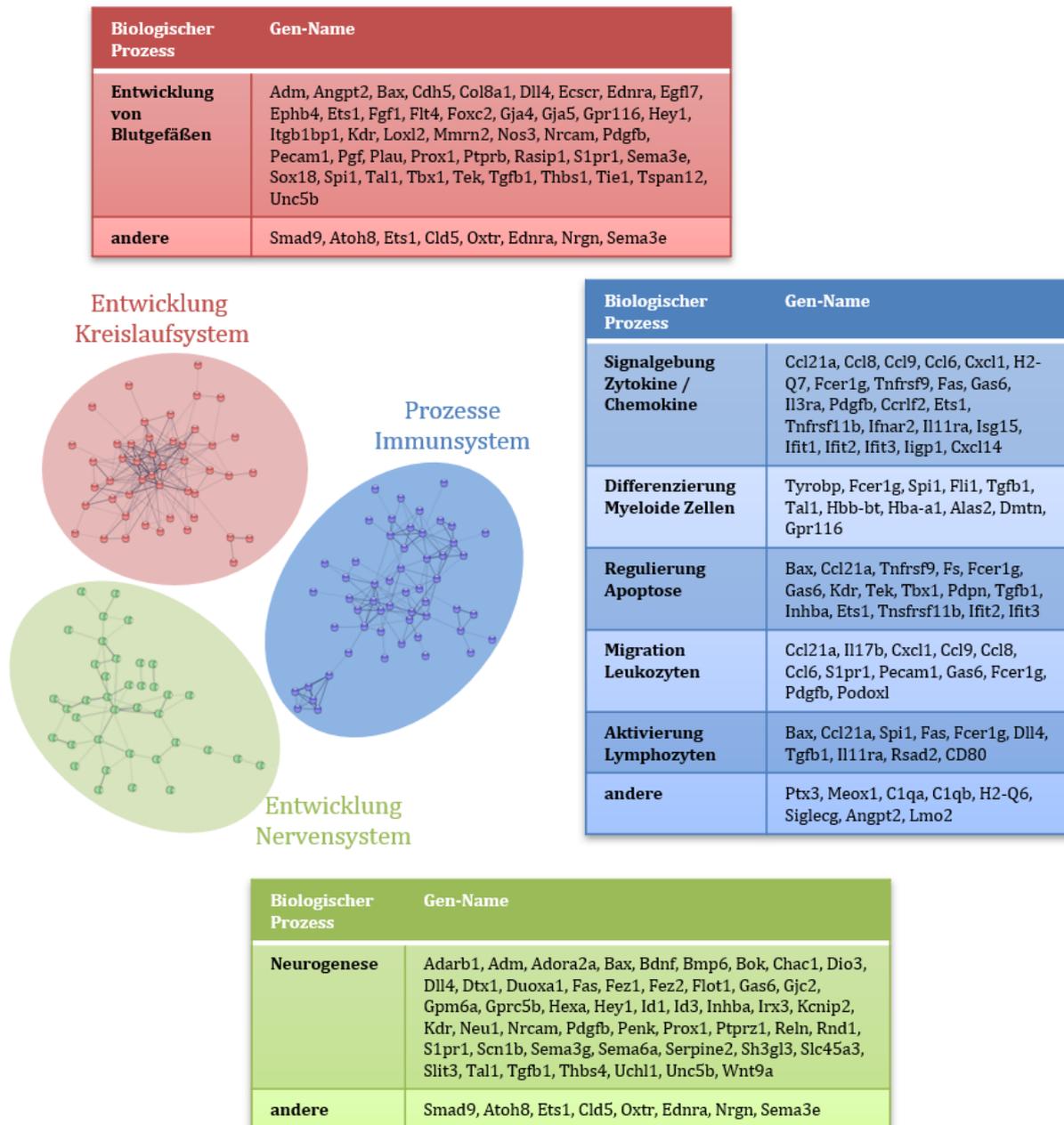


Abbildung 24: Gene, die für die Entwicklung von Blutgefäßen, für die Neurogenese und für Prozesse des Immunsystems verantwortlich sind, waren im Uterus von Qa2-defizienten Mäusen runterreguliert.

Trächtige WT- und Qa2-Mäuse wurden an E18.5 getötet und der Uterus entnommen. Die RNA wurde isoliert und durch Kollegen des Next-Generation-Sequencing (NGS) Competence Center Tübingen (NCCT) sequenziert. Dargestellt ist eine schematische Abbildung mit Ausschnitten aus den Netzwerkanalysen von den Genen, welche bei WT-Mäusen im Vergleich zu Qa2-Mäusen hochreguliert waren.

Die Akkumulation von MDSC während der Trächtigkeit ist bei Qa2-defizienten Mäusen gestört

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Fehlens von Qa2 auf die Immunzell-Komposition und insbesondere auf die Akkumulation von MDSC während der Trächtigkeit untersucht. Die Gating-Strategie für MDSC- und MDSC-Subpopulationen ist in Abbildung 25 veranschaulicht.

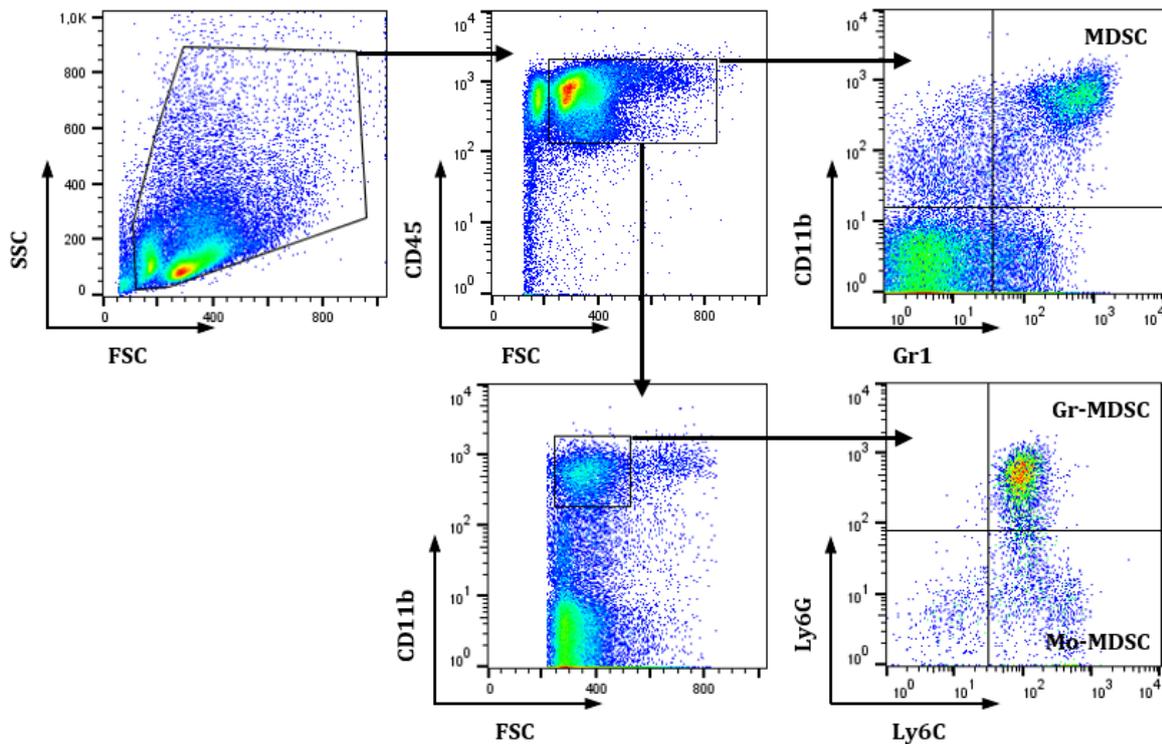


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Gating-Strategie zur Identifizierung muriner MDSC und MDSC-Subpopulationen.

Die Färbung CD45, CD11b und Gr1 ermöglicht die Bestimmung von MDSC - Gesamtpopulation (CD45⁺ CD11b⁺ Gr1⁺). CD45 und CD11b in Kombination mit Ly6G und Ly6C ermöglicht die Bestimmung der MDSC-Subpopulationen granulozytäre (Gr)-MDSC (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁻) und monozytäre (Mo)-MDSC (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺).

Bei WT-Mäusen kam es in der Milz im Verlauf der Trächtigkeit zu einem Anstieg der MDSC-Zahlen von $3,9 \pm 0,9$ % (nicht trüchtig) auf $9,1 \pm 4,9$ % (E18.5) ($p < 0,0001$). Bei Qa2-Mäusen blieb die MDSC-Akkumulation aus ($6,0 \pm 3,5$ % (nicht trüchtig); $6,8 \pm 1,9$ % (E18.5); Abbildung 26 A + B).

Auch im Uterus stiegen die MDSC-Zahlen bei WT-Mäusen im Verlauf der Trächtigkeit von $18,8 \pm 10,8$ % (nicht trüchtig) auf $33,2 \pm 10,3$ % (E18.5) ($p = 0,0017$), was bei Qa2-Mäusen ebenfalls ausblieb ($23,6 \pm 13,5$ % (nicht trüchtig); $25,2 \pm 6,0$ % (E18.5); Abbildung 26 C + D).

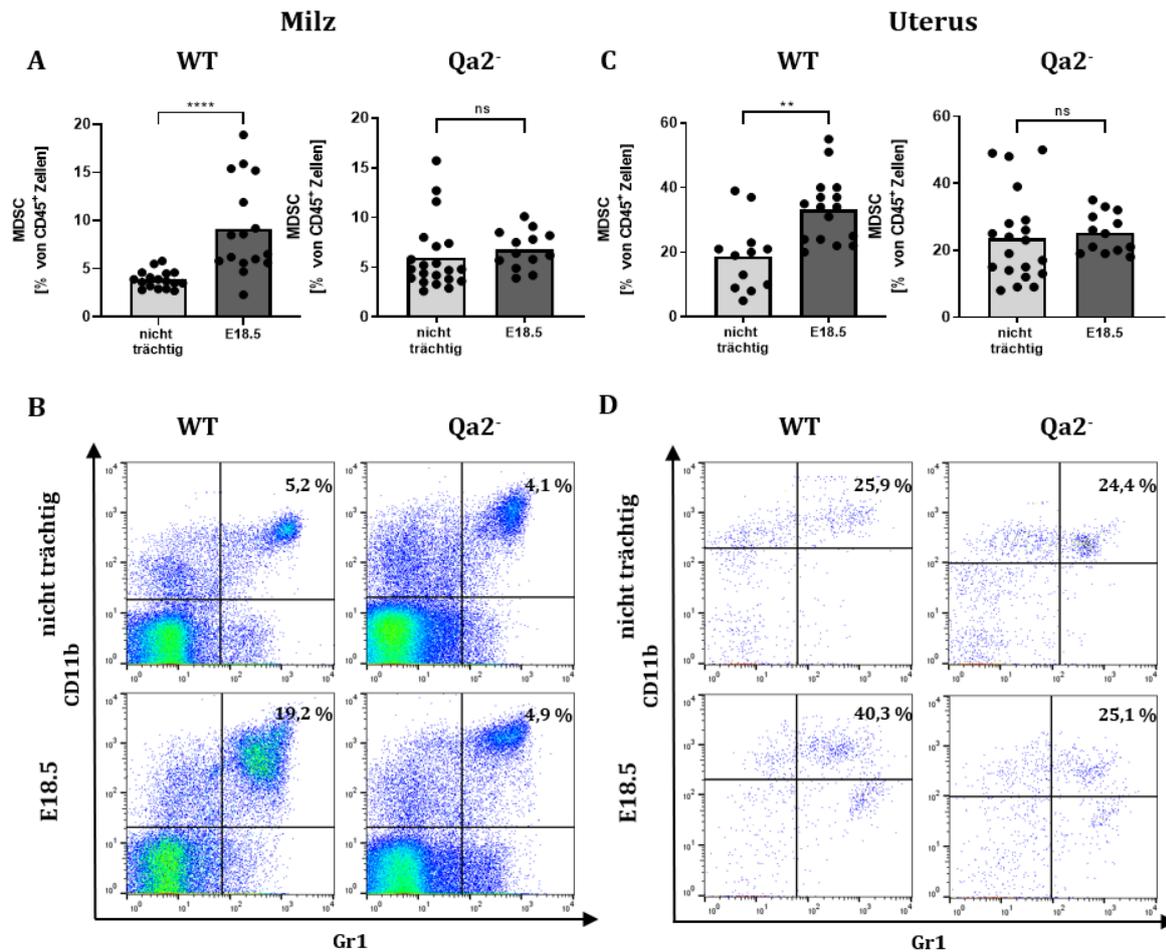


Abbildung 26: Bei Qa2⁻-Mäusen kam es während der Trächtigkeit im Vergleich zu WT-Mäusen zu keinem Anstieg der MDSC-Zahlen in der Milz.

Nicht trächtige Mäuse und Mäuse an Trächtigkeitstag E18.5 wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die MDSC (CD45⁺CD11b⁺Gr1⁺) wurden durchflusszytometrisch quantifiziert. (A + C) Streudiagramme zeigen prozentuale MDSC-Zahlen von allen CD45⁺ Zellen bei nicht trächtigen Mäusen (hellgrau) und an E18.5 (dunkelgrau) sowohl bei WT-Mäusen als auch bei Qa2⁻-Mäusen in der Milz (A) und im Uterus (C). Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test, **** p < 0.0001, ns = nicht signifikant, n = 16. (B + D) Repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen von MDSC (CD45⁺ CD11b⁺ Gr1⁺) in der Milz (B) und im Uterus (D) von nicht trächtigen Mäusen und Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5.

Auch im Blut und im Knochenmark kam es nur bei WT-Mäusen im Verlauf der Trächtigkeit zu einer Akkumulation von MDSC. Die Akkumulation von MDSC betraf bei WT-Tieren sowohl die Subpopulation der Gr-MDSC als auch die der Mo-MDSC (Tabelle 12).

Tabelle 12: Prozentzahlen von MDSC und den MDSC-Subpopulationen in Milz, Uterus, Plazenta, Blut und Knochenmark.

Nicht trüchtige Mäuse und Mäuse an Trüchtigkeitstag E18.5 wurden getötet und es wurden Blut, Milz, Plazenta, Knochenmark und Uterus entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die verschiedenen Immunzellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Prozentzahlen der nicht trüchtigen Tiere. Mann-Whitney Test, $n = 16$, * $p = < 0.05$, ** $p = < 0.01$, *** $p = < 0.001$, **** $p = < 0.0001$.

	Wildtyp-Mäuse		Qa2-defiziente Mäuse	
	nicht trüchtig	E18.5	nicht trüchtig	E18.5
MDSC				
Milz	3,9 \pm 0,9 %	9,1 \pm 4,9 % ****	6,0 \pm 3,5 %	6,8 \pm 1,9 %
Uterus	18,8 \pm 10,8 %	33,2 \pm 10,3 % **	23,6 \pm 13,5 %	25,2 \pm 6,0 %
Blut	12,1 \pm 1,9 %	19,0 \pm 4,0 % ****	13,0 \pm 3,4 %	15,7 \pm 4,6 % *
Knochenmark	57,9 \pm 6,7 %	68,7 \pm 3,6 % ****	62,9 \pm 6,8 %	66,7 \pm 4,0 % *
Plazenta	N/A	31,5 \pm 8,0 %	N/A	28,5 \pm 10,3 %
Gr-MDSC				
Milz	3,3 \pm 0,8 %	7,4 \pm 3,6 % ****	4,9 \pm 3,2 %	4,9 \pm 1,4 %
Blut	9,5 \pm 2,1 %	14,5 \pm 2,4 % ****	9,5 \pm 3,4 %	11,5 \pm 3,8 %
Knochenmark	43,1 \pm 5,5 %	48,7 \pm 3,3 % **	43,5 \pm 6,2 %	47,5 \pm 3,2 % *
Mo-MDSC				
Milz	3,7 \pm 2,4 %	6,7 \pm 3 % **	4,9 \pm 3,8 %	4,1 \pm 1,5 %
Blut	7,9 \pm 1,5 %	8,5 \pm 1,7 %	9,9 \pm 2,2 %	9,3 \pm 2,6 %
Knochenmark	19,2 \pm 2,2 %	22,6 \pm 2,6 % ***	23 \pm 3,8 %	21,4 \pm 2,9 %
* Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Zahlen der nicht trüchtigen Mäuse				

Das Fehlen von Qa2 führte zu einem veränderten Lymphozyten-Profil

Im Hinblick auf andere Immunzellpopulationen zeigte sich ein Anstieg der T-Zellen in der Milz von Qa2-Mäusen während der Trächtigkeit ($31,5 \pm 4,5\%$ (nicht trüchtig) und $38,8 \pm 6,8\%$ (E18.5); $p = 0,0014$; Abbildung 27 B + C), welcher bei WT-Mäusen nicht zu beobachten war ($34,9 \pm 4,9\%$ (nicht trüchtig) und $33,9 \pm 6,6\%$ (E18.5); Abbildung 27 A + C).

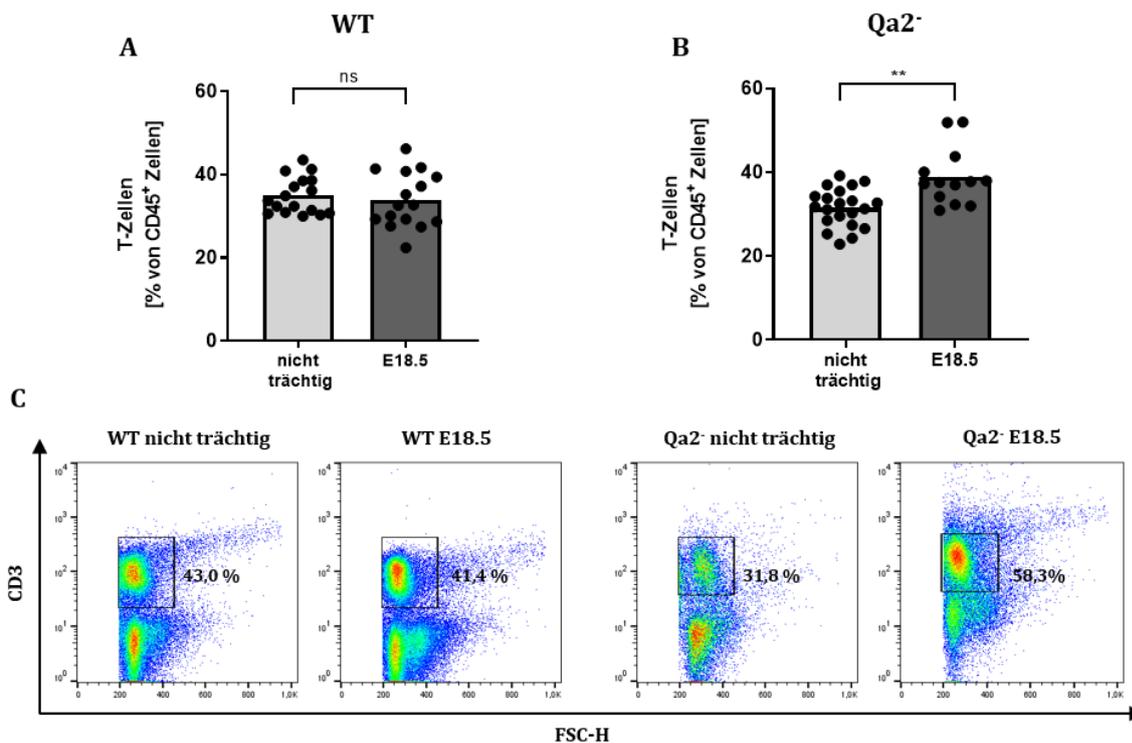


Abbildung 27: Bei Qa2-defizienten Mäusen kam es während der Trächtigkeit im Gegensatz zu WT-Mäusen zu einem Anstieg der T-Zellen in der Milz.

Nicht trüchtige Mäuse und Mäuse an Trüchtigkeitstag E18.5 wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und der Anteil von T-Zellen (CD3⁺) an allen Leukozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A + B) Streudiagramme zeigen die prozentualen Anteile von CD3⁺ T-Zellen an allen CD45⁺ Zellen bei nicht trüchtigen Mäusen (hellgrau) und an E18.5 (dunkelgrau) bei WT- und Qa2-Mäusen. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test, ** $p < 0.01$, ns = nicht signifikant, $n = 16$. (C) Repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen von T-Zellen (CD3⁺) in der Milz von nicht trüchtigen Mäusen und Mäusen an Trüchtigkeitstag E18.5.

Neben der Zunahme von T-Zellen, kam es im Verlauf der Trächtigkeit zu einer Abnahme der B-Zellen in der Milz von Qa2-Mäusen, während die Anzahl an B-Zellen in der Milz von WT-Mäusen unverändert blieb. Bei WT-Mäusen, aber nicht bei Qa2-Mäusen nahmen die NK-Zellen in der Milz während der Trächtigkeit zu. Die uterinen NK-Zellen waren bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen an E18.5 deutlich verringert (Tabelle 13).

In den anderen Organen waren keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten der untersuchten Immunzellpopulationen zu beobachten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Immunzellen in Milz, Blut, Knochenmark, Plazenta und Uterus.

Nicht trächtige Mäuse und Mäuse an E18.5 wurden getötet und die Organe entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die verschiedenen Immunzell-Populationen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte in Prozent \pm Standardabweichung. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Prozentzahlen der nicht trächtigen Tiere. Mann-Whitney Test, $n = 16$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, N/A = nicht verfügbar.

	Wildtyp-Mäuse		Qa2-defiziente Mäuse	
	nicht trächtig	E18.5	nicht trächtig	E18.5
Milz				
T-Helferzellen	20,4 \pm 4,5 %	18 \pm 4,4 %	20 \pm 4,5 %	21,5 \pm 3 %
zytotox.T-Zellen	13 \pm 2,6 %	12,2 \pm 5,2 %	14,1 \pm 4 %	15,3 \pm 2,4 %
B-Zellen	36,7 \pm 13,4 %	31,6 \pm 13,3 %	42,2 \pm 11,2 %	32 \pm 13,7 % *
Monozyten	4,2 \pm 1,4 %	6,1 \pm 2,5 % **	5,4 \pm 2,1 %	4,1 \pm 1,5 %
NK-Zellen	2,5 \pm 0,9 %	3,5 \pm 1,6 % *	2,7 \pm 0,7 %	2,6 \pm 0,9 %
Blut				
T-Zellen	32,0 \pm 7,8 %	33,9 \pm 3,5 %	30,4 \pm 6,5 %	35,3 \pm 8,9 %
T-Helferzellen	15,6 \pm 4,3 %	15,9 \pm 2,9 %	13,5 \pm 2,3 %	14,5 \pm 4,5 %
zytotox.T-Zellen	12 \pm 3,3 %	11,1 \pm 1,3 %	12,5 \pm 3,1 %	12,2 \pm 3,4 %
B-Zellen	32 \pm 9,8 %	29,8 \pm 5,7 %	32,7 \pm 9,1 %	29,1 \pm 11,4 %
Monozyten	10,3 \pm 3 %	11,7 \pm 2,8 %	12,6 \pm 3,2 %	13,4 \pm 5,1 %
NK-Zellen	5,8 \pm 2,5 %	6,5 \pm 1,4 %	6,5 \pm 2 %	5,4 \pm 1,5 %
Knochenmark				
B-Zellen	19,1 \pm 5,5 %	10,6 \pm 3 % ****	12,6 \pm 6,9 %	7,1 \pm 2,3 % **
Monozyten	4,1 \pm 1,6 %	5,1 \pm 2,3 %	3,8 \pm 1,5 %	5,4 \pm 1,9 % *
Uterus				
T-Zellen	33,1 \pm 9,6 %	35,3 \pm 7,3 %	33,4 \pm 11,6 %	38,4 \pm 10,3 %
T-Helferzellen	9,9 \pm 4,8 %	6,2 \pm 1,9 % **	12,6 \pm 6,7 %	7,5 \pm 3 % **
zytotox.T-Zellen	5,9 \pm 3,6 %	3,5 \pm 1,6 % *	7,4 \pm 4,1 %	5 \pm 2,9 % *
B-Zellen	6,6 \pm 5,1 %	2,8 \pm 1,7 % **	6,9 \pm 4,8 %	3,2 \pm 1,3 % **
Monozyten	17 \pm 8,2 %	11,3 \pm 5,3 %	12,3 \pm 6,4 %	14 \pm 4,7 %
NK-Zellen	10,8 \pm 9,6 %	6,1 \pm 3,5 %	17,1 \pm 10,9 %	6,6 \pm 2 % ***
Plazenta				
T-Zellen	Ø trächtig	E18.5	Ø trächtig	E18.5
T-Zellen	N/A	14,9 \pm 3,3 %	N/A	16,2 \pm 4,7 %
T-Helferzellen	N/A	11,2 \pm 5,5 %	N/A	14,1 \pm 8,3 %
zytotox.T-Zellen	N/A	14,3 \pm 6,3 %	N/A	18,1 \pm 10,4 %
B-Zellen	N/A	19,8 \pm 5,7 %	N/A	21,5 \pm 8,4 %
Monozyten	N/A	7,5 \pm 1,9 %	N/A	7,3 \pm 2,0 %
NK-Zellen	N/A	1,8 \pm 0,5 %	N/A	1,8 \pm 0,4 %

* Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die nicht trächtigen Mäuse

Weiter wurden anhand charakteristischer Oberflächenmarker verschiedene T-Zell-Subpopulationen, wie in Abbildung 28 dargestellt, in der Milz von WT- und Qa2-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5 vergleichend analysiert.

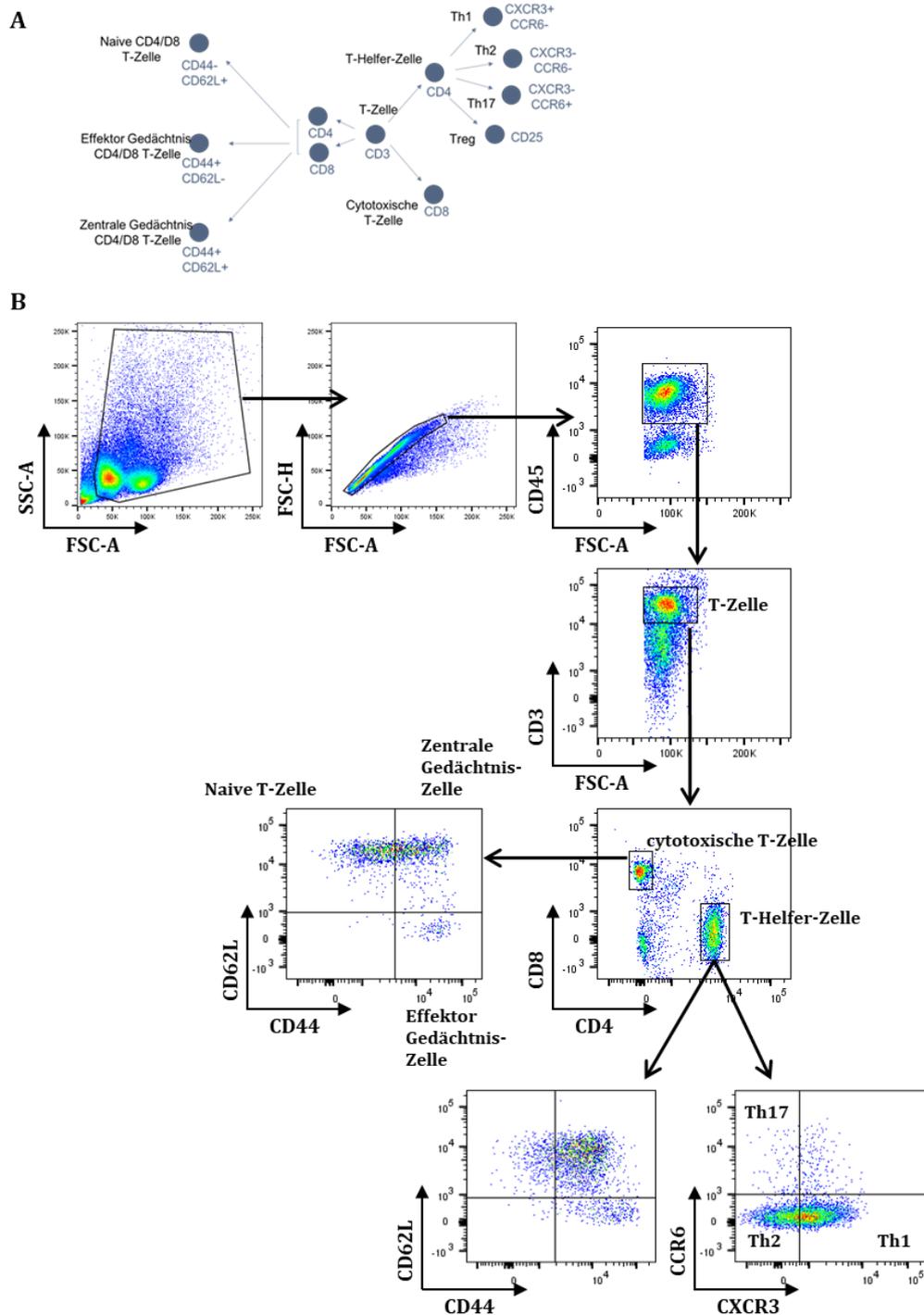


Abbildung 28: Schematische Darstellung der T-Zell-Subpopulationen mit den dazugehörigen Oberflächenmarker und die Gating-Strategie.

Die Färbungen CD3, CD4, CD8, CD44 und CD62L ermöglicht die Differenzierung von T-Zellen nach ihrem Aktivierungszustand. CD3 und CD4 in Kombination mit CXCR3 und CCR6 ermöglicht die Differenzierung von T-Zellen nach ihrem Effektor-Phänotyp.

Naive CD4⁺ und naive CD8⁺ T-Zellen unterschieden sich nicht zwischen trächtigen WT- und trächtigen Qa2⁻-Mäusen (CD4⁺: 11,3 ± 3,1 % (WT) vs. 10,6 ± 3,3 % (Qa2⁻); Abbildung 29 A und CD8⁺ 47,3 ± 9,3 % (WT) vs. 38,7 ± 7,4 % (Qa2⁻); Abbildung 29 D). Qa2⁻-Mäuse hatten in der Milz mit 36,7 ± 13,6 % und 18,2 ± 17,3 % signifikant mehr Effektor Gedächtnis CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als WT-Mäuse mit 16,2 ± 9,2 % und 5,3 ± 3,8 % (CD4⁺: p = < 0,0001; CD8⁺: p = 0,0015; Abbildung 29 B + E).

Weiterhin wiesen Qa2⁻-Mäuse in der Milz deutlich geringere Zahlen an Zentralen Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen auf als WT-Mäuse (71,7 ± 8,8 % (WT) vs. 51,7 ± 14,8 % (Qa2⁻); p = 0,0006; Abbildung 29 C), während sich die zentralen Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen nicht unterschieden (46,4 ± 6,6 % (WT) vs. 40 ± 14,8 % (Qa2⁻); Abbildung 29 F).

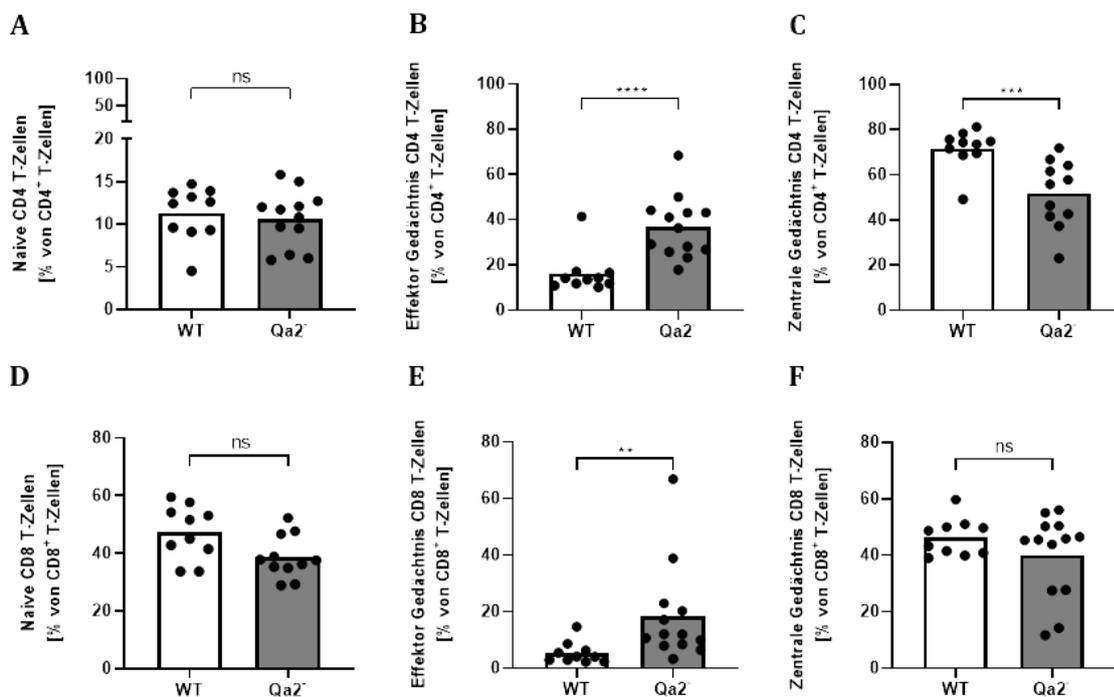


Abbildung 29: Qa2-defiziente Mäuse hatten in der Milz vermehrt Effektor-Gedächtniszellen.

Mäuse wurden an Trächtigkeitstag E18.5 getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die T-Zellsubpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt. (A-F) Streudiagramme zeigen die prozentualen Anteile an T-Zell-Subpopulationen bei WT-Mäusen (weißer Balken) und Qa2⁻-Mäusen (graue Balken) an Trächtigkeitstag E18.5. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test, **** p = < 0,0001, *** p = < 0,001, ** p = < 0,01, ns = nicht signifikant, n = 14.

Hinsichtlich der T-Helferzell-Subpopulationen zeigt sich kein Unterschied zwischen WT- und Qa2⁻-Mäusen bei Th1- und Th2-Zellen (Th1: 55,0 ± 11,9 % (WT) vs. 49,4 ± 12,6 % (Qa2⁻), Th2: 39,2 ± 12,6 % (WT) vs. 39,3 ± 13,8 % (Qa2⁻)), aber erhöhte Zahlen an Th17-Zellen in der Milz von Qa2⁻-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5 (Th17: 1,8 ± 0,7 % (WT) vs. 3,8 ± 2,9 % (Qa2⁻); p = 0,0035; Abbildung 30 A-C).

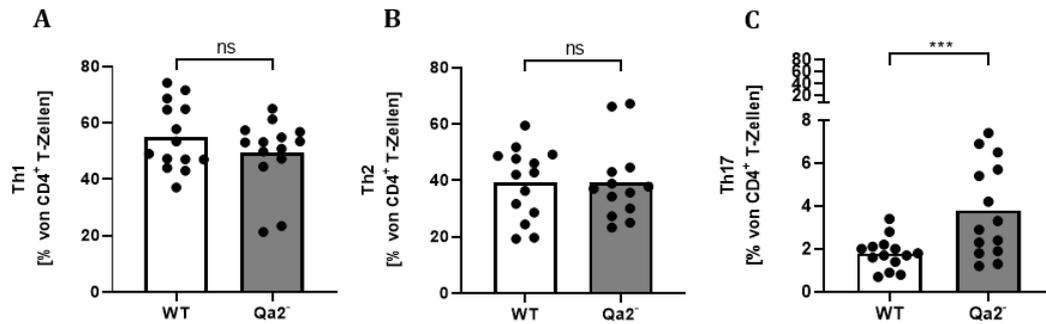


Abbildung 30: Qa2-defiziente Mäuse hatten in der Milz eine höhere Th17-Antwort.

Mäuse wurden an Trächtigkeitstag E18.5 getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die T-Zellsubpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt. (A-C) Streudiagramme zeigen die prozentualen Anteile an Th1- (A), Th2- (B) und Th17-T-Zellen (C) bei WT-Mäusen (weiße Balken) und Qa2-Mäusen (graue Balken) an Trächtigkeitstag E18.5. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test, ns = nicht signifikant, *** $p < 0.001$, ns = nicht signifikant, $n = 14$.

Außerdem hatten Qa2-Mäuse in der Milz deutlich niedrigere Zahlen an CD25⁺ regulatorischen T-Zellen als WT-Mäuse ($6,7 \pm 2,8$ % (WT) vs. $4,3 \pm 1,6$ % (Qa2⁻); $p = 0,0086$; Abbildung 31 A + B). Dies wurde durch intrazelluläre Färbung von Foxp3 bestätigt ($6,1 \pm 1,0$ % (WT) vs. $4,3 \pm 1,4$ % (Qa2⁻); $p = 0,031$; Abbildung 31 C + D).

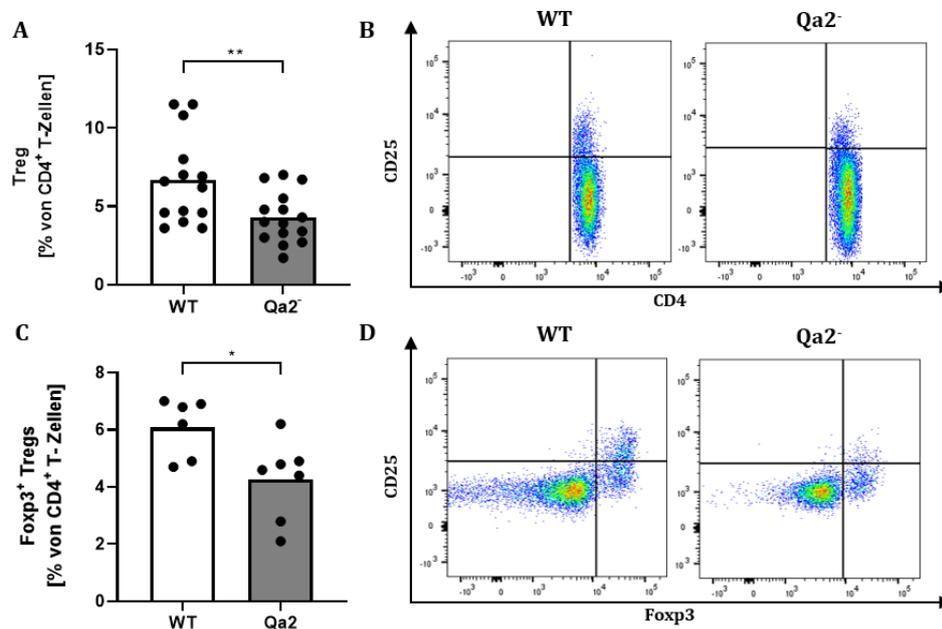


Abbildung 31: Qa2-defiziente Mäuse hatten in der Milz weniger Tregs und diese produzierten weniger Foxp3.

Mäuse wurden an Trächtigkeitstag E18.5 getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die Treg-Populationen durchflusszytometrisch bestimmt. (A+C) Streudiagramme zeigen die prozentualen Anteile an Tregs bei WT-Mäusen (weiße Balken) und Qa2-Mäusen (graue Balken) an Trächtigkeitstag E18.5. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n = 6-14$. (B+D) Repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen von Tregs in der Milz von WT-Mäusen und Qa2-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5.

Das Fehlen von Qa2 führte zu einer verringerten Funktionalität von MDSC

Neben der suppressiven Aktivität auf T-Zellen, ist die Induktion von T_{regs} eine bereits beschriebene funktionelle Eigenschaft von MDSC [47, 186]. Aufgrund der mit der verminderten MDSC-Akkumulation einhergehenden verringerten T_{reg}-Zahlen bei Qa2-Mäusen wurde die Kapazität von MDSC T_{regs} zu induzieren und die T-Zell-Proliferation zu hemmen untersucht.

In-vitro generierte MDSC aus Knochenmark von nicht trächtigen WT- als auch von Qa2-Mäusen wurden zu isolierten CD4⁺ T-Zellen aus nicht trächtigen WT-Mäusen gegeben und nach drei Tagen wurde die Expression von Foxp3 intrazellulär analysiert. Als Kontrolle diente eine Monokultur von T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen exprimierten ohne die Zugabe von generierten MDSC kein Foxp3 ($0,22 \pm 0,15$ %). *In-vitro* generierte MDSC aus Knochenmark sowohl von WT- als auch von Qa2-Mäusen induzierten T_{regs}, wobei MDSC von Qa2-Mäusen eine im Vergleich zu MDSC von WT-Mäusen verminderte Kapazität zur T_{reg}-Induktion zeigten ($12,0 \pm 4,0$ % (WT) vs. $10,7 \pm 4,2$ % (Qa2); $p = 0,001$; Abbildung 32).

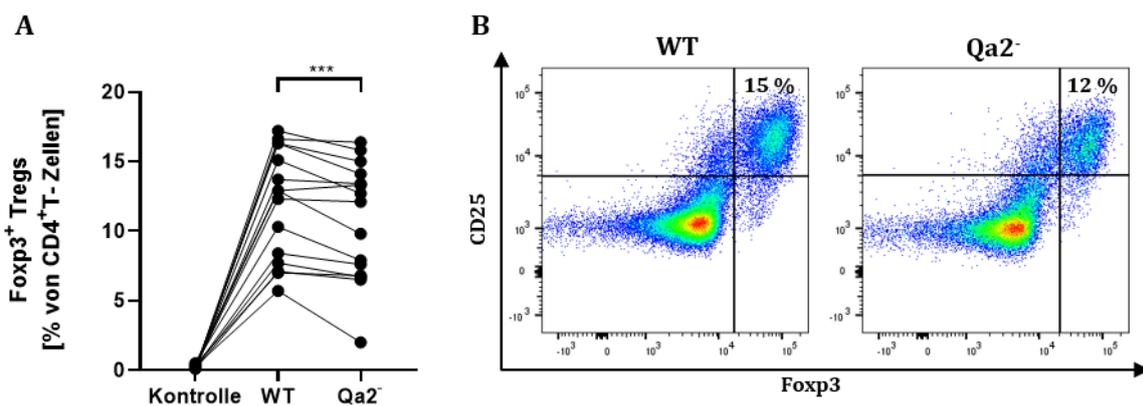


Abbildung 32: MDSC von Qa2-Mäusen induzierten im Vergleich zu WT-Mäusen weniger T_{regs}.

Nicht trächtige Mäuse wurden getötet und Knochenmark entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellen wurden zur MDSC-Generierung für vier Tage mit GM-CSF und G-CSF kultiviert. Die CD25⁺Foxp3⁺ T_{regs} wurden nach Intrazellulärfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Das Liniendiagramm zeigt die prozentualen Anteile an CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen nach 4 tägiger Kultivierung ohne MDSC (Kontrolle), mit WT-MDSC (WT) und MDSC von Qa2-Mäusen (Qa2). Die Linien verbinden die zusammengehörigen Punkte einer Messung. Dargestellt sind die Einzelwerte. Friedmans-Test, **** $p < 0,001$, $n = 15$. (B) Repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen von induzierten CD25⁺Foxp3⁺ T_{regs} durch *in-vitro* generierte MDSC von WT-Mäusen und Qa2-Mäusen.

Zur Untersuchung der suppressiven Aktivität wurden MDSC aus der Milz von trächtigen WT- und Qa2-Mäusen zu isolierten und CFSE-gefärbten CD4⁺ T-Zellen aus nicht trächtigen WT-Mäusen gegeben und nach 72 h wurde die T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch gemessen.

Die Hemmung der CD4⁺ T-Zell-Proliferation war bei MDSC aus trächtigen Qa2⁻-Mäusen ebenfalls geringer ausgeprägt als bei MDSC aus WT-Mäusen. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (2:1 T-Zellen : MDSC 56,2 ± 22,8 % (Qa2⁻) vs. 40,9 ± 22,9 % (B6), 4:1 81,6 ± 18,1 % (Qa2⁻) vs. 65,7 ± 23,0 % (B6) und 8:1 90,7 ± 13 % (Qa2⁻) vs. 82,8 ± 12,3 % (B6); alle p > 0,05; Abbildung 33 A + B).

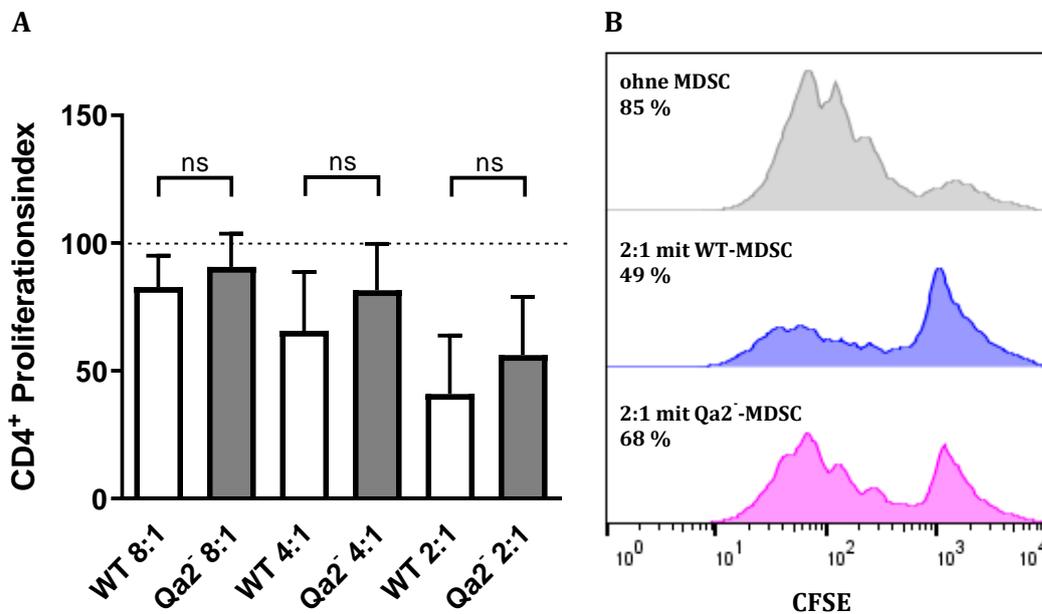


Abbildung 33: MDSC von Qa2-Mäusen hemmen die T-Zell-Proliferation im Vergleich zu WT-Mäusen schwächer.

Nicht trächtige und trächtige Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die MDSC und CD4⁺ T-Zellen wurden mittels MACS angereichert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit CFSE markiert, mit CD3/CD28-Dynabeads und mIL-2 stimuliert und in verschiedenen Verhältnissen (2:1, 4:1, 8:1) mit MDSC für 72 h kultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Balkendiagramm zeigt den Proliferationsindex von CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Wilcoxon-Test, ns = nicht signifikant, n = 9 (B) Repräsentative Histogramme der T-Zell-Proliferation ohne MDSC (oben) und im 2:1-Verhältnis mit WT-MDSC (Mitte) oder MDSC von Qa2⁻-Mäusen (unten).

Die Expression von Qa2 auf MDSC wird durch Östrogen über HIF1- α reguliert

Aufgrund der gezeigten funktionellen Relevanz von Qa2 für die Funktion der MDSC sollte im Weiteren untersucht werden, wie die Qa2-Expression reguliert ist. Zunächst wurde die Qa2-Expression auf MDSC und T-Zellen aus der Milz nicht trächtiger und trächtiger WT-Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. Zwischen 10 % und 60 % der MDSC und alle T-Zellen exprimierten Qa2 auf der Oberfläche.

Während der Trächtigkeit von WT-Mäusen stieg die Expression von Qa2 auf MDSC von $25 \pm 13,7\%$ auf $35,6 \pm 14,7\%$ ($p = 0,0175$; Abbildung 34 A) und auf T-Zellen der MFI von $241,7 \pm 137,4$ auf $MFI\ 563,0 \pm 130,6$ an ($p < 0,0001$; Abbildung 34 B).

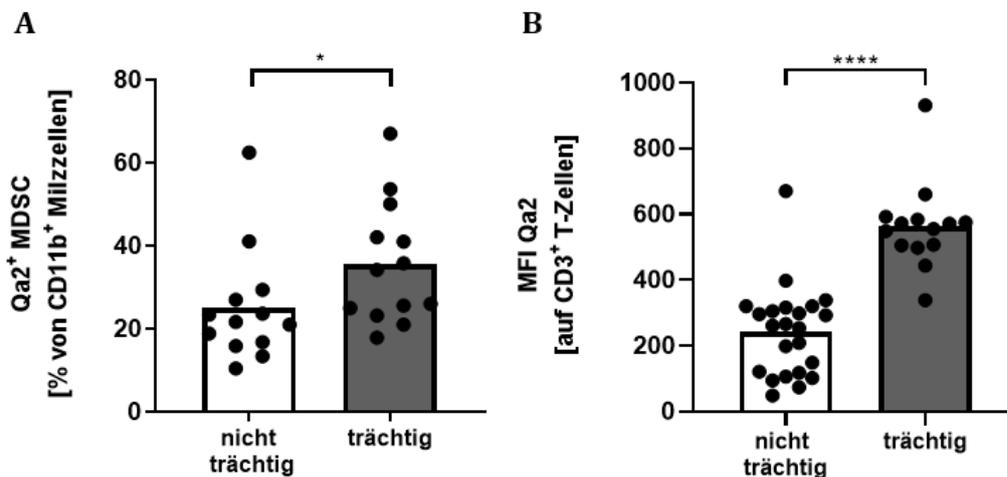


Abbildung 34: Qa2 wurde sowohl auf MDSC als auch auf T-Zellen während der Trächtigkeit vermehrt exprimiert.

Nicht trächtige und trächtige WT-Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die Qa2-Expression auf MDSC und T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Das Streudiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2-exprimierenden MDSC von nicht trächtigen (weiße Balken) und trächtigen WT-Mäusen an Trächtigkeitstag E10.5 (graue Balken). (B) Das Streudiagramm zeigt den MFI der Qa2-exprimierenden T-Zellen von nicht trächtigen (weiße Balken) und trächtigen WT-Mäusen an Trächtigkeitstag E10.5 (graue Balken). Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test; * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$; $n = 13-24$.

Der gleiche Effekt zeigte sich auch für die HLA-G-Expression auf humanen MDSC: die Expression von HLA-G war auf MDSC während der Schwangerschaft deutlich erhöht (nicht schwanger $31,5 \pm 16,5\%$ vs. schwanger $53,5 \pm 10,1\%$; Abbildung 35).

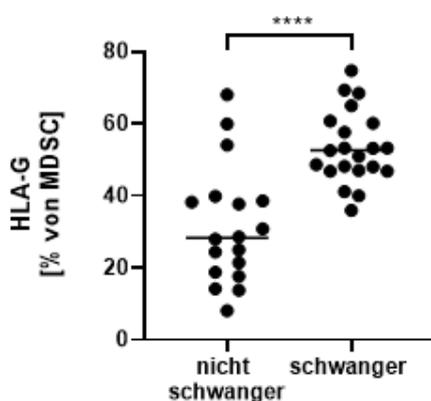


Abbildung 35: HLA-G wurde auf MDSC von Schwangeren vermehrt exprimiert.

PBMC wurden aus dem Blut nicht schwangerer Probanden und gesunder Schwangerer isoliert und die Expression von HLA-G auf MDSC wurde durchflusszytometrisch mit den Antikörpern CD66b und HLA-G analysiert. Das Streudiagramm zeigt die prozentualen Anteile an HLA-G-exprimierenden MDSC im Blut gesunder Schwangerer und in nicht schwangeren Kontrollen. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test; **** $p < 0,001$; $n = 18-22$.

Aufgrund der erhöhten Expression von Qa2 während der Trächtigkeit ergab sich die Hypothese, dass zyklusabhängige Faktoren in die Regulation involviert sein könnten. Daher wurde im nächsten Schritt bei nicht trächtigen WT-Mäusen an vier aufeinanderfolgenden Tagen unter Isofluran-Narkose ein Vaginalabstrich gemacht und Blut entnommen. Anhand der zellulären Zusammensetzung des Vaginalabstrichs wurde die Zyklusphase bestimmt (Abbildung 36 A). Die Qa2-Expression auf MDSC wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Expression von Qa2 war in den ersten beiden Zyklusphasen Proestrus und Estrus, in denen laut Literatur hohe Östrogenspiegel vorliegen [60], deutlich höher, als in den letzten zwei Zyklusphasen Metestrus und Diestrus ($11,0 \pm 5,8\%$ vs. $6,0 \pm 4,5\%$; $p = 0,0046$; Abbildung 36 B).

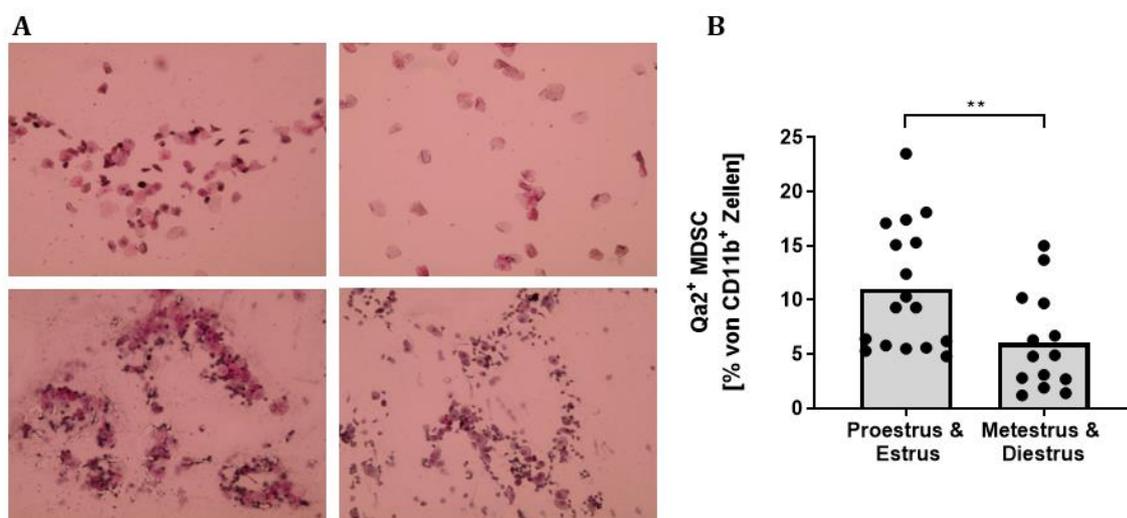


Abbildung 36: Qa2 war zyklusabhängig und wurde während dem Proestrus & Estrus vermehrt exprimiert.

Zur Analyse der zyklusabhängigen Qa2-Expression auf MDSC wurde bei nicht trächtigen WT-Mäusen an vier aufeinanderfolgenden Tagen unter Isofluran-Narkose ein Vaginalabstrich durchgeführt und Blut entnommen. Der Vaginalabstrich wurde mittels HE gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Anhand der zellulären Zusammensetzung des Vaginalabstrichs wurde die Zyklusphase und die Qa2-Expression auf MDSC wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Mikroskopische Bilder der HE-gefärbten Vaginalabstriche der vier Zyklusphasen Proestrus (links oben), Estrus (rechts oben), Metestrus (links unten) und Diestrus (rechts unten). (B) Das Streudiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2 exprimierenden MDSC im Blut in den verschiedenen Zyklusphasen. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test; ** $p < 0,01$; $n = 14-17$.

Um weiter zu überprüfen ob tatsächlich Östrogen in die Regulation der Qa2-Expression involviert ist, wurden Milzzellen von WT-Mäusen mit steigenden Östrogenkonzentrationen (17 β -Estradiol, 1 nM, 10 nM, 100 nM) stimuliert und die Expression von Qa2 auf MDSC und T-Zellen bestimmt.

Auf MDSC führte die Östrogen-Stimulation konzentrationsabhängig zu einer höheren Expression von Qa2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Kontrolle: $32,3 \pm 6,3$ %; 1 nM: $35,1 \pm 5,3$ %; 10 nM: $38,1 \pm 8,9$ % und 100 nM: $39,4 \pm 9,5$ %; Abbildung 37 A).

Auf T-Zellen kam es durch Stimulation mit Östrogen zu keiner erhöhten Qa2-Expression (MFI Kontrolle: 167; 1 nM: 170; 10 nM: 172 und 100 nM: 177; Abbildung 37 B).

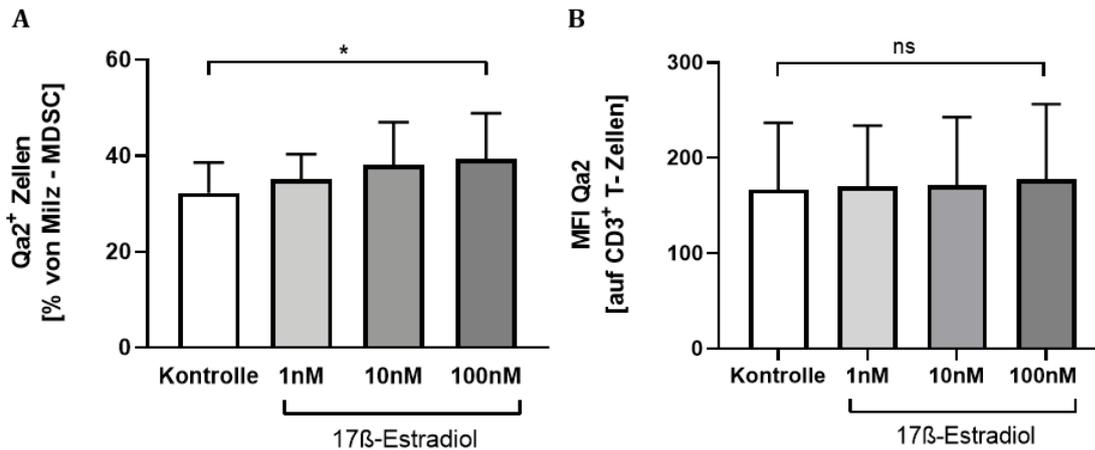


Abbildung 37: Die Expression von Qa2 auf MDSC ließ sich konzentrationsabhängig durch die Stimulation von Östrogen erhöhen.

Nicht trächtige Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 4 h mit steigenden Konzentrationen von 17β-Estradiol stimuliert und die Qa2-Expression auf MDSC und T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Das Balkendiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2-exprimierenden MDSC von unstimulierten Milzzellen (Kontrolle, weißer Balken) und Milzzellen mit 1 nM, 10 nM und 100 nM 17β-Estradiol stimuliert (graue Balken). (B) Das Balkendiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2-exprimierenden T-Zellen von unstimulierten Milzzellen (Kontrolle, weißer Balken) und Milzzellen mit 1 nM, 10 nM und 100 nM 17β-Estradiol stimuliert (graue Balken). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen, Mann-Whitney Test; * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant, $n = 6-7$.

Literaturdaten zeigten, dass die Expression von HLA-G auf Tumorzellen durch den Transkriptionsfaktor HIF-1α [187, 188] reguliert wird und dass HIF-1α wiederum durch Östrogen stimuliert werden kann [189].

Daher wurden zunächst Milzzellen aus nicht trächtigen WT-Mäusen in Anoxie (Sauerstoffmangel als klassischen HIF-Stimulus [190]) und durch bakterielle Stimulation mit *E. coli* (als alternativen HIF-Stimulus [191]) stimuliert und es konnte gezeigt werden, dass beides die Expression von Qa2 auf MDSC steigerte (Kontrolle: $32,2 \pm 12,4$ %, *E. coli*: $55,2 \pm 10,5$ %, Anoxie: $54,8 \pm 11,5$ %, Abbildung 38 A).

Auf T-Zellen kam es durch Stimulation mit Anoxie oder *E. coli* zu keiner Erhöhung der Qa2-Expression (MFI Kontrolle: $328,0 \pm 58,3$; *E. coli*: $319,8 \pm 36,0$; Anoxie: $327,0 \pm 149,6$; Abbildung 38 B).

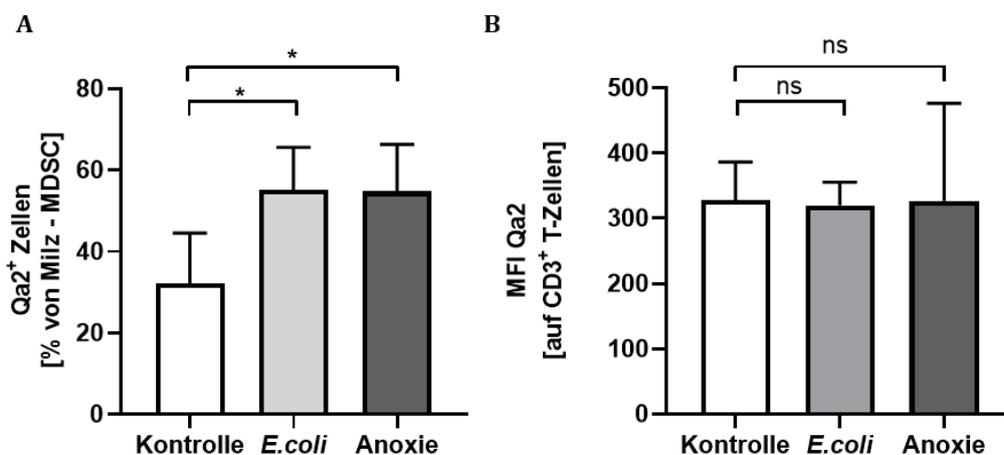


Abbildung 38: Die Expression von Qa2 auf MDSC wurde durch die Stimulation mit *E. coli* und unter anoxischen Bedingungen erhöht.

Nicht trächtige Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und in DMEM-Medium + 10 % FCS + 1 % P/S + 1 % Glutamin über Nacht kultiviert (Kontrolle, weiße Balken). Ein Teil der Zellen wurde dann mit *E. coli* in einer MOI 1:50 stimuliert (*E. coli*, hellgraue Balken) und der andere Teil wurde in einer Anoxie-Kammer bei < 1 % O₂ kultiviert (Anoxie, dunkelgraue Balken). Nach vier Stunden wurde die Expression von Qa2 auf MDSC und T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Balken-Diagramme zeigen den Anteil an Qa2-positiven MDSC von allen CD11b⁺/Gr1⁺ MDSC (A) und den MFI von Qa2 auf allen CD3⁺ T-Zellen (B). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen, Kruskal-Wallis Test, * p = < 0,05, ns = nicht signifikant, n = 5

Des Weiteren wurde die Expression von Qa2 auf MDSC aus trächtigen Mäusen mit gezielter Deletion von HIF-1 α in myeloischen Zellen (HIF-KO) analysiert. Hier zeigte sich, dass HIF-KO-MDSC weniger Qa2 exprimierten als MDSC aus WT-Mäusen ($46,4 \pm 12,4$ % vs. $30,0 \pm 6,5$ %; p = 0,0159; Abbildung 39).

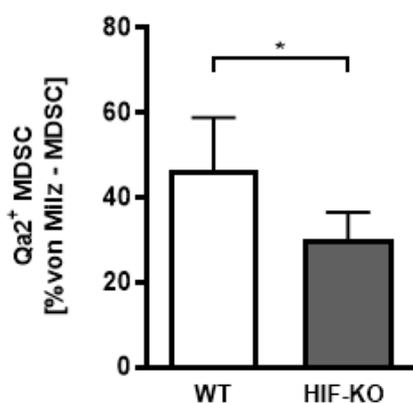


Abbildung 39: Bei HIF-KO Mäusen war die Expression von Qa2 auf MDSC vermindert.

Die Mäuse wurden getötet und die Milz entnommen. Es wurden Einzelzellsuspension hergestellt und die Qa2-Expression auf MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2-exprimierenden MDSC von WT-Mäusen (weiße Balken) und HIF-KO-Mäusen (graue Balken). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. Mann-Whitney Test; * p = < 0,05; n = 5.

Eine Stimulation von Milzzellen aus trächtigen HIF-KO Mäusen mit ansteigenden Östrogenkonzentrationen führte ebenfalls zu keiner Hochregulation der Qa2-Expression auf MDSC (Kontrolle: $46,3 \pm 11,1$ %; 1 nM: $48,1 \pm 14,2$ %; 10 nM: $47,0 \pm 11,2$ % und 100 nM: $50,2 \pm 8,2$ %; Abbildung 40 B) oder auf T-Zellen (MFI Kontrolle: 25748; 1 nM: 23677; 10 nM: 23761 und 100 nM: 25591; Abbildung 40B).

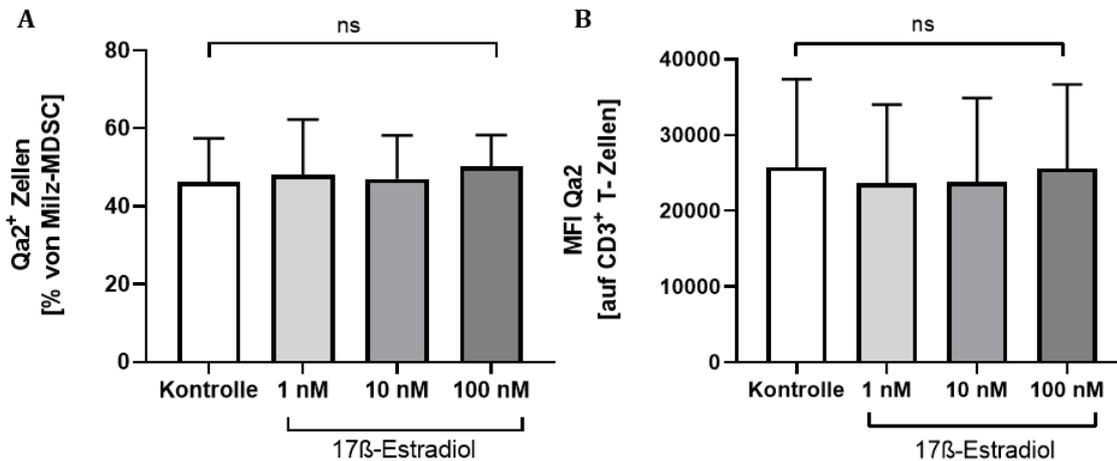


Abbildung 40: Die Expression von Qa2 auf MDSC bei HIF-KO Mäusen ließ sich durch die Stimulation von Östrogen nicht erhöhen.

Nicht trächtige Mäuse wurden durch CO₂-Einleitung in den Heimatkäfig und anschließender zervikalen Dislokation getötet. Die Organentnahme der Milz erfolgte postmortal. Das Gewebe wurde homogenisiert, gefiltert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Milzzellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 17β-Estradiol stimuliert und die Qa2-Expression auf MDSC und T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Das Balkendiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2-exprimierenden MDSC von unstimulierten Milzzellen (Kontrolle, weißer Balken) und Milzzellen mit 1 nM, 10 nM und 100 nM 17β-Estradiol stimuliert (graue Balken). (B) Das Balkendiagramm zeigt die prozentualen Anteile an Qa2-exprimierenden T-Zellen von unstimulierten Milzzellen (Kontrolle, weißer Balken) und Milzzellen mit 1 nM, 10 nM und 100 nM 17β-Estradiol stimuliert (graue Balken). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. Mann-Whitney Test; ns = nicht signifikant, n = 6-7.

In-vivo Applikation von sHLA-G führte bei Qa2-Mäusen zu einer verminderten Abortrate und erhöhter MDSC-Akkumulation

Zuletzt sollte untersucht werden, ob die Gabe von löslichem HLA-G (sHLA-G) die verminderte MDSC-Akkumulation und eine erhöhte Abortrate verbessern kann. Dies sollte zunächst im immunologischen CBA/J × DBA/2J Abortmodell untersucht werden. Daher wurde als Pilotstudie sHLA-G an weibliche nicht trächtige CBA/J-Mäuse injiziert, mit dem Ziel dadurch MDSC zu induzieren.

Es konnte durch die intraperitoneale Injektion von sHLA-G weder konzentrationsabhängig noch zeitabhängig ein Effekt auf die Akkumulation von MDSC (Tabelle 14), Gr-MDSC und Mo-MDSC (Daten nicht gezeigt) in Milz, Blut und Knochenmark gefunden werden.

Auch bei den anderen untersuchten Immunzellen (T-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen) zeigte sich kein Effekt durch die HLA-G Applikation (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 14: sHLA-G führte zu keiner Induktion von MDSC bei nicht trächtigen CBA-Mäusen.

sHLA-G wurde intraperitoneal in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 µg/g Körpergewicht (KG) und 1,0 µg/g KG) in weibliche nicht trächtige CBA/J-Mäuse injiziert. Nach drei, fünf oder zehn Tagen wurden die Tiere getötet und es wurden Blut, Milz und Knochenmark entnommen. Das Gewebe wurde manuell zerkleinert, Einzelzellsuspensionen hergestellt und der prozentuale Anteil von MDSC an allen CD45⁺ Zellen durchflusszytometrisch über die Oberflächenmarker CD11b und Gr1 bestimmt. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Dargestellt sind die prozentualen MDSC-Zahlen und die Standardabweichung, n = 6, Kruskal-Wallis Test.

	Tag 3			Tag 5			Tag 10		
	PBS	HLA-G 0,1 µg/g KG	HLA-G 1,0 µg/g KG	PBS	HLA-G 0,1 µg/g KG	HLA-G 1,0 µg/g KG	PBS	HLA-G 0,1 µg/g KG	HLA-G 1,0 µg/g KG
MDSC Milz	4,3 ± 1,5 %	3,6 ± 1 %	3,1 ± 1,2 %	8,3 ± 8,1 %	7 ± 4,1 %	8,5 ± 6,3 %	9,6 ± 6,7 %	9,3 ± 10,3 %	9,4 ± 11 %
MDSC Blut	15,1 ± 6,6 %	11,9 ± 2,5 %	11,9 ± 2,8 %	14,6 ± 3,6 %	13,8 ± 3,6 %	12,3 ± 3,8 %	16,8 ± 7,5 %	14,6 ± 3,8 %	13,3 ± 3,3 %
MDSC Knochenmark	41,4 ± 5,9 %	36,3 ± 1,9 %	42,1 ± 7 %	44,5 ± 9,9 %	42,2 ± 6,8 %	45,5 ± 8 %	45 ± 9,8 %	41,2 ± 18,4 %	41,8 ± 11,2 %

Daher wurde im nächsten Schritt sHLA-G an trächtige Qa2-Mäusen verabreicht. Es wurden nun nicht mehr Monomere, sondern Tetramere verwendet und es erfolgte eine zweimalige intravenöse Injektion an E10.5 und E14.5.

In den Qa2-Mäusen kam es durch die Applikation von löslichem HLA-G vor allem im Uterus und in der Plazenta zu einem signifikanten Anstieg der MDSC-Zahlen (Uterus: $17,3 \pm 8,9\%$ vs. $26,0 \pm 7,8\%$; $p = 0,03$; Abbildung 41 A + C, Plazenta: $28,0 \pm 16,4\%$ vs. $38,3 \pm 11,5\%$; $p = 0,16$; Abbildung 41 B).

Im Blut und in der Milz kam es durch sHLA-G zu keinem Anstieg der MDSC-Zahlen (Milz: $4,9 \pm 2,2\%$ vs. $4,8 \pm 1,3\%$; Blut: $13,9 \pm 6,0\%$ vs. $12,9 \pm 5,5\%$; Abbildungen nicht gezeigt).

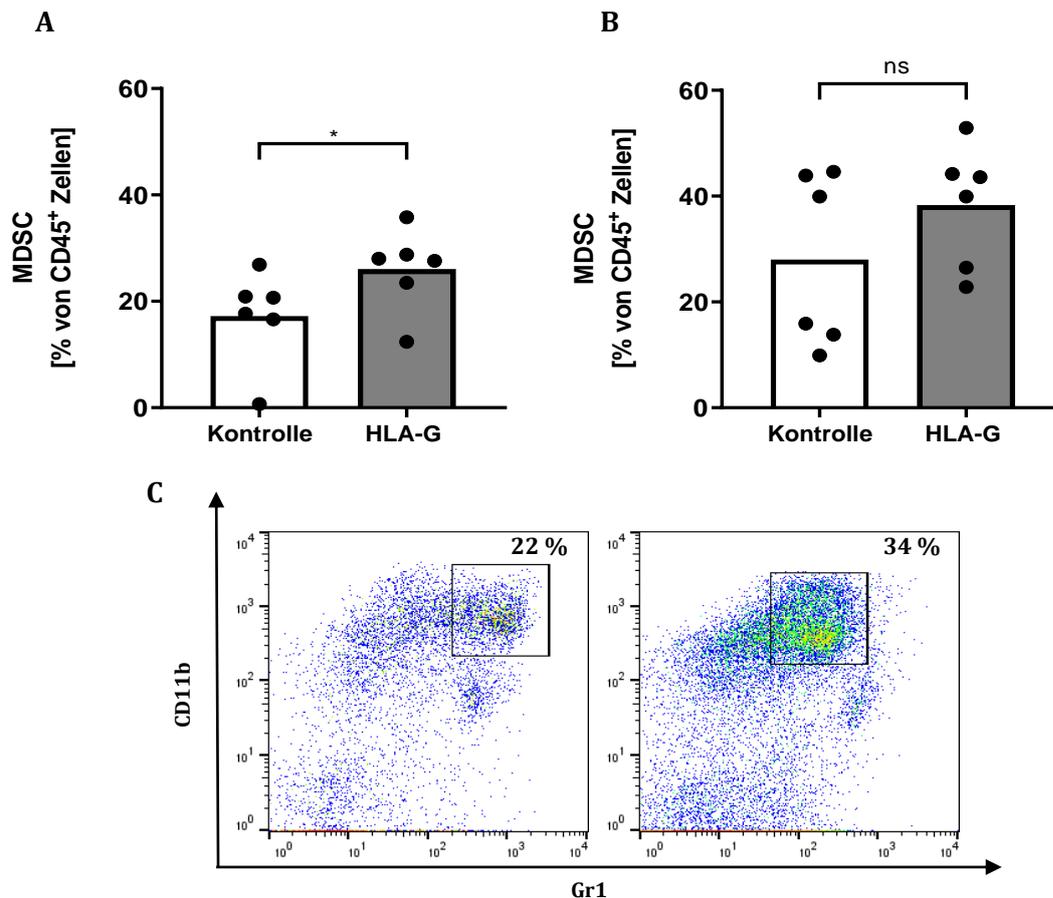


Abbildung 41: sHLA-G führte zu einer Induktion von MDSC im Uterus bei trächtigen Qa2-Mäusen.

Nach erfolgreicher Plug-Verpaarung wurde den Mäusen an Trächtigkeitstag E10.5 und E14.5 $1,0 \mu\text{g/g KG}$ sHLA-G in die Schwanzvene injiziert. An E18.5 wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die Abortrate visuell bestimmt. Es wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und der prozentuale Anteil von MDSC an allen CD45+ Zellen durchflusszytometrisch über die Oberflächenmarker CD11b und Gr1 bestimmt. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. (A+B) Streudiagramme zeigen die prozentualen Anteile an MDSC bei der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der HLA-G-Gruppe (graue Balken) an E18.5 im Uterus (A) und in der Plazenta (B). Dargestellt sind die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die Mittelwerte. Mann-Whitney Test, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant, $n = 6$. (C) Repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen von MDSC im Uterus von der Kontrollgruppe (links) und der HLA-G-Gruppe (rechts) an E18.5.

Außerdem konnte durch die Applikation von sHLA-G die Abortrate von Qa2-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion von PBS) deutlich von $23,3 \pm 9,9\%$ auf $10,7 \pm 13,4\%$ reduziert werden (Abbildung 42 A). Auch die Morphologie der Chorionzotten mit den eosinophilen Aggregaten normalisierte sich (vgl. Abbildung 20 und Abbildung 42) und ähnelte jetzt phänotypisch mehr den Plazenten von WT-Mäusen (Abbildung 42 B + C).

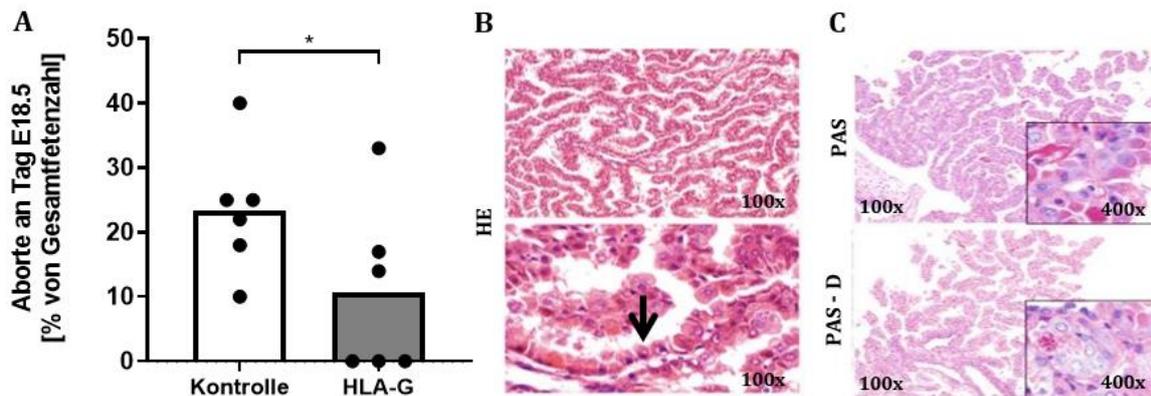


Abbildung 42: Die Applikation von sHLA-G reduzierte die Abortrate und normalisierte die Morphologie der Chorionzotten.

Trächtigen Mäusen wurde an E10.5 und E14.5 $1,0 \mu\text{g/g KG}$ sHLA-G i.v. in die Schwanzvene injiziert. An Trächtigkeitstag E18.5 wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die Abortrate visuell bestimmt. Es wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und der prozentuale Anteil von MDSC an allen CD45^+ Zellen durchflusszytometrisch über die Oberflächenmarker CD11b und Gr1 bestimmt. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Plazenten von WT- und Qa2-Mäusen wurden in Paraffin eingebettet und $3\text{-}5 \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Die immunhistochemischen Färbungen sowie die Analysen erfolgten durch erfahrene Pathologen im Institut für Pathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend. (A) Streudiagramm zeigt die Abortrate bei der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der HLA-G-Gruppe (graue Balken) an Trächtigkeitstag E18.5. Dargestellt sind die Einzelwerte (schwarze Punkte) sowie die prozentualen Mittelwerte, Mann-Whitney Test, * $p < 0,05$, $n = 6$. (B) HE Färbung zur Darstellung der Chorionzotten in 100- und 400-facher mikroskopischer Vergrößerung. Der Pfeil zeigt auf die normalisierte Struktur der Chorionzotten. (C) PAS- und PAS-Diastase-Färbung zur Darstellung von Glykogen in 100- und 400-facher Vergrößerung.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte im murinen Modell gezeigt werden, dass die Expression von Qa2 auf der Oberfläche von Immunzellen für eine komplikationslose Trächtigkeit notwendig zu sein scheint und, dass das Fehlen von Qa2 zu einer veränderten immunologischen Anpassung an die Trächtigkeit führte.

Zusammenfassend führte das Fehlen von Qa2:

- (1) zu einer erhöhten Abortrate und zu intrauteriner Wachstumsretardierung der Feten
- (2) zu einer veränderten Plazenta-Morphologie mit Ansammlung von eosinophilen Aggregaten und einer veränderten Proteinexpression
- (3) zu Veränderungen in der Genexpression im Uterus, insbesondere bei Genen die an der Vaskulogenese beteiligt sind
- (4) zu einer verringerten Akkumulation und verminderten funktionalen Aktivität von MDSC während der Trächtigkeit und
- (5) zu immunologischen Veränderungen im Lymphozytenprofil während der Trächtigkeit, insbesondere zu erhöhten T-Zellen.

Durch *in-vivo* Applikation von sHLA-G bei Qa2-Mäusen konnte die MDSC-Akkumulation erhöht, die Abortrate gegen Ende der Trächtigkeit verringert und die Plazenta-Morphologie mit der Ansammlung an eosinophilen Aggregaten normalisiert werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Qa2 auf MDSC:

- (6) während der Trächtigkeit und zu Beginn eines Zyklus erhöht war und
- (7) durch Östrogenstimulation über den Transkriptionsfaktor HIF1- α reguliert wird.

4. Diskussion

Die Schwangerschaft ist ein „immunologischer Ausnahmezustand“, bei dem ein semi-allogener Organismus vom mütterlichen Immunsystem toleriert wird, jedoch andere Immunfunktionen, wie die Abwehr von Pathogenen aber weitgehend unbeeinträchtigt erhalten bleiben. Eine Fehlregulation der immunologischen Anpassung an eine Schwangerschaft kann zu schweren Schwangerschaftskomplikationen wie Aborten, Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit oder zu Wachstumsrestriktion des Feten führen. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet sind die zugrundeliegenden Mechanismen, die hier von Bedeutung sind, bislang nur teilweise verstanden.

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass es im Rahmen der Immunadaptation an die Schwangerschaft zu einer Zunahme von immunmodulatorisch wirkenden MDSC im mütterlichen und fetalen Blut [39] und der Plazenta [40] kommt. Bei Patientinnen mit spontanen Aborten waren MDSC im Vergleich zu Frauen mit einem elektiven Schwangerschaftsabbruch bei bis dahin intakter Schwangerschaft vermindert [40]. Weiter konnte unsere Gruppe zeigen, dass das MHC-I-Molekül HLA-G, das als ein wesentlicher Vermittler der materno-fetalen Toleranz gilt [102], *in-vitro* eine Induktion von MDSC bewirkt [56]. HLA-G wird von Trophoblastzellen in der feto-maternalen Grenzschicht der Plazenta exprimiert [96] und während der Schwangerschaft ins Blut der Schwangeren sezerniert, wo es im Vergleich zu nicht schwangeren Individuen in deutlich höherer Konzentration nachweisbar ist [102, 103]. Bei Patientinnen mit Aborten oder mit Präeklampsie sind die Serumspiegel von HLA-G vermindert [105-107]. Qa2 gilt als das murine Korrelat zum humanen HLA-G [135]. Aus der Literatur war bis dato bekannt, dass Qa2-negative Mäuse kleinere Feten und geringere Wurfgrößen haben als Qa2-positive Mäuse [148].

Die Bedeutung von Qa2 für das Auftreten von Aborten und für die Akkumulation und Funktion von MDSC während der Trächtigkeit war bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich ein Fehlen von Qa2 auf die MDSC-Akkumulation während der Trächtigkeit und den Trächtigkeitsverlauf bei Mäusen auswirkt. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass ein Fehlen von Qa2 zu einer verminderten Akkumulation von MDSC während der Trächtigkeit bei Mäusen führt und es dadurch zu einem vermehrten Auftreten von Aborten kommt. Weiter sollte überprüft werden, ob die Gabe von löslichem HLA-G (sHLA-G) die verminderte MDSC-Akkumulation und das vermehrte Auftreten von Aborten aufhebt und damit als therapeutische Option für immunologisch bedingte Aborte in Frage kommt.

Die wesentlichen Ergebnisse wurden hier bildlich nochmal zusammengefasst (Abbildung 43).

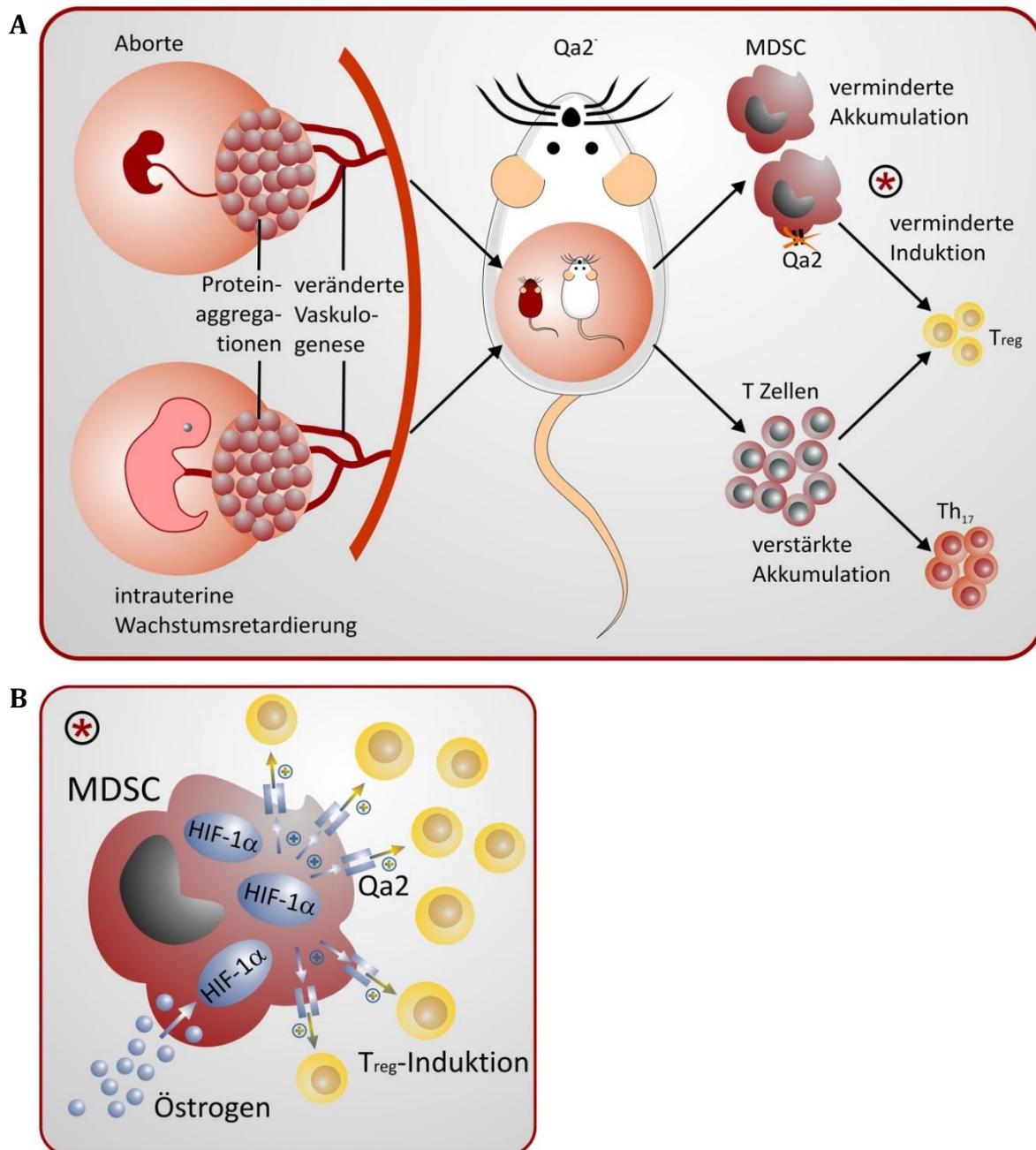


Abbildung 43: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

(A) Das Fehlen von Qa2 führte zu einer erhöhten Abortrate, zu intrauteriner Wachstumsretardierung der Feten, zu einer veränderten Plazenta-Morphologie mit Ansammlung von eosinophilen Aggregaten sowie zu Veränderungen in der Genexpression im Uterus, insbesondere bei Genen die an der Vaskulogenese beteiligt sind. Des Weiteren führte eine Qa2-Defizienz zu einer verringerten Akkumulation und funktionalen Aktivität von MDSC während der Trächtigkeit sowie zu immunologischen Veränderungen im Lymphozytenprofil während der Trächtigkeit, insbesondere zu einer Akkumulation der T-Zellen. (B) Außerdem bewirkte Östrogen eine Aktivierung von HIF-1 α in MDSC, das zur gesteigerten Expression von Qa2 auf der Oberfläche führte und das dann wiederum zur Induktion von T_{regs}. (Visualisierung der Abbildung: DTP-Medien-Photo Kinderklinik Peter Weber)

Das Fehlen von Qa2 führte zu einer veränderten strukturellen Anpassung an die Schwangerschaft und zu einer erhöhten Abortrate

Um die Bedeutung von Qa2/HLA-G für den Verlauf der Trächtigkeit/Schwangerschaft besser untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell gewählt, bei dem es durch Spontanmutationen zum Fehlen des Qa2-Moleküls kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Qa2-Mäuse geringere Wurfgrößen und leichtere Feten im Vergleich zu WT-Mäusen hatten. Diese Ergebnisse decken sich mit bereits publizierten Daten von Warner et al. und Watkins et al., die ebenfalls beschrieben, dass Qa2-negative Mäuse im Vergleich zu Qa2-positiven Mäusen kleinere und leichtere Feten [138, 148] und geringere Wurfgrößen [148] hatten. Hikmah et al. zeigten, dass durch die Injektion eines anti-Qa2-Antikörpers die Fetenzahl reduziert werden konnte und die Feten kleiner und leichter waren [150].

Als Ursache für die geringere Wurfgröße bei Qa2-Mäusen wurde ein später Fetenverlust zwischen E10.5 und E18.5 der Trächtigkeit nachgewiesen. An E10.5, welches etwa die Mitte der Trächtigkeit darstellt, wurde lediglich eine leichte, nicht signifikant erhöhte Abortrate in Qa2-Mäusen bei einer gleich großer Gesamtfetenzahl im Vergleich zu WT-Mäusen beobachtet.

Warner et al. zeigten, dass Qa2-positive (*Ped fast*) Embryonen eine höhere intrauterine Überlebenschance hatten und bei der Geburt schwerer waren als Qa2-negative Embryonen bzw. Feten [148]. Als Ursache wurde beschrieben, dass Qa2-positive Embryonen sich im Vergleich zu Qa2-negativen Embryonen schneller entwickeln, dadurch die Gebärmutter früher erreichen und besser vaskularisierte Implantationsstellen zeigen, was letztendlich zu einer besseren Plazentabildung und fetalen Entwicklung führte [142, 192]. Auch im humanen System wurde beschrieben, dass die Stärke der HLA-G-Expression mit der Invasivität des extravillösen Trophoblasten korreliert [104]. Warner et al. vermuteten, dass Qa2 möglicherweise den sich entwickelnden Feten vor einem Angriff durch mütterliche NK-Zellen oder Makrophagen schützt [142]. Weitere Studien zeigten, dass die Expression von Qa2 auf fetaler Seite mit dem Überleben der Feten und einer erhöhten embryonalen Furchungsrate korreliert [148, 193]. All diese Studien konzentrierten sich jedoch auf die frühe bis mittlere Schwangerschaft.

Die Beobachtungen eines späten Verlustes von Feten während der zweiten Trächtigkeitshälfte decken sich mit Daten von Exley et al., die zeigten, dass es bei Mäusen, denen das Qa2-Protein fehlt (*Ped slow*), erst gegen Ende der Trächtigkeit zum Verlust von Feten kam, während die Fetenzahl in der Mitte der Trächtigkeit mit Qa2⁺-Mäusen noch vergleichbar war [149]. Dadurch scheint das Vorhandensein von Qa2 nicht nur zu Beginn einer Schwangerschaft, also während der Implantationsphase, von Bedeutung zu sein, sondern es schafft auch später in der Schwangerschaft einen selektiven Vorteil.

Über die Ursache dieses späten Fetenverlustes ist bisher nur sehr wenig bekannt. Sulistyowati et al. konnten zeigen, dass eine durch Injektion von Anti-Qa2 verursachte fetale Wachstumsretardierung durch Injektion von rekombinanten VEGF aufgehoben werden konnte, was auf eine vaskuläre Störung als Ursache für die Retardierung und möglicherweise auch auf den Fetenverlust hindeuten könnte [194]. Bei intrauteriner Wachstumsretardierung scheint es zur vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen und zur verminderten Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen zu kommen. Raghupathy et al. spekulierten, dass dieses Ungleichgewicht zu Entzündungsreaktionen führt, die die Spiralarterieninvasion beeinträchtigen und somit die Versorgung des Feten durch verminderte plazentare Durchblutung einschränken [195].

In vergleichenden Transkriptomanalysen von Uterus-Lysaten in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren eine verminderte Expression von Genen, die bei der Angiogenese eine Rolle spielen. Während der Schwangerschaft kommt es durch Trophoblasteneinwanderung zum Umbau der maternalen Spiralarterien im Uterus. Dabei werden die Spiralarterien der Gebärmutter Schleimhaut von den extravillösen Trophoblastzellen aktiv infiltriert und erweitert. Dieser Prozess des Spiralarterienumbaus gewährleistet durch die Weitstellung der Gefäße einen geringeren Gefäßwiderstand und einen dadurch verstärkten Blutfluss durch die Plazenta. Hierdurch wird sichergestellt, dass der Fetus ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird [196]. Diese Anpassung auf mütterlicher Seite sichert durch die Nährstoffversorgung das Wachstum des Feten. Eine unzureichende Nährstoffversorgung wiederum führt zu plazentarer Hypoxie und trägt beispielsweise zur Entwicklung einer Präeklampsie (Schwangerschaftsvergiftung) bei.

Präeklampsie ist definiert als eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung mit unklarer immunologischer Ursache, die meist erst ab der 20. SSW auftritt und die Wachstumseinschränkungen zur Folge haben kann [197]. Eine Präeklampsie zeigt sich in bis zu 10 % aller Schwangerschaften. Leitsymptome der Präeklampsie sind Hypertonie (Bluthochdruck > 140/90 mm Hg), Proteinurie (Eiweiß im Urin, > 300 mg/24 h), Nierenschäden und Ödeme (Wassereinlagerungen). In den meisten Fällen kommt es zu einem leichten Krankheitsverlauf, in schweren Fällen kann es jedoch zu epileptischen Krampfanfällen (Eklampsie) kommen [198]. Die einzige kausale Therapie ist eine rasche Entbindung und damit vorzeitige Beendigung der Schwangerschaft [199].

Goldmann-Wohl et al. zeigten, dass die HLA-G-Expression mit der Invasivität des extravillösen Trophoblasten korreliert [104]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Qa2-positive Mäuse im Vergleich zu Qa2-negativen Tieren während der Embryonalentwicklung höhere Zellzahlen am Trophoblast und Embryoblast aufweisen, was zu einer besseren Vaskularisation an der

Implantationsstelle und einer besseren Plazentabildung führt, wodurch die fetale Entwicklung gefördert wird [192]. Möglicherweise bedingt die fehlende Expression von Qa2 in unserem Modell eine eingeschränkte Trophoblasten-Invasivität, was dann zu einem gestörten Spiralarterienumbau und zur Entstehung einer Präeklampsie führt.

Neben der veränderten Genexpression in den Uteri von Qa2- und WT-Mäusen konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine strukturelle Veränderung in der Plazentamorphologie der Tiere beobachtet werden. Bei Qa2-Mäusen kam es im Vergleich zu WT-Mäusen zu einer Ansammlung eosinophiler Aggregate im Zytoplasma der Trophoblastzellen. Eine vermehrte Glykogen-Speicherung konnte anhand einer PAS-Diastase-Färbung ausgeschlossen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um abgelagerte Proteinaggregate handelt. Eine Reihe von Erkrankungen, insbesondere neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson werden durch Proteinfehlfaltungen und daraus resultierender Ablagerungen von faserigen Proteinaggregaten (Amyloiden) in Geweben verursacht [200]. Interessanterweise wurde auch beschrieben, dass sich während einer Präeklampsie fehlgefaltete Proteine im Urin, im Serum und in der Plazenta von Schwangeren ansammeln können. Proteine, die hier beschrieben wurden, sind beispielsweise Transthyretin [201] oder β -Amyloid [202, 203]. Letzteres wird auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer gefunden [201-203].

In den hier durchgeführten Proteomanalysen der Plazenten von Qa2- und WT-Mäusen zeigte sich insbesondere Ansammlungen von Proteinen, die am Proteinmetabolismus beteiligt sind, was darauf hindeuten könnte, dass das Fehlen von Qa2 tatsächlich Einfluss auf die Proteinsynthese, den Proteintransport und -abbau nimmt. Eine Überexpression von β -Amyloid oder Transthyretin, wie sie für die Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen beschrieben wurden, konnte in den Proteomdaten der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Hierbei wurde sowohl bei Qa2- als auch in WT-Plazenten ausschließlich das Amyloid-Vorläuferprotein APP identifiziert. Es ist bereits beschrieben, dass APP in der Plazenta auch unter nicht pathologischen Zuständen exprimiert wird [202]. Interessanterweise war jedoch die Expressionsstärke von APP in Qa2-Plazenten deutlich höher als in WT-Plazenten (LFQ 515.922.500 vs. 258.100.000). Aus APP wird durch die Enzyme β - und γ -Sekretase das β -Amyloid herausgeschnitten. Die Enzyme β - und γ -Sekretase konnten durch die Proteomanalysen nicht nachgewiesen werden.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Identität der akkumulierenden Proteine bei einer Qa2-Defizienz zu entschlüsseln. Die Zusammenschau der Ergebnisse mit wachstumsretardierten Feten, erhöhtem Schwangerschaftsverlust in der zweiten Schwangerschaftshälfte, veränderter Genexpression im Sinne einer verminderten Expression von in die Angiogenese involvierten Genen und die placentaren Veränderungen mit Ablagerungen im Trophoblasten, deutet auf einen Defekt in der mütterlichen Anpassung hin und ergeben die

Vermutung, dass eine Qa2-Defizienz zur Entwicklung eines Präeklampsie-ähnlichen Krankheitsbildes führt. Diese Daten decken sich mit der Studie von Watkins et al., die zeigten, dass Qa2⁻ im Vergleich zu Qa2⁺-Mäusen einen erhöhten systolischen Blutdruck entwickeln [138].

Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu überprüfen.

Das Fehlen von Qa2 führte zu einer veränderten immunologischen Anpassung an die Schwangerschaft

Im nächsten Schritt der hier vorliegenden Arbeit wurden immunologische Unterschiede zwischen Qa2⁻ und WT-Mäusen im Verlauf der Trächtigkeit untersucht. Während es bei WT-Mäusen im Verlauf der Trächtigkeit zu einem stetigen Anstieg von MDSC in Blut, Milz, Uterus und Knochenmark kam, fehlte dieser Anstieg bei Qa2⁻-Mäusen. Verschiedene andere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass es während der normalen Trächtigkeit bei Mäusen zu einem Anstieg der MDSC-Zahlen im Knochenmark, in der Milz, im Blut und im Uterus kam [46]. Bei Mäusen mit verstärkter Abortneigung war die MDSC-Akkumulation gestört [49, 160] und eine Depletion von MDSC führte bei trächtigen Mäusen zu einer erhöhten Abortrate [46-48], während umgekehrt ein adoptiver Transfer von MDSC das Auftreten von Fehlgeburten bei Mäusen reduzieren konnte [49]. Beim Menschen wurde ebenfalls gezeigt, dass Patientinnen mit Aborten geringere Zahlen an MDSC aufwiesen als Frauen mit intakter Schwangerschaft [40].

All diese Studien konzentrierten sich jedoch auf die frühe bis mittlere Schwangerschaft. Die bisher einzige Studie, die sich mit MDSC zu einem späteren Schwangerschaftszeitpunkt befasst, zeigte beim Menschen, dass Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren ebenfalls verminderte Zahlen an MDSC aufweisen [204]. Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen verminderter MDSC-Akkumulation und negativem Schwangerschaftsoutcome auch in der späteren Schwangerschaft gezeigt werden.

In den hier durchgeführten Transkriptomanalysen der Uteri von trächtigen Qa2⁻ und WT-Mäusen wurde zudem eine Hochregulierung von Genen nachgewiesen, die in der Differenzierung von myeloiden Zellen und der Chemotaxis und Migration von Leukozyten beteiligt sind. *In-vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass sHLA-G neben einer Induktion auch die funktionelle Aktivität von MDSC steigert [56]. Dies lässt vermuten, dass *in-vivo* die Kombination aus systemischer Induktion von MDSC und lokaler Aktivierung im Uterus für den erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf verantwortlich sein könnte.

Die verringerte MDSC-Akkumulation während der Trächtigkeit bei Qa2⁻-Mäusen wurde von einem Anstieg der CD3⁺ T-Zellen in der Milz im Verlauf der Trächtigkeit begleitet. Ähnlich dazu

zeigten Agaugue et al., dass es bei HLA-G⁺ tumortragenden Mäusen zu einer Abnahme von T-Zellen bei gleichzeitigem Anstieg von CD11b⁺Gr1⁺ MDSC kam [129]. Darüber hinaus beschrieben Du et al., dass ein erhöhter Anteil von CD3⁺ T-Zell-Populationen mit dem Risiko einer Fehlgeburt korrelierte [205].

Unterschiede in den T-Zell-Subpopulationen zwischen WT- und Qa2⁻-Mäusen betrafen hauptsächlich Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, T_{regs} und Th17-Zellen. CD44⁺/CD62L⁻ Effektor-Gedächtnis T-Zellen (sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺) waren bei trächtigen Qa2⁻-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren erhöht, während naive CD8⁺ T-Zellen und zentrale CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen vermindert waren. Dies deutet auf einen höheren Aktivierungsstatus der T-Zellen in Qa2⁻-Mäusen hin.

Arenas-Hernandez et al. zeigten, dass aktivierte Effektor-T-Zellen den Schwangerschaftsverlauf nachteilig beeinflussen und zu Frühgeburten führen können [206]. Im Verlauf einer komplikationslosen Schwangerschaft wurde gezeigt, dass es zur Zunahme von naiven T-Zellen kommt, während Gedächtnis-T-Zellen prozentual abnehmen [207]. Weiterhin wurde gezeigt, dass bei Patientinnen mit Präeklampsie CD62L, ein Leukozyten-Selektin, welches bei Aktivierung der Mutterzelle „gshedded“ wird, auf T-Zellen vermindert exprimiert ist [208]. Da die Haupt-Effektor-Funktion von MDSC eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung ist, könnte vermutet werden, dass die erhöhte T-Zell-Aktivierung bei Qa2⁻-Mäusen ein Resultat der verminderten MDSC-Akkumulation ist. Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeitsgruppen, dass MDSC die Expression von CD62L auf T-Zellen vermindern [48, 209, 210]. Da Qa2 auch auf T-Zellen exprimiert wird, ist es möglich, dass das Fehlen von Qa2 selbst zu den Unterschieden in der T-Zell-Aktivierung zwischen WT- und Qa2⁻-Mäusen führt, die den Effekt von MDSC überlagern.

Die Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen blieb in unseren Untersuchungen durch das Fehlen von Qa2 unbeeinflusst. Klassischerweise wird ein Überwiegen von Th1-Zellen in Zusammenhang mit Schwangerschaftskomplikationen wie Spontanaborten gesehen während Th2-Antworten das Bild einer erfolgreichen Schwangerschaft prägen [70, 79]. Raghupathy et al. konnten zeigen, dass es bei intrauteriner Wachstumsretardierung zur vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Th1-Zytokinen kam, wohingegen antiinflammatorische Th2-Zytokine vermindert sezerniert wurden. Möglicherweise führte dieses Ungleichgewicht zu Entzündungsreaktionen, die die Spiralarterieninvasion beeinträchtigten und dadurch die Versorgung des Feten durch eine verminderte plazentare Durchblutung einschränkten [195]. Andere Daten dagegen zeigten, dass IL-4- und IL-10-defiziente Mäusen eine komplikationslose Schwangerschaft haben, was eine grundlegende Bedeutung der T-Helfer-Polarisierung für den Schwangerschaftsverlauf in Frage stellt [211].

Jedoch wurde in den hier vorliegenden Versuchen in der Milz von trächtigen Qa2-Mäusen eine deutliche Zunahme von Th17-Zellen und eine Abnahme von T_{regs} beobachtet. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten von Saito et al. und Wang et al. überein, die zeigten, dass Th17-Zellen mit der Initiierung inflammatorischer Vorgänge sowie der Abstoßung von Transplantaten assoziiert sind [18] und dass Frauen mit Aborten eine erhöhte Zahl an Th17-Zellen aufweisen im Vergleich zu Normalschwangeren [84]. Ebenfalls entsprechend den Ergebnissen konnte bereits gezeigt werden, dass T_{regs} essentiell für den Erhalt einer komplikationslosen Schwangerschaft sind. Sie stellen einen wichtigen Toleranz-Mechanismus gegenüber Fremd- und Selbst-Antigenen während der Schwangerschaft dar [73, 74, 212, 213]. T_{regs} akkumulieren an der feto-maternalen Grenzschicht und schützen den Feten vor einem Angriff durch mütterliche Immunzellen [72]. Im Rahmen von Aborten beim Menschen sind die T_{regs} vermindert [73-75]. Außerdem konnte in einem murinen Abortmodell gezeigt werden, dass die Anzahl an T_{regs} in Mäusen mit erhöhter Abortrate im Vergleich zu Mäusen mit normaler Trächtigkeit reduziert war und dass ein adoptiver Transfer von T_{regs} , die erhöhte Abortrate wieder verbesserte [77, 213]. Weiterhin führte eine Depletion von T_{regs} in Mäusen zu einer erhöhten Resorptionsrate der Feten, gekennzeichnet durch eine gestörte fetale Entwicklung, Blutungen an der feto-maternalen Schnittstelle und eine verstärkte Infiltration von $CD3^+$ T-Zellen [76]. Auch im Rahmen der Präeklampsie konnte gezeigt werden, dass die Foxp3-Expression verglichen mit gesunden Schwangerschaften vermindert war [82].

NK-Zellen waren in der Milz von trächtigen WT-Mäusen im Vergleich zu Qa2-Mäusen erhöht. Im Uterus von Qa2-Mäusen kam es im Verlauf der Trächtigkeit im Vergleich zu WT-Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der NK-Zellen. Neben einer Interaktion mit T_{regs} sind NK-Zellen für strukturelle Umbauprozesse im Uterus von Bedeutung. Sie interagieren mit von Trophoblastzellen exprimierten Moleküle wie HLA-G und haben direkten Einfluss auf die Angiogenese und die Umstrukturierung plazentarer Gefäße wie die Spiralarterien [214, 215]. Damit könnte die Abnahme von NK-Zellen bei Qa2-Mäusen eine weitere Ursache für das vermehrte Auftreten von Aborten und die veränderte Uterus- und Plazentamorphologie sein. Wie genau der Effekt von Qa2 auf die NK-Zell-Akkumulation vermittelt wird, ist bisher nicht klar.

Das Fehlen von Qa2 führte zu einer verringerten Funktionalität von MDSC

Hinsichtlich der Funktionalität von MDSC bei Fehlen von Qa2 konnte hier gezeigt werden, dass Qa2-MDSC eine geringere Fähigkeit hatten T_{regs} zu induzieren. Das passt zu der Beobachtung, dass Qa2-Mäusen während der Trächtigkeit einhergehend mit der verminderten MDSC-Akkumulation auch eine verminderte Akkumulation von T_{regs} aufwiesen. Neben der suppressiven Aktivität auf T-Zellen, ist die Induktion von T_{regs} eine bereits beschriebene funktionelle Eigenschaft von MDSC

[47, 186]. Unsere Arbeitsgruppe konnte *in-vitro* zeigen, dass MDSC aus dem Nabelschnurblut T_{regs} induzieren können [186].

Die erhöhten MDSC-Level während der Trächtigkeit von WT-Mäusen scheinen damit sowohl direkt als auch durch die Induktion von T_{regs} immunmodulatorische Effekte auszuüben und damit für die materno-fetale Toleranz wichtig zu sein. Zwei Studien konnten zeigen, dass sHLA-G zur Induktion von T_{regs} führt [216, 217] und dass ein HLA-G-blockierender Antikörper diese Induktion wieder reduziert [216]. Hinsichtlich des Mechanismus für die Induktion von T_{regs} durch MDSC konnte gezeigt werden, dass die Produktion von ROS für die T_{reg}-Induktion eine Rolle spielt [218, 219]. ROS wurde weiterhin als immunmodulatorischer Mechanismus von MDSC beschrieben [40]. Ob MDSC aus Qa2-Mäusen tatsächlich eine geringere Kapazität zur ROS-Produktion haben, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und könnte Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Auch zeigten Qa2-MDSC im T-Zell-Proliferationsassay eine Tendenz zu einer schlechteren suppressiven Aktivität im Vergleich zu WT-MDSC. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die Stimulation von MDSC mit sHLA-G zu einer verstärkten suppressiven Aktivität führte [56]. Für HLA-G ist bekannt, dass es über die Bindung an Rezeptoren auf T-Zellen deren Proliferation hemmt [116]. Wie Qa2 auf die T-Zell-Proliferation wirkt ist bisher nicht beschrieben.

Ein Mechanismus für die geringere Fähigkeit zur Hemmung der T-Zell-Proliferation bei Qa2-Defizienz könnte über die Expression der Ectonukleosidase CD39 vermittelt sein. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von CD39 auf MDSC mit deren suppressiven Aktivität korreliert [220] und auch T_{regs} CD39 exprimieren [221]. CD39 wandelt Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosinmonophosphat (AMP) um, was weiter von der Ectonukleosidase CD73 in Adenosin zersetzt wird. Während einer normalen Schwangerschaft sind die Plasmaspiegel von Adenosin, nicht aber die von ATP erhöht, was wahrscheinlich zu hämodynamischen Veränderungen während der Schwangerschaft und zur Angiogenese beim Fetus und in der Plazenta beiträgt [222]. Eine Überexpression von CD39 schützt durch erhöhte Adenosin-Konzentrationen vor Präeklampsie-ähnlichen Symptomen [221].

In einem aktuell laufenden Parallelprojekt welches sich mit der Präeklampsie befasst, konnte bereits gezeigt werden, dass es während der Trächtigkeit bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen zu einer geringeren Heraufregulation von CD39 auf MDSC kommt (Daten nicht gezeigt), was deren verminderte suppressive Aktivität erklären könnte. Auch unterstützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass es bei Qa2-Mäusen zu einem Präeklampsie-ähnlichen Erscheinungsbild kommt. Weitere Untersuchungen hierzu sind geplant.

Die Expression von Qa2 auf MDSC wird durch Östrogen über HIF1- α reguliert

Aufgrund der gezeigten Relevanz von Qa2 für die Funktion von MDSC während der Trächtigkeit sollte im Weiteren untersucht werden, wie die Qa2-Expression auf MDSC reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Qa2-Expression bei trächtigen Mäusen im Vergleich zu nicht trächtigen Tieren sowohl auf MDSC als auch auf T-Zellen erhöht war. Ebenso war die Expression von HLA-G auf MDSC von Schwangeren im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen verstärkt.

Es wurde bereits vielfach beschrieben, dass HLA-G, welches vor allem während der Schwangerschaft von Trophoblastzellen an der feto-maternalen Grenzschicht exprimiert wird [96] und auch ins Blut der Schwangeren sezerniert wird, während der Schwangerschaft in deutlich erhöhter Menge zu finden ist im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen [102, 103]. Außerdem besteht eine Assoziation von bestimmten HLA-G-Allelen mit Aborten und zwischen dem HLA-G-Genotyp und den Serumkonzentrationen von löslichem HLA-G [109]. Bei Abortpatientinnen und Frauen mit Präeklampsie sind die Serumspiegel von HLA-G bzw. die Expression von HLA-G in der Plazenta deutlich vermindert [105-107]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei IVF-Behandlungen die Höhe der Expression von HLA-G auf dem embryonalen Gewebe mit dem IVF-Erfolg korreliert [108], was nahelegt, dass HLA-G bereits in der Frühschwangerschaft während der Embryonalentwicklung eine wichtige Toleranz-induzierende Rolle spielt. Über die Regulation der Expression von Qa2 während der Schwangerschaft ist bisher kaum etwas bekannt.

Aufgrund der erhöhten Expression von Qa2 auf MDSC während der Trächtigkeit und der sehr variablen Qa2-Expression bei nicht trächtigen Tieren ergab sich die Hypothese, dass vielleicht zyklusabhängige Faktoren in die Regulation involviert sein könnten. Mithilfe einer Zyklusbestimmung anhand der zellulären Zusammensetzung des Vaginalabstriches und gleichzeitiger Blutentnahme bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Qa2-Expression auf MDSC in den ersten zwei Zyklusphasen, dem Proöstrus und Östrus im Vergleich zu den letzten zwei Zyklusphasen, dem Metöstrus und Diöstrus erhöht ist.

Über die Regulation der Expression von HLA-G ist bisher wenig beschrieben. Jedoch scheinen neben Wachstumsfaktoren und anti- oder pro-inflammatorischen Zytokinen auch Hormone wie z.B. β -Estradiol und Progesteron einen Effekt auf die HLA-G-Expression zu haben [223]. Während des Zyklus bei Mäusen liegt Östrogen insbesondere zu Beginn in hohen Konzentrationen vor [60] d.h. in den Zyklusphasen, in denen die Qa2-Expression auf MDSC in unseren Versuchen erhöht war. Es ist bekannt, dass Östrogene neben der Funktion als Sexualhormone auch immunologische Eigenschaften besitzen und damit zur feto-maternalen Toleranz beitragen [224]. Sie fördern die Induktion von Toleranz-induzierenden dendritischen Zellen (DC), können zur Produktion von antiinflammatorischen Th2-Zytokinen anregen und hemmen die Produktion von

proinflammatorischen Th1-Zytokinen. Östrogene stimulieren außerdem die Expansion von T_{regs} [225] und vermindern die Produktion von IL-17 durch T-Zellen [226].

Um zu überprüfen, ob Östrogen in die Regulation der Qa2-Expression auf MDSC involviert ist, wurden Milzzellen von WT-Mäusen mit steigenden Östrogenkonzentrationen (17 β -Estradiol) stimuliert und die Expression von Qa2 auf MDSC und T-Zellen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Stimulation mit Östrogen konzentrationsabhängig zu einer erhöhten Qa2-Expression auf MDSC, nicht aber auf T-Zellen, kam.

Daten anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass die Expression von HLA-G auf Tumorzellen über den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha (HIF-1 α) reguliert werden kann [187, 188]. HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, welcher klassischerweise unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) [190] oder durch proinflammatorische Reize, wie beispielsweise bakterielle Stimulation, aktiviert wird [191]. HIF-1 α wird ständig synthetisiert, jedoch bei normalem Sauerstoffpartialdruck (pO₂) innerhalb kürzester Zeit proteasomal wieder abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen bleibt die Expression von HIF-1 α stabil [190].

HIF-1 α kann auch durch Östrogen aktiviert werden [189]. Daher wurde vermutet, dass der Effekt von Östrogen auf die Qa2-Expression auf MDSC über HIF vermittelt sein könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit HIF-aktivierenden Stimuli (Anoxie und *E. coli*) ebenfalls zu einer Hochregulation von Qa2 auf MDSC führte. Dagegen war die Expression von Qa2 auf MDSC aus trächtigen Mäusen mit konditionellem Knockout für den Transkriptionsfaktor HIF-1 α in der myeloiden Zellreihe (HIF-KO) im Vergleich zu MDSC aus trächtigen WT-Tieren vermindert, und eine Östrogen-Stimulation von Milzzellen aus HIF-KO-Mäusen bewirkte keine Hochregulation von Qa2 auf MDSC, wie sie bei WT-MDSC beobachtet wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass Östrogen neben der Expression von HLA-G [223] auch die Expression von Qa2 auf MDSC über HIF-1 α reguliert.

In der Plazenta herrschen insbesondere während der frühen Schwangerschaft hypoxische Bedingungen, was zu einer vermehrten Expression von HIF führt [227] und wodurch auch eine vermehrte Aktivität von HLA-G beschrieben wird [228]. Plazentare Hypoxie spielt sowohl bei der normalen Embryonalentwicklung und der Proliferation von Trophoblasten, als auch bei der Pathogenese der Präeklampsie und der dadurch beeinträchtigten Plazentaentwicklung eine bedeutsame Rolle [229, 230]. Außerdem konnte im Zusammenhang mit malignen Tumoren gezeigt werden, dass HIF-1 α kritisch für die MDSC-Aktivierung im hypoxischen Umfeld der Tumoren zu sein scheint [231-233].

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass ein Fehlen von HIF-1 α in myeloiden Zellen wichtig für eine komplikationslose Schwangerschaft ist und dass der Verlust von HIF-1 α in myeloiden Zellen

während der Schwangerschaft zu einer verminderten Akkumulation von MDSC, einer erhöhten Apoptoserate und zur Beeinträchtigung der Funktionen von MDSC im Uterus führt [160]. In Zusammenschau dieser Ergebnisse und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann spekuliert werden, dass der reduzierte Sauerstoffpartialdruck in der Plazenta zu einer Aktivierung von MDSC führt und dass diese zumindest teilweise über eine Hochregulation der Qa2-Expression vermittelt wird.

***In-vivo* Applikation von sHLA-G führte zu erhöhten MDSC-Zahlen und einer reduzierten Abortrate**

Zuletzt sollte untersucht werden, ob die Gabe von löslichem HLA-G (sHLA-G) über eine Induktion von MDSC die Abortrate bei Mäusen mit erhöhter Abortneigung reduzieren kann und damit als Therapeutikum für immunologisch bedingte Aborte in Frage kommt.

Die Untersuchung der Wirkung von HLA-G im Mausmodell ist deshalb möglich, weil HLA-G, obwohl es ein nur beim Menschen vorkommendes Molekül ist, an den murinen Rezeptor PIR-B auf Leukozyten binden kann und darüber tolerogene Effekte auch in der Maus vermitteln kann [131].

Zunächst wurde im Rahmen einer Pilotstudie sHLA-G in Monomerform an weibliche, nicht trüchtige CBA/J-Mäusen appliziert, mit dem Ziel dadurch die Generierung von MDSC zu induzieren. CBA/J-Mäuse wurden gewählt, da es bei der Verpaarung von CBA/J-Weibchen mit DBA/2J-Männchen zu einer erhöhten Abortrate von 20-30 % kommt [158, 159, 234] und in diesen Tieren bereits beschrieben war, dass die MDSC-Akkumulation während der Trächtigkeit gestört ist [49]. Im nächsten Schritt sollte das CBA x DBA-Modell dann genutzt werden, um durch die Gabe von sHLA-G und einer daraus resultierenden Induktion von MDSC die Abortrate zu reduzieren. Jedoch konnte durch die intraperitoneale Injektion von sHLA-G weder konzentrationsabhängig noch zeitabhängig einen Effekt auf die Akkumulation von MDSC in Milz, Blut und Knochenmark nachgewiesen werden.

In verschiedenen Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass HLA-G die Entstehung von CD11b⁺Gr1⁺-MDSC mit einer erhöhten suppressiven Aktivität induziert und hierdurch im Rahmen von Transplantationen das Überleben des Transplantats verlängert werden konnte [32, 130]. Auch im Tumormodell führte die Interaktion von HLA-G exprimierenden Tumorzellen mit dem Rezeptor PIR-B zu einer Induktion von CD11b⁺Gr1⁺PIR-B⁺ MDSC [129]. Wie bereits erwähnt, zeigte unsere Gruppe *in-vitro*, dass eine Zugabe von sHLA-G zu menschlichen PBMC zu einer quantitativen Induktion von MDSC und zu einer Steigerung ihrer suppressiven Aktivität führte [56]. Daher war es überraschend, dass in den hier präsentierten Untersuchungen kein Effekt von sHLA-G auf die Induktion von MDSC in CBA-Mäusen nachgewiesen werden konnte. Eine der

möglichen Ursachen für die fehlende Wirkung von sHLA-G könnte sein, dass durch die intraperitoneale Injektion keine ausreichende Menge an sHLA-G systemisch aufgenommen wurde. Ein weiterer Grund könnte sein, dass nicht trächtige Mäuse bzw. Mäuse ohne Pathologien wie Transplantationen oder Tumoren aufgrund einer fehlenden Voraktivierung nicht auf die Gabe von löslichem HLA-G ansprechen.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde im nächsten Schritt sHLA-G intravenös an trächtige Qa2-Mäuse appliziert. Es wurden nun auch nicht mehr Monomere, sondern Tetramere verwendet. Tetramere binden mit einer deutlich höheren Affinität an ihre Rezeptoren als Monomere. Der Unterschied in der Affinität ist vor allem auf die erhöhte Dissoziationsrate von Monomeren zurückzuführen [235]. Boyson et al. konnten beschreiben, dass eine Dimerisierung oder Trimerisierung von HLA-G-Molekülen zu einer erhöhten Avidität für verschiedene Rezeptoren wie z.B. ILT2 führt und es dadurch zu einer verbesserten Hemmung der lytischen Aktivität von NK-Zellen kommt [236].

In dieser zweiten Versuchsreihe kam es durch die Applikation von sHLA-G vor allem im Uterus aber auch in der Plazenta zu einem Anstieg der MDSC-Zahlen. Außerdem konnte durch die Applikation von sHLA-G die Abortrate von Qa2-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion von PBS) deutlich reduziert werden. Auch die Morphologie der Chorionzotten mit der Ansammlung eosinophiler Aggregate normalisierte sich und glich sich dem Phänotyp von WT-Mäusen an.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass humane MDSC aus der Plazenta die stärksten Expressionen von HLA-G-Rezeptoren aufwiesen und damit wahrscheinlich am empfindlichsten auf sHLA-G reagieren [56]. Dies würde erklären, warum vor allem dort der Effekt von HLA-G auf die MDSC-Akkumulation zu beobachten war.

Zusammenfassend konnte mit der hier vorliegenden Arbeit erstmals ein therapeutischer Effekt von HLA-G auf das Auftreten von Aborten im Mausmodell gezeigt werden. Außerdem verbesserten sich die placentaren Veränderungen, die möglicherweise auf das Vorliegen einer Präeklampsie in den Qa2-Mäusen hindeuten.

Es sind daher weitere Untersuchungen geplant, um den Effekt von HLA-G auf das Auftreten der Präeklampsie zu untersuchen.

V. Schlussfolgerung und Ausblick

Aborte und Präeklampsie zählen zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen überhaupt. Trotz intensiver Weiterentwicklung der Reproduktionsmedizin bleiben einige Paare am Ende kinderlos. Das bessere Verständnis der Pathogenese von Aborten und der Präeklampsie, zusätzlich zur Weiterentwicklung von präventiven und therapeutischen Maßnahmen sind ein wichtiges Ziel der reproduktionsmedizinischen Forschung.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Qa2 zu einer veränderten strukturellen und immunologischen Anpassung an die Trächtigkeit/Schwangerschaft und zu einem vermehrten Auftreten von Aborten gegen Ende der Trächtigkeit/Schwangerschaft führte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Qa2 auf MDSC zu deren Funktionalität beiträgt und über Östrogen und den Transkriptionsfaktor HIF-1 α reguliert wird. Zuletzt konnten durch die Applikation von sHLA-G MDSC bei trächtigen Qa2-Mäusen induziert, die erhöhte Abortrate reduziert und die veränderte Trophoblast-Morphologie normalisiert werden.

Unsere phänotypischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Qa2-Mäuse möglicherweise ein Präeklampsie-ähnliches Erscheinungsbild entwickeln. Es sind nun weitere Untersuchungen notwendig, um das Qa2-Modell als mögliches neues Mausmodell für die Präeklampsie zu beschreiben. Hierzu müssen die zentralen Prozesse bei der Pathogenese der Präeklampsie, wie die gestörte Trophoblasteninvasion und den gestörten Spiralarterienumbau, die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus und einer Proteinurie und der Nachweis des anti-angiogenen VEGF-Rezeptor sFlt-1 im Serum genauer untersucht werden. Dies stellt das weiterführende Projekt dar, welches an diese Dissertation anknüpfen wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen aber bereits dazu bei, die immunologischen Vorgänge während der Schwangerschaft besser zu verstehen und Ansätze für neue, zellbasierte Therapiestrategien bei Schwangerschaftskomplikationen wie Aborten und Präeklampsie zu entwickeln. Darüber hinaus können mit dem besseren Verständnis der Funktion von HLA-G bzw. Qa2 und deren Beeinflussung von MDSC auch neue therapeutische Optionen für andere pathologische Situationen, in denen die Funktionen von HLA-G und MDSC eine Rolle spielen, wie beispielsweise Organtransplantationen, Tumorerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen entwickelt werden.

VI. Reflexion der Methodik

Tierversuche

Wesentlicher Leitgedanke in der tierexperimentellen Forschung ist das ethische Prinzip der „3R“ – Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern) und Refine (Verbessern). Tierversuche werden von den zuständigen Behörden nur dann genehmigt, wenn zur Aufklärung der wissenschaftlichen Fragestellung keine anderen geeigneten Methoden zur Verfügung stehen und die Anzahl und die Belastung der Tiere auf ein unerlässliches Maß beschränkt werden [237].

Die Mechanismen zu verstehen, welche sich während der Schwangerschaft zwischen der Mutter und dem Feten abspielen, ist das Ziel vieler Arbeitsgruppen. In humanen Studien wird eine Limitierung dadurch erreicht, dass es aus ethischer Sicht und mit den heutigen Untersuchungsmethoden nicht möglich ist, während einer Schwangerschaft vitale Zellpopulationen von der feto-maternalen Grenzschicht zu untersuchen. Auch *in-vitro* lassen sich die komplexen immunologischen Mechanismen, die sich während einer Schwangerschaft abspielen, nicht vollständig nachahmen. Mithilfe der Zellkultur lassen sich Interaktionen einzelner Immunzell-Subtypen abbilden, nicht jedoch die komplexen Wechselwirkungen zwischen mütterlichen Immunzellen und dem sich entwickelnden Feten sowie das Zusammenspiel von verschiedensten löslichen Faktoren während der Schwangerschaft. Untersuchungen hierzu sind nur im intakten Gesamtorganismus möglich. Daher stellt die Labormaus seit vielen Jahren einen viel genutzten Modellorganismus für wissenschaftliche Untersuchungen dar. Das menschliche und murine Genom stimmen zu ca. 99 % überein [238].

Die Belastung der Mäuse in den, für diese Arbeit durchgeführten, Tierversuchen ist mit Plug-Verpaarungen, wiederholten Blutentnahmen unter Narkose oder i.p. bzw. i.v.-Injektionen, sowie der Entnahme von Vaginalabstrichen als gering einzustufen. Der Erkenntnisgewinn wurde als höher eingeschätzt als die durch die Versuche verursachten Belastungen der Versuchstiere. Daher wurden die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck als ethisch vertretbar erachtet.

Gewebeaufarbeitung

Die Verarbeitung der Organe erfolgte rein mechanisch, was vor allem beim Uterus zu sehr unsauberer Leukozytenpopulationen führte. Auf den Einsatz von Enzymen wurde bewusst verzichtet, um die Oberflächenstrukturen der Zellen nicht zu verändern.

MDSC

Eine generelle Schwierigkeit bei der Forschung an und mit MDSC ist, dass MDSC nicht durch phänotypische Charakteristika, sondern nur durch ihre suppressive Funktion von reifen myeloiden Zellen zu unterscheiden sind. In den murinen Geweben Uterus, Milz und Knochenmark wurden in den Quantifizierungsversuchen alle Gr1/CD11b-exprimierenden Zellen als MDSC bezeichnet. In diesen Populationen sind aber mit Sicherheit auch reife Granulozyten enthalten. Daher wurden funktionelle Tests durchgeführt, die zeigten, dass die Summe aller Gr1/CD11b-positiven Zellen aus der Milz trächtiger Mäuse suppressiv auf die T-Zell-Proliferation wirkt und damit die Kriterien erfüllt, als MDSC bezeichnet werden zu können. Funktionelle Untersuchungen von Zellen aus dem Uterus waren aber aufgrund der extrem geringen Gesamtzellmenge nicht möglich. Hier muss sich auf bereits vorhandene humane Daten unserer Gruppe berufen werden, die zeigen, dass granulozytäre Zellen aus der Plazenta deutlich suppressive Eigenschaften besitzen, die die von MDSC aus dem peripheren Blut sogar übersteigen [40].

VII. Literaturverzeichnis

1. **Dbstet, A. (1977):** WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 56(3): p. 247-53.
2. **Zinaman, M.J., Clegg, E.D., Brown, C.C., O'Connor, J. et al. (1996):** Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*, 65(3): p. 503-9.
3. **Edmonds, D.K., Lindsay, K.S., Miller, J.F., Williamson, E. et al. (1982):** Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril*, 38(4): p. 447-53.
4. **Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'Connor, J.F., Baird, D.D. et al. (1988):** Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 319(4): p. 189-94, doi: 10.1056/NEJM198807283190401.
5. **Miller, J.F., Williamson, E., Glue, J., Gordon, Y.B. et al. (1980):** Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet*, 2(8194): p. 554-6, doi: 10.1016/s0140-6736(80)91991-1.
6. **Carrington, B., Sacks, G. and Regan, L. (2005):** Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 17(6): p. 591-7, doi: 10.1097/01.gco.0000194112.86051.26.
7. **Uhl, B. (2017):** Gynäkologie und Geburtshilfe compact. 6. Auflage, *Stuttgart: Thieme Verlag*.
8. **Lindbohm, M.L., Sallmen, M. and Taskinen, H. (2002):** Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health*, 28 Suppl 2: p. 84-96.
9. **Kesmodel, U., Wisborg, K., Olsen, S.F., Henriksen, T.B. et al. (2002):** Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol*, 37(1): p. 87-92, doi: 10.1093/alcalc/37.1.87.
10. **Ness, R.B., Grisso, J.A., Hirschinger, N., Markovic, N. et al. (1999):** Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*, 340(5): p. 333-9, doi: 10.1056/NEJM199902043400501.
11. **Rai, R. and Regan, L. (2006):** Recurrent miscarriage. *Lancet*, 368(9535): p. 601-11, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69204-0.
12. **Katz, V.L. and Kuller, J.A. (1994):** Recurrent miscarriage. *Am J Perinatol*, 11(6): p. 386-97, doi: 10.1055/s-2007-994603.
13. **Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, Ungewollt kinderlos. Was kann die moderne Medizin gegen den Kindermangel in Deutschland tun? last update Juni 2007, cited Oktober 2020 from: <http://docplayer.org/10832899-Berlin-institut-fuer-bevoelkerung-und-entwicklung-ungewollt-kinderlos-was-kann-die-moderne-medizin-gegen-den-kindermangel-in-deutschland-tun.html>.**
14. **Murphy, K.M. and Weaver C. (2016):** Janeway's Immunobiology. 9th edition, *New York: Garland Science - Taylor & Francis Group*

15. **Koolman, J. and Röhm, K.-H. (2009):** Taschenatlas Biochemie des Menschen. 5. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag.
16. **Tripathi, S.K. and Lahesmaa, R. (2014):** Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification. *Immunol Rev*, 261(1): p. 62-83, doi: 10.1111/imr.12204.
17. **Swain, S.L., McKinstry, K.K. and Strutt, T.M. (2012):** Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*, 12(2): p. 136-48, doi: 10.1038/nri3152.
18. **Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. and Ito, M. (2010):** Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 63(6): p. 601-10, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x.
19. **Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V. and Bayry, J. (2012):** Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*, 181(1): p. 8-18, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044.
20. **Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T. et al. (2009):** Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*, 119(12): p. 3573-85, doi: 10.1172/JCI40202.
21. **Soussi-Gounni, A., Kontolemos, M. and Hamid, Q. (2001):** Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 107(4): p. 575-82, doi: 10.1067/mai.2001.114238.
22. **Faulkner, H., Renauld, J.C., Van Snick, J. and Grecis, R.K. (1998):** Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*. *Infect Immun*, 66(8): p. 3832-40, doi: 10.1128/IAI.66.8.3832-3840.1998.
23. **Koch, S., Sopel, N. and Finotto, S. (2017):** Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Semin Immunopathol*, 39(1): p. 55-68, doi: 10.1007/s00281-016-0601-1.
24. **Crotty, S. (2014):** T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41(4): p. 529-42, doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.004.
25. **Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J. et al. (2001):** Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*, 166(1): p. 678-89, doi: 10.4049/jimmunol.166.1.678
26. **Bronte, V. and Zanovello, P. (2005):** Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5(8): p. 641-54, doi: 10.1038/nri1668.
27. **Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. (2009):** Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9(3): p. 162-74, doi: 10.1038/nri2506.
28. **Young, M.R., Newby, M. and Wepsic, H.T. (1987):** Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*, 47(1): p. 100-5.
29. **Greten, T.F., Manns, M.P. and Korangy, F. (2011):** Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol*, 11(7): p. 802-7, doi: 10.1016/j.intimp.2011.01.003.

30. **Wu, T., Zhao, Y. and Zhao, Y. (2014):** The roles of myeloid-derived suppressor cells in transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*, 10(10): p. 1385-94, doi: 10.1586/1744666X.2014.948424.
31. **Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A. et al. (2010):** Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood*, 116(25): p. 5738-47, doi: 10.1182/blood-2010-06-287839.
32. **Zhang, W., Liang, S., Wu, J. and Horuzsko, A. (2008):** Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation*, 86(8): p. 1125-34, doi: 10.1097/TP.0b013e318186fccd.
33. **Zhu, B., Bando, Y., Xiao, S., Yang, K. et al. (2007):** CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 179(8): p. 5228-37, doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5228.
34. **Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D. et al. (2007):** MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*, 204(6): p. 1463-74, doi: 10.1084/jem.20062602.
35. **Brudecki, L., Ferguson, D.A., McCall, C.E. and El Gazzar, M. (2012):** Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun*, 80(6): p. 2026-34, doi: 10.1128/IAI.00239-12.
36. **Zhang, H., Guan, S., Yang, K., Ye, J. et al. (2015):** The frequency of peripheral blood CD14(+)HLA-DR(-/low) MDSCs is negatively correlated with the inflammation in patients with chronic hepatitis B. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 31(10): p. 1387-90, 1395.
37. **Makarenkova, V.P., Bansal, V., Matta, B.M., Perez, L.A. et al. (2006):** CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J Immunol*, 176(4): p. 2085-94, doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2085.
38. **Cuenca, A.G., Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Moreno, C. et al. (2011):** A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med*, 17(3-4): p. 281-92, doi: 10.2119/molmed.2010.00178.
39. **Köstlin, N., Kugel, H., Spring, B., Leiber, A. et al. (2014):** Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur J Immunol*, 44(9): p. 2582-91, doi: 10.1002/eji.201344200.
40. **Köstlin, N., Hofstadter, K., Ostermeir, A.L., Spring, B. et al. (2016):** Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. *J Immunol*, 196(3): p. 1132-45, doi: 10.4049/jimmunol.1500340.
41. **Rieber, N., Gille, C., Kostlin, N., Schafer, I. et al. (2013):** Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin Exp Immunol*, 174(1): p. 45-52, doi: 10.1111/cei.12143.
42. **Zhu, M., Huang, X., Yi, S., Sun, H. et al. (2019):** High granulocytic myeloid-derived suppressor cell levels in the peripheral blood predict a better IVF treatment outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 32(7): p. 1092-1097, doi: 10.1080/14767058.2017.1400002.

43. **Hu, C., Zhen, Y., Pang, B., Lin, X. et al. (2019):** Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Regulated by Estradiol and Are a Predictive Marker for IVF Outcome. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: p. 521, doi: 10.3389/fendo.2019.00521.
44. **Köstlin, N., Schoetensack, C., Schwarz, J., Spring, B. et al. (2018):** Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (GR-MDSC) in Breast Milk (BM); GR-MDSC Accumulate in Human BM and Modulate T-Cell and Monocyte Function. *Front Immunol*, 9: p. 1098, doi: 10.3389/fimmu.2018.01098.
45. **Kostlin-Gille, N., Flaig, L.A., Ginzler, M., Arand, J. et al. (2020):** Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Milk (BM-MDSC) Correlate with Gestational Age and Postnatal Age and Are Influenced by Infant's Sex. *Nutrients*, 12(9), doi: 10.3390/nu12092571.
46. **Zhao, H., Kalish, F., Schulz, S., Yang, Y. et al. (2015):** Unique roles of infiltrating myeloid cells in the murine uterus during early to midpregnancy. *J Immunol*, 194(8): p. 3713-22, doi: 10.4049/jimmunol.1401930.
47. **Kang, X., Zhang, X., Liu, Z., Xu, H. et al. (2016):** Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain feto-maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4+CD25-T cells by activation of the TGF-beta/beta-catenin pathway. *Mol Hum Reprod*, 22(7): p. 499-511, doi: 10.1093/molehr/gaw026.
48. **Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Figley, C., Long, R. et al. (2017):** Frontline Science: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal-fetal tolerance in mice. *J Leukoc Biol*, 101(5): p. 1091-1101, doi: 10.1189/jlb.1HI1016-306RR.
49. **Pan, T., Liu, Y., Zhong, L.M., Shi, M.H. et al. (2016):** Myeloid-derived suppressor cells are essential for maintaining feto-maternal immunotolerance via STAT3 signaling in mice. *J Leukoc Biol*, 100(3): p. 499-511, doi: 10.1189/jlb.1A1015-481RR.
50. **Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.H., Colombo, M.P. et al. (2016):** Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*, 7: p. 12150, doi: 10.1038/ncomms12150.
51. **Dumitru, C.A., Moses, K., Trellakis, S., Lang, S. et al. (2012):** Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother*, 61(8): p. 1155-67, doi: 10.1007/s00262-012-1294-5.
52. **Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R. et al. (2000):** Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*, 96(12): p. 3838-46, PMC2734459.
53. **Movahedi, K., Williams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R. et al. (2008):** Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, 111(8): p. 4233-44, doi: 10.1182/blood-2007-07-099226.
54. **Ren, J., Zeng, W., Tian, F., Zhang, S. et al. (2019):** Myeloid-derived suppressor cells depletion may cause pregnancy loss via upregulating the cytotoxicity of decidual natural killer cells. *Am J Reprod Immunol*, 81(4): p. e13099, doi: 10.1111/aji.13099.

55. **Dietz, S., Schwarz, J., Vogelmann, M., Spring, B. et al. (2019):** Cord blood granulocytic myeloid-derived suppressor cells impair monocyte T cell stimulatory capacity and response to bacterial stimulation. *Pediatr Res*, 86(5): p. 608-615, doi: 10.1038/s41390-019-0504-7.
56. **Köstlin, N., Ostermeir, A.L., Spring, B., Schwarz, J. et al. (2017):** HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. *Eur J Immunol*, 47(2): p. 374-384, doi: 10.1002/eji.201646564.
57. **Zhang, Y., Qu, D., Sun, J., Zhao, L. et al. (2016):** Human trophoblast cells induced MDSCs from peripheral blood CD14(+) myelomonocytic cells via elevated levels of CCL2. *Cell Mol Immunol*, 13(5): p. 615-27, doi: 10.1038/cmi.2015.41.
58. **Köstlin-Gille, N. and Gille, C. (2020):** Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period. *Frontiers in Immunology*, 11(2647), doi: 10.3389/fimmu.2020.584712.
59. **Allen, E. (1922):** The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* 30(3): p. 297-371, doi: 10.1002/aja.1000300303.
60. **McLean, A.C., Valenzuela, N., Fai, S. and Bennett, S.A. (2012):** Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*, (67): p. e4389, doi: 10.3791/4389.
61. **Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L. and Taft, R.A. (2012):** Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*, 7(4): p. e35538, doi: 10.1371/journal.pone.0035538.
62. **Nelson, J.F., Felicio, L.S., Randall, P.K., Sims, C. et al. (1982):** A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*, 27(2): p. 327-39, doi: 10.1095/biolreprod27.2.327.
63. **Norwitz, E.R., Schust, D.J. and Fisher, S.J. (2001):** Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*, 345(19): p. 1400-8, doi: 10.1056/NEJMra000763.
64. **Moore K., Persaud T.V.N. and Viehban C. (2007):** Embryologie - Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. 5. Auflage, München: Urban & Fischer.
65. **Kaufman, H.M. (1992):** The Atlas of Mouse Development 1st edition, Cambridge: Academic Press
66. **Zenclussen, A.C., Gentile, T., Kortebani, G., Mazzolli, A. et al. (2001):** Asymmetric antibodies and pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 45(5): p. 289-94, doi: 10.1111/j.8755-8920.2001.450504.x.
67. **Clark, D.A., Coulam, C.B., Daya, S. and Chaouat, G. (2001):** Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millennium: a critical analysis of immune mechanisms and treatments. *Hum Reprod Update*, 7(5): p. 501-11, doi: 10.1093/humupd/7.5.501.
68. **Warning, J.C., McCracken, S.A. and Morris, J.M. (2011):** A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction*, 141(6): p. 715-24, doi: 10.1530/REP-10-0360.

69. **Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. and Mosmann, T.R. (1993):** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 14(7): p. 353-6, doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D.
70. **Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S. et al. (1993):** Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol*, 151(9): p. 4562-73.
71. **Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Xin, L. and Way, S.S. (2012):** Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*, 490(7418): p. 102-6, doi: 10.1038/nature11462.
72. **Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S. et al. (2004):** Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*, 10(5): p. 347-53, doi: 10.1093/molehr/gah044.
73. **Dimova, T., Nagaeva, O., Stenqvist, A.C., Hedlund, M. et al. (2011):** Maternal Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples. *Am J Reprod Immunol*, 66 Suppl 1: p. 44-56, doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01046.x.
74. **Ernerudh, J., Berg, G. and Mjosberg, J. (2011):** Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *Am J Reprod Immunol*, 66 Suppl 1: p. 31-43, doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01049.x.
75. **Toldi, G., Saito, S., Shima, T., Halmos, A. et al. (2012):** The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 68(2): p. 175-80, doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01145.x.
76. **Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. and Betz, A.G. (2004):** Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, 5(3): p. 266-71, doi: 10.1038/ni1037.
77. **Zenclussen, M.L., Anegon, I., Bertoja, A.Z., Chauveau, C. et al. (2006):** Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol*, 69(1): p. 35-52, doi: 10.1016/j.jri.2005.10.001.
78. **Ng, S.C., Gilman-Sachs, A., Thaker, P., Beaman, K.D. et al. (2002):** Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 48(2): p. 77-86, doi: 10.1034/j.1600-0897.2002.01105.x.
79. **Sykes, L., MacIntyre, D.A., Yap, X.J., Teoh, T.G. et al. (2012):** The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm*, 2012: p. 967629, doi: 10.1155/2012/967629.
80. **Toldi, G., Svec, P., Vasarhelyi, B., Meszaros, G. et al. (2008):** Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87(11): p. 1229-33, doi: 10.1080/00016340802389470.
81. **Prins, J.R., Boelens, H.M., Heimweg, J., Van der Heide, S. et al. (2009):** Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy*, 28(3): p. 300-11, doi: 10.1080/10641950802601237.

82. **Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M. et al. (2007):** Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*, 149(1): p. 139-45, doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x.
83. **Wang, W.J., Hao, C.F., Qu, Q.L., Wang, X. et al. (2010):** The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum Reprod*, 25(10): p. 2591-6, doi: 10.1093/humrep/deq198.
84. **Wang, W.J., Hao, C.F., Yi, L., Yin, G.J. et al. (2010):** Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol*, 84(2): p. 164-70, doi: 10.1016/j.jri.2009.12.003.
85. **Ghaebi, M., Nouri, M., Ghasemzadeh, A., Farzadi, L. et al. (2017):** Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed Pharmacother*, 88: p. 61-73, doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.016.
86. **Coulam, C.B., Goodman, C., Roussev, R.G., Thomason, E.J. et al. (1995):** Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol*, 33(1): p. 40-6, doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb01136.x.
87. **Moffett, A. and Loke, C. (2006):** Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol*, 6(8): p. 584-94, doi: 10.1038/nri1897.
88. **Emmer, P.M., Nelen, W.L., Steegers, E.A., Hendriks, J.C. et al. (2000):** Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56(pos)CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*, 15(5): p. 1163-9, doi: 10.1093/humrep/15.5.1163.
89. **Aoki, K., Kajiura, S., Matsumoto, Y., Ogasawara, M. et al. (1995):** Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet*, 345(8961): p. 1340-2, doi: 10.1016/s0140-6736(95)92539-2.
90. **Gorer, P.A. (1937):** The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 44(3): p. 691-697.
91. **Dausset, J. (1981):** The major histocompatibility complex in man. *Science*, 213(4515): p. 1469-1474, doi: 10.1126/science.6792704.
92. **Kulski, J.K., Shiina, T., Anzai, T., Kohara, S. et al. (2002):** Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol Rev*, 190: p. 95-122, doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.19008.x.
93. **Klein, J. (1979):** The major histocompatibility complex of the mouse. *Science*, 203(4380): p. 516-21, doi: 10.1126/science.104386.
94. **McCluskey, J. and Peh, C.A. (1999):** The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet*, 1(1): p. 3-20.
95. **Parkin, J. and Cohen, B. (2001):** An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270): p. 1777-89, doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
96. **Le Bouteiller, P. (1994):** HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol*, 14(2): p. 89-129, doi: 10.1615/critrevimmunol.v14.i2.10.

97. **Pfeiffer, K.A., Fimmers, R., Engels, G., van der Ven, H. et al. (2001):** The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod*, 7(4): p. 373-8, doi: 10.1093/molehr/7.4.373.
98. **Gomes, A.Q., Correia, D.V. and Silva-Santos, B. (2007):** Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. *EMBO Rep*, 8(11): p. 1024-30, doi: 10.1038/sj.embor.7401090.
99. **Carosella, E.D., Moreau, P., Lemaoult, J. and Rouas-Freiss, N. (2008):** HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol*, 29(3): p. 125-32, doi: 10.1016/j.it.2007.11.005.
100. **Carosella, E.D., Moreau, P., Le Maoult, J., Le Discorde, M. et al. (2003):** HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol*, 81: p. 199-252, doi: 10.1016/s0065-2776(03)81006-4.
101. **Scarabel, L., Garziera, M., Fortuna, S., Asaro, F. et al. (2020):** Soluble HLA-G expression levels and HLA-G/irinotecan association in metastatic colorectal cancer treated with irinotecan-based strategy. *Sci Rep*, 10(1): p. 8773, doi: 10.1038/s41598-020-65424-z.
102. **Hunt, J.S., Petroff, M.G., McIntire, R.H. and Ober, C. (2005):** HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*, 19(7): p. 681-93, doi: 10.1096/fj.04-2078rev.
103. **Ellis, S.A., Sargent, I.L., Redman, C.W. and McMichael, A.J. (1986):** Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*, 59(4): p. 595-601, PMC1453327.
104. **Goldman-Wohl, D.S., Ariel, I., Greenfield, C., Hanoch, J. et al. (2000):** HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. *Mol Hum Reprod*, 6(6): p. 535-40, doi: 10.1093/molehr/6.6.535.
105. **Peng, B., Zhang, L., Xing, A.Y., Hu, M. et al. (2008):** The expression of human leukocyte antigen G and E on human first trimester placenta and its relationship with recurrent spontaneous abortion. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 39(6): p. 976-9.
106. **Yie, S.M., Taylor, R.N. and Librach, C. (2005):** Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 193(1): p. 204-8, doi: 10.1016/j.ajog.2004.11.062.
107. **Alegre, E., Diaz-Lagares, A., Lemaoult, J., Lopez-Moratalla, N. et al. (2007):** Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol*, 68(8): p. 661-7, doi: 10.1016/j.humimm.2007.04.007.
108. **Rizzo, R., Andersen, A.S., Lassen, M.R., Sorensen, H.C. et al. (2009):** Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 62(5): p. 320-38, doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00742.x.
109. **Rebmann, V., van der Ven, K., Passler, M., Pfeiffer, K. et al. (2001):** Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*, 57(1): p. 15-21, doi: 10.1034/j.1399-0039.2001.057001015.x.
110. **Djurisic, S. and Hviid, T.V. (2014):** HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia. *Front Immunol*, 5: p. 652, doi: 10.3389/fimmu.2014.00652.

111. **Rouas-Freiss, N., Moreau, P., LeMaout, J. and Carosella, E.D. (2014):** The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*, 2014: p. 359748, doi: 10.1155/2014/359748.
112. **Le Friec, G., Laupeze, B., Fardel, O., Sebti, Y. et al. (2003):** Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol*, 64(8): p. 752-61, doi: 10.1016/s0198-8859(03)00091-0.
113. **Contini, P., Ghio, M., Poggi, A., Filaci, G. et al. (2003):** Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol*, 33(1): p. 125-34, doi: 10.1002/immu.200390015.
114. **Kanai, T., Fujii, T., Kozuma, S., Yamashita, T. et al. (2001):** Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod*, 7(2): p. 195-200, doi: 10.1093/molehr/7.2.195.
115. **Lynge Nilsson, L., Djurisic, S. and Hviid, T.V. (2014):** Controlling the Immunological Crosstalk during Conception and Pregnancy: HLA-G in Reproduction. *Front Immunol*, 5: p. 198, doi: 10.3389/fimmu.2014.00198.
116. **Riteau, B., Menier, C., Khalil-Daher, I., Sedlik, C. et al. (1999):** HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol*, 43(2): p. 203-11, doi: 10.1016/s0165-0378(99)00034-0.
117. **Rouas-Freiss, N., Marchal, R.E., Kirszenbaum, M., Dausset, J. et al. (1997):** The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10): p. 5249-54, doi: 10.1073/pnas.94.10.5249.
118. **Le Gal, F.A., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I. et al. (1999):** HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*, 11(8): p. 1351-6, doi: 10.1093/intimm/11.8.1351.
119. **Rajagopalan, S. and Long, E.O. (1999):** A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, 189(7): p. 1093-100, doi: 10.1084/jem.189.7.1093.
120. **Cordero, E.A., Veit, T.D., da Silva, M.A., Jacques, S.M. et al. (2009):** HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens*, 74(4): p. 308-13, doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01331.x.
121. **Brenol, C.V., Veit, T.D., Chies, J.A. and Xavier, R.M. (2012):** The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Reumatol*, 52(1): p. 82-91.
122. **Graebin, P., Veit, T.D., Alho, C.S., Dias, F.S. et al. (2012):** Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients. *Crit Care*, 16(5): p. R211, doi: 10.1186/cc11845.
123. **Crispim, J.C., Mendes-Junior, C.T., Wastowski, I.J., Costa, R. et al. (2008):** Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. *Tissue Antigens*, 71(1): p. 35-41, doi: 10.1111/j.1399-0039.2007.00961.x.

124. **Rouas-Freiss, N., LeMaout, J., Moreau, P., Dausset, J. et al. (2003):** HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant*, 3(1): p. 11-6, doi: 10.1034/j.1600-6143.2003.30103.x.
125. **Qiu, J., Terasaki, P.I., Miller, J., Mizutani, K. et al. (2006):** Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant*, 6(9): p. 2152-6, doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01417.x.
126. **Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Ferrone, S. and Carosella, E.D. (2005):** HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res*, 65(22): p. 10139-44, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0097.
127. **Carosella, E.D., Moreau, P., Aractingi, S. and Rouas-Freiss, N. (2001):** HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol*, 22(10): p. 553-5, doi: 10.1016/s1471-4906(01)02007-5.
128. **Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P. et al. (1998):** HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(8): p. 4510-5, doi: 10.1073/pnas.95.8.4510.
129. **Agaugue, S., Carosella, E.D. and Rouas-Freiss, N. (2011):** Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood*, 117(26): p. 7021-31, doi: 10.1182/blood-2010-07-294389.
130. **Loumagne, L., Baudhuin, J., Favier, B., Montespan, F. et al. (2014):** In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance. *Int J Cancer*, 135(9): p. 2107-17, doi: 10.1002/ijc.28845.
131. **Liang, S., Baibakov, B. and Horuzsko, A. (2002):** HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur J Immunol*, 32(9): p. 2418-26, doi: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2418::AID-IMMU2418>3.0.CO;2-L.
132. **Riteau, B., Faure, F., Menier, C., Viel, S. et al. (2003):** Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol*, 64(11): p. 1064-72, doi: 10.1016/j.humimm.2003.08.344.
133. **Tetta, C., Ghigo, E., Silengo, L., Deregibus, M.C. et al. (2013):** Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine*, 44(1): p. 11-9, doi: 10.1007/s12020-012-9839-0.
134. **Kshirsagar, S.K., Alam, S.M., Jasti, S., Hodes, H. et al. (2012):** Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta*, 33(12): p. 982-90, doi: 10.1016/j.placenta.2012.10.005.
135. **Comiskey, M., Goldstein, C.Y., De Fazio, S.R., Mammolenti, M. et al. (2003):** Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product. *Hum Immunol*, 64(11): p. 999-1004, doi: 10.1016/j.humimm.2003.08.352.
136. **Byrne, M.J., Jones, G.S. and Warner, C.M. (2007):** Preimplantation embryo development (Ped) gene copy number varies from 0 to 85 in a population of wild mice identified as *Mus musculus domesticus*. *Mamm Genome*, 18(11): p. 767-78, doi: 10.1007/s00335-007-9067-8.

137. **Chiang, E.Y. and Stroynowski, I. (2005):** Protective immunity against disparate tumors is mediated by a nonpolymorphic MHC class I molecule. *J Immunol*, 174(9): p. 5367-74, doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5367.
138. **Watkins, A., Wilkins, A., Osmond, C., Warner, C.M. et al. (2006):** The influence of mouse Ped gene expression on postnatal development. *J Physiol*, 571(Pt 1): p. 211-20, doi: 10.1113/jphysiol.2005.099192.
139. **Stiernberg, J., Low, M.G., Flaherty, L. and Kincade, P.W. (1987):** Removal of lymphocyte surface molecules with phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on mitogen responses and evidence that ThB and certain Qa antigens are membrane-anchored via phosphatidylinositol. *J Immunol*, 138(11): p. 3877-84.
140. **Geraghty, D.E., Koller, B.H. and Orr, H.T. (1987):** A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24): p. 9145-9, doi: 10.1073/pnas.84.24.9145.
141. **Stroynowski, I. and Tabaczewski, P. (1996):** Multiple products of class Ib Qa-2 genes which ones are functional? *Res Immunol*, 147(5): p. 290-301, doi: 10.1016/0923-2494(96)89642-8.
142. **Warner, C.M. and Brenner, C.A. (2001):** Genetic regulation of preimplantation embryo survival. *Curr Top Dev Biol*, 52: p. 151-92, doi: 10.1016/s0070-2153(01)52011-6.
143. **Goldbard, S.B., Verbanac, K.M. and Warner, C.M. (1982):** Role of the H-2 complex in preimplantation mouse embryo development. *Biol Reprod*, 26(4): p. 591-6, doi: 10.1095/biolreprod26.4.591.
144. **Wu, L., Feng, H. and Warner, C.M. (1999):** Identification of two major histocompatibility complex class Ib genes, Q7 and Q9, as the Ped gene in the mouse. *Biol Reprod*, 60(5): p. 1114-9, doi: 10.1095/biolreprod60.5.1114.
145. **Terriou, P., Sapin, C., Giorgetti, C., Hans, E. et al. (2001):** Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril*, 75(3): p. 525-31, doi: 10.1016/s0015-0282(00)01741-6.
146. **Tian, Z., Xu, Y. and Warner, C.M. (1992):** Removal of Qa-2 antigen alters the Ped gene phenotype of preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*, 47(2): p. 271-6, doi: 10.1095/biolreprod47.2.271.
147. **Xu, Y., Jin, P., Mellor, A.L. and Warner, C.M. (1994):** Identification of the Ped gene at the molecular level: the Q9 MHC class I transgene converts the Ped slow to the Ped fast phenotype. *Biol Reprod*, 51(4): p. 695-9, doi: 10.1095/biolreprod51.4.695.
148. **Warner, C.M., Panda, P., Almquist, C.D. and Xu, Y. (1993):** Preferential survival of mice expressing the Qa-2 antigen. *J Reprod Fertil*, 99(1): p. 145-7, doi: 10.1530/jrf.0.0990145.
149. **Exley, G.E. and Warner, C.M. (1999):** Selection in favor of the Ped fast haplotype occurs between mid-gestation and birth. *Immunogenetics*, 49(7-8): p. 653-9, doi: 10.1007/s002510050661.
150. **Hikmah, E.M.t. and Liben, P. (2019):** Anti-Qa2 Animal Models for Preeclampsia Preclinical Studies: A Pathological Elevation of Blood Pressure and Proteinuria. *Folia Biologica*, 67(2): p. 69-78, doi: 10.3409/fb_67-2.07.

151. **Carosella, E.D., Rouas-Freiss, N., Tronik-Le Roux, D., Moreau, P. et al. (2015):** HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol*, 127: p. 33-144, doi: 10.1016/bs.ai.2015.04.001.
152. **Curigliano, G., Criscitiello, C., Gelao, L. and Goldhirsch, A. (2013):** Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res*, 19(20): p. 5564-71, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3697.
153. **Takai, T., Nakamura, A. and Endo, S. (2011):** Role of PIR-B in autoimmune glomerulonephritis. *J Biomed Biotechnol*, 2011: p. 275302, doi: 10.1155/2011/275302.
154. **Goodall, K.J., Nguyen, A., Sullivan, L.C. and Andrews, D.M. (2019):** The expanding role of murine class Ib MHC in the development and activation of Natural Killer cells. *Mol Immunol*, 115: p. 31-38, doi: 10.1016/j.molimm.2018.05.001.
155. **Lu, N., Wan, F., Yang, X., Wang, C. et al. (2009):** Qa-2 mRNA in peripheral blood mononuclear cells: a potential marker of acute allograft rejection. *Med Sci Monit*, 15(4): p. BR99-105.
156. **Ungchusri, T., Chiang, E.Y., Brown, G., Chen, M. et al. (2001):** Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells. *Immunogenetics*, 53(6): p. 455-67, doi: 10.1007/s002510100347.
157. **Silver, L.M. (1995):** Mouse genetics: concepts and applications. *Oxford University Press*.
158. **Kiger, N., Chaouat, G., Kolb, J.P., Wegmann, T.G. et al. (1985):** Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. Preimmunization of females with allogeneic cells. *J Immunol*, 134(5): p. 2966-70.
159. **Zenclussen, A.C., Blois, S., Stumpo, R., Olmos, S. et al. (2003):** Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the fetomaternal interface. *Cytokine*, 24(4): p. 150-60, doi: 10.4049/jimmunol.179.8.5228.
160. **Köstlin-Gille, N., Dietz, S., Schwarz, J., Spring, B. et al. (2019):** HIF-1alpha-Deficiency in Myeloid Cells Leads to a Disturbed Accumulation of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) During Pregnancy and to an Increased Abortion Rate in Mice. *Front Immunol*, 10: p. 161, doi: 10.3389/fimmu.2019.00161.
161. **Thermo Fisher Scientific**, Pierce™ BCA Protein Assay Kit - User Guide. last update January 2020, [Datasheet], cited January 2021 from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf.
162. **Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG**, CD4+ T Cell Isolation Kit mouse. last update 2020, [Datasheet], cited January 2021 from: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/cd4-t-cell-isolation-kit-mouse.html#130-104-454>.
163. **Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG**, Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit, mouse. last update 2020, [Datasheet], cited January 2021 from: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/myeloid-derived-suppressor-cell-isolation-kit-mouse.html#130-094-538>.
164. **Qiagen**, RNeasy Mini Handbook. last update October 2019, [Datasheet], cited January 2021 from: <https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>.

165. **Whitten, W.K. (1958):** Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *J Endocrinol*, 17(3): p. 307-13, doi: 10.1677/joe.0.0170307.
166. **Whitten, W.K. (1959):** Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J Endocrinol*, 18(1): p. 102-7, doi: 10.1677/joe.0.0180102.
167. **Voss, R. (1979):** Male accessory glands and the evolution of copulatory plugs in rodents.
168. **Qiu, L.Q., Lai, W.S., Stumpo, D.J. and Blackshear, P.J. (2016):** Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. *Bio Protoc*, 6(13), doi: 10.21769/BioProtoc.1859.
169. **Heyne, G.W., Plisch, E.H., Melberg, C.G., Sandgren, E.P. et al. (2015):** A Simple and Reliable Method for Early Pregnancy Detection in Inbred Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 54(4): p. 368-71, PMC4521569.
170. **Wiebold, J.L., Stanfield, P.H., Becker, W.C. and Hillers, J.K. (1986):** The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J Reprod Fertil*, 78(1): p. 185-92, doi: 10.1530/jrf.0.0780185.
171. **Bruce, H.M. (1959):** An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, 184: p. 105, doi: 10.1038/184105a0.
172. **Hirsch, R.E. (2003):** Hemoglobin fluorescence. *Methods Mol Med*, 82: p. 133-54, doi: 10.1385/1-59259-373-9:133.
173. **Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K. et al. (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1): p. 76-85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
174. **Cohen, A.S. and Karger, B.L. (1987):** High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *J Chromatogr*, 397: p. 409-17, doi: 10.1016/s0021-9673(01)85026-3.
175. **Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K. et al. (1996):** From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 14(1): p. 61-5, doi: 10.1038/nbt0196-61.
176. **Kliza, K., Taumer, C., Pinzuti, I., Franz-Wachtel, M. et al. (2017):** Internally tagged ubiquitin: a tool to identify linear polyubiquitin-modified proteins by mass spectrometry. *Nat Methods*, 14(5): p. 504-512, doi: 10.1038/nmeth.4228.
177. **European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and Universität Zürich, STRING Database.** last update October 2020, [Website], cited December 2020 from: <https://string-db.org/>.
178. **Frith, M.C., Pheasant, M. and Mattick, J.S. (2005):** Genomics: The amazing complexity of the human transcriptome. *European Journal of Human Genetics*, 13(8): p. 894-897, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201459.
179. **Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barrett, J. and Herzenberg, L.A. (1969):** Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166(3906): p. 747-9, doi: 10.1126/science.166.3906.747.

180. **Koehn, B.H., Apostolova, P., Haverkamp, J.M., Miller, J.S. et al. (2015):** GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, 126(13): p. 1621-8, doi: 10.1182/blood-2015-03-634691.
181. **Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W. and Radbruch, A. (1990):** High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2): p. 231-8, doi: 10.1002/cyto.990110203.
182. **Lyons, A.B. and Parish, C.R. (1994):** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 171(1): p. 131-7, doi: 10.1016/0022-1759(94)90236-4.
183. **Alturkistani, H.A., Tashkandi, F.M. and Mohammedsaleh, Z.M. (2015):** Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci*, 8(3): p. 72-9, doi: 10.5539/gjhs.v8n3p72.
184. **Bayer, E.A., Ben-Hur, H., Gitlin, G. and Wilchek, M. (1986):** An improved method for the single-step purification of streptavidin. *J Biochem Biophys Methods*, 13(2): p. 103-12, doi: 10.1016/0165-022x(86)90022-9.
185. **Fons, P., Chabot, S., Cartwright, J.E., Lenfant, F. et al. (2006):** Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*, 108(8): p. 2608-15, doi: 10.1182/blood-2005-12-019919.
186. **Köstlin, N., Vogelmann, M., Spring, B., Schwarz, J. et al. (2017):** Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype. *Immunology*, 152(1): p. 89-101, doi: 10.1111/imm.12751.
187. **Garziera, M., Scarabel, L. and Toffoli, G. (2017):** Hypoxic Modulation of HLA-G Expression through the Metabolic Sensor HIF-1 in Human Cancer Cells. *J Immunol Res*, 2017: p. 4587520, doi: 10.1155/2017/4587520.
188. **Yaghi, L., Poras, I., Simoes, R.T., Donadi, E.A. et al. (2016):** Hypoxia inducible factor-1 mediates the expression of the immune checkpoint HLA-G in glioma cells through hypoxia response element located in exon 2. *Oncotarget*, 7(39): p. 63690-63707, doi: 10.18632/oncotarget.11628.
189. **Yang, J., Altahan, A., Jones, D.T., Buffa, F.M. et al. (2015):** Estrogen receptor-alpha directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(49): p. 15172-7, doi: 10.1073/pnas.1422015112.
190. **Semenza, G.L. (2001):** HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2): p. 167-71, doi: 10.1016/s0955-0674(00)00194-0.
191. **van Uden, P., Kenneth, N.S. and Rocha, S. (2008):** Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J*, 412(3): p. 477-84, doi: 10.1042/BJ20080476.
192. **McElhinny, A.S., Kadow, N. and Warner, C.M. (1998):** The expression pattern of the Qa-2 antigen in mouse preimplantation embryos and its correlation with the Ped gene phenotype. *Mol Hum Reprod*, 4(10): p. 966-71, doi: 10.1093/molehr/4.10.966.
193. **McElhinny, A.S., Exley, G.E. and Warner, C.M. (2000):** Painting Qa-2 onto Ped slow preimplantation embryos increases the rate of cleavage. *Am J Reprod Immunol*, 44(1): p. 52-8, doi: 10.1111/j.8755-8920.2000.440108.x.

194. **Sulistyowati, S., Bachnas, M.A., Anggraini, N.D., Yuliantara, E.E. et al. (2017):** Recombinant vascular endothelial growth factor 121 injection for the prevention of fetal growth restriction in a preeclampsia mouse model. *J Perinat Med*, 45(2): p. 245-251, doi: 10.1515/jpm-2016-0149.
195. **Raghupathy, R., Al-Azemi, M. and Azizieh, F. (2012):** Intrauterine growth restriction: cytokine profiles of trophoblast antigen-stimulated maternal lymphocytes. *Clin Dev Immunol*, 2012: p. 734865, doi: 10.1155/2012/734865.
196. **Pijnenborg, R., Vercruyse, L. and Hanssens, M. (2006):** The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*, 27(9-10): p. 939-58, doi: 10.1016/j.placenta.2005.12.006.
197. **Cui, Y.J., Wang, W., Dong, N.Z., Lou, J.L. et al. (2012):** Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature*, 484(7393): p. 246-U134, doi: 10.1038/nature10897.
198. **Collange, O., Launoy, A., Kopf-Pottecher, A., Dietemann, J.L. et al. (2010):** [Eclampsia]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 29(4): p. e75-82, doi: 10.1016/j.annfar.2010.02.021.
199. **Sones, J.L. and Davisson, R.L. (2016):** Preeclampsia, of mice and women. *Physiol Genomics*, 48(8): p. 565-72, doi: 10.1152/physiolgenomics.00125.2015.
200. **Gerasimova, E.M., Fedotov, S.A., Kachkin, D.V., Vashukova, E.S. et al. (2019):** Protein Misfolding during Pregnancy: New Approaches to Preeclampsia Diagnostics. *Int J Mol Sci*, 20(24), doi: 10.3390/ijms20246183.
201. **Tong, M., Cheng, S.B., Chen, Q., DeSousa, J. et al. (2017):** Aggregated transthyretin is specifically packaged into placental nano-vesicles in preeclampsia. *Sci Rep*, 7(1): p. 6694, doi: 10.1038/s41598-017-07017-x.
202. **Buhimschi, I.A., Nayeri, U.A., Zhao, G., Shook, L.L. et al. (2014):** Protein misfolding, congophilia, oligomerization, and defective amyloid processing in preeclampsia. *Sci Transl Med*, 6(245): p. 245ra92, doi: 10.1126/scitranslmed.3008808.
203. **Cater, J.H., Kumita, J.R., Zeineddine Abdallah, R., Zhao, G. et al. (2019):** Human pregnancy zone protein stabilizes misfolded proteins including preeclampsia- and Alzheimer's-associated amyloid beta peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(13): p. 6101-6110, doi: 10.1073/pnas.1817298116.
204. **Wang, Y., Liu, Y., Shu, C., Wan, J. et al. (2018):** Inhibition of pregnancy-associated granulocytic myeloid-derived suppressor cell expansion and arginase-1 production in preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 127: p. 48-54, doi: 10.1016/j.jri.2018.05.002.
205. **Du, M., Yu, N., Ding, Q., Chen, X. et al. (2018):** Elevated percentage of CD3(+)T cells and pregnancy outcome in women with recurrent pregnancy loss. *Clin Chim Acta*, 486: p. 341-346, doi: 10.1016/j.cca.2018.08.024.
206. **Arenas-Hernandez, M., Romero, R., Xu, Y., Panaitescu, B. et al. (2019):** Effector and Activated T Cells Induce Preterm Labor and Birth That Is Prevented by Treatment with Progesterone. *J Immunol*, 202(9): p. 2585-2608, doi: 10.4049/jimmunol.1801350.

207. **Rich, K.C., Siegel, J.N., Jennings, C., Rydman, R.J. et al. (1999):** CD8+ lymphocytes in pregnancy and HIV infection: characterization of CD8+ subpopulations and CD8+ noncytotoxic antiviral activity. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15(7): p. 665-70, doi: 10.1089/088922299310962.
208. **Luppi, P., Tse, H., Lain, K.Y., Markovic, N. et al. (2006):** Preeclampsia activates circulating immune cells with engagement of the NF-kappaB pathway. *Am J Reprod Immunol*, 56(2): p. 135-44, doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00386.x.
209. **Hanson, E.M., Clements, V.K., Sinha, P., Ilkovitch, D. et al. (2009):** Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, 183(2): p. 937-44, doi: 10.4049/jimmunol.0804253.
210. **Ku, A.W., Muhitch, J.B., Powers, C.A., Diehl, M. et al. (2016):** Tumor-induced MDSC act via remote control to inhibit L-selectin-dependent adaptive immunity in lymph nodes. *Elife*, 5, doi: 10.7554/eLife.17375.
211. **Svensson, L., Arvola, M., Sallstrom, M.A., Holmdahl, R. et al. (2001):** The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol*, 51(1): p. 3-7, doi: 10.1016/s0165-0378(01)00065-1.
212. **Zenclussen, A.C. (2006):** Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol*, 28(1): p. 31-9, doi: 10.1007/s00281-006-0023-6.
213. **Zenclussen, A.C., Gerlof, K., Zenclussen, M.L., Sollwedel, A. et al. (2005):** Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol*, 166(3): p. 811-22, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62302-4.
214. **Croy, B.A. and Xie, X. (2006):** In vivo models for studying homing and function of murine uterine natural killer cells. *Methods Mol Med*, 122: p. 77-92, doi: 10.1385/1-59259-989-3:75.
215. **Linke, N., Schumacher, A., Woidacki, K., Croy, B.A. et al. (2014):** Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. *Hypertension*, 63(3): p. 580-8, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02403.
216. **Chen, C., Liang, J., Yao, G., Chen, H. et al. (2017):** Mesenchymal stem cells upregulate Treg cells via sHLA-G in SLE patients. *Int Immunopharmacol*, 44: p. 234-241, doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.024.
217. **Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B. et al. (2008):** Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*, 26(1): p. 212-22, doi: 10.1634/stemcells.2007-0554.
218. **Kraaij, M.D., van der Kooij, S.W., Reinders, M.E., Koekkoek, K. et al. (2011):** Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by anti-inflammatory macrophages. *Mol Immunol*, 49(3): p. 549-57, doi: 10.1016/j.molimm.2011.10.002.
219. **Raghupathy, R. (2001):** Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol*, 13(4): p. 219-27, doi: 10.1006/smim.2001.0316.

220. **Li, J., Wang, L., Chen, X., Li, L. et al. (2017):** CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 6(6): p. e1320011, doi: 10.1080/2162402X.2017.1320011.
221. **McRae, J.L., Russell, P.A., Chia, J.S. and Dwyer, K.M. (2013):** Overexpression of CD39 protects in a mouse model of preeclampsia. *Nephrology (Carlton)*, 18(5): p. 351-5, doi: 10.1111/nep.12058.
222. **Spaans, F., de Vos, P., Bakker, W.W., van Goor, H. et al. (2014):** Danger signals from ATP and adenosine in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension*, 63(6): p. 1154-60, doi: 10.1161/hypertensionaha.114.03240.
223. **Akhter, A., Faridi, R.M., Das, V., Pandey, A. et al. (2012):** In vitro up-regulation of HLA-G using dexamethasone and hydrocortisone in first-trimester trophoblast cells of women experiencing recurrent miscarriage. *Tissue Antigens*, 80(2): p. 126-35, doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01884.x.
224. **Papenfuss, T.L., Powell, N.D., McClain, M.A., Bedarf, A. et al. (2011):** Estriol generates tolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity. *J Immunol*, 186(6): p. 3346-55, doi: 10.4049/jimmunol.1001322.
225. **Polanczyk, M.J., Carson, B.D., Subramanian, S., Afentoulis, M. et al. (2004):** Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol*, 173(4): p. 2227-30, doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2227.
226. **Wang, C., Dehghani, B., Li, Y., Kaler, L.J. et al. (2009):** Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. *Immunology*, 126(3): p. 329-35, doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03051.x.
227. **Tal, R., Shaish, A., Barshack, I., Polak-Charcon, S. et al. (2010):** Effects of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression in pregnant mice: possible implications for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol*, 177(6): p. 2950-62, doi: 10.2353/ajpath.2010.090800.
228. **Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A. et al. (2004):** Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*, 114(6): p. 744-54, doi: 10.1172/JCI22991.
229. **Caniggia, I., Mostachfi, H., Winter, J., Gassmann, M. et al. (2000):** Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest*, 105(5): p. 577-87, doi: 10.1172/JCI8316.
230. **Rajakumar, A. and Conrad, K.P. (2000):** Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod*, 63(2): p. 559-69, doi: 10.1095/biolreprod63.2.559.
231. **Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J. et al. (2010):** HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 207(11): p. 2439-53, doi: 10.1084/jem.20100587.
232. **Doedens, A.L., Stockmann, C., Rubinstein, M.P., Liao, D. et al. (2010):** Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res*, 70(19): p. 7465-75, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439.

-
233. **Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M. et al. (2014):** PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med*, 211(5): p. 781-90, doi: 10.1084/jem.20131916.
234. **Clark, D.A., Chaput, A. and Tutton, D. (1986):** Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity. *J Immunol*, 136(5): p. 1668-75.
235. **Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H. et al. (1996):** Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274(5284): p. 94-6, doi: 10.1126/science.274.5284.94.
236. **Boyson, J.E., Erskine, R., Whitman, M.C., Chiu, M. et al. (2002):** Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25): p. 16180-5, doi: 10.1073/pnas.212643199.
237. **Russell W.M.S. and Burch R.L. (1960):** The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1(13): p. 500-500, doi: 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.
238. **Peters, L.L., Robledo, R.F., Bult, C.J., Churchill, G.A. et al. (2007):** The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet*, 8(1): p. 58-69, doi: 10.1038/nrg2025.
239. **Dietz, S., Schwarz, J., Rühle, J., Schaller, M. et al. (2020):** Extracellular vesicles released by myeloid-derived suppressor cells from pregnant women modulate adaptive immune responses. *Cellular Immunology*: p. 104276, doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104276.

VIII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bestandteile des menschlichen Immunsystems [15].	19
Abbildung 2: Die adaptive Immunantwort erkennt durch B- und T-Zellen hoch spezifische Oberflächenmerkmale von Pathogenen [15].	20
Abbildung 3: Mechanismen der MDSC-Induktion und der MDSC-vermittelten Immunmodulation während einer komplikationslosen Schwangerschaft [58].	25
Abbildung 4: Die zyklusabhängigen Veränderungen während des weiblichen Zyklus bei Mäusen sind durch endokrine Ereignisse gesteuert [60].	26
Abbildung 5: Vaginalabstriche erlauben die Bestimmung des Zykluspunktes bei Mäusen [60].	27
Abbildung 6: Blastozystenanlagerung, Implantation und Aufrechterhaltung der Frühschwangerschaft [63].	28
Abbildung 7: HLA-G und seine sieben Isoformen [101].	33
Abbildung 8: Qa2-defiziente Mäuse exprimierten auf der Oberfläche von Milzzellen kein Qa2.	39
Abbildung 9: Vaginal-Plug eines C57BL/6J-Weibchens nach erfolgreicher Verpaarung.	47
Abbildung 10: Falsche Plug-Positivität.	48
Abbildung 11: Gewichtsverlauf Plug-positiver Tiere.	48
Abbildung 12: Uterus mit neun angelegten Feten und einem Abort an Trächtigkeitstag E10.5.	49
Abbildung 13: Reinheit der aus Knochenmark generierten MDSC.	55
Abbildung 14: Reinheit der aus der Milz isolierten MDSC.	56
Abbildung 15: Reinheit von aus der Milz isolierten CD4 ⁺ T-Zellen.	56
Abbildung 16: PIR-B Rezeptor auf Gr1-exprimierenden Zellen von WT- und Qa2-defizienten Mäusen.	61
Abbildung 17: Qa2-defiziente Mäuse hatten eine geringere Wurfgröße und die Feten waren leichter.	63
Abbildung 18: Die Anzahl an Feten von WT- und Qa2-Mäusen an Trächtigkeitstag E10.5 unterschied sich nicht, aber die Abortrate war bei Qa2-Mäusen leicht erhöht.	64
Abbildung 19: Qa2-Mäuse hatten im Vergleich zu WT-Mäusen an Trächtigkeitstag E18.5 eine geringe Feten-Anzahl und eine höhere Abortrate.	65
Abbildung 20: Plazenten von Qa2-Mäusen zeigten eine unregelmäßige Zottenstruktur mit unbekanntem eosinophilen Aggregaten.	66
Abbildung 21: Proteinexpression der Plazenta-Lysate von Qa2-Mäusen und WT Mäusen zeigten auf der SDS Page keine Unterschiede.	67

Abbildung 22: 654 Proteine wurden nur in Plazenten von Qa2-defizienten Mäusen nachgewiesen und diese waren hauptsächlich an der Proteinbiosynthese und bei Immunfunktionen beteiligt.....	68
Abbildung 23: Bei Qa2--Mäusen kam es im Vergleich zu WT-Mäusen vermehrt zu Runterregulierung bestimmter Gene	69
Abbildung 24: Gene, die für die Entwicklung von Blutgefäßen, für die Neurogenese und für Prozesse des Immunsystems verantwortlich sind, waren im Uterus von Qa2-defizienten Mäusen runterreguliert.....	70
Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Gating-Strategie zur Identifizierung muriner MDSC und MDSC-Subpopulationen.....	71
Abbildung 26: Bei Qa2--Mäusen kam es während der Trächtigkeit im Vergleich zu WT-Mäusen zu keinem Anstieg der MDSC-Zahlen in der Milz.....	72
Abbildung 27: Bei Qa2-defizienten Mäusen kam es während der Trächtigkeit im Gegensatz zu WT-Mäusen zu einem Anstieg der T-Zellen in der Milz.....	74
Abbildung 28: Schematische Darstellung der T-Zell-Subpopulationen mit den dazugehörigen Oberflächenmarker und die Gating-Strategie.....	76
Abbildung 29: Qa2-defiziente Mäuse hatten in der Milz vermehrt Effektor-Gedächtniszellen.	77
Abbildung 30: Qa2-defiziente Mäuse hatten in der Milz eine höhere Th17-Antwort.....	78
Abbildung 31: Qa2-defiziente Mäuse hatten in der Milz weniger T _{regs} und diese produzierten weniger Foxp3.....	78
Abbildung 32: MDSC von Qa2--Mäusen induzierten im Vergleich zu WT-Mäusen weniger T _{regs}	79
Abbildung 33: MDSC von Qa2--Mäusen hemmten die T-Zell-Proliferation im Vergleich zu WT-Mäusen schwächer.....	80
Abbildung 34: Qa2 wurde sowohl auf MDSC als auch auf T-Zellen während der Trächtigkeit vermehrt exprimiert.....	81
Abbildung 35: HLA-G wurde auf MDSC von Schwangeren vermehrt exprimiert.....	81
Abbildung 36: Qa2 war zyklusabhängig und wurde während dem Proestrus & Estrus vermehrt exprimiert.....	82
Abbildung 37: Die Expression von Qa2 auf MDSC ließ sich konzentrationsabhängig durch die Stimulation von Östrogen erhöhen.....	83
Abbildung 38: Die Expression von Qa2 auf MDSC wurde durch die Stimulation mit <i>E. coli</i> und unter anoxischen Bedingungen erhöht.....	84
Abbildung 39: Bei HIF-KO Mäusen war die Expression von Qa2 auf MDSC vermindert.....	84
Abbildung 40: Die Expression von Qa2 auf MDSC bei HIF-KO Mäusen ließ sich durch die Stimulation von Östrogen nicht erhöhen.....	85

Abbildung 41: sHLA-G führte zu einer Induktion von MDSC im Uterus bei trächtigen Qa2-Mäusen.....	87
Abbildung 42: Die Applikation von sHLA-G reduzierte die Abortrate und normalisierte die Morphologie der Chorionzotten.	88
Abbildung 43: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	91
Abbildung 44: Gating-Strategie des gesamten Immunzellprofils	133
Abbildung 45: Netzwerkanalyse der Proteine aus WT-Plazenten	134
Abbildung 46: Netzwerkanalyse der Proteine von Qa2-Plazenten.....	135
Abbildung 47: Netzwerkanalyse von Genen, die bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen runterreguliert waren.....	136
Abbildung 48: Netzwerkanalyse von Genen, die bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen hochreguliert waren	137

IX. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subtypen von T-Helferzellen	21
Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien.....	38
Tabelle 3: Liste der für diese Arbeit genehmigten Tierversuche.....	40
Tabelle 4: Liste der verwendeten humanen Antikörper für die Durchflusszytometrie	41
Tabelle 5: Liste der verwendeten murinen Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	41
Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits.....	42
Tabelle 7: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	42
Tabelle 8: Liste der verwendeten Kulturmedien und Puffer mit ihrer Zusammensetzung.....	44
Tabelle 9: Liste der verwendeten Großgeräte	46
Tabelle 10: Liste der verwendeten Softwares für Messungen und Auswertungen der Daten	46
Tabelle 11: HE-Färbereihe	58
Tabelle 12: Prozentzahlen von MDSC und den MDSC-Subpopulationen in Milz, Uterus, Plazenta, Blut und Knochenmark.....	73
Tabelle 13: Immunzellen in Milz, Blut, Knochenmark, Plazenta und Uterus.....	75
Tabelle 14: sHLA-G führte zu keiner Induktion von MDSC bei nicht trächtigen CBA-Mäusen.....	86

X. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Stefanie Dietz, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Bedeutung von HLA-G/Qa2 für die MDSC-Akkumulation während der Schwangerschaft und für den Schwangerschaftserfolg“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25. Mai 2000) beachtet wurden.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, 07.04.21

Ort, Datum

Stefanie Dietz

XI. Beteiligungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Neonatologie, AG Neonatale Immunologie und Immuntoleranz unter Betreuung von Herrn PD Dr.med. Christian Gille und Frau Dr.med. Natascha Köstlin-Gille durchgeführt. Herr Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee stand als Zweitgutachter jederzeit für Fragen und Anregungen zur Verfügung.

Die Konzeption dieser Studie und die Interpretation der Ergebnisse erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr.med. Natascha Köstlin-Gille.

Finanziert wurde diese Studie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Die Daten in der vorliegenden Dissertation entstammen bis auf folgende Ausnahmen meiner alleinigen experimentellen Arbeit:

Histologie Plazenta (s. 2.2.5): Die Einbettung in Paraffin sowie die weitere Verarbeitung der Proben und Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen erfolgte durch erfahrene Pathologen im Institut für Pathologie Tübingen, Mauspathologie als Core Facility unter der Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend.

Proteomanalysen (s. 2.2.9): Die Datenanalyse sowie funktionelle Charakterisierung spezifischer Proteinbanden erfolgte mit der LTQ-Orbitrap Massenspektrometrie durch Kollegen des Proteome Center in Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Boris Maček.

Transkriptomanalysen (s. 2.2.10): Die Qualitätskontrolle von RNA sowie die Datenanalysen zur Identifikation unterschiedlicher exprimierter Transkripte erfolgten auf etablierten Bioinformatik-Pipelines durch die Kollegen des Next-Generation-Sequencing (NGS) Competence Center Tübingen (NCCT) als CoreFacility des Universitätsklinikums unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Rieß und in Kooperation mit Dr. Nicolas Casadei.

XII. Veröffentlichungen

Dietz, S., Schwarz, J., Vogelmann, M., Spring, B. et al. (2019): Cord blood granulocytic myeloid-derived suppressor cells impair monocyte T cell stimulatory capacity and response to bacterial stimulation. *Pediatr Res*, 86(5): p. 608-615, doi: 10.1038/s41390-019-0504-7 [55].

Köstlin-Gille, N., **Dietz, S.**, Schwarz, J., Spring, B. et al. (2019): HIF-1alpha-Deficiency in Myeloid Cells Leads to a Disturbed Accumulation of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) During Pregnancy and to an Increased Abortion Rate in Mice. *Front Immunol*, 10: p. 161, doi: 10.3389/fimmu.2019.00161 [160].

Dietz, S., Schwarz, J., Rühle, J., Schaller, M. et al. (2020): Extracellular vesicles released by myeloid-derived suppressor cells from pregnant women modulate adaptive immune responses. *Cellular Immunology*: p. 104276, doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104276 [239].

XIII. Vorträge/Posterpräsentationen

44. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) gemeinsam mit der 26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Neonatologie Mecklenburg-Vorpommern e.V., Rostock, 07.06.2018 - 09.06.2018

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) aus dem Nabelschnurblut hemmen die antigenpräsentierenden und co-stimulatorischen Eigenschaften von Monozyten

Dietz S., Vogelmann M., Spring B., Schwarz J., Orlikowsky T., Poets C.F., Gille C., Köstlin N.

26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie e. V. (DGPI), Köln, 21.06.2018 - 23.06.2018

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) aus dem Nabelschnurblut hemmen die antigenpräsentierenden und co-stimulatorischen Eigenschaften von Monozyten

Dietz S., Vogelmann M., Spring B., Schwarz J., Orlikowsky T., Poets C.F., Gille C., Köstlin N.

45. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin e. V. (GNPI) mit der 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie e. V. (DGPI), Leipzig, 23.05.2019 - 25.05.2019

Das MHC-Ib-Molekül Qa2 ist wichtig für die MDSC-Akkumulation und den Schwangerschaftserhalt bei Mäusen

Dietz S., Schwarz J., Spring B., Poets C.F., Gille C., Köstlin-Gille N.

XIV. Danksagung

Zuallererst möchte ich den Gutachtern dieser Arbeit Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und PD Dr. med. Christian Gille danken, die sowohl zu Beginn meiner Promotion als auch währenddessen jederzeit für wertvolle Ratschläge zur Verfügung standen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille, die mir als erste naturwissenschaftliche Doktorandin in der Arbeitsgruppe überhaupt die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses Projektes unter ihrer Leitung gab. Vielen Dank für die uneingeschränkte Unterstützung, sowohl bei der Planung und Durchführung der Versuche, dem Schreiben von Tierversuchsanträgen, der Zusammenstellung der Ergebnisse als auch der Ausarbeitung meiner Dissertation und dem Schreiben von Publikationen.

Ich danke auch meinem gesamten LabLab-Team. Mit euch ließ sich auch in den frustrierendsten Momenten eine Lösung finden und die langen Labortage wurden erträglicher. Ein Dank hierbei geht an Julian Schwarz, der mich bei sämtlichen TroubleShootings, bei den Mausversuchen oder beim Messen mit bestimmten Geräten (keine Namensnennung ☺) auch nachts um 3 Uhr nicht alleine gelassen hat.

Ein großes Dankeschön gilt auch den Tierpflegern, vor allem Alisha Huff, die sich täglich um die Mäuse gekümmert hat, die Plug-Kontrollen gemacht hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, auch wenn unsere Wünsche manchmal nicht ganz einfach waren oder die Mäuse nicht mitgespielt haben.

Ich möchte mich bei auch allen Kooperationspartnern (Mauspathologie, Proteome Center, Next-Generation-Sequencing Competence Center) bedanken, die teilweise an dieser Arbeit beteiligt waren sowie der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung.

Vielen Dank an die Korrekturleser, besonders Herr Schlosshauer.

Außerdem möchte ich all meinen Freunden besonders aus Tübingen, Karlsruhe und Konstanz danken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ich bin froh euch an meiner Seite zu haben.

Mein größter Dank gilt allerdings meinen Eltern, Gudrun und Günter Dietz sowie meinem Freund Michael Ziegler. Ich danke euch von Herzen für die Geduld und die uneingeschränkte und vor allem mentale Unterstützung während den letzten Jahren. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft!

XV. Anhang

Gating-Strategie Immunzellprofil

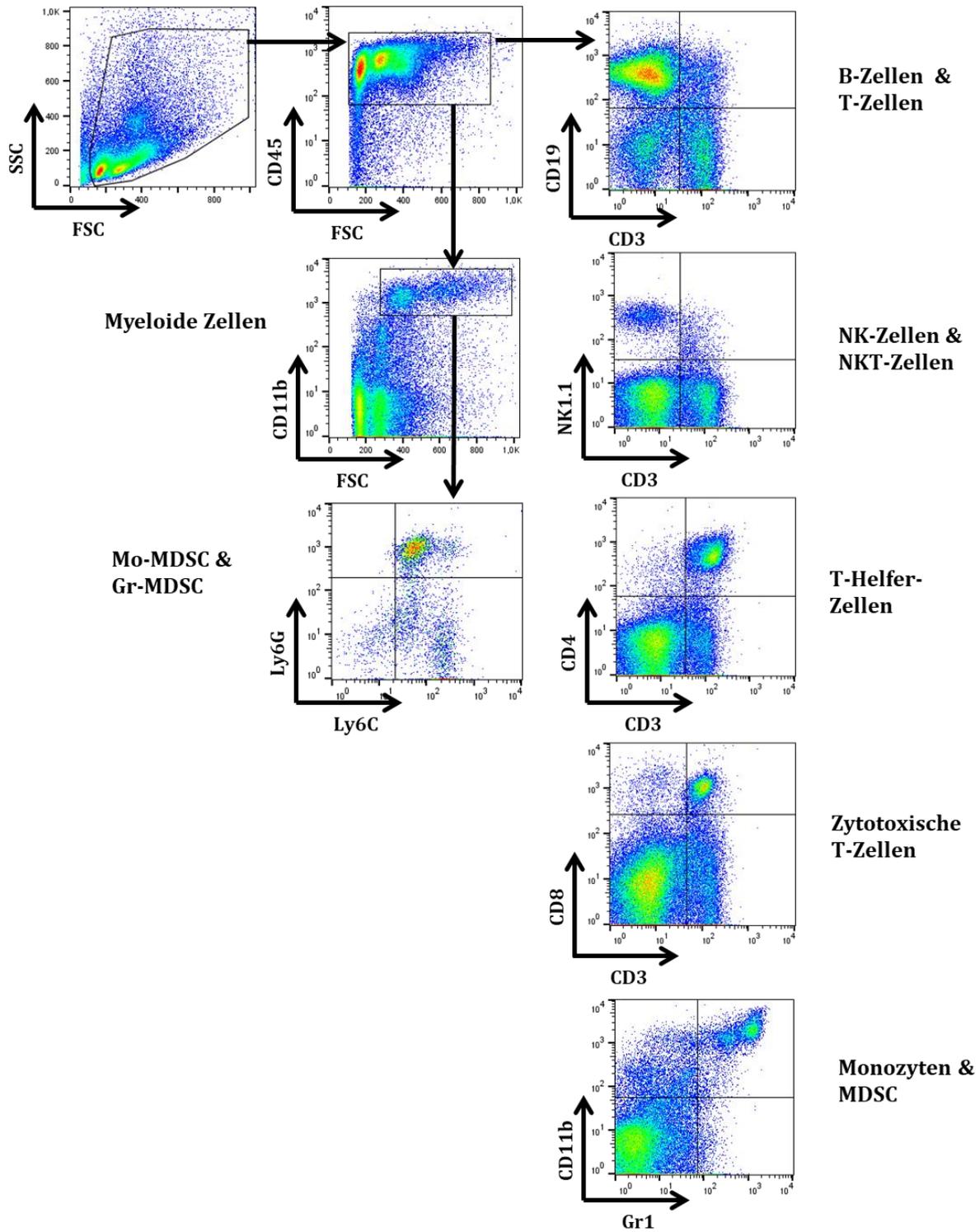


Abbildung 44: Gating-Strategie des gesamten Immunzellprofils

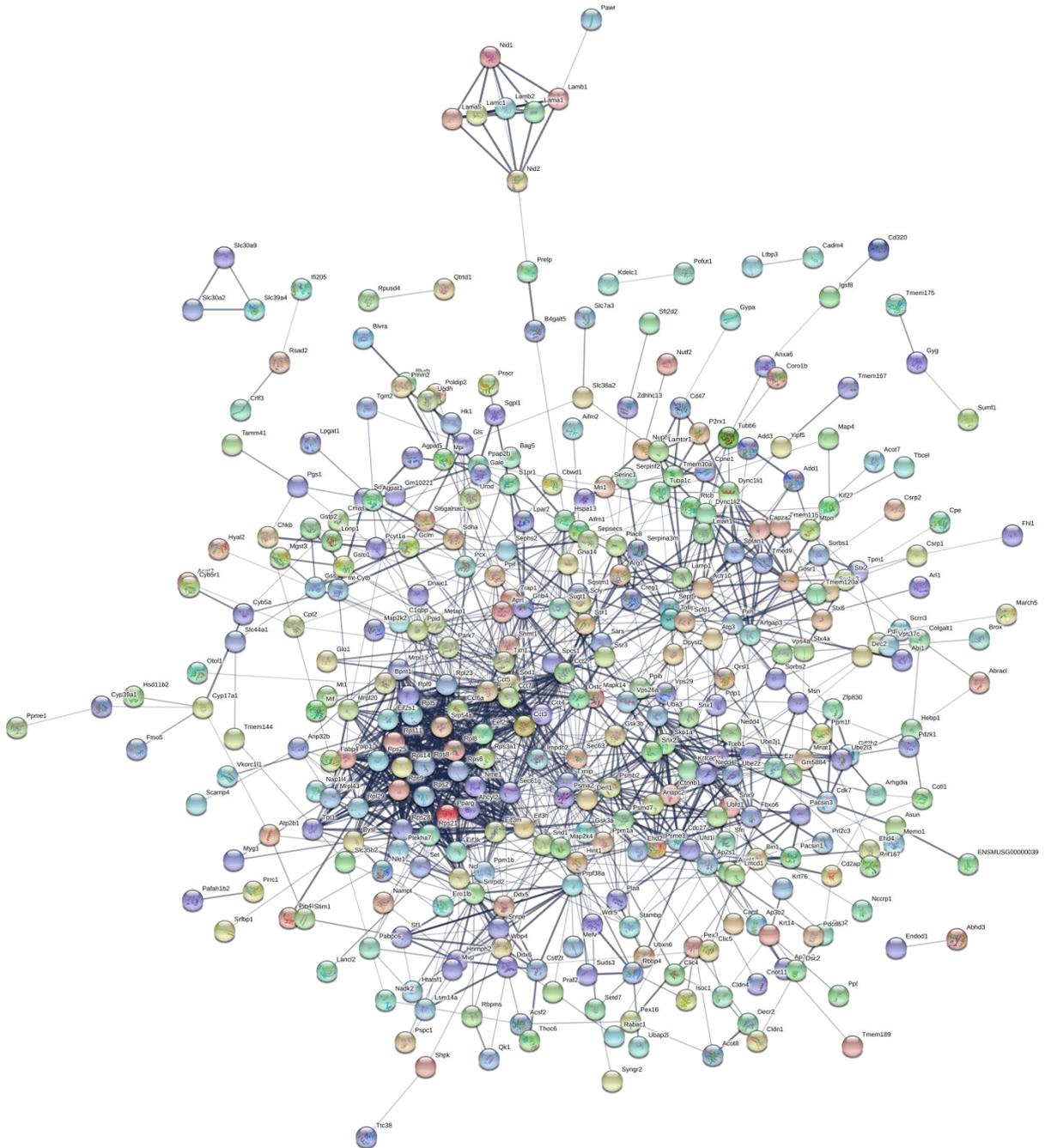


Abbildung 46: Netzwerkanalyse der Proteine von Qa2-Plazenten

Transkriptomanalysen

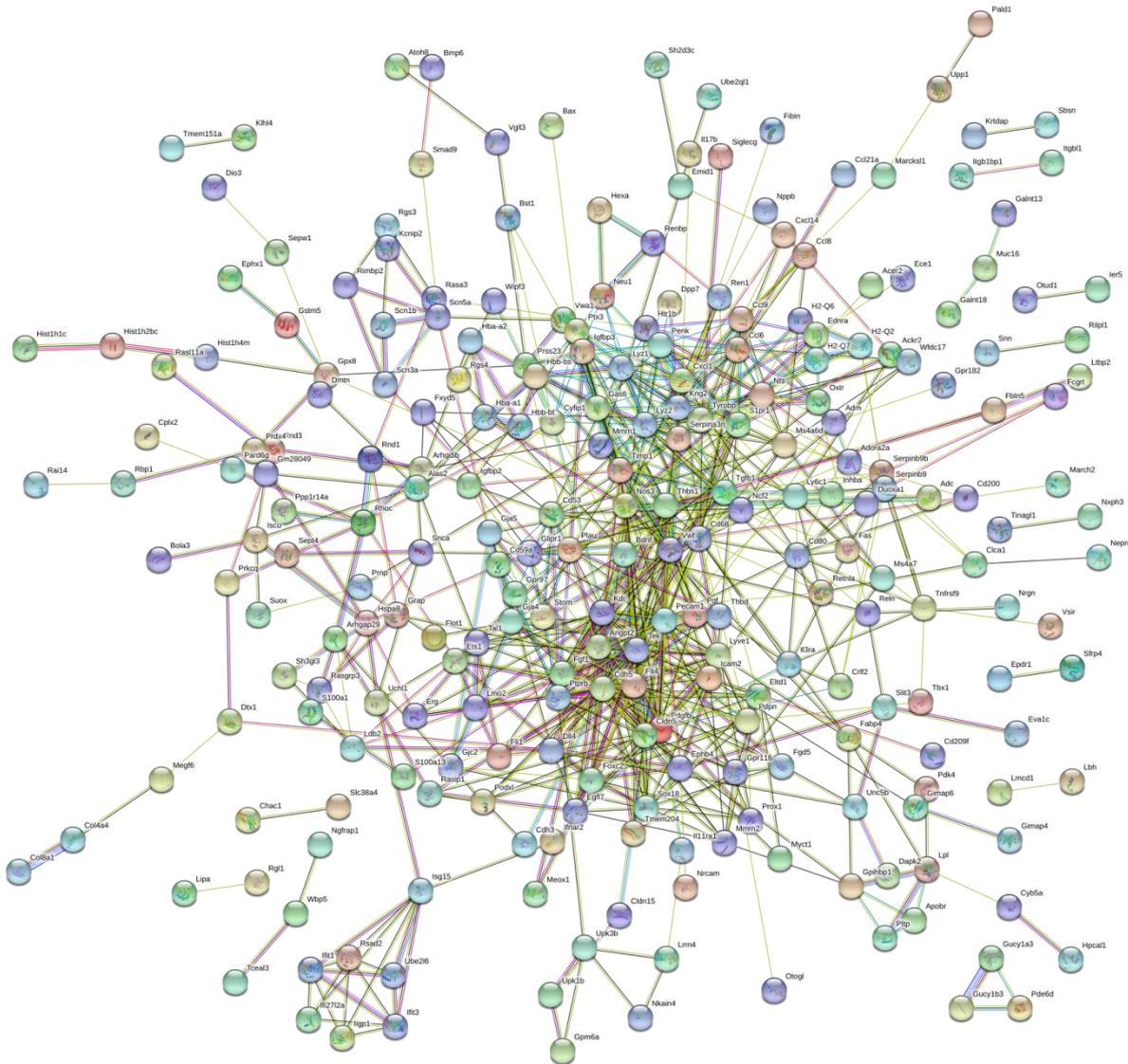


Abbildung 47: Netzwerkanalyse von Genen, die bei Qa2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen runterreguliert waren

