

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde IV
(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

**Mechanismen der Induktion myeloider Suppressorzellen in
der Schwangerschaft**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ostermeir, Anna-Lena Janina**

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Gille
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Kolahian, Ph.D.

Tag der Disputation: 07.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem in der Schwangerschaft	1
1.2 Myeloide Suppressorzellen	4
1.3 HLA-G	5
1.4 Schwangerschaftsassozierte Hormone: Progesteron, Östrogen und HCG	6
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Patientinnen	9
2.2 Zellisolation	10
2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	10
2.2.2 Isolation von mononukleären Zellen aus Plazentagewebe	11
2.2.3 Isolation von MDSC mittels Magnetic Activated Cell Sorting	12
2.3 Induktion von MDSC	15
2.3.1 Induktion von MDSC durch lösliche Faktoren	15
2.3.2 Induktion von MDSC durch humane Trophoblastzellen	17
2.4 T-Zell-Proliferations-Versuche.....	18
2.5 Stimulation von plaGR-MDSC zur Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	19
2.6 Stimulation von plaGR-MDSC zur Bestimmung der Expression der Enzyme Arginase 1 und iNOS	20
2.7 Durchflusszytometrie.....	20
2.7.1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....	21

2.7.2 Extrazellulärfärbung	22
2.7.3 Intrazellulärfärbung	23
2.8 Statistik	24
3. Ergebnisse	26
3.1 Abort-Studie	26
3.2 Effekt von sHLA-G auf die Induktion und Funktion von GR-MDSC	27
3.2.1 Expression der HLA-G Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC ...	28
3.2.2 sHLA-G steigert die suppressive Funktion von GR-MDSC aus der Plazenta.....	32
3.2.3 sHLA-G beeinflusst die Expression von iNOS in plaGR-MDSC, während die Expression von Arg1 und die Produktion von ROS unbeeinflusst bleibt	34
3.2.4 sHLA-G bewirkt eine quantitative Induktion von MDSC aus PBMC ..	36
3.2.5 Durch sHLA-G induzierte MDSC sind funktionell aktiviert.....	38
3.2.6 Die Induktion von MDSC durch sHLA-G wird über den Rezeptor ILT4 vermittelt.....	39
3.3 Effekt einer Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 auf die Induktion und Funktion von MDSC	41
3.3.1 Eine Ko-Kultur mit JEG-3 führt nicht zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC	41
3.3.2 Eine Ko-Kultur mit JEG-3 bewirkt eine funktionelle Aktivierung von MDSC	42
3.4 Effekt schwangerschaftsassoziierter Hormone auf die Induktion von MDSC.....	43
4. Diskussion	48
4.1 Die Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta ist bei Patientinnen mit Abort vermindert.....	48
4.2 Wirkung von sHLA-G auf die Induktion und Funktion von GR-MDSC.....	49
4.3 Wirkung einer Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 auf die Induktion und Funktion von MDSC	54

4.4 Wirkung von Progesteron, Östrogen und HCG auf die Induktion von MDSC.....	55
4.5 Methodenkritik und Limitationen unseres Systems	57
4.6 Schlussfolgerung.....	59
5. Zusammenfassung.....	61
Liste der Veröffentlichungen.....	63
Literaturverzeichnis	64
Erklärung zum Eigenanteil	79
Danksagung.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des direkten und indirekten Anheftens superparamagnetischer Partikel.....	13
Abbildung 2: Ablauf der Aufreinigung von Zellen mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)	13
Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung des methodischen Vorgehens für die Versuche zur quantitativen und funktionellen Induktion von MDSC.....	17
Abbildung 4: GR-MDSC in der Plazenta sind bei Patientinnen mit Spontanabort vermindert	27
Abbildung 5: GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer exprimieren die HLA-G-Rezeptoren ILT2 und ILT4	29
Abbildung 6: Expression der HLA-G-Rezeptoren ILT2 und ILT4 über den Schwangerschaftsverlauf	30
Abbildung 7: In der Plazenta kommt es zu einer Hochregulation der Expression von ILT4, nicht aber von ILT2 auf GR-MDSC.....	31
Abbildung 8: Die Expression von ILT2 und ILT4 auf plaGR-MDSC ist in der Frühschwangerschaft im Vergleich zur Spätschwangerschaft verändert	32
Abbildung 9: sHLA-G steigert die suppressive Funktion von GR-MDSC aus Plazenta	33
Abbildung 10: sHLA-G beeinflusst die Expression von iNOS in plaGR-MDSC, während die Expression von Arg1 und die Produktion von ROS unbeeinflusst bleibt.....	35
Abbildung 11: sHLA-G bewirkt eine quantitative Induktion von MDSC aus PBMC.....	37
Abbildung 12: Durch sHLA-G induzierte MDSC sind funktionell aktiviert	38
Abbildung 13: Die Induktion von MDSC durch sHLA-G wird über den Rezeptor ILT4 vermittelt.....	40
Abbildung 14: Ko-Kultur mit JEG-3 führt nicht zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC.....	42
Abbildung 15: Eine Ko-Kultur mit JEG-3 bewirkt eine funktionelle Aktivierung von MDSC.....	43
Abbildung 16: Die Hormone Östrogen, Progesteron und HCG führen nicht zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der in die Abortstudie eingeschlossenen Patientinnen	10
Tabelle 2: Auflistung der für die Extrazellulärfärbung verwendeten Antikörper	23

Abkürzungsverzeichnis

Arg1	Arginase 1
Breg	Regulatorische B-Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester, Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester
DHR	Dihydrorhodamin 123
FACS	Fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GR-MDSC	Granulocytic myeloid derived suppressor cells, Myeloide Suppressorzellen mit granulozytärem Subtyp
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HLA	Human leucocyte antigen, Humanes Leukozytenantigen
HLA-C	Humanes Leukozytenantigen C
HLA-E	Humanes Leukozytenantigen E
HLA-G	Humanes Leukozytenantigen G
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10

ILT2	Immunoglobulin-like Transcript-2
ILT4	Immunoglobulin-like Transcript-4
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
MACS	Magnetic activated cell sorting
MDSC	Myeloid derived suppressor cells, Myeloide Suppressorzellen
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononuclear cells, mononukleäre Zellen
MO-MDSC	Monocytic myeloid derived suppressor cells, Myeloide Suppressorzellen mit monozytärem Subtyp
NKT	Natural Killer T-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOX2	NADPH-Oxidase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
plMNC	Mononukleäre Zellen aus Plazenta
plGR-MDSC	Myeloide Suppressorzellen mit granulozytärem Subtyp aus Plazenta
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
sHLA-G	Soluble HLA-G, lösliches HLA-G
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
TGF- β	Transforming growth factor β
Th	T-Helferzellen

Th1	T-Helfer-1 Zellen
Th2	T-Helfer-2 Zellen
Th17	T-Helfer-17 Zellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tregs	Regulatorische T-Zellen
uNK	Uterine Natürliche Killerzellen

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem in der Schwangerschaft

Aborte sind die häufigste Komplikation in der Schwangerschaft. Von den bereits klinisch bestätigten Schwangerschaften enden rund 15 % in einem Abort, zählt man die noch nicht erfassten Schwangerschaften mit, sind es bis zu 50 %. Von habituellen Aborten spricht man bei Verlust von drei oder mehr Schwangerschaften in Folge; hiervon ist rund 1 % der Paare mit Kinderwunsch betroffen. Die Ursachen für einen Abort sind vielfältig – u.a. spielen Infektionen, fetale Chromosomenaberrationen und Störungen der Blutgerinnung hierbei eine Rolle, aber auch eine unzureichende immunologische Toleranz gegenüber dem Fetus kann eine Ursache für habituelle Aborte sein (Rai und Regan 2006). Während der Schwangerschaft muss das mütterliche Immunsystem einen besonderen Balanceakt vollbringen: Es muss so reguliert werden, dass es einerseits zu keiner Immunreaktion gegen den semiallogenen Fetus und damit zu einer Abstoßung kommen kann, gleichzeitig muss weiterhin eine suffiziente Infektabwehr gewährleistet sein. Wie das mütterliche Immunsystem so reguliert wird, dass dies gelingt, ist dabei seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Einer der Ersten, die sich mit dieser Frage auseinandersetzten, war Sir Peter Medawar. Er beschrieb bereits 1953 „the immunological paradox of pregnancy“, worin er erstmals postulierte, dass zur damaligen Zeit noch unbekannte toleranzfördernde Regulationsvorgänge während der Schwangerschaft stattfinden müssen, welche eine Abstoßung des semiallogenen Fetus verhindern und damit eine erfolgreiche Schwangerschaft ermöglichen (Billingham et al. 1953; Medawar 1953). Später wurde hierfür der Begriff der feto-maternalen Toleranz geprägt. Er umfasst sämtliche Mechanismen und Regulationsvorgänge, welche zur Aufrechterhaltung einer komplikationslosen Schwangerschaft beitragen. Diese finden sowohl lokal im Bereich der Plazenta als auch systemisch statt und schließen die angeborene und erworbene Immunabwehr mit ein. Verschiedene Zelltypen spielen hierbei eine Rolle, jedoch scheinen insbesondere Veränderungen in der Anzahl und Funktion von T-Zellen den Schwangerschaftsverlauf zu beeinflussen: so kommt es im Rahmen einer

normalen Schwangerschaft im peripheren Blut und in der Dezidua zu einer Akkumulation von regulatorischen T-Zellen (Treg) (Toldi et al. 2012; Dimova et al. 2011; Ernerudh et al. 2011; Sasaki et al. 2004; Somerset et al. 2004), welche unter anderem durch die Freisetzung von Interleukin 10 (IL-10) und Transforming Growth Factor β (TGF- β) andere Immunzellen in ihrer Funktion hemmen können und eine gegen fetale Antigene gerichtete Immunantwort unterdrücken (Weiner 2001; Groux et al. 1997; Ernerudh et al. 2011; Rowe et al. 2012; Tilburgs et al. 2008). Zudem kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von proinflammatorischen T-Helfer-1 Zellen (Th1), welche unter anderem die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IFN- γ produzieren und antiinflammatorischen T-Helfer-2 Zellen (Th2) zugunsten von Th2, welche durch ein antiinflammatorisches Zytokinprofil charakterisiert sind (beispielsweise IL-4, IL-10 und TGF- β) (Ernerudh et al. 2011; Ng et al. 2002; Sykes et al. 2012; Cubro et al. 2018). Umgekehrt wurden eine verminderte Funktion und Zahl von Tregs sowie ein gestörtes Th1/Th2-Gleichgewicht bei Schwangerschaftskomplikationen wie Aborten und Präeklampsie beschrieben (Toldi et al. 2008; Prins et al. 2009; Sasaki et al. 2007; Wang et al. 2010; Raghupathy 1997; Kwiatek et al. 2015). Als ungünstig wird außerdem das vermehrte Vorkommen von T-Helfer-17 Zellen (Th17) angesehen, welche das proinflammatorische Zytokin IL-17 produzieren und mit dem Auftreten von Komplikationen wie Frühgeburtlichkeit, habituellen Aborten und Präeklampsie assoziiert sind (Wang et al. 2010; Santner-Nanan et al. 2009; Lee et al. 2012b; Ghaebi et al. 2017). Daneben wurde das Vorhandensein regulatorischer B-Zellen (Breg), welche unter anderem IL-10 bilden und die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α hemmen, als günstig für einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf beschrieben (Fillatreau et al. 2002; Jensen et al. 2013; Ghaebi et al. 2017; Rolle et al. 2013).

An weiteren beteiligten Zelltypen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen zu nennen, die bei gesunden Schwangeren vermehrt in Blut und Dezidua vorkommen und Natürliche Killer T-Zellen (NKT), die das Th1/Th2-Gleichgewicht modulieren (Ghaebi et al. 2017). Auch den Zellen der Plazenta als feto-maternaler Grenzschicht – Trophoblast auf der fetalen Seite und Dezidua auf der maternalen Seite – werden

immunologische Eigenschaften zugeschrieben: So exprimieren die Zellen des villösen Trophoblasten weder MHC-Klasse I- noch Klasse II-Moleküle und produzieren beispielsweise IL-10 (Roth et al. 1996), während die Zellen des extravillösen Trophoblasten eine ungewöhnliche Kombination aus MHC-Klasse I-Molekülen exprimieren (HLA-G, HLA-E und HLA-C) und hierüber mit verschiedenen maternalen Immunzellen interagieren (Guleria und Sayegh 2007; Moffett-King 2002; Tilburgs et al. 2015; Apps et al. 2009). Deziduazellen bilden ebenfalls die Zytokine IL-10, IL-4 und TGF- β 2 (Lin et al. 1993; Wegmann et al. 1993). Zudem wurde mit den uterinen Natürlichen Killerzellen (uNK) ein weiterer Zelltyp nachgewiesen, der insbesondere in der Dezidua zu finden ist. Sie bilden ebenfalls IL-10, regulieren die Invasion des Trophoblasten und begünstigen eine korrekte Ausbildung der plazentaren Blutversorgung (Moffett und Colucci 2014; Sojka et al. 2019; Thaxton und Sharma 2010; Lash 2015; Moffett-King 2002; Hanna et al. 2006).

Auch lösliche Faktoren spielen eine Rolle. Die bereits genannten antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 werden von verschiedenen Zelltypen gebildet und beeinflussen beispielsweise das Th1/Th2-Gleichgewicht zugunsten einer Th2-vermittelten Immunantwort, gleichzeitig sezernieren auch Th2 selbst IL-4 und IL-10 (Herz und Renz 2001). Insbesondere IL-10 wird als bedeutsam für einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf angesehen, da es unter anderem die korrekte Ausbildung der plazentaren Gefäßversorgung begünstigt und insgesamt immunsuppressiv wirkt; erniedrigte Spiegel von IL-10 sind hingegen mit Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit und Präeklampsie assoziiert (Cubro et al. 2018; Thaxton und Sharma 2010; Kalkunte et al. 2011; Cheng und Sharma 2015). Auch das Zytokin TGF- β bzw. die Zytokinfamilie scheinen eine Rolle beim erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft zu spielen. So wurden beispielsweise erhöhte Spiegel von TGF- β 1 im Serum von schwangeren Frauen nachgewiesen (Ayatollahi et al. 2005), zudem scheint TGF- β einen positiven Effekt auf die Dezidualisierung des Endometriums zu haben, was essentiell für eine erfolgreiche Implantation ist (Ando et al. 1998; Ni und Li 2017; Latifi et al. 2019).

Insgesamt sind die immunologischen Veränderungen, welche zur Vermittlung und Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz beitragen, komplex und sind – ebenso wie ihre Regulationsvorgänge – bisher nur unvollständig verstanden.

1.2 Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (myeloid derived suppressor cells, MDSC) sind myeloide Zellen, die durch ihre Fähigkeit, andere Immunzellen – insbesondere T-Zellen – zu hemmen charakterisiert sind (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Es werden mehrere Subtypen von MDSC unterschieden, wobei hier näher auf zwei davon eingegangen werden soll: granulozytäre MDSC (GR-MDSC), die beim Menschen granulozytäre Oberflächenmarker wie CD11b, CD15 oder CD66b exprimieren und monozytäre MDSC (MO-MDSC), die das Monozyten-Antigen CD14 tragen. Gemeinsam ist ihnen die Expression allgemeiner Marker myeloischer Zellen wie CD33, während die Expression weiterer Oberflächenmarker reifer, ausdifferenzierter myeloischer Zellen fehlt (Bronte et al. 2016; Brandau et al. 2011; Greten et al. 2011; Safarzadeh et al. 2017). Am besten untersucht ist das Vorkommen von MDSC im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen. Dort werden sie durch das Mikromilieu des Tumors induziert und dienen dem Tumor dazu, sich einer gegen ihn gerichteten Immunantwort zu entziehen (Immune escape). Dies ermöglicht ein weiteres Wachstum sowie eine Metastasierung des Tumors (Safarzadeh et al. 2017; Umansky et al. 2016). Auch in vielen anderen – meist pathologischen – Situationen sind MDSC vermehrt zu finden, so z.B. bei bakteriellen, viralen oder parasitären Infektionen, Sepsis, nach Traumata oder im Rahmen von Autoimmunerkrankungen (Greten et al. 2011; Delano et al. 2007; Makarenkova et al. 2006; Zhu et al. 2007). Auch wurden MDSC nach einer Organtransplantation im Blut und Transplantat nachgewiesen, wo sie alloreaktive T-Zellen hemmen und sich damit günstig auf eine Graft-versus-Host-Reaktion und das Transplantatüberleben auswirken (Dugast et al. 2008; Zhang et al. 2008; Luyckx et al. 2012). MDSC verfügen über verschiedenste Mechanismen, mit Hilfe derer sie T-Zell-Funktionen hemmen. Hierzu gehört unter anderem die Depletion

der semi-essentiellen Aminosäure L-Arginin mit Hilfe der Enzyme Arginase 1 (Arg1) und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowie die Depletion der essentiellen Aminosäure Tryptophan durch Expression des Enzyms Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO)(Rodriguez et al. 2009; Yu et al. 2013; Zea et al. 2005). Außerdem sind MDSC durch die Expression der Enzyme Arg1, iNOS und NADPH-Oxidase (NOX2) in der Lage, verschiedene reaktive Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Peroxynitrit zu bilden und hierdurch die Proliferation und Funktion von T-Zellen zu hemmen (Tacke et al. 2012; Corzo et al. 2009; Gabilovich und Nagaraj 2009; Nagaraj et al. 2010; Seyfizadeh 2016).

In den letzten Jahren konnte zudem eine Bedeutung von MDSC für die Vermittlung der feto-maternalen Toleranz gezeigt werden. Unsere Arbeitsgruppe beschrieb erstmals, dass GR-MDSC während einer Schwangerschaft im peripheren Blut schwangerer Frauen erhöht sind (Köstlin et al. 2014), besonders an der Plazenta als feto-maternaler Grenzschicht akkumulieren und das Gleichgewicht von T-Helferzellen zugunsten einer Th2-Antwort verschieben (Köstlin et al. 2016). Auch bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass MDSC im Uterus und in der Plazenta vorhanden sind (Zhao et al. 2015; Fainaru et al. 2014). Im Weiteren zeigten Pan et al. und Ostrand-Rosenberg et al., dass eine Depletion von MDSC in Mäusen zu einer erhöhten Rate an Aborten führte (Pan et al. 2016b; Ostrand-Rosenberg et al. 2017). Diese Erkenntnisse stützen die These, dass MDSC an der Vermittlung und Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz beteiligt sind. Über die Mechanismen, die zu einer Akkumulation von MDSC in der Schwangerschaft führen, war bisher sehr wenig bekannt. Auch war bisher nicht untersucht, ob es im Rahmen von Aborten auch beim Menschen zu Veränderungen in der MDSC-Zahl und -Funktion kommt.

1.3 HLA-G

Das humane Leukozytenantigen G (HLA-G) ist ein Major Histocompatibility Complex (MHC)-Klasse I-Molekül, welches im Gegensatz zu anderen klassischen MHC-Klasse I-Molekülen im gesunden Organismus nahezu

ausschließlich von Trophoblastzellen exprimiert wird. Durch alternatives Splicing existieren vier membrangebundene (HLA-G1 bis HLA-G4) und drei lösliche (HLA-G5 bis HLA-G7) Isoformen des Moleküls. HLA-G wirkt über den Rezeptor Immunoglobulin-like Transcript-2 (ILT2, auch CD85j) auf lymphatische und myeloische Zellen, über den Rezeptor ILT4 (auch CD85d) auf myeloische Zellen und über den Killer Cell Immunoglobulin-like Rezeptor (KIR) 2DL4 auf CD8⁺ T-Zellen und natürliche Killerzellen (Agaugué et al. 2011; Rebmann et al. 2014). Während der Schwangerschaft wird HLA-G von Trophoblastzellen gebildet und exprimiert und lösliches HLA-G (soluble HLA-G, sHLA-G) ist über die gesamte Dauer der Schwangerschaft im Serum von schwangeren Frauen nachweisbar (Hunt et al. 2005; Hunt et al. 2000). Verminderte HLA-G Konzentrationen im Serum von Schwangeren sind mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie und Aborten assoziiert (Keskin et al. 2013; Yie et al. 2004; Dahl et al. 2014).

Neben seiner physiologischen Expression während der Schwangerschaft wird HLA-G unter pathologischen Bedingungen z.B. von Tumorgewebe exprimiert (Alegre et al. 2007; Alegre et al. 2014). Hier konnte gezeigt werden, dass HLA-G eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort durch Induktion von MDSC unterdrücken kann (Agaugué et al. 2011).

Über eine mögliche Interaktion von HLA-G und MDSC in der Schwangerschaft war bis zur Erstellung dieser Arbeit nichts bekannt.

1.4 Schwangerschaftsassozierte Hormone: Progesteron, Östrogen und HCG

Die Steroidhormone Progesteron und Östrogen, welche während der Schwangerschaft in erhöhten Konzentrationen vorliegen, haben neben der Funktion als Sexualhormone auch immunologische Wirkung.

Progesteron trägt durch eine Verschiebung des Gleichgewichts von T-Helferzellen zugunsten einer Th2-getragenen Immunantwort zur fetomaternalen Toleranz bei und bewirkt eine Akkumulation von Tregs an der fetomaternalen Grenzschicht (Schumacher et al. 2017; Lissauer et al. 2015). In einem Infektionsmodell bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass Progesteron

die Funktion von Th17-Zellen hemmen kann und auch hier zu einer Induktion von Tregs führte (Xu et al. 2013).

Östrogen bewirkt unter anderem eine Induktion von toleranz-fördernden dendritischen Zellen und trägt so möglicherweise ebenfalls zur feto-maternalen Toleranz bei (Papenfuss et al. 2011).

Humanes Choriongonadotropin (HCG) ist ein Glykoprotein, welches physiologischerweise nur während der Schwangerschaft vorkommt. Auch für HCG wurden immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben, die die feto-maternale Toleranz begünstigen: Es führt zu einer Induktion von Bregs (Rolle et al. 2013; Fettke et al. 2016) und Tregs (Schumacher et al. 2013; Schumacher et al. 2009) und beeinflusst die Funktion uteriner NK-Zellen (uNK) und dendritischer Zellen (Fournier et al. 2015). HCG soll zudem das Gleichgewicht von T-Helferzellen zugunsten einer antiinflammatorischen, Th2-getragenen Immunantwort beeinflussen (Theofanakis et al. 2017).

Der Einfluss der schwangerschaftsassozierten Hormone Progesteron, Östrogen und HCG auf die Anzahl und Funktion von MDSC war bis zum Beginn der Versuche zur vorliegenden Arbeit nicht ausreichend untersucht. Für Östrogen konnte in der Zwischenzeit gezeigt werden, dass es *in vitro* humane MDSC induzieren kann (Pan et al. 2016a).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die schwangerschaftsassozierten Hormone Progesteron, Östrogen und HCG, die lösliche Form des MHC-I-Moleküls HLA-G sowie der Kontakt zu humanen Trophoblastzellen auf die Menge und Funktion von humanen MDSC *in vitro* auswirken. Zudem sollte die Hypothese überprüft werden, dass die bereits vorbeschriebene Akkumulation von MDSC in der Plazenta bei Patientinnen mit Spontanabort im Vergleich zu Frauen mit einer intakten Schwangerschaft vermindert ist. Wir konzentrierten uns bei diesen Fragestellungen auf die Untersuchung von GR-MDSC, da in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie in der aktuellen Patientenkohorte nur eine Zunahme von GR-MDSC im peripheren Blut schwangerer Frauen zu beobachten war, nicht jedoch eine Zunahme von MO-MDSC (Köstlin et al. 2014). In den Fällen, in denen aus methodischen

Gründen eine exakte Differenzierung zwischen MO-MDSC und GR-MDSC nicht möglich war, wird allgemein von MDSC gesprochen.

2. Material und Methoden

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Methoden entsprechen großteils dem Standardrepertoire der Arbeitsgruppe Neonatale Immunologie; die Beschreibung der Methoden erfolgte in Anlehnung an frühere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe (Hofstädter 2016; Kugel 2018; Spieles 2018).

2.1 Patientinnen

Die Rekrutierung der Probandinnen für die Untersuchungen zur Expression von HLA-G-Rezeptoren während der Schwangerschaft erfolgte über den niedergelassenen Gynäkologen Dr. A. Marmé von Oktober 2014 bis Januar 2015. Die Rekrutierung der Patientinnen für die Untersuchungen zur Expression von GR-MDSC bei Aborten erfolgte über die Prämedikationsambulanz, die allgemeine gynäkologische Ambulanz und das ambulante OP-Zentrum der Universitätsfrauenklinik Tübingen von Januar 2015 bis Oktober 2015. Alle Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Ein positives Votum der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen lag vor (430/2014BO2). Die Aufklärung erfolgte während des Besuchs beim niedergelassenen Gynäkologen bzw. während des Aufenthaltes in der Universitätsfrauenklinik Tübingen.

In die Studie zur Expression von GR-MDSC bei Aborten wurden Patientinnen mit Spontanabort oder Interruptio zwischen der 6+0 und der 12+6 Schwangerschaftswoche eingeschlossen. Nicht verwendet wurde Gewebe von Schwangeren, bei deren Feten eine bekannte genetische Aberration vorlag. Weitere Ausschlusskriterien waren mütterliches Alter unter 18 Jahre, akute oder chronische Infektionserkrankungen, rheumatische oder autoimmunologische Erkrankungen, immunsuppressive Behandlung während der Schwangerschaft und Zustand nach Eizellspende.

Von den in die Studie eingeschlossenen Patientinnen litten vier aus der Gruppe mit Spontanabort an einer Hypothyreose, welche mit L-Thyroxin (25 µg – 100 µg) substituiert wurde. Weitere Patientencharakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen sind in Tabelle 1 dargestellt.

	Spontanabort	Interruptio
Patientenalter [Jahre]	31,80 ± 5,25	29,50 ± 9,31
Gestationsalter [Wochen]	10,2 (8 - 11)	8,4 (7 - 12)
frühere Schwangerschaften	0-7	0-4
frühere Aborte	0-2	0-1
Lebendgeburten	0-5	0-2

Tabelle 1: Charakteristika der in die Abortstudie eingeschlossenen Patientinnen

Das Gewebe für die Abortstudie wurde im Rahmen des Eingriffs in der Universitätsfrauenklinik Tübingen gewonnen. Der Eingriff erfolgte in der Regel in Allgemeinanästhesie. Nach Vorbehandlung mit einem Prostaglandin (Misoprostol 200 µg oder Gemeprost 1 mg) erfolgte eine Saugkürettage des Uteruskavums, wobei typisches Schwangerschaftsgewebe gewonnen wurde. Das Gewebe wurde zunächst in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und dann gemeinsam mit den Kollegen der Pathologie gesichtet, um Plazenta und Dezidua zu identifizieren. Ein Teil des gewonnenen Gewebes wurde für die Studie verwendet, das übrige Gewebe wurde in Formalin eingebettet und entweder einer histologischen Untersuchung (Abort) oder einer Sammelbestattung (Interruptio) zugeführt.

2.2 Zellisolation

2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus Vollblut (PBMC) wurden EDTA-Blutproben für quantitative Analysen und Natrium-Heparin-Blutproben für funktionelle Untersuchungen gewonnen. Als Spender dienten hierbei nicht-schwangere Erwachsene (männlich und weiblich). Für quantitative Analysen erfolgte eine Verarbeitung innerhalb von 4 Stunden nach Abnahme, das Blut für die funktionellen Untersuchungen wurde unmittelbar weiterverarbeitet. Das Vollblut wurde zunächst mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) (PBS Dulbecco, Fa. Biochrom GmbH, Berlin) mindestens im Verhältnis 1:1 auf ein Volumen von 35 ml verdünnt. Das so entstandene Volumen wurde dann

vollständig mithilfe einer Pipettierhilfe (Accu-jet pro, Fa. Brand, Wertheim) und einer serologischen Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml, Costar®, Corning Incorporated, Corning NY, USA) aufgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml, Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) auf 15 ml Biocoll (Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077 g/ml, Fa. Biochrom GmbH, Berlin) geschichtet. Danach wurde die Probe bei 20 °C für 25 min mit 400 g und ohne Bremse zentrifugiert. Bei den zu den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Zentrifugen handelte es sich um eine Rotanta 46 RS bzw. Rotanta 460 RS (Fa. Hettich, Tuttlingen). Durch das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation setzen sich die dichteren Blutbestandteile wie Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Zentrifugenröhrchens ab, die weniger dichten PBMC bilden einen Ring oberhalb des Biocoll. Im Anschluss wurden die PBMC mit einer serologischen Pipette aufgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Danach folgten zwei Waschschrte. Zunächst wurden die PBMC bei 10 °C für 10 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die PBMC in einem definierten Volumen PBS aufgenommen, um die Zellzahl bestimmen zu können. Hierfür wurden mithilfe einer Pipette (Fa. Abimed, Langenfeld) 100 µl aus der Zellsuspension entnommen, in ein Eppendorf-Cup (Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Fa. Eppendorf AG, Hamburg) gegeben und die Zellkonzentration am Hämozytometer Sysmex XP-300 (Fa. Sysmex GmbH, Norderstedt) bestimmt. Danach folgte der zweite Waschschrte, bei dem die PBMC bei 4 °C für 10 min mit 400 g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die PBMC konnten im gewünschten Medium aufgenommen und auf die erforderliche Konzentration eingestellt werden.

2.2.2 Isolation von mononukleären Zellen aus Plazentagewebe

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus Plazentagewebe (plMNC) im dritten Trimenon wurden Plazenten termingeborener Kinder nach Spontangeburt oder Kaiserschnitt über den Kreißsaal der Universitätsfrauenklinik Tübingen gewonnen und unmittelbar weiterverarbeitet. Es wurden ca. 8 x 8 cm große Gewebestücke über die gesamte Dicke der Plazenta entnommen und mithilfe einer chirurgischen Pinzette und einer Schere in ca. 2 cm große Stücke zerteilt. Diese wurden in einer Petrischale (Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen)

mit physiologischer Kochsalzlösung (Isotonische Kochsalzlösung, 100 ml, Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) gewaschen, um Blutreste und Blutkoagel zu entfernen. Die gewaschenen Gewebestücke wurden in einen Mixbecher (studio, Hans-Ulrich Petermann GmbH & Co. KG, Seefeld; über Aldi Süd) gegeben und unter Zugabe von 150 ml PBS mit einem konventionellen Stabmixer (studio, Hans-Ulrich Petermann GmbH & Co. KG, Seefeld; über Aldi Süd) zerkleinert. Die entstandene Suspension wurde mit einer serologischen Pipette aufgenommen und durch ein 40 µm Zellsieb (Easystainer, Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) pipettiert, um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Die Probe wurde im Anschluss bei 4 °C für 10 min mit 310 g zentrifugiert, danach wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und die Zellen in 35 ml PBS aufgenommen. Das gesamte Volumen wurde auf einen 15 ml Biocoll-Gradienten geschichtet. Die weitere Isolation der plamNC erfolgte wie bereits unter Punkt 2.2.1 beschrieben.

Das im ersten Trimenon gewonnene Gewebe wurde zunächst in einer Petrischale (Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette und eines Skalpell (pfm medical ag, Köln bzw. Feather Safety Razor Co., Ltd. Osaka, Japan) in kleinere Stücke zerteilt und anschließend in einem Gewebehomogenisator (5 ml, Fa. Wheaton, USA) mithilfe eines Glasstempels zerdrückt. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit einer serologischen Pipette aufgenommen, durch ein 40 µm Zellsieb gegeben und anschließend auf einen 15 ml Biocoll-Gradienten geschichtet. Die weitere Isolation von plamNC erfolgte nach Punkt 2.2.1.

2.2.3 Isolation von MDSC mittels Magnetic Activated Cell Sorting

Humane GR-MDSC tragen unter anderem die Oberflächenmarker CD66b und CD33 und können über diese angereichert werden. Die Anreicherung erfolgt mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS). Dies ist eine Methode, um spezifische Zellen anhand ihrer Oberflächeneigenschaften aus einer Zellsuspension zu isolieren. Hierfür werden superparamagnetische Partikel, sogenannte Beads bzw. MicroBeads, mit einer Größe von 50 nm verwendet, die über monoklonale Antikörper direkt oder über zusätzliche Moleküle (Antikörper,

Biotin, Fluorochrome) indirekt an die Oberflächenmarker der entsprechenden Zellen binden, ohne die Zellen dabei zu aktivieren oder zu beeinflussen.



Abbildung 1: Schematische Darstellung des direkten und indirekten Anheftens superparamagnetischer Partikel

Für das Markieren von Zellen mit magnetischen Beads gibt es mehrere Möglichkeiten: Der mit einem magnetischen Bead beladene monoklonale Antikörper bindet direkt an ein Oberflächenmerkmal der gewünschten Zelle (Abbildung links) oder die Markierung erfolgt indirekt, indem zunächst bspw. ein mit einem Fluorochrom verbundener monoklonaler Antikörper an das gewünschte Oberflächenmerkmal bindet und dann der mit einem magnetischen Bead beladene Antikörper an das Fluorochrom bindet (Abbildung rechts). Abbildung aus Miltenyi Biotec GmbH 2020.

Nach entsprechender Markierung und Inkubation der Zellen wird die Zellsuspension über eine magnetische Trennsäule gegeben, an welcher nur die spezifischen, mit magnetischen Beads markierten Zellen haften bleiben (positive Selektion), während der Rest der Suspension das magnetische Feld ungehindert passiert und als Suspension aus allen nicht-markierten Zellen (negative Selektion bzw. Depletion) weiterverwendet werden kann oder verworfen wird. Nach Entfernen der magnetischen Säule werden dann die mit magnetischen Beads markierten Zellen eluiert.

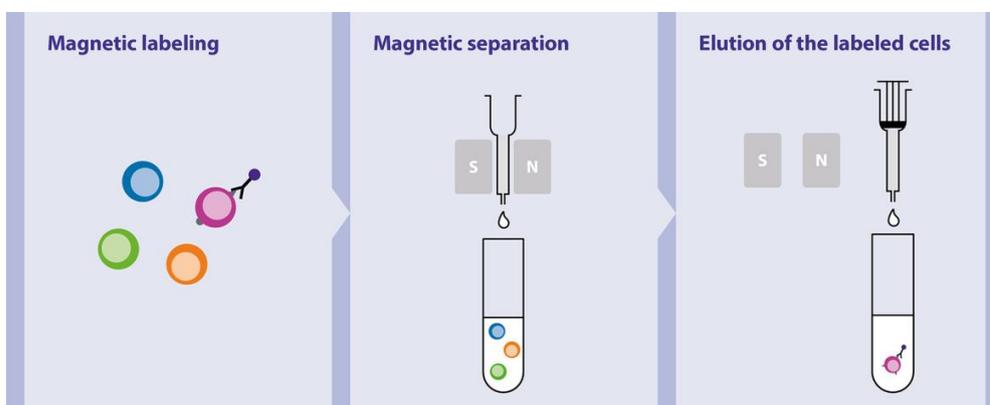


Abbildung 2: Ablauf der Aufreinigung von Zellen mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Die gewünschten Zellen werden mit magnetischen MicroBeads markiert (Magnetic labeling). Danach wird die Zellsuspension in einem autoMACS-Gerät über eine magnetische Trennsäule gegeben. Die Zellen, welche ungehindert das magnetische Feld passieren konnten, werden als Negativfraktion – ohne die markierten Zellen – aufgefangen (Magnetic separation). Zuletzt wird die magnetische Säule entfernt und die mittels magnetischer Partikel markierten und angereicherten Zellen werden freigegeben (Elution of labeled cells). Abbildung aus Miltenyi Biotec GmbH 2020.

Zur Anreicherung von GR-MDSC aus Plazentagewebe wurden mononukleäre Zellen wie unter 2.1.2 beschrieben aufgereinigt und in 4 °C kalten Running buffer (CliniMACS PBS/EDTA Buffer, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach + humanes Serumalbumin 20 % iges 20 ml pro 1000 ml, CSL Behring) überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten dann auf Eis bzw. mit 4 °C kalten Reagenzien. Zunächst wurden die Zellen mit anti-CD66b-FITC (FITC Mouse Anti-Human CD66b, Clone G10F5, Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Germany) markiert. Pro 2×10^7 Zellen wurden 100 µl Running buffer und 10 µl anti-CD66b-FITC hinzugegeben und diese für 10 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Running buffer (Zentrifugation bei 4 °C für 5 min mit 310 g), um überschüssige und nicht bzw. unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mit anti-FITC-MicroBeads (anti-FITC MicroBeads, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) markiert. Hierfür wurden pro 2×10^7 Zellen 200 µl Running buffer und 10 µl anti-FITC-MicroBeads zugegeben und die Zellen anschließend für 15 min bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift, nach welchem das Pellet in 500 µl Running buffer aufgenommen wurde. Die Anreicherung der CD66b⁺ GR-MDSC erfolgte anschließend maschinell (autoMACS, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Zur Anreicherung von MDSC aus den Kulturansätzen zur Induktion von MDSC (s.u.) wurden direkt an anti-CD33-gekoppelte magnetische Beads (CD33 MicroBeads, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet. Die Anreicherung erfolgte in diesem Fall über CD33, da CD66b nach mehreren Tagen in Kultur nicht mehr in ausreichender Stärke auf den Zellen exprimiert wird. Hierzu wurden die über 7 Tage kultivierten PBMC (s.u.) zunächst mithilfe von Detachin (Fa. GenLantis, San Diego, CA) und einem Cell Scraper (Costar®, Costar Corporation Cambridge, MA) aus der Zellkulturplatte gelöst und bei 4 °C

für 5 min mit 310 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 4 °C kaltem Running buffer aufgenommen, die folgenden Arbeitsschritte wurden ebenfalls auf Eis bzw. mit 4 °C kalten Reagenzien durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 80 µl Running buffer und 20 µl CD33-MicroBeads pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und für 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Running buffer gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl Running buffer aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Isolation der markierten Zellen mittels autoMACS.

2.3 Induktion von MDSC

Um den Einfluss verschiedener löslicher Faktoren sowie den Effekt einer Ko-Kultur mit humanen Trophoblastzellen auf die Induktion von GR-MDSC zu untersuchen, wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut gesunder, nicht-schwangerer Erwachsener isoliert und nach einem von Lechner et al. (Lechner et al. 2011) etablierten Protokoll über 7 Tage kultiviert.

2.3.1 Induktion von MDSC durch lösliche Faktoren

PBMC wurden wie unter 2.1.1 beschrieben isoliert und in einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml in Medium (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium (RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l HCO_3 , ohne L-Glutamin, Fa. Biochrom, Berlin), 10 % fetales Kälberserum (FCS) (Fa. Biochrom, Berlin), 1 % Penicillin/Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin)) aufgenommen. Es erfolgte dann die Kultur entweder in 12-Well-Platten (Costar®, Corning Incorporated – Life Sciences, Kennebunk, ME) mit je 2 ml Zellsuspension pro Well für Quantifizierungsversuche oder in 6-Well-Platten (Falcon®, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) mit je 5 ml pro Well für funktionelle Versuche. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart) bei 37 °C und 5 % CO_2 über 7 Tage, ein Wechsel des Mediums erfolgte an Tag 3 und Tag 6. Zur Untersuchung des Effektes von Progesteron, Östrogen, HCG und löslichem HLA-G (sHLA-G) wurden die entsprechenden Substanzen der Kultur zugegeben. Als Negativkontrolle dienten PBMC ohne Zugabe weiterer Substanzen, als

Positivkontrolle diente die Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Hormone Progesteron, Östrogen und HCG in Kombination mit 1 ng/ml GM-CSF zugegeben.

Die Konzentrationen der drei Hormone wurden entsprechend vorangegangenen Studien gewählt, welche einen Effekt der Substanzen *in vitro* nachweisen konnten. Progesteron wurde in den Konzentrationen 5 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,05 µg/ml und 0,005 µg/ml eingesetzt (Lee et al. 2011; Lissauer et al. 2015; Lee et al. 2012a), Östrogen in den Konzentrationen 2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml (Prieto und Rosenstein 2006; Luo et al. 2011) und HCG in den Konzentrationen 100 U/ml, 10 U/ml, 1 U/ml und 0,1 U/ml (Srivastava et al. 2013; Ehrentraut et al. 2019; Paiva et al. 2011; Perrier d'Hauterive et al. 2004).

Lösliches HLA-G (sHLA-G) wurde über Ph. D. Jianhong Cao (Immune Monitoring Lab, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA) bezogen und in den Konzentrationen 1 µg/ml und 0,1 µg/ml (Poehlmann et al. 2006) eingesetzt. Auch in später veröffentlichten Studien wurden ähnliche Konzentrationen wie von uns verwendet, wie beispielweise von Mociornita 2018 (Mociornita et al. 2018).

Nach 7 Tagen Kultur wurden die induzierten Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert oder mittels T-Zell-Proliferationsassay auf ihre suppressive Aktivität untersucht.

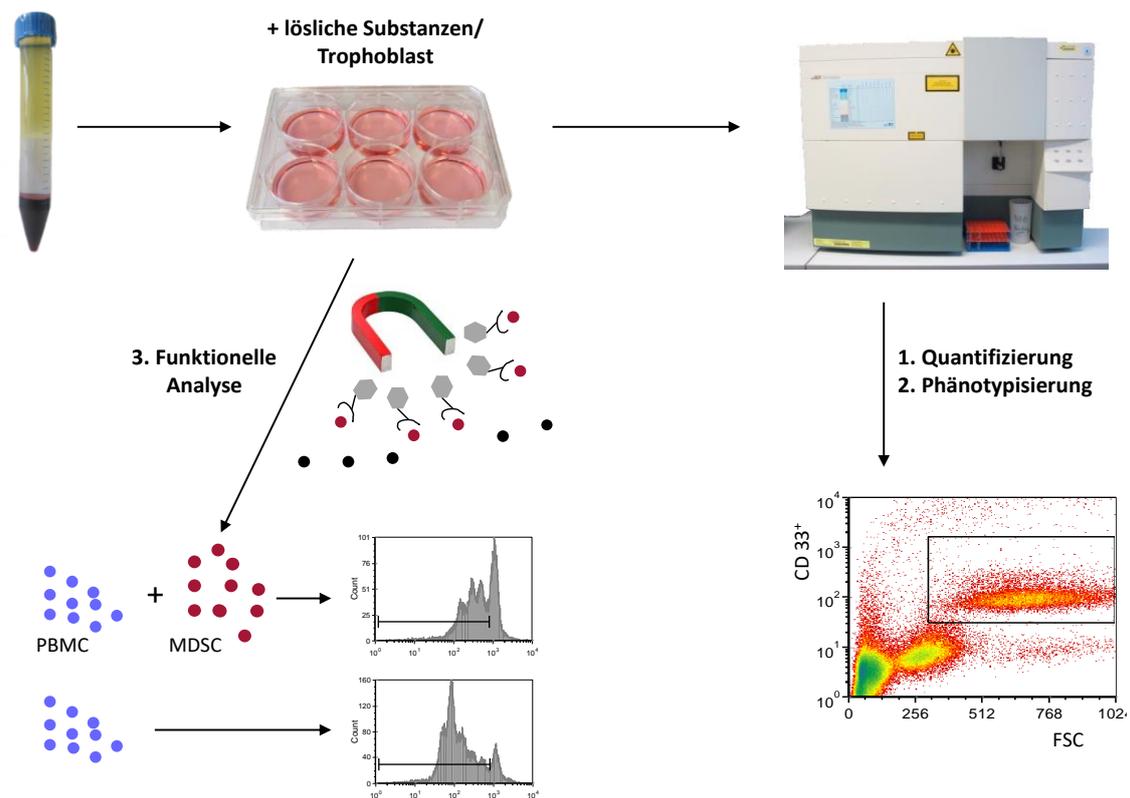


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung des methodischen Vorgehens für die Versuche zur quantitativen und funktionellen Induktion von MDSC

Zunächst wurden MNC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und unter Zugabe verschiedener löslicher Substanzen bzw. einer Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 kultiviert. Im Anschluss daran erfolgte bei Versuchen zur quantitativen Induktion von MDSC eine durchflusszytometrische Quantifizierung und Phänotypisierung der Zellen. Für die weitere funktionelle Analyse wurden MDSC mittels MACS isoliert und in einem T-Zell-Proliferationsassay auf ihre suppressive Wirkung hin untersucht.

2.3.2 Induktion von MDSC durch humane Trophoblastzellen

Zur Induktion von MDSC durch humane Trophoblastzellen wurde die Trophoblastzelllinie JEG-3 (JEG-3 ATCC, Manassas, USA) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine hormonproduzierende klonale Zelllinie, die 1971 von Kohler et al. aus einem humanen Chorionkarzinom isoliert wurde. Laut Angaben des Herstellers exprimieren die Zellen Gene für hCG, Plazenta-Laktogen und Progesteron und sind dazu in der Lage, Vorläufer von Steroidhormonen zu Estradiol und Estrone umzuwandeln (ATCC). Laut weiteren Quellen exprimiert JEG-3 auch HLA-G (Poras et al. 2017; Wang et al. 2013).

Für die Induktionsversuche mit Trophoblastzellen wurden 4×10^5 JEG3-Zellen bereits einen Tag vor Zugabe der PBMC in eine 6-Well-Platte gegeben, um bis zum Folgetag eine Adhärenz der Zellen zu erreichen. Am nächsten Tag wurden $2,5 \times 10^6$ /ml PBMC hinzugegeben, so dass wieder eine Zellkonzentration der PBMC von 5×10^5 /ml erreicht wurde. Bei der Induktion mit der Trophoblastzelllinie JEG3 wurde als Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (gibco® by life technologies; Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Um die adhärennten Zellen nicht zu lösen, wurde kein Mediumwechsel durchgeführt, sondern an Tag 3 und Tag 6 jeweils ca. 2 ml frisches Medium hinzugegeben.

2.4 T-Zell-Proliferations-Versuche

Zur Untersuchung der suppressiven Wirkung von MDSC auf die T-Zell-Proliferation wurden CFSE-Proliferationsassays durchgeführt.

Hierfür wurden frisch isolierte PBMC mit Carboxyfluoreszeindiacetat-succinimidyl Ester (CFDA-SE) gefärbt, welches die Zellmembran gut passieren kann und anschließend durch intrazelluläre Esterasen via Abspaltung der beiden Acetat-Gruppen in das fluoreszierende Carboxyfluoreszein-succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt wird. 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. Der Farbstoff wird bei jeder Zellteilung jeweils zur Hälfte an die beiden entstehenden Tochterzellen weitergegeben; insgesamt können so ca. 7-8 Generationen von Tochterzellen dargestellt werden, bis das Fluoreszenzsignal zu sehr abgeschwächt ist.

Für die Versuche mit aus PBMC induzierten MDSC wurde für die PBMC-Isolation für den Proliferationsversuch der gleiche Blutspender verwendet wie zur Induktion der MDSC. 1×10^7 PBMC wurden mit 25 µl einer 1:50 verdünnten CFDA-SE-Lösung (CFDA-SE Cell Tracer Kit, Fa. Invitrogen, Heidelberg) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff

durch Zugabe von 1-2 ml reinem FCS (Fa. Biochrom, Berlin) für 1-2 min inaktiviert und die Zellen bei 4 °C für 8 min mit 310 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die CFSE-gefärbten Zellen in Medium (RPMI mit 5 % Serum des jeweiligen Spenders und 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^5 /ml eingestellt. Die CFSE-markierten Zellen wurden nun mit 1,5 µg/ml OKT3 (LEAF purified anti-human CD3, OKT3, IgG_{2aK}, Fa. Biolegend, San Diego CA, USA) und 150 U/ml Interleukin-2 (IL-2) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) stimuliert und in den Verhältnissen 1:1, 2:1, 4:1 und 6:1 mit MDSC in einer 96 Well-Rundbodenplatte (Cellstar®, Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) zusammengegeben. Pro Well waren 6×10^4 Zielzellen und MDSC entsprechend den angegebenen Verhältnissen in 180 µl Medium enthalten. Nach 96 Stunden Kultur wurde die CD4- und CD8-T-Zellproliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte PBMC, als Positivkontrolle PBMC ohne Zugabe von MDSC.

Um zu untersuchen, ob sHLA-G einen direkten Einfluss auf die Funktion von MDSC hat, wurde den Zellen während der 96-stündigen Inkubationszeit des T-Zell-Proliferationsassays sHLA-G in den Konzentrationen 1 µg/ml und 0,1 µg/ml zugegeben. Als Positivkontrolle dienten PBMC mit Zugabe der Substanz aber ohne Zugabe von MDSC.

2.5 Stimulation von plaGR-MDSC zur Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch MDSC wurde mithilfe des Farbstoffes Dihydrorhodamin 123 (DHR) nachgewiesen. DHR diffundiert passiv in die Zellen und wird dort durch die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies zu Rhodamin oxidiert, welches dann durchflusszytometrisch gemessen werden kann (Crow 1997).

Um den Einfluss von HLA-G auf die Produktion von ROS durch MDSC zu untersuchen, wurden plaMNC wie unter 2.1.2 beschrieben aufgereinigt und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in reinem RPMI eingestellt. Die Zellen

wurden dann in einer 12-Well-Platte ohne oder mit Zugabe von HLA-G in einer Konzentration von 1 µg/ml für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit einer serologischen Pipette aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 4 °C für 5 min mit 310 g zentrifugiert, so dass die Zellen sedimentierten. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in reinem RPMI aufgenommen und auf eine Konzentration von 4x10⁵/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurde je 1 ml in ein FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden 10 µl Dihydrorhodamin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München) hinzugegeben und die Zellen für 5 min bei 37 °C im Wasserbad (14 l, GFL, Burgwedel) inkubiert. Danach erfolgte eine Stimulation mit 100 nmol/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München) für 10 und 20 Minuten. Nach Ablauf der Zeit wurden die Röhrchen sofort auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Nach einem Waschschrift mit FACS Flow und Zentrifugation bei 4 °C für 5 min mit 310 g wurden die Zellen mit CD66b-APC (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gefärbt und die ROS-Produktion durchflusszytometrisch gemessen.

2.6 Stimulation von plaGR-MDSC zur Bestimmung der Expression der Enzyme Arginase 1 und iNOS

Zur Untersuchung des Effektes von HLA-G auf die Expression der Enzyme Arginase 1 und iNOS wurden MNC aus der Plazenta isoliert, in einer Konzentration von 4x10⁶ Zellen/ml in Medium aufgenommen, für 24 h mit 1 µg/ml HLA-G stimuliert und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Expression der Enzyme Arginase 1 und iNOS durchflusszytometrisch bestimmt.

2.7 Durchflusszytometrie

Sämtliche Analysen wurden mithilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt.

2.7.1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung und Analyse von Zellen und ihrer Eigenschaften aufgrund von Lichtstreuung und Fluoreszenzeffekten. Zur durchflusszytometrischen Messung müssen die Zellen einzeln in einer Suspension vorliegen, damit sie nacheinander einen Laserstrahl passieren können. Durch die Streuung von Licht durch eine Zelle wird dessen Richtung verändert, wodurch Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle gezogen werden können. Die beiden gemessenen Parameter hierbei sind das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), welches auf die ungefähre Zellgröße schließen lässt und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), welches eine Unterscheidung von Zellen aufgrund ihrer Granularität und Membranfaltung/Komplexität ermöglicht. Zusätzlich können zur Phänotypisierung von Zellen fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt werden. Die eingesetzten Fluorochrome werden durch Laser zur Emission von Licht einer bestimmten, für sie charakteristischen Wellenlänge angeregt (= Fluoreszenz), welche dann in den verschiedenen Kanälen des Durchflusszytometers detektiert werden. Die Fluorochrome sind an monoklonale Antikörper gebunden, die direkt oder über sekundäre Antikörper an spezifische CD-Moleküle (Cluster of differentiation) auf der Zelloberfläche binden (Extrazellulärfärbung); für Intrazellulärfärbungen diffundiert der Farbstoff nach entsprechender Vorbehandlung der Zelle ins Zellinnere und bindet dort entweder direkt oder über intrazelluläre Antikörper an zytoplasmatische Strukturen. In den Versuchen zu dieser Arbeit wurden folgende Farbstoffe verwendet: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) sowie Allophycocyanin (APC), außerdem Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) und Rhodamin 123 für Intrazellulärfärbungen. Die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden sich bezüglich ihres Absorptions- und Emissionsspektrums. Es können auch mehrere Fluoreszenzfarbstoffe in einer Probe eingesetzt werden, sofern sich ihre Emissionsmaxima ausreichend unterscheiden.

Die gemessenen Signale werden dann mit Hilfe eines Computers verarbeitet und gespeichert. Dabei wurden FSC- und SSC-Signale linear, Fluoreszenz-Signale logarithmisch dargestellt.

Beim zur Gewinnung der Daten dieser Arbeit eingesetzten Gerät handelt es sich um ein FACSCalibur der Firma BD, Heidelberg, Deutschland. Das FACSCalibur ist ein 4-Farben-Durchflusszytometer, das über 2 Laser (15-mW-Argon-Laser 488 nm und 10-mW-Dioden-Laser 633 nm) und 6 Messparameter (2 Streulichtparameter und 4 Fluoreszenzparameter) verfügt.

Die Daten wurden mit der Software CellQuest pro ausgewertet (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

2.7.2 Extrazellulärfärbung

Zur Oberflächenfärbung wurden die zu untersuchenden Zellen in einer Konzentration von $2-4 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS aufgenommen. Je 100 μl dieser Zellsuspension wurden dann mit den extrazellulären Antikörpern gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 4 °C unter Lichtausschluss wurden die Zellen mit FACS Flow gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 dargestellt.

Antikörper	Menge	Hersteller
CD4 APC	2 µl	BD Pharmingen. APC Mouse Anti-Human CD4. Mouse IgG _{1,K}
CD4 PerCP	1,5 µl	BD Pharmingen / BD Biosciences CD4 PerCP Mouse BALB/ IgG _{1,K} . Anti-Human. Clone SK3
CD8 PE	2 µl	BD Pharmingen PE Mouse Anti-Human CD8. Clone RPA-T8 (RUO). Mouse IgG _{1,k}
CD14 APC	1 µl	CD14 (MoP9) BD Biosciences, San Jose, USA REF 345787
CD25 FITC	5 µl	CD25 FITC (2A3) BD Biosciences, San Jose, USA. REF 345796
CD33 PE	1 µl	BD Pharmingen / BD Biosciences CAT 555450 PE Mouse Anti-Human CD33
CD66b FITC	1 µl	BD Pharmingen / BD Biosciences CAT 555724 FITC Mouse Anti-Human CD66b
CD85d PE	2 µl	Anti-hILT/CD85d, PE Conjugated Mouse IgG _{2A} , Catalog Number FAB2078P, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
CD85j PE	5 µl	Anti-Hu CD85j (ILT2), PE, Clone GHI/75, EXBIO Prag, Czech Republic LOT 526795
CD183 PE	2 µl	PE Mouse Anti-Human CD183. Clone: 1C6/CXCR3. Cat 560928. BD Biosciences
CD194 FITC	2,5 µl	Anti-h/rCCR4, FITC conjugated Mouse IgG _{2B} , Catalog Number FAB 1567F, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
CD196 APC	1,5 µl	BD Pharmingen, Alexa Fluor 647 Mouse anti-Human CD196 (CCR6), CAT 560466, BD Biosciences
HLA-DR PerCP	0,5 µl	PerCP-Cy. Mouse anti-Human HLA-DR. Clone G46-6. Cat 560652. BD Biosciences
HLA-G PE	0,5 µl	BD Pharmingen, PE Mouse Anti-Human HLA-G. Clone 87G (RUO). Mouse IgG _{2α,K}

Tabelle 2: Auflistung der für die Extrazellulärfärbung verwendeten Antikörper

2.7.3 Intrazellulärfärbung

Zur intrazellulären Färbung der Effektorenzyme Arg1 und iNOS wurden die Zellen auf eine Konzentration von 4×10^6 /ml eingestellt. Hiervon wurden je 50 µl in 3 Wells einer 96-Well-Platte mit round bottom gegeben. Zunächst wurde der extrazelluläre Antikörper anti-CD66b-FITC in einer Menge von 1 µl pro Well

hinzugegeben, die Platte kurz geschüttelt und für 10 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 150 µl pro Well Waschpuffer (PBS + 0,1 % BSA + 0,1% NaN₃) und Zentrifugation bei 4 °C für 5 min mit 310 g. Der Überstand wurde verworfen, in jedes Well 100 µl Fix/Perm (BD Cytifix/Cytoperm, BD Biosciences, Heidelberg) gegeben und die Platte für 10 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sofort die intrazellulären Antikörper hinzugegeben. Zur Bestimmung der Expression von Arginase 1 wurden 3 µl des Antikörpers (Anti-hArginase 1. PE Conjugated Mouse IgG_{2B}. Catalog number IC8026P. R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) in das entsprechende Well gegeben, zur Bestimmung der Expression der iNOS 2 µl (NOS2 (C-11). Alexa Fluor 647. Sc-7271 AF647, Lot L2012. Santa Cruz Biotechnology). Nun wurde die Platte erneut für 10 min im Brutschrank inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit Zentrifugation der Platte bei 4 °C für 5 min mit 310 g, anschließend wurden die Zellen in 100 µl Waschpuffer aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch gemessen.

2.8 Statistik

Die statistische Analyse und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Die gewonnenen Daten wurden zunächst mittels D'Agostino & Pearson normality test auf Normalverteilung überprüft. Nicht normalverteilte Daten zweier unabhängiger, nicht gepaarter Stichproben (Abortstudie, Rezeptorexpression Früh- vs. Spätschwangerschaft (ILT4)) wurden mittels Mann-Whitney-Test analysiert. Lagen normalverteilte Daten vor, so wurde bei verbundenen Stichproben der paired t-Test (Rezeptorexpression Blut vs. Plazenta (ILT4), Expression iNOS), bei unverbundenen Stichproben der unpaired t-Test verwendet (Rezeptorexpression Früh- vs. Spätschwangerschaft (ILT2)). Bei den Versuchen, bei denen entweder keine Normalverteilung vorlag (Expression Arg1 und ROS-Produktion unter HLA-G Stimulation, Rezeptorexpression Blut vs. Plazenta (ILT2)) oder bei denen aufgrund der kleinen Stichprobe keine Testung auf Normalverteilung erfolgen konnte (Hemmung unter HLA-G Stimulation,

Hemmung nach Induktion durch HLA-G bzw. JEG-3, Induktion durch HLA-G bzw. JEG-3), wurde anhand der Verteilung der Proben vom Vorliegen nicht normalverteilter Daten ausgegangen und bei Vorliegen zweier verbundener Stichproben der Wilcoxon matched-pairs signed rank test zur Analyse verwendet. Beim Vorliegen mehrerer unabhängiger, gepaarter Stichproben (Induktion durch HLA-G mit blockierenden Antikörpern) erfolgte bei nicht normalverteilten Daten zunächst eine Analyse mittels Friedman Test, woran bei Vorliegen eines positiven Ergebnisses Dunn's multiple comparison test angeschlossen wurde. Zur Darstellung von Zusammenhängen zwischen zwei abhängigen Größen wurde eine Regressionsanalyse bzw. lineare Regression gewählt (Rezeptorexpression im Verlauf der Schwangerschaft).

3. Ergebnisse

3.1 Abort-Studie

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2016). Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta, wie sie von unserer Arbeitsgruppe bereits für komplikationslose Schwangerschaften gezeigt werden konnte (Köstlin et al. 2016), bei Patientinnen mit Fehlgeburt vermindert ist. Hierzu wurde Plazentagewebe von Patientinnen nach elektivem Schwangerschaftsabbruch (Interruptio) und nach stattgehabtem Spontanabort jeweils im ersten Trimenon durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von GR-MDSC hin untersucht.

Wir konnten dabei zeigen, dass der Anteil von GR-MDSC in der Plazenta bei Patientinnen mit Spontanabort im Vergleich zu Patientinnen mit elektivem Schwangerschaftsabbruch signifikant vermindert war (Anteil von plaGR-MDSC an plaMNC 1,13 % (0,16 % - 8,08 %) vs. 4,70 % (1,22 % - 11,80 %), Abbildung 4C).

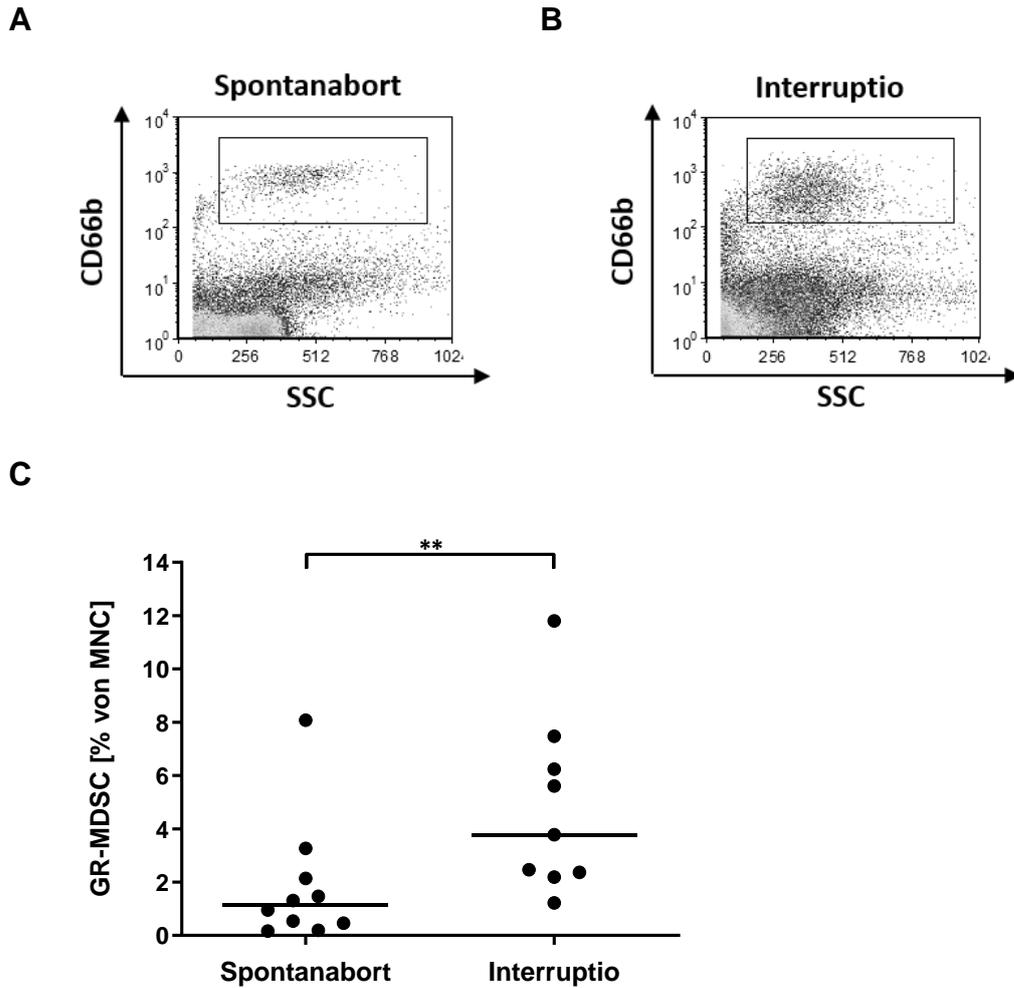


Abbildung 4: GR-MDSC in der Plazenta sind bei Patientinnen mit Spontanabort vermindert

MNC aus Plazentagewebe von Patientinnen mit elektivem Schwangerschaftsabbruch im ersten Trimenon bei intakter Schwangerschaft und aus Plazentagewebe von Patientinnen mit Spontanabort im ersten Trimenon wurden isoliert und es wurde durchflusszytometrisch der Anteil der CD66b⁺ plaGR-MDSC an allen plaMNC bestimmt. (A)+(B) Beispielhafte Density Plots für Side Scatter (SSC) versus CD66b mit Gating auf die Population der CD66b⁺ plaGR-MDSC. (C) Punktdiagramm zur Darstellung des Anteils von plaGR-MDSC an allen plaMNC für Patientinnen mit Spontanabort (Spontanabort) sowie Patientinnen mit elektivem Schwangerschaftsabbruch bei intakter Schwangerschaft (Interruptio). Darstellung des Medians (schwarze Linie) von 9-10 unabhängigen Proben, jeder Punkt steht für eine Probe. n = 9-10, ** p < 0,01, Mann-Whitney Test. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2016.

3.2 Effekt von sHLA-G auf die Induktion und Funktion von GR-MDSC

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Faktoren zur Akkumulation von GR-MDSC und deren funktioneller Aktivierung während der Schwangerschaft beitragen. Ein löslicher Faktor, welcher in der Schwangerschaft

im Vergleich zum nicht-schwangeren Organismus in deutlich erhöhter Konzentration vorliegt und welchem eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der feto-maternalen Toleranz zugeschrieben wird, ist das MHC-Klasse I-Molekül HLA-G. Über eine mögliche Interaktion von HLA-G und MDSC in der Schwangerschaft war bislang nichts bekannt.

3.2.1 Expression der HLA-G Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2017). Zunächst wurde untersucht, ob GR-MDSC Rezeptoren für HLA-G exprimieren. Dazu wurden GR-MDSC aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen unterschiedlichen Gestationsalters isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von ILT2 (CD85j) und ILT4 (CD85d) hin untersucht. Wir konnten dabei zeigen, dass GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer sowohl ILT2 als auch ILT4 exprimierten. Für ILT2 lag der prozentuale Anteil an exprimierenden GR-MDSC bei ca. 70 %. Dieser Anteil war über die Schwangerschaft hinweg nahezu konstant (Abbildung 5B). Nahezu alle GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer exprimierten ILT4 auf ihrer Oberfläche (Anteil an ILT4⁺ GR-MDSC ca. 97 %); auch hier zeigten sich keine relevanten Unterschiede im Verlauf der Schwangerschaft (Abbildung 5C).

Es konnte somit gezeigt werden, dass GR-MDSC aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen Rezeptoren für HLA-G exprimieren und damit eine Interaktion zwischen HLA-G und GR-MDSC in der Schwangerschaft möglich ist.

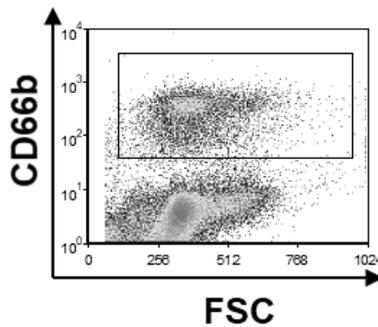
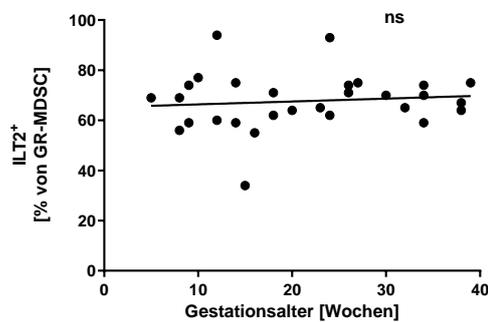
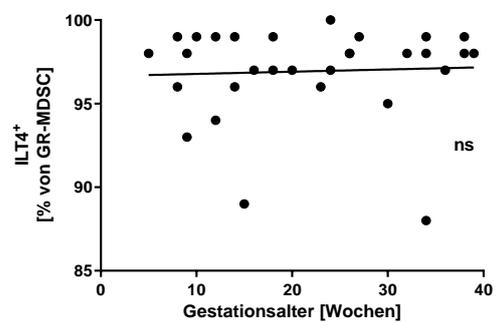
A**B****C**

Abbildung 5: GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer exprimieren die HLA-G-Rezeptoren ILT2 und ILT4

MNC aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen unterschiedlichen Gestationsalters wurden isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression der HLA-G Rezeptoren ILT2 und ILT4 hin untersucht. (A) Beispielhafter Density Plot mit Forward Scatter (FSC) versus CD66b mit Gating auf die Population der CD66b⁺ GR-MDSC. (B)+(C) Punktdiagramme zur Darstellung des Anteils von CD66b⁺ GR-MDSC an allen GR-MDSC, die den Rezeptor ILT2 (B) bzw. ILT4 (C) exprimieren in Abhängigkeit vom Gestationsalter in Wochen. Die Gerade zeigt die Korrelation zwischen ILT2⁺ bzw. ILT4⁺ GR-MDSC und dem Gestationsalter; jeder Punkt steht für eine Probe. n = 29-30, ns nicht signifikant, lineare Regression. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

Hinsichtlich der Expressionsstärke von ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC zeigte sich eine Abnahme der Expression von ILT4 mit zunehmender Schwangerschaftsdauer (Abbildung 6D), während die Expression von ILT2 konstant blieb bzw. eine leichte Tendenz zur Zunahme zeigte, welche jedoch nicht signifikant war (Abbildung 6C).

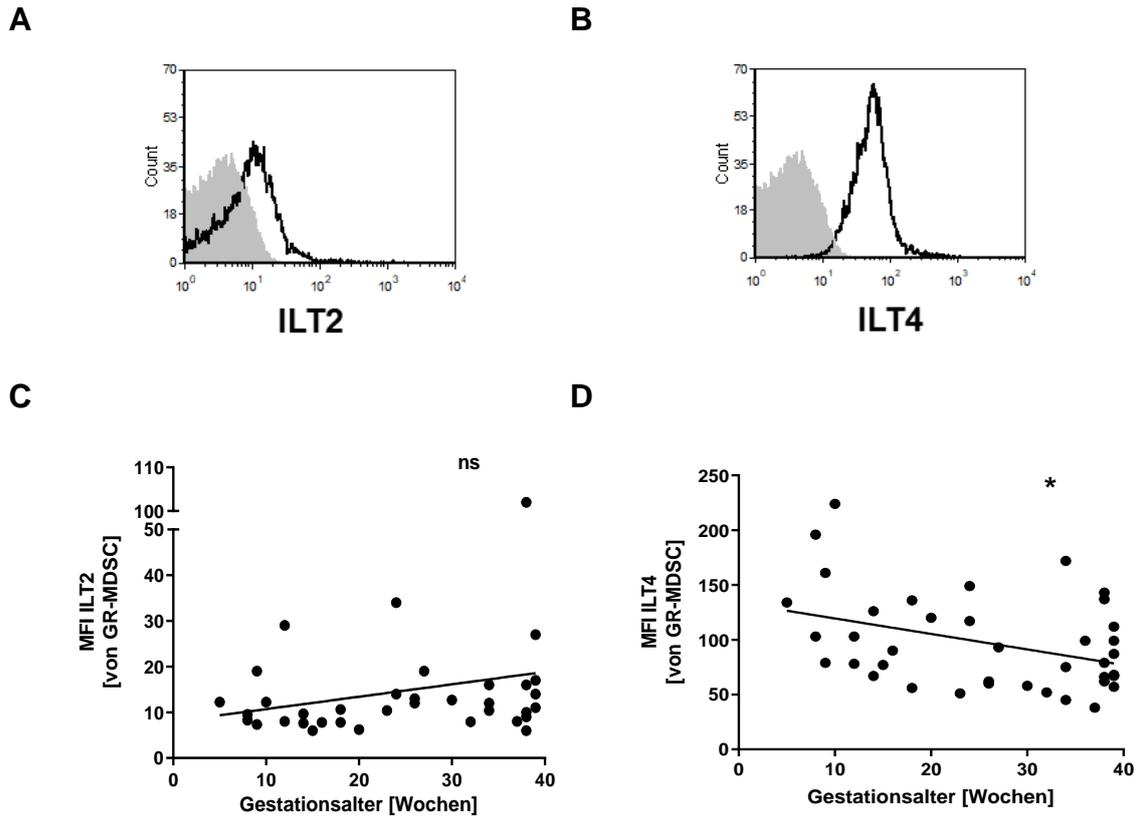


Abbildung 6: Expression der HLA-G-Rezeptoren ILT2 und ILT4 über den Schwangerschaftsverlauf

MNC aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen unterschiedlichen Gestationsalters wurden isoliert und die Expression der Oberflächenmarker ILT2 und ILT4 auf CD66b⁺ GR-MDSC wurde durchflusszytometrisch gemessen. (A)+(B) Beispielhafte Histogramme für die Expression der Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC. Das schwarz gerahmte Histogramm zeigt die Expression des Rezeptors ILT2 (A) bzw. des Rezeptors ILT4 (B). Die grau hinterlegten Histogramme zeigen jeweils die Isotyp-Kontrolle. (C)+(D) Punktdiagramme zur Darstellung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) des Rezeptors ILT2 (C) und ILT4 (D) auf CD66b⁺ GR-MDSC in Abhängigkeit vom Gestationsalter in Wochen. Die Gerade zeigt die Korrelation zwischen der Expression von ILT2 bzw. ILT4 und dem Gestationsalter; jeder Punkt steht für eine Probe. n = 38-39, * p < 0,05, ns nicht signifikant, lineare Regression. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es an der feto-maternalen Grenzschicht zu einer Akkumulation und Aktivierung von GR-MDSC kommt (Köstlin et al. 2016). Da HLA-G in der Schwangerschaft überwiegend von Trophoblastzellen gebildet wird, sollte untersucht werden, ob sich GR-MDSC aus dem peripheren Blut und GR-MDSC aus der Plazenta bezüglich der Expression von HLA-G-Rezeptoren unterscheiden. Hierzu wurden MNC aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen am Geburtstermin sowie aus Plazentagewebe derselben

Frau unmittelbar nach der Entbindung isoliert und die Expression der HLA-G-Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC durchflusszytometrisch gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von ILT2 auf GR-MDSC aus dem peripheren Blut im Vergleich zu GR-MDSC aus Plazenta nicht unterschied (MFI $21,56 \pm 30,85$ vs. $26,22 \pm 13,19$, Abbildung 7C), während die Expression von ILT4 auf GR-MDSC aus der Plazenta im Vergleich zu GR-MDSC aus dem peripheren Blut signifikant erhöht war (MFI $136,70 \pm 46,45$ vs. $75,20 \pm 30,11$, Abbildung 7D).

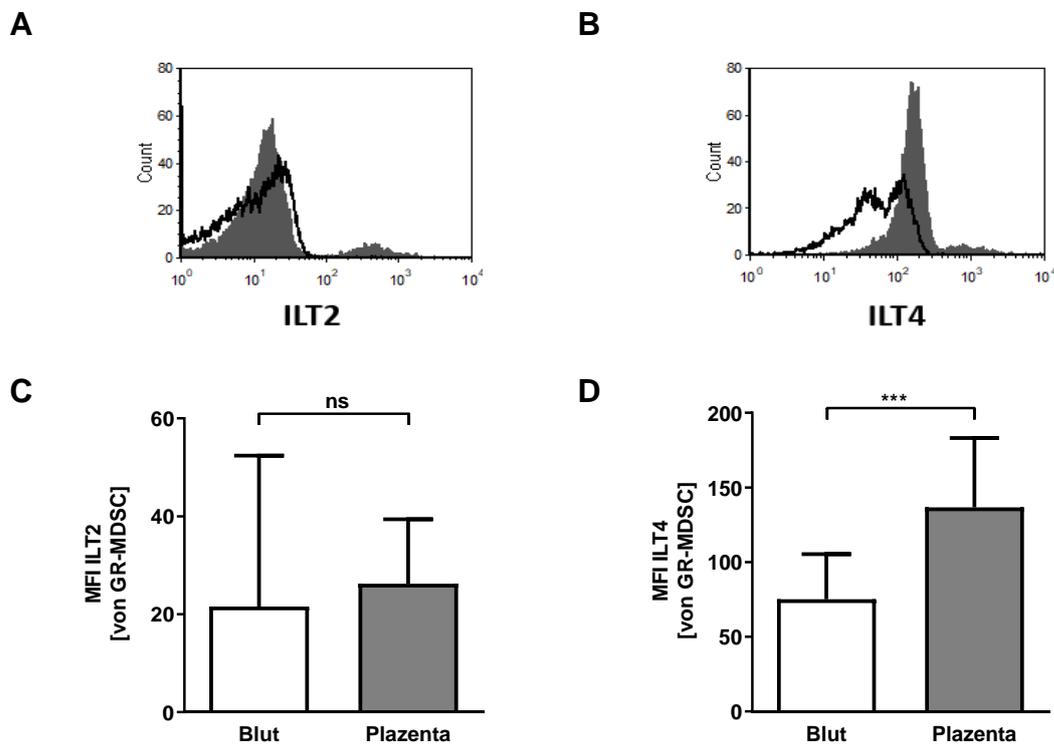


Abbildung 7: In der Plazenta kommt es zu einer Hochregulation der Expression von ILT4, nicht aber von ILT2 auf GR-MDSC

MNC aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen am Geburtstermin sowie aus Plazentagewebe derselben Frau unmittelbar nach Entbindung wurden isoliert und die Expression der Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. (A)+(B) Beispielhafte Histogramme zeigen die Expression des Rezeptors ILT2 (A) bzw. ILT4 (B) jeweils auf GR-MDSC aus dem peripheren Blut (schwarz gerahmtes Histogramm) und auf plaGR-MDSC (grau hinterlegtes Histogramm). (C)+(D) Balkendiagramme zur Darstellung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) für den Rezeptor ILT2 (C) bzw. ILT4 (D) jeweils auf GR-MDSC aus dem peripheren Blut (weißer Balken) und auf plaGR-MDSC (grauer Balken). Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 9-10 unabhängigen Proben. $n = 9-10$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test (C) bzw. paired t-test (D). Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

Entsprechend den Ergebnissen aus dem peripheren Blut zeigte sich eine verminderte Expression von ILT4 und eine erhöhte Expression von ILT2 auf GR-MDSC aus der Plazenta am Geburtstermin verglichen mit GR-MDSC aus der Plazenta im ersten Trimenon (MFI $26,22 \pm 13,19$ vs. $8,49 \pm 2,92$ für ILT2 (Abbildung 8A) und MFI $136,70 \pm 46,45$ vs. $193,90 \pm 83,65$ für ILT4 (Abbildung 8B)).

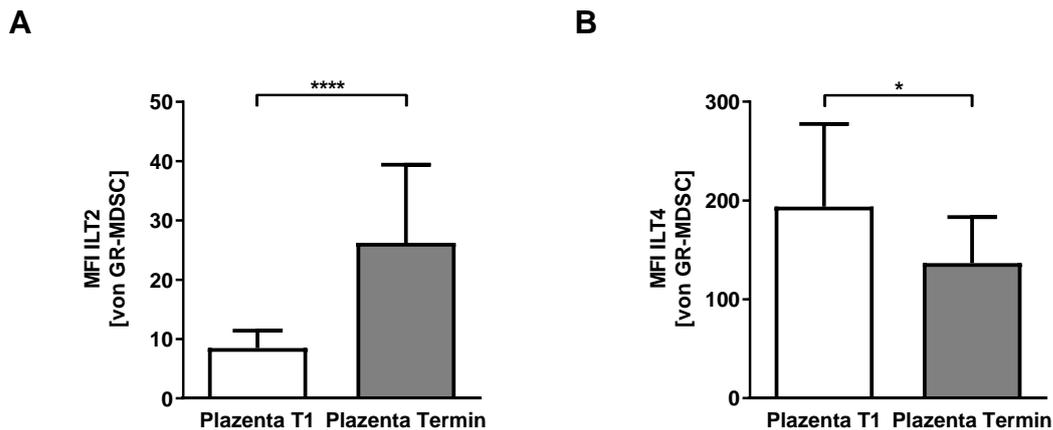


Abbildung 8: Die Expression von ILT2 und ILT4 auf plaGR-MDSC ist in der Frühschwangerschaft im Vergleich zur Spätschwangerschaft verändert

Plazentagewebe von Müttern am errechneten Geburtstermin und von Patientinnen nach Schwangerschaftsabbruch im ersten Trimenon wurde mechanisch zerkleinert, MNC daraus isoliert und die Expression der Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf CD66b⁺ plaGR-MDSC wurde durchflusszytometrisch gemessen. (A)+(B) Balkendiagramme zur Darstellung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) des Rezeptors ILT2 (A) und ILT4 (B) auf plaGR-MDSC nach Schwangerschaftsabbruch im ersten Trimenon (weiße Balken) und auf plaGR-MDSC am errechneten Geburtstermin (graue Balken). Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 9-18 unabhängigen Proben. n = 9-18, * p < 0,05, **** p < 0,0001, unpaired t-test (A) bzw. Mann Whitney Test (B).

3.2.2 sHLA-G steigert die suppressive Funktion von GR-MDSC aus der Plazenta

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2017). Die wichtigste funktionelle Eigenschaft von MDSC ist ihre suppressive Aktivität gegenüber anderen Immunzellen, insbesondere T-Zellen. Um zu untersuchen, ob sHLA-G direkt die suppressive Funktion von GR-MDSC beeinflusst, wurden GR-MDSC aus Plazenta isoliert und im T-Zell-Proliferationsassay mit und ohne

Zugabe von sHLA-G auf ihre suppressive Aktivität getestet. Es konnte dabei gezeigt werden, dass GR-MDSC aus der Plazenta nach Zugabe von sHLA-G die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen signifikant besser hemmen können als plaGR-MDSC ohne Zugabe von sHLA-G (Proliferationsindex 60,00 ± 14,66 vs. 81,20 ± 7,26 für CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 9B) und 58,40 ± 15,44 vs. 72,80 ± 16,75 für CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 9D)).

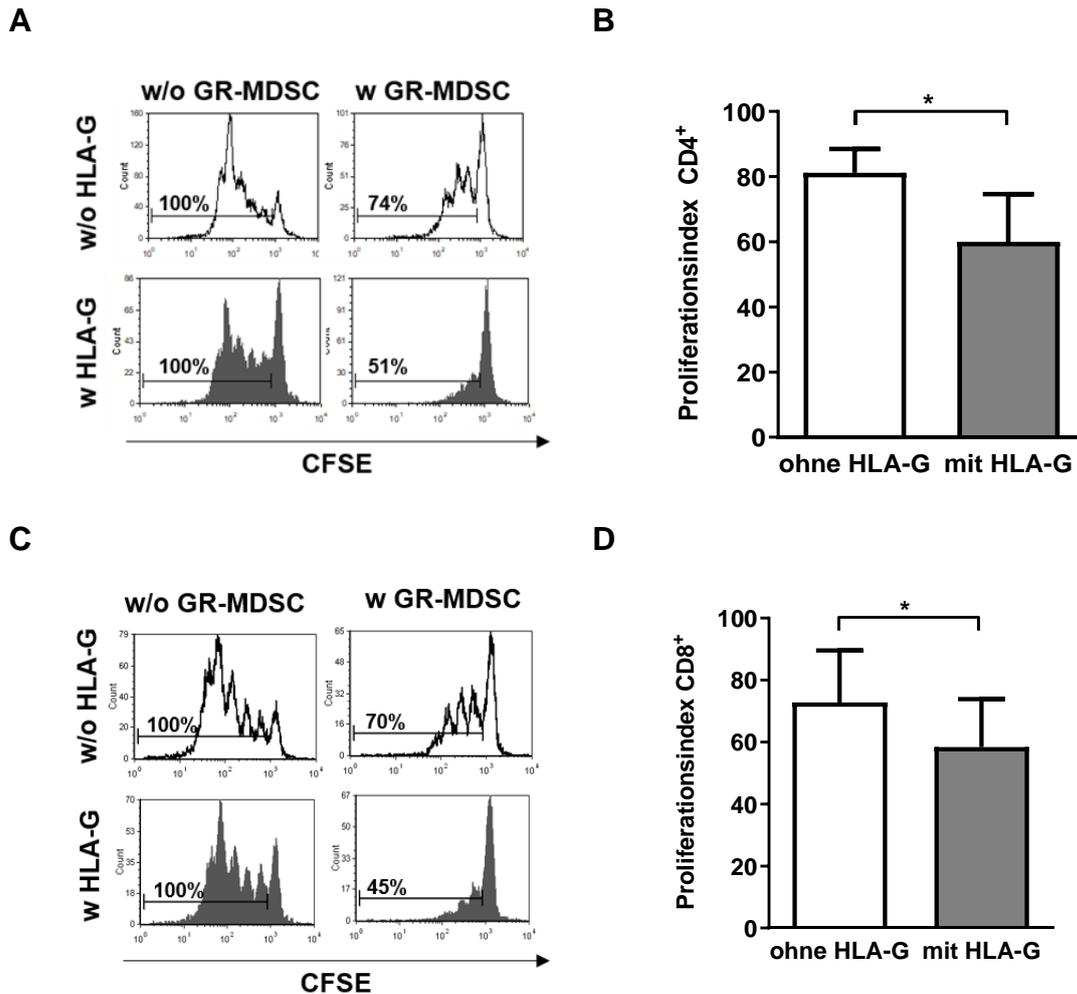


Abbildung 9: sHLA-G steigert die suppressive Funktion von GR-MDSC aus Plazenta

Plazentagewebe reifer Neugeborener wurde mechanisch zerkleinert, plaMNC daraus isoliert und CD66b⁺ plaGR-MDSC mittels Magnetic Activated Cell Sorting angereichert. Diese wurden im Verhältnis 1:2 mit frisch isolierten, CFSE-gefärbten und mit IL-2 und OKT3-stimulierten PBMC zusammengegeben und mit oder ohne Stimulation durch 1 µg/ml sHLA-G für 96 h kultiviert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. (A)+(C) Repräsentative Histogramme zur

Darstellung der Hemmung der Proliferation CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (C) ohne Zugabe von plaGR-MDSC und sHLA-G (w/o HLA-G, w/o GR-MDSC), nach alleiniger Zugabe von plaGR-MDSC im Verhältnis 1:2 (w/o HLA-G, w GR-MDSC), nach alleiniger Zugabe von sHLA-G in einer Konzentration von 1 µg/ml (w HLA-G, w/o GR-MDSC) sowie nach Zugabe von plaGR-MDSC und sHLA-G (w HLA-G, w GR-MDSC). Der Proliferationsindex ist jeweils mit angegeben. (B)+(D) Balkendiagramme zur Darstellung des Proliferationsindex von CD4⁺ T-Zellen (B) und von CD8⁺ T-Zellen (D) nach Zugabe von plaGR-MDSC im Verhältnis 1:2 ohne (weiße Balken) und mit Zugabe von sHLA-G (graue Balken). Der Proliferationsindex wurde definiert als Verhältnis aus der T-Zell-Proliferation nach Zugabe von plaGR-MDSC und der T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von plaGR-MDSC. Die Proliferation von T-Zellen allein wurde dabei auf 100 % gesetzt. Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten. n = 5, * p < 0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

3.2.3 sHLA-G beeinflusst die Expression von iNOS in plaGR-MDSC, während die Expression von Arg1 und die Produktion von ROS unbeeinflusst bleibt

Zu den wichtigsten Effektormechanismen von MDSC zählt, wie eingangs beschrieben, eine Depletion der Aminosäure L-Arginin durch die Enzyme Arg1 und iNOS und die Produktion von ROS. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Arg1 in plaGR-MDSC sowie die Produktion von ROS nach Stimulation mit sHLA-G unverändert blieb im Vergleich zu unstimulierten plaGR-MDSC (MFI 68,67 ± 29,59 vs. 69,00 ± 27,44 für Arg1, Abbildung 10A; MFI 23,67 ± 12,07 vs. 51,67 ± 87,40 für Rhodamin ohne PMA-Stimulation, MFI 639,70 ± 325,20 vs. 611,60 ± 310,00 für Rhodamin nach 10-minütiger PMA-Stimulation, MFI 1114,00 ± 702,80 vs. 1222,00 ± 759,70 nach 20-minütiger PMA-Stimulation, Abbildung 10C), wohingegen die Expression von iNOS nach Stimulation mit sHLA-G im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant abnahm (MFI 723,70 ± 248,50 vs. 566,40 ± 221,30, Abbildung 10B).

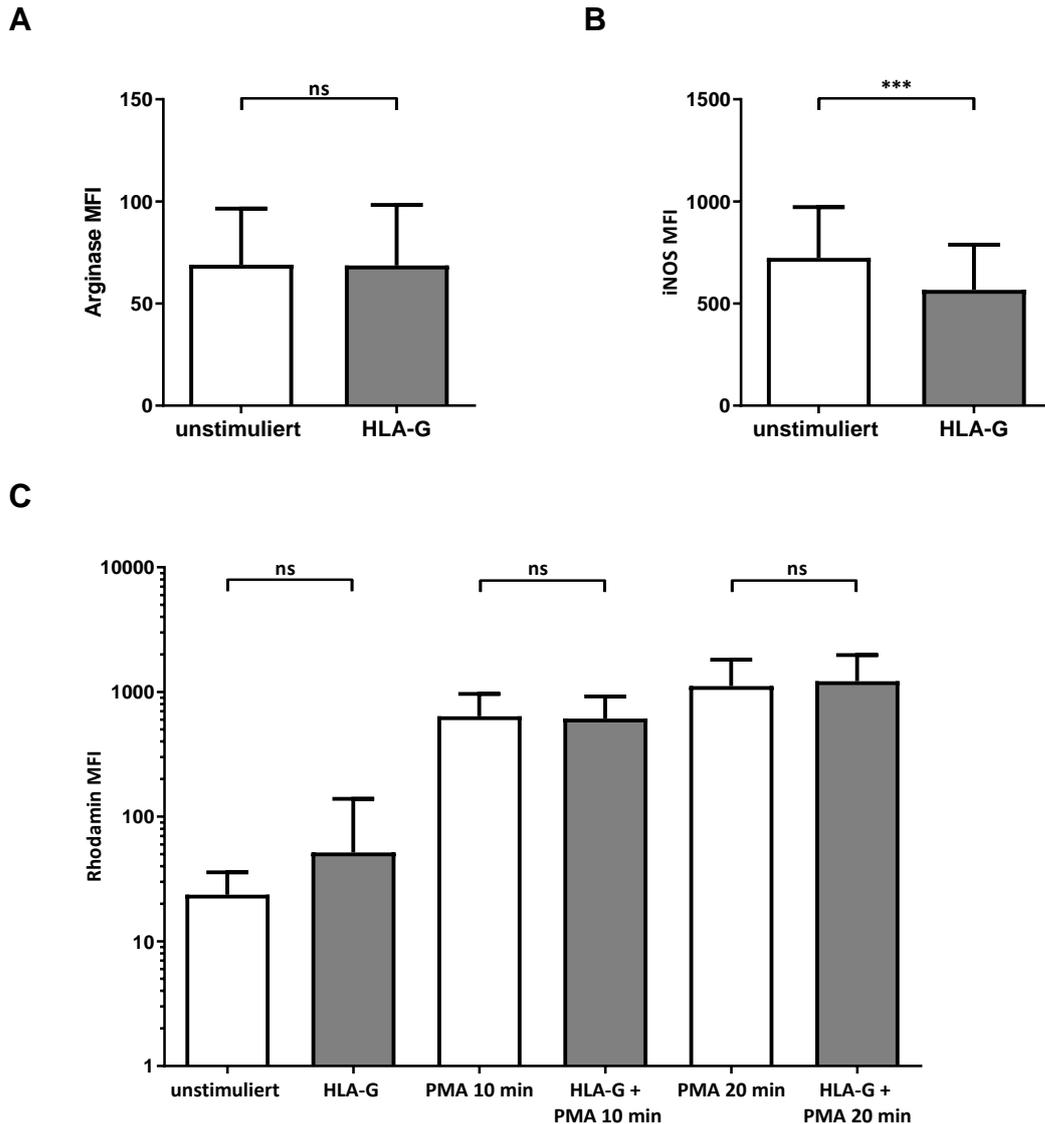


Abbildung 10: sHLA-G beeinflusst die Expression von iNOS in plaGR-MDSC, während die Expression von Arg1 und die Produktion von ROS unbeeinflusst bleibt

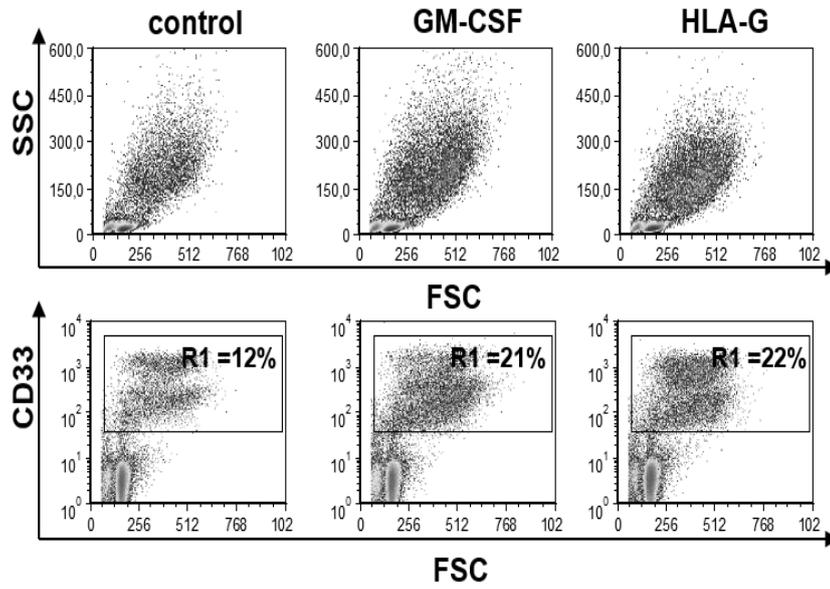
MNC wurden aus Plazentagewebe reifer Neugeborener isoliert und 24 h in Medium mit und ohne Zugabe von 1 µg/ml sHLA-G inkubiert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Expression der Enzyme Arg1 und iNOS in plaGR-MDSC sowie deren Fähigkeit zur ROS-Produktion bestimmt. (A)+(B) Balkendiagramme zur Darstellung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) der Expression von Arg1 (A) und iNOS (B) unstimulierter Zellen (unstimuliert) und nach 24 h Stimulation mit 1 µg/ml sHLA-G (HLA-G). Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 9 unabhängigen Experimenten. n = 9, ns nicht signifikant, *** p < 0,001, Wilcoxon matched-pairs signed rank test (A) und paired t-test (B). Nach 24 h Stimulation ohne oder mit 1 µg/ml sHLA-G wurden die Zellen für 10 bzw. 20 min mit PMA stimuliert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die ROS-Produktion durch Umwandlung des Farbstoffes Dihydrorhodamin in Rhodamin bestimmt. (C) Balkendiagramm zur Darstellung der Mean Fluorescence Intensity (MFI) von Rhodamin nach 24 h Inkubation ohne (unstimuliert) und mit 1 µg/ml sHLA-G (HLA-G) ohne Stimulation mit PMA, sowie nach 10-minütiger Stimulation mit PMA (PMA 10 min bzw.

HLA-G + PMA 10 min) und nach 20-minütiger Stimulation mit PMA (PMA 20 min bzw. HLA-G + PMA 20 min). Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 9 unabhängigen Experimenten. n = 9, ns nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

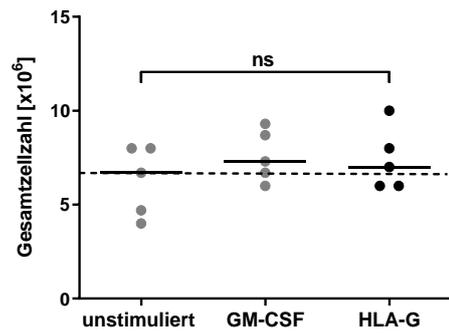
3.2.4 sHLA-G bewirkt eine quantitative Induktion von MDSC aus PBMC

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2017). Weiter wurde untersucht, ob sHLA-G eine Induktion von MDSC bewirken kann. Hierzu wurden zunächst PBMC von gesunden, nicht-schwangeren Erwachsenen isoliert und in Anlehnung an bereits etablierte Protokolle ohne Zugabe weiterer Substanzen oder nach Zugabe von 1 µg/ml sHLA-G über 7 Tage kultiviert. Im Anschluss daran wurde durchflusszytometrisch der Anteil von CD33⁺ MDSC sowie die absolute Zellzahl in der Kultur gemessen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 1 ng/ml GM-CSF. Die Gesamtzellzahl unterschied sich mit $6,70 \times 10^6$ ($4,00 - 8,00 \times 10^6$) Zellen in der unstimulierten Kontrolle, $7,30 \times 10^6$ ($6,00 - 9,30 \times 10^6$) Zellen nach Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF und $7,00 \times 10^6$ ($6,00 - 10,00 \times 10^6$) Zellen nach Induktion mit 1 µg/ml sHLA-G nicht (Abbildung 11B). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sHLA-G zu einer anteiligen Induktion von MDSC aus PBMC führt (Abbildung 11C). Der Anteil von MDSC an allen PBMC lag in der unstimulierten Kontrolle bei 12,00 % ($4,00 - 13,00$ %). Die Zugabe von GM-CSF führte zu einer Zunahme des Anteils an MDSC auf 22,00 % ($20,00 - 24,00$ %). Die Zugabe von 1 µg/ml sHLA-G bewirkte eine Zunahme des Anteils an MDSC auf 25,00 % ($17,00 - 48,00$ %). Ebenso bewirkte sHLA-G eine Zunahme der absoluten Zahl an MDSC (unstimulierte Kontrolle $7,20 \times 10^5$ ($2,00 - 9,60 \times 10^5$) Zellen, Stimulation mit 1 ng/ml GM-CSF $16,10 \times 10^5$ ($14,40 - 18,70 \times 10^5$) Zellen, Stimulation mit 1 µg/ml sHLA-G $19,60 \times 10^5$ ($10,00 - 38,40 \times 10^5$) Zellen, Abbildung 11D).

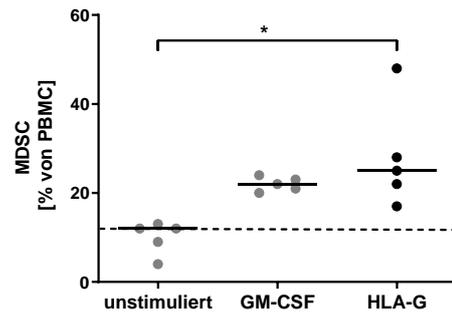
A



B



C



D

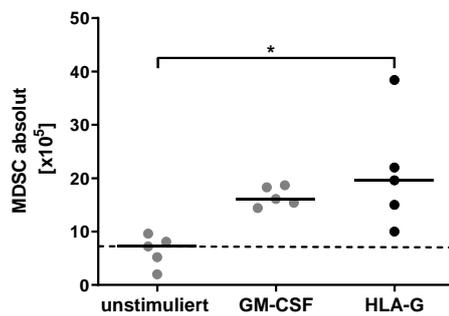


Abbildung 11: sHLA-G bewirkt eine quantitative Induktion von MDSC aus PBMC

PBMC gesunder, nicht-schwangerer Erwachsener wurden isoliert und 7 Tage in Medium ohne Zugabe weiterer Substanzen, in Medium mit 1 ng/ml GM-CSF oder in Medium mit 1 µg/ml sHLA-G kultiviert. Im

Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils von CD33⁺ MDSC. (A) Repräsentative Density Plots zur Darstellung der Bestimmung des Anteils CD33⁺ MDSC an allen PBMC. Forward Scatter versus Side Scatter (obere Reihe) bzw. Forward Scatter versus CD33 (untere Reihe) von PBMC ohne Zugabe weiterer Substanzen (control), nach Induktion durch 1 ng/ml GM-CSF (GM-CSF) sowie nach Induktion durch 1 µg/ml sHLA-G (HLA-G). (B)-(D) Punktdiagramme zur Darstellung der Gesamtzellzahl (B), des prozentualen Anteils von MDSC an allen PBMC (C) und der absoluten Zahl an MDSC (D) ohne Zugabe weiterer Substanzen (unstimuliert), nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF (GM-CSF) und nach Zugabe von 1 µg/ml sHLA-G (HLA-G). Die gestrichelte Linie zeigt die Werte ohne Zugabe weiterer Substanzen (Negativ-Kontrolle). Darstellung des Medians (schwarze Linie) von 5 unabhängigen Experimenten, jeder Punkt steht für eine Probe. n = 5, * p < 0,05, ns nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

3.2.5 Durch sHLA-G induzierte MDSC sind funktionell aktiviert

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2017). Die durch sHLA-G induzierten MDSC wurden im nächsten Schritt mittels MACS angereichert und in einem T-Zell-Proliferationsassay auf ihre suppressive Aktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch sHLA-G induzierte MDSC die Proliferation sowohl von CD4⁺ T-Zellen als auch von CD8⁺ T-Zellen signifikant stärker hemmen als MDSC aus der unstimulierten Kontrolle (Proliferationsindex nach Induktion mit HLA-G 26,40 ± 14,50 (CD4⁺) und 24,00 ± 14,27 (CD8⁺) vs. 46,60 ± 13,81 (CD4⁺) und 47,40 ± 18,16 (CD8⁺) in der unstimulierten Kontrolle). Die Hemmung der T-Zell-Proliferation nach Induktion mit sHLA-G war vergleichbar mit der Hemmung nach Induktion durch GM-CSF (Proliferationsindex 32,40 ± 15,47 (CD4⁺) und 32,60 ± 16,07 (CD8⁺), Abbildung 12).

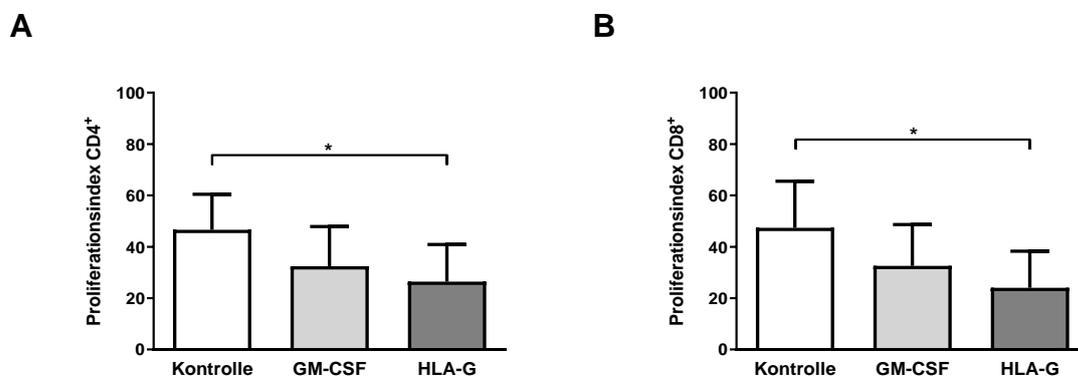


Abbildung 12: Durch sHLA-G induzierte MDSC sind funktionell aktiviert

PBMC gesunder, nicht-schwangerer Erwachsener wurden isoliert und 7 Tage in Medium ohne Zugabe weiterer Substanzen, nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF oder nach Zugabe von 1 µg/ml HLA-G kultiviert. Im Anschluss daran wurden CD33⁺ MDSC mittels MACS angereichert. Diese wurden im Verhältnis 1:2 mit CFSE-gefärbten und mit IL-2 und OKT3-stimulierten PBMC derselben Person zusammengegeben. Nach 96 h Kultur erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. (A)+(B) Balkendiagramme zur Darstellung des Proliferationsindex von CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) nach Zugabe von MDSC, denen in der Kultur keine weiteren Substanzen zugegeben worden waren (Kontrolle), MDSC nach Induktion durch 1 ng/ml GM-CSF (GM-CSF) und MDSC nach Induktion durch 1 µg/ml HLA-G (HLA-G). Der Proliferationsindex wurde definiert als Verhältnis aus der T-Zell-Proliferation nach Zugabe von MDSC und der T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von MDSC. Die Proliferation von T-Zellen allein wurde auf 100 % gesetzt. Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten. n = 5, * p < 0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

3.2.6 Die Induktion von MDSC durch sHLA-G wird über den Rezeptor ILT4 vermittelt

Die folgenden Ergebnisse wurden durch Frau Dr. Köstlin-Gille zur Verfügung gestellt und wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2017). Um zu untersuchen, über welchen der beiden Rezeptoren die induktiven Effekte von sHLA-G auf MDSC vermittelt werden, wurden die Induktionsversuche unter Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen ILT2 und ILT4 durchgeführt. Dabei konnten wir zeigen, dass der Effekt von sHLA-G auf die Induktion von MDSC vorrangig über den Rezeptor ILT4 vermittelt wird. Der Anteil an MDSC betrug in der unstimulierten Kontrolle 11,00 % (3,00 – 19,00 %), nach Induktion durch 1 µg/ml sHLA-G 15,00 % (9,00 – 32,00 %), nach Zugabe von anti-ILT2 14,00 % (7,00 – 31,00 %) und nach Zugabe von anti-ILT4 10,00 % (6,00 – 22,00 %) (Abbildung 13B).

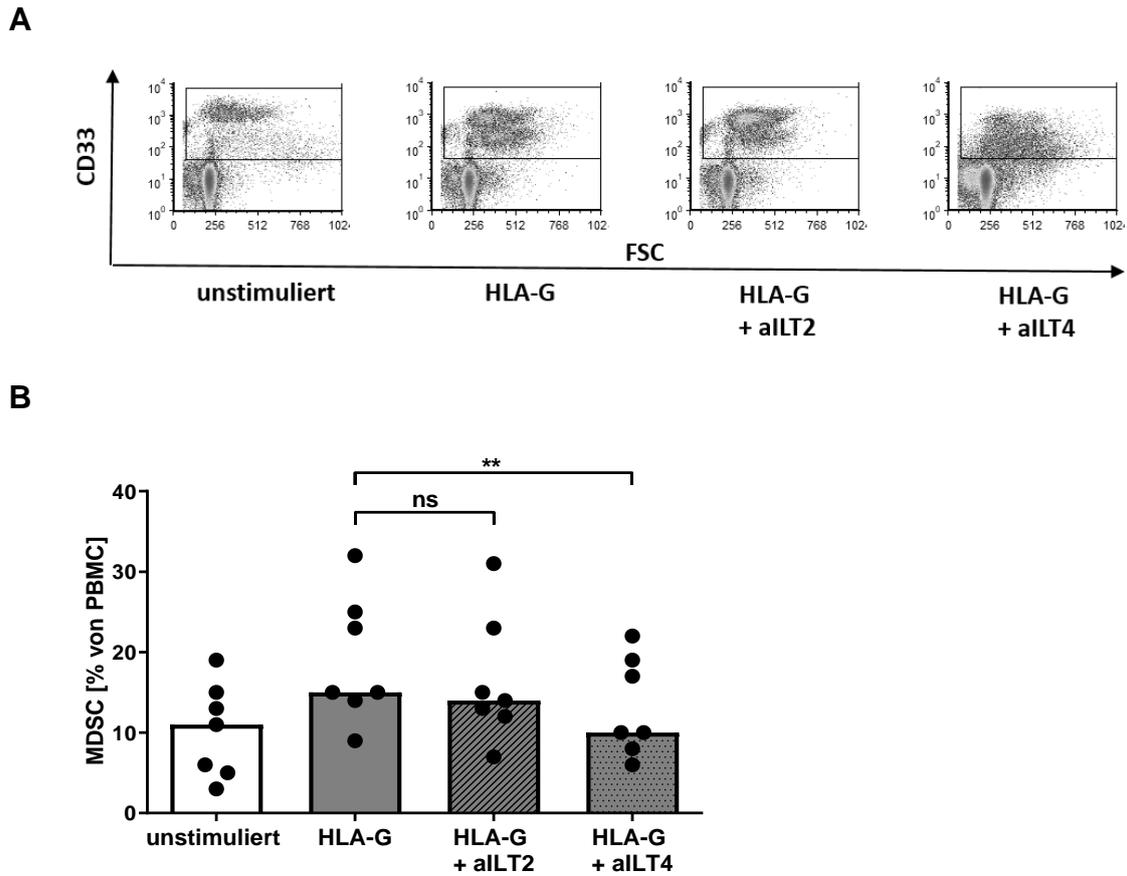


Abbildung 13: Die Induktion von MDSC durch sHLA-G wird über den Rezeptor ILT4 vermittelt

PBMC von gesunden, nicht-schwangeren Erwachsenen wurden für 7 Tage in Medium oder in Medium unter Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ sHLA-G mit oder ohne Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen ILT2 oder ILT4 kultiviert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch der Anteil von CD33⁺ MDSC bestimmt. (A) Repräsentative Density Plots für Forward Scatter (FSC) vs. CD33 von PBMC nach Kultur in Medium alleine (unstimuliert), unter Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ sHLA-G (HLA-G), unter Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ sHLA-G und einem blockierenden Antikörper gegen ILT2 (HLA-G + aILT2) sowie unter Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ sHLA-G und einem blockierenden Antikörper gegen ILT4 (HLA-G + aILT4). Der Rahmen zeigt die CD33⁺ MDSC. (B) Balkendiagramm zur Darstellung des prozentualen Anteils von MDSC an allen PBMC nach 7 Tagen Kultur in Medium (unstimuliert), nach Induktion mit 1 $\mu\text{g/ml}$ sHLA-G (HLA-G) und nach Induktion mit 1 $\mu\text{g/ml}$ sHLA-G und einem blockierenden Antikörper gegen ILT2 (grau gestreift) bzw. gegen ILT4 (grau mit Punkten). Die Balken zeigen jeweils den Median von 7 unabhängigen Experimenten, jeder Punkt steht für eine Probe. $n = 7$, ** $p < 0,01$, ns nicht signifikant, Friedman Test und Dunn's multiple comparison test. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2017.

3.3 Effekt einer Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 auf die Induktion und Funktion von MDSC

Der dichteste Kontakt zwischen Mutter und semiallogenem Fetus besteht im Bereich der Plazenta als feto-maternaler Grenzschicht. Diese wird von unterschiedlichen anatomischen Strukturen gebildet, zu denen unter anderem die Zellen des Zyto- und Synzytiotrophoblasten gehören. Daher sollte untersucht werden, ob eine Interaktion mit Trophoblastzellen einen Einfluss auf Menge und Funktion von MDSC hat. Hierzu wurde ein Ko-Kulturmodell mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 eingesetzt.

3.3.1 Eine Ko-Kultur mit JEG-3 führt nicht zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC

Um zu untersuchen, ob eine Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 eine Induktion von MDSC aus PBMC bewirken kann, wurden PBMC über 7 Tage mit JEG-3-Zellen ko-kultiviert und im Anschluss der Anteil von CD33⁺ MDSC an allen PBMC durchflusszytometrisch bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ko-Kultur von PBMC mit JEG-3-Zellen zwar eine Erhöhung des prozentualen Anteils von CD33⁺ MDSC an den Gesamt-PBMC (unstimulierte Kontrolle 6,00 % (4,00 – 13,00 %), Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF 22,00 % (11,00 – 36,00 %), Ko-Kultur mit JEG-3 11,00 % (5,00 – 26,00 %)), nicht jedoch eine Erhöhung der absoluten Zahl an MDSC (unstimulierte Kontrolle $4,80 \times 10^5$ ($1,50 - 7,20 \times 10^5$) Zellen, Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF $14,00 \times 10^5$ ($5,70 - 28,80 \times 10^5$) Zellen, Ko-Kultur mit JEG-3 $4,20 \times 10^5$ ($3,00 - 11,20 \times 10^5$) Zellen) bewirkte (Abbildung 14).

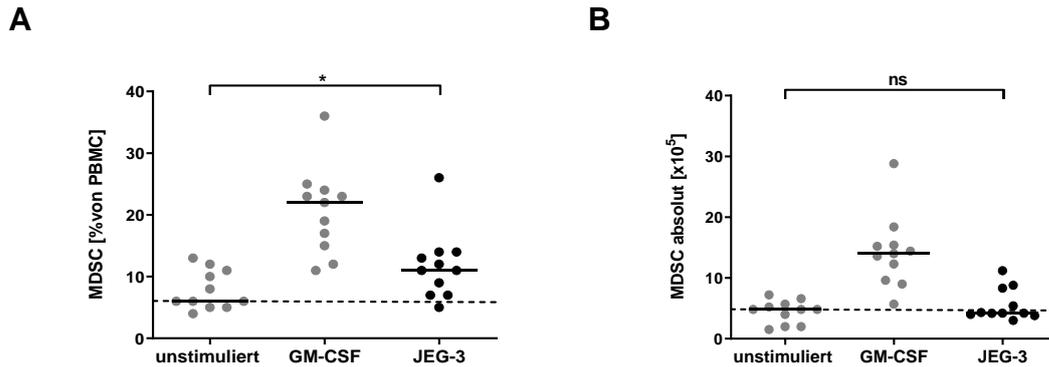


Abbildung 14: Ko-Kultur mit JEG-3 führt nicht zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC

PBMC von gesunden, nicht-schwangeren Erwachsenen wurden isoliert und für 7 Tage mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 ko-kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils und der absoluten Zahl von CD33⁺ MDSC. (A)+(B) Punktdiagramme zur Darstellung des prozentualen Anteils (A) von MDSC an allen PBMC und der absoluten Zahl (B) von MDSC ohne Zugabe weiterer Substanzen (unstimuliert), nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF (GM-CSF) und nach Ko-Kultur mit JEG-3-Zellen (JEG-3). Darstellung des Medians (schwarze Linie) von 11 unabhängigen Experimenten, jeder Punkt steht für eine Probe. Die gestrichelte Linie zeigt die Werte ohne Zugabe weiterer Substanzen an (Negativ-Kontrolle). n = 11, * p < 0,05, ns nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.3.2 Eine Ko-Kultur mit JEG-3 bewirkt eine funktionelle Aktivierung von MDSC

Die folgenden Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Köstlin et al. 2016). Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Aktivität der durch JEG-3 induzierten MDSC im T-Zell-Proliferationsassay getestet. Es zeigte sich, dass durch JEG-3 induzierte MDSC die Proliferation sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen signifikant besser hemmen konnten als MDSC aus der unstimulierten Kontrolle. Der CD4⁺-Proliferationsindex lag bei Zugabe von MDSC aus der unstimulierten Kontrolle bei $63,40 \pm 21,87$, bei Zugabe von mit 1 ng/ml GM-CSF-induzierten MDSC bei $40,40 \pm 12,05$ und bei Zugabe von JEG-3-induzierten MDSC bei $36,60 \pm 30,36$ (Abbildung 15A). Der CD8⁺-Proliferationsindex lag bei Zugabe von MDSC aus der unstimulierten Kontrolle bei $64,40 \pm 24,03$, bei Zugabe von mit 1 ng/ml GM-CSF-induzierten MDSC bei $42,00 \pm 11,79$ und bei Zugabe von JEG-3-induzierten MDSC bei $37,40 \pm 29,57$ (Abbildung 15B).

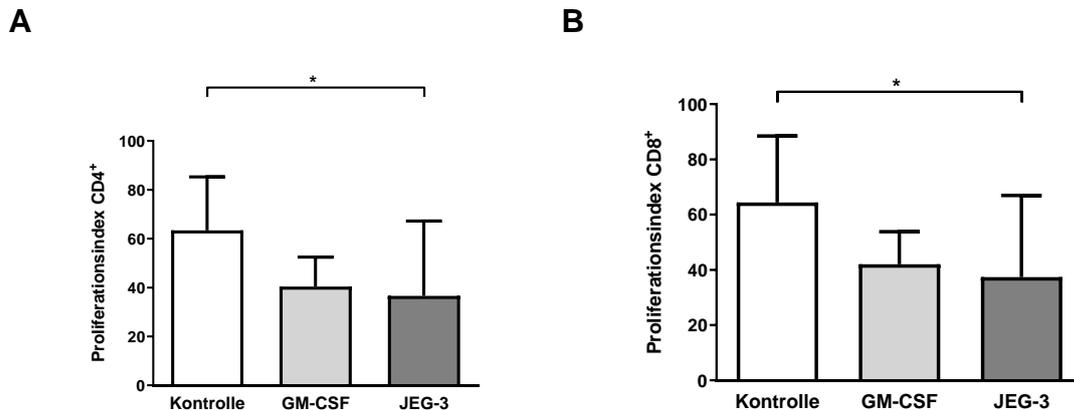


Abbildung 15: Eine Ko-Kultur mit JEG-3 bewirkt eine funktionelle Aktivierung von MDSC

PBMC von gesunden, nicht-schwangeren Erwachsenen wurden isoliert und 7 Tage mit Zellen der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 ko-kultiviert. Im Anschluss daran wurden CD33⁺ MDSC mittels MACS angereichert und im Verhältnis 1:2 mit CFSE-gefärbten und mit IL-2 und OKT3-stimulierten PBMC derselben Person zusammengegeben. Nach 96 h erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. (A)+(B) Balkendiagramme zur Darstellung des Proliferationsindex von CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (B) nach Zugabe unstimulierter Zellen (Kontrolle), nach Zugabe von mit 1 ng/ml GM-CSF induzierten MDSC (GM-CSF) und nach Zugabe von durch Ko-Kultur mit JEG-3 induzierten MDSC (JEG-3). Der Proliferationsindex wurde definiert als Verhältnis aus der T-Zell-Proliferation nach Zugabe von MDSC und der T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von MDSC. Die Proliferation von T-Zellen allein wurde auf 100 % gesetzt. Die Balken zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten. n = 5, * p < 0,05, ns nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Abbildung in Anlehnung an Köstlin et al. 2016.

3.4 Effekt schwangerschaftsassoziierter Hormone auf die Induktion von MDSC

Den Steroidhormonen Progesteron und Östrogen, welche während der Schwangerschaft in erhöhten Konzentrationen vorliegen, werden zusätzlich zu ihrer Funktion als Sexualhormone auch immunologische Wirkungen zugeschrieben. Für beide Hormone sowie für das nur in der Schwangerschaft vorkommende HCG gibt es Hinweise darauf, dass sie eine Rolle für die Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz spielen. Wie diese Wirkung vermittelt wird, ist auch aktuell noch Gegenstand der Forschung. Wir untersuchten daher, ob die schwangerschaftsassozierten Hormone

Progesteron, Östrogen und HCG eine Induktion von MDSC bewirken können und möglicherweise hierüber ihre immunmodulatorischen Effekte vermitteln.

Angelehnt an Lechner et al. wurden PBMC mit *in vitro* wirksamen Konzentrationen von Östrogen (2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,002 µg/ml und 0,0002 µg/ml), Progesteron in den Konzentrationen 5 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,05 µg/ml und 0,005 µg/ml und HCG in den Konzentrationen 100 U/ml, 10 U/ml, 1 U/ml und 0,1 U/ml kultiviert und nach 7 Tagen der Anteil CD33⁺ MDSC in der Kultur durchflusszytometrisch bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF. Weder für die Induktion mit Östrogen (prozentualer Anteil von CD33⁺ MDSC in der Kultur nach Induktion mit Östrogen: unstimuliert 8,46 % (3,50 – 14,50 %), Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF 16,76 % (9,20 – 34,00 %), Induktion mit 2 µg/ml Östrogen 8,45 % (5,72 – 11,18 %), Induktion mit 0,2 µg/ml Östrogen 6,51 % (3,80 – 11,00 %), Induktion mit 0,02 µg/ml Östrogen 6,55 % (1,60 – 13,00 %), Induktion mit 0,002 µg/ml Östrogen 6,25 % (3,25 – 11,00 %) und Induktion mit 0,0002 µg/ml Östrogen 7,00 % (2,85 – 13,00 %), Abbildung 16A), noch für die Induktion mit Progesteron (prozentualer Anteil von CD33⁺ MDSC in der Kultur nach Induktion mit Progesteron: unstimuliert 8,11 % (4,88 – 14,50 %), Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF 17,52 % (10,00 – 34,00 %), Induktion mit 5 µg/ml Progesteron 10,62 % (6,21 – 11,00 %), Induktion mit 0,5 µg/ml Progesteron 7,30 % (1,80 – 9,00 %), Induktion mit 0,05 µg/ml Progesteron 6,30 % (2,48 – 10,00 %) und Induktion mit 0,005 µg/ml Progesteron 6,40 % (3,96 – 13,90 %), Abbildung 16B) oder HCG (prozentualer Anteil von CD33⁺ MDSC in der Kultur nach Induktion mit HCG: unstimuliert 1,83 % (0,70 – 9,00 %), Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF 14,69 % (4,79 – 23,00 %), Induktion mit 100 U/ml HCG 2,09 % (1,25 – 13,00 %), Induktion mit 10 U/ml HCG 1,65 % (0,90 – 20,00 %), Induktion mit 1 U/ml HCG 1,59 % (0,66 – 14,00 %) und Induktion mit 0,1 U/ml HCG 1,65 % (0,78 – 11,00 %), Abbildung 16C) zeigte sich eine quantitative Induktion von MDSC aus PBMC.

Auch unter zusätzlicher Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF zu allen Versuchsansätzen konnte durch keine der untersuchten Hormonkonzentrationen eine weitere Induktion von MDSC hervorgerufen werden. In der unstimulierten Kontrolle lag

der Anteil von MDSC an allen PBMC bei 4,00 % (1,08 – 10,89 %), nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF bei 17,00 % (10,00 – 24,00 %). Keine der untersuchten Konzentrationen von Östrogen führte zu einer signifikanten Zunahme des Anteils an MDSC (prozentualer Anteil von CD33⁺ MDSC in der Kultur nach Induktion mit 2 µg/ml Östrogen und 1 ng/ml GM-CSF 18,00 % (3,88 – 28,00 %), nach Induktion mit 0,2 µg/ml Östrogen und 1 ng/ml GM-CSF 13,00 % (11,63 – 18,00 %), nach Induktion mit 0,02 µg/ml Östrogen und 1 ng/ml GM-CSF 14,00 % (8,00 – 26,79 %), nach Induktion mit 0,002 µg/ml Östrogen und 1 ng/ml GM-CSF 14,61 % (3,67 – 22,00 %) und nach Induktion mit 0,0002 µg/ml Östrogen und 1 ng/ml GM-CSF 14,00 % (8,00 – 21,00 %), Abbildung 16D). Ebenso führte die zusätzliche Zugabe von Progesteron (prozentualer Anteil von CD33⁺ MDSC in der Kultur: unstimuliert 2,25 % (0,19 – 10,89 %), nach Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF 17,00 % (10,00 – 24,00 %), nach Induktion mit 5 µg/ml Progesteron und 1 ng/ml GM-CSF 14,87 % (12,00 – 29,00 %), nach Induktion mit 0,5 µg/ml Progesteron und 1 ng/ml GM-CSF 13,40 % (12,00 – 19,00 %), nach Induktion mit 0,05 µg/ml Progesteron und 1 ng/ml GM-CSF 14,00 % (10,00 – 17,02 %) und nach Induktion mit 0,005 µg/ml Progesteron und 1 ng/ml GM-CSF 14,50 % (10,00 – 20,27 %), Abbildung 16E) oder HCG (prozentualer Anteil von CD33⁺ MDSC in der Kultur: unstimuliert 1,83 % (0,89 – 6,48 %), nach Induktion mit 1 ng/ml GM-CSF 12,69 % (4,79 – 17,23 %), nach Induktion mit 100 U/ml HCG und 1 ng/ml GM-CSF 9,61 % (4,79 – 16,98 %), nach Induktion mit 10 U/ml HCG und 1 ng/ml GM-CSF 9,45 % (5,41 – 17,00 %), nach Induktion mit 1 U/ml HCG und 1 ng/ml GM-CSF 12,32 % (4,56 – 18,41 %) und nach Induktion mit 0,1 U/ml HCG und 1 ng/ml GM-CSF 8,89 % (5,00 – 17,71 %), Abbildung 16F) zu keiner weiteren Induktion von MDSC.

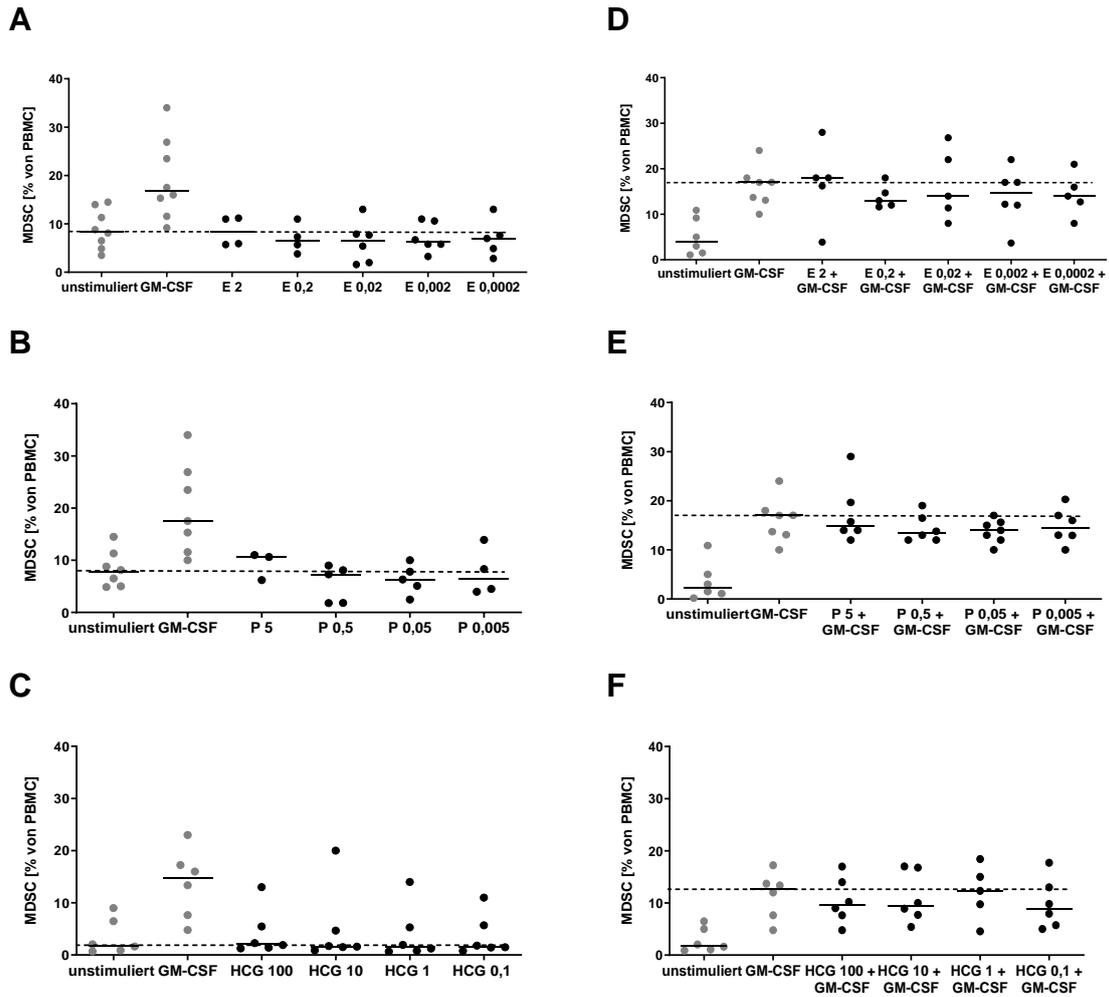


Abbildung 16: Die Hormone Östrogen, Progesteron und HCG führen nicht zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC

PBMC von gesunden, nicht-schwangeren Erwachsenen wurden isoliert und für 7 Tage unter alleiniger Zugabe der Hormone Östrogen (A), Progesteron (B) oder HCG (C) in verschiedenen Konzentrationen oder unter Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF und zusätzlicher Zugabe der Hormone Östrogen (D), Progesteron (E) oder HCG (F) in verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils CD33⁺ MDSC. (A)-(C) Punktdiagramme zur Darstellung des prozentualen Anteils von MDSC an allen PBMC ohne Zugabe weiterer Substanzen (unstimuliert), nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF (GM-CSF) und nach Zugabe von Östrogen in den Konzentrationen 2 µg/ml (E 2), 0,2 µg/ml (E 0,2), 0,02 µg/ml (E 0,02), 0,002 µg/ml (E 0,002) und 0,0002 µg/ml (E 0,0002) (A), von Progesteron in den Konzentrationen 5 µg/ml (P 5), 0,5 µg/ml (P 0,5), 0,05 µg/ml (P 0,05) sowie 0,005 µg/ml (P 0,005) (B) und von HCG in den Konzentrationen 100 U/ml (HCG 100), 10 U/ml (HCG 10), 1 U/ml (HCG 1) und 0,1 U/ml (HCG 0,1) (C). Die gestrichelte Linie zeigt den prozentualen Anteil an MDSC ohne Zugabe weiterer Substanzen an (Negativ-Kontrolle). n = 3-7. (D)-(F) Punktdiagramme zur Darstellung des prozentualen Anteils von MDSC an allen PBMC ohne Zugabe weiterer Substanzen (unstimuliert), nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF (GM-CSF) allein und nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF und Östrogen in den

Konzentrationen 2 µg/ml (E 2 + GM-CSF), 0,2 µg/ml (E 0,2 + GM-CSF), 0,02 µg/ml (E 0,02 + GM-CSF), 0,002 µg/ml (E 0,002 + GM-CSF) und 0,0002 µg/ml (E 0,0002 + GM-CSF) (D), nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF und Progesteron in den Konzentrationen 5 µg/ml (P 5 + GM-CSF), 0,5 µg/ml (P 0,5 + GM-CSF), 0,05 µg/ml (P 0,05 + GM-CSF) sowie 0,005 µg/ml (P 0,005 + GM-CSF) (E) und nach Zugabe von 1 ng/ml GM-CSF und HCG in den Konzentrationen 100 U/ml (HCG 100 + GM-CSF), 10 U/ml (HCG 10 + GM-CSF), 1 U/ml (HCG 1 + GM-CSF) und 0,1 U/ml (HCG 0,1 + GM-CSF) (F). Die gestrichelte Linie zeigt den prozentualen Anteil an MDSC nach Induktion durch GM-CSF allein. n = 6-7.

In Bezug auf die Ergebnisse der Versuche zur quantitativen Induktion von MDSC durch die schwangerschaftsassozierten Hormone Östrogen, Progesteron und HCG bzw. Induktion durch die genannten Hormone unter Zugabe von GM-CSF entschieden wir uns für eine rein deskriptive Darstellung der Daten. Eine statistische Auswertung war aufgrund der teilweise geringen Probenzahl oder dem Fehlen einzelner Werte nicht sinnvoll möglich. Aus den Abbildungen ergibt sich jedoch, dass die Zugabe der schwangerschaftsassozierten Hormone Östrogen, Progesteron und HCG nicht zu einer wesentlichen Zunahme des Anteils von MDSC führte. Die Zugabe von GM-CSF bewirkte eine Zunahme des Anteils von MDSC, darüber hinaus war jedoch durch die Kombination aus GM-CSF und den schwangerschaftsassozierten Hormonen in unseren Versuchen keine relevante Zunahme des Anteils an MDSC zu erreichen.

4. Diskussion

MDSC sind im gesunden Organismus nur in sehr geringer Zahl vorhanden und eine Akkumulation von MDSC erfolgt nur unter bestimmten Bedingungen. Zum besseren Verständnis der MDSC-Biologie ist es daher von besonderer Bedeutung, Faktoren zu identifizieren, welche die Akkumulation von MDSC begünstigen und deren Funktion beeinflussen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich während einer Schwangerschaft GR-MDSC im mütterlichen Blut und ganz besonders im Bereich der Plazenta anreichern und die mütterliche Immunantwort beeinflussen (Köstlin et al. 2014; Köstlin et al. 2016). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob bei Patientinnen mit stattgehabtem Abort die Akkumulation von GR-MDSC verändert ist und welchen Einfluss lösliches HLA-G und die schwangerschaftsassozierten Hormone Östrogen, Progesteron und HCG sowie der Kontakt zu Trophoblastzellen auf die Induktion und Funktion von GR-MDSC haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass (1) im Rahmen von Aborten die Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta vermindert war, dass (2) lösliches HLA-G eine quantitative und funktionelle Induktion von MDSC bewirkte und dass dieser Effekt über den Rezeptor ILT4 vermittelt wurde, dass (3) eine Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 zu einer funktionellen Induktion von MDSC führte und dass (4) die schwangerschaftsassozierten Hormone Östrogen, Progesteron und HCG keinen relevanten Effekt auf die Induktion von MDSC hatten.

4.1 Die Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta ist bei Patientinnen mit Abort vermindert

Physiologisch kommt es im Rahmen einer unkompliziert verlaufenden Schwangerschaft zu einer Zunahme von GR-MDSC im peripheren Blut (Köstlin et al. 2014) sowie zu einer Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta (Köstlin et al. 2016) als dem Ort mit dem dichtesten Kontakt zwischen Mutter und semiallogenem Fetus. Insbesondere hier sind immunregulatorische Mechanismen von Bedeutung und erforderlich für eine unkomplizierte

Schwangerschaft. Wir konnten zeigen, dass GR-MDSC in der Plazenta bei Patientinnen mit spontanem Abort vermindert sind im Vergleich zu Frauen mit einer intakten Schwangerschaft.

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Nair et al., die zeigen konnten, dass bei Frauen mit Abort eine verminderte Anzahl an funktionell aktiven MDSC sowohl im Endometrium als auch im peripheren Blut vorliegt (Nair et al. 2015). In der Zwischenzeit konnte die Bedeutung von MDSC für den Schwangerschaftserhalt auch *in vivo* gezeigt werden. Ostrand-Rosenberg et al. und Pan et al. zeigten, dass bei Mäusen eine Depletion von MDSC zu einer höheren Rate an Aborten führte und dass nach adoptivem Transfer von MDSC bzw. *in vivo* Induktion von MDSC die Abortrate wieder reduziert werden konnte (Ostrand-Rosenberg et al. 2017; Pan et al. 2016a; Pan et al. 2016b).

Diese Erkenntnisse stützen die These, dass MDSC bedeutsam für die Vermittlung und Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz sind und eine fehlende Zunahme von MDSC im peripheren Blut und/oder eine verminderte Akkumulation von MDSC in der Plazenta zu Schwangerschaftskomplikationen führen. Weitere Studien sind notwendig, um die Ursachen einer unzureichenden MDSC-Akkumulation während der Schwangerschaft aufzuklären und damit therapeutische Ansatzpunkte zur Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen bei Aborten zu entwickeln.

4.2 Wirkung von sHLA-G auf die Induktion und Funktion von GR-MDSC

Obwohl HLA-G als toleranzinduzierendes Molekül während der Schwangerschaft und im Rahmen von Tumorerkrankungen bereits gut untersucht ist, war bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit nichts über den Einfluss von HLA-G auf die MDSC-Funktion während der Schwangerschaft bekannt. Während der Schwangerschaft wird HLA-G überwiegend von Trophoblastzellen gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der feto-maternalen Toleranz. Wir konnten zeigen, dass GR-MDSC während der Schwangerschaft Rezeptoren für HLA-G exprimieren und deren Expression auf GR-MDSC aus der Plazenta

verändert ist, dass HLA-G zu einer quantitativen und funktionellen Induktion von MDSC führt und dass dies über den Rezeptor ILT4 vermittelt wird.

Zunächst wurde untersucht, ob GR-MDSC während der Schwangerschaft Rezeptoren für HLA-G exprimieren. Auf myeloiden Zellen spielen vor allem die Rezeptoren ILT2 und ILT4 eine Rolle (Rouas-Freiss et al. 2014; Lyngé Nilsson et al. 2014). Bezüglich der Expression von HLA-G-Rezeptoren konnten wir zeigen, dass ILT2 und ILT4 über die gesamte Schwangerschaft hinweg auf GR-MDSC aus dem peripheren Blut exprimiert werden und dass die Expression von ILT4 im Verlauf der Schwangerschaft abnahm, wohingegen die Expression des Rezeptors ILT2 konstant blieb. Außerdem kam es auf GR-MDSC aus der Plazenta zu einer Heraufregulation von ILT4 im Vergleich zu GR-MDSC aus dem peripheren Blut. Die HLA-G-Spiegel steigen in der frühen Schwangerschaft an und bleiben über die gesamte Dauer der Schwangerschaft erhöht (Hunt et al. 2000); zum Ende der Schwangerschaft hin nehmen die HLA-G-Konzentrationen im Serum jedoch ab und sind am Geburtstermin signifikant niedriger als in der Mitte der Schwangerschaft (Klitkou et al. 2015; Hackmon et al. 2004). Da HLA-G durch Bindung an seine Rezeptoren ILT2 und ILT4 deren Expression stimuliert (Lyngé Nilsson et al. 2014), könnte die Abnahme der Expression von ILT4 auf GR-MDSC im Verlauf der Schwangerschaft durch die abnehmenden HLA-G-Spiegel verursacht sein (Hunt et al. 2000). Die verstärkte Expression von ILT4 auf GR-MDSC aus der Plazenta im Vergleich zu GR-MDSC aus dem peripheren Blut könnte darin begründet sein, dass die von Trophoblastzellen – den primären Produzenten von HLA-G in der Schwangerschaft – gebildete Isoform von HLA-G vor allem an den Rezeptor ILT4 bindet (Rouas-Freiss et al. 2014) und damit vornehmlich dessen Expression stimuliert. Auch die Tatsache, dass nahezu alle GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer den Rezeptor ILT4 exprimierten, jedoch nur rund 70 % den Rezeptor ILT2, könnte darauf hindeuten, dass ILT4 die größere Bedeutung für die Interaktion zwischen GR-MDSC und HLA-G in der Schwangerschaft zukommt. Auch in früheren Studien wurde vermutet, dass in Bezug auf eine Interaktion zwischen HLA-G und monozytären Zellen in der Dezidua der Rezeptor ILT4 eine größere Rolle spielt (Hunt et al. 2005). Die starke Expression von ILT4 auf plaGR-MDSC in der frühen

Schwangerschaft könnte darauf hindeuten, dass im ersten Trimenon der Schwangerschaft mit der Implantation des Embryos und dem Einwachsen der Plazenta die immunologische Toleranz gegenüber fetalen Antigenen besonders relevant ist. Möglicherweise führen die zum Ende der Schwangerschaft hin abnehmenden HLA-G-Spiegel in Zusammenhang mit der verminderten Expression des Rezeptors ILT4 auf GR-MDSC aus dem Blut und auf plaGR-MDSC dazu, dass eine Immunreaktion auf kindliche Antigene nicht mehr ausreichend unterdrückt wird, was dann den Geburtsvorgang mit initiieren könnte (Hackmon et al. 2004).

Es ist anzumerken, dass die Expression von ILT2 und ILT4 auf GR-MDSC nicht nur auf die Schwangerschaft beschränkt ist; auch GR-MDSC gesunder, nicht-schwangerer Erwachsener exprimierten die beiden Rezeptoren, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Die Expression von ILT2 und ILT4 ist damit nicht spezifisch für die Schwangerschaft, hat jedoch wahrscheinlich unter physiologischen Bedingungen, in denen HLA-G nahezu nicht vorhanden ist, keine Bedeutung. Die Expression dieser beiden Rezeptoren könnte aber in anderen Situationen, in denen HLA-G verstärkt gebildet wird, wie zum Beispiel im Rahmen von Krebserkrankungen, eine Bedeutung bekommen.

Um eine mögliche direkte Wirkung von HLA-G auf die suppressiven Eigenschaften von MDSC zu untersuchen, stimulierten wir plaGR-MDSC mit sHLA-G. Wir wählten diese Zellen, da plaGR-MDSC die stärkste Expression der HLA-G-Rezeptoren aufwiesen und damit wahrscheinlich am empfindlichsten auf eine Stimulation mit sHLA-G reagieren. Wir konnten zeigen, dass die direkte Zugabe von sHLA-G zu GR-MDSC aus der Plazenta deren T-Zell-suppressive Kapazität verstärkte. In der Literatur ist beschrieben, dass HLA-G selbst sowohl über direkte als auch über indirekte Mechanismen Lymphozyten in ihrer Funktion beeinflusst. Direkte Effekte sind beispielsweise eine Reduktion der lytischen Aktivität von NK-Zellen (Rouas-Freiss et al. 1997), der Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und eine Apoptose-Induktion von CD8⁺ T-Lymphozyten (Hunt et al. 2005). Als indirekter Effekt ist die Hemmung der Ausreifung von Antigen-präsentierenden Zellen beschrieben (Liang et al. 2002). Wir konnten nun

erstmals zeigen, dass HLA-G seine Wirkung auch über eine Interaktion mit MDSC vermittelt und über eine Verstärkung der suppressiven Funktion von MDSC einen indirekten hemmenden Einfluss auf andere Immunzellen hat.

Hinsichtlich möglicher Mechanismen, über die eine Stimulation mit sHLA-G die suppressive Kapazität von MDSC steigert, untersuchten wir die Expression der klassischen MDSC-Effektormechanismen – Arg1, iNOS und ROS. Wir konnten zeigen, dass die Expression von Arg1 und die Produktion von ROS nach Stimulation mit sHLA-G unverändert blieb, während die Expression von iNOS in plaGR-MDSC abnahm. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Zhang et al. bei transgenen ILT2-Mäusen und Stimulation mit HLA-G zeigen, dass eine stärkere suppressive Aktivität von MDSC aus diesen Tieren mit einer höheren Transkriptionsrate von Arg1 einherging. Die Transkriptionsrate von iNOS war weder bei MDSC von ILT2-Mäusen noch bei Kontrollmäusen messbar (Zhang et al. 2008). Wie bereits diskutiert, scheinen nach unseren Ergebnissen die Effekte von sHLA-G während der Schwangerschaft vorwiegend über ILT4 vermittelt zu werden, so dass hier möglicherweise andere Signalwege als in der Studie von Zhang et al. aktiviert werden. Auch ist es möglich, dass *in vivo* durch die Interaktion mit verschiedenen anderen Zelltypen und weiteren löslichen Faktoren andere Effekte auftreten als in unseren *in vitro* Kulturen.

Ein weiterer Mechanismus, über den MDSC ihre suppressive Wirkung vermitteln, ist die Expression des Enzyms IDO (Yu et al. 2013). Nachfolgende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Stimulation mit sHLA-G zu einer erhöhten Expression von IDO durch MDSC führte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Lee et al., die zeigen konnten, dass sHLA-G bei Makrophagen zu einer erhöhten IDO-Aktivität führt (Lee et al. 2015). Auch ist bekannt, dass IDO eine bedeutende Rolle in der Schwangerschaft und bei der Vermittlung der feto-maternalen Toleranz spielt und dass eine verminderte Expression oder Aktivität von IDO mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie assoziiert ist (Munn et al. 1998; Santillan et al. 2015; Kudo et al. 2003). Eine verstärkte IDO-Expression könnte damit ein Mechanismus sein, wie HLA-G seine

aktivierende Wirkung auf die MDSC-Funktion während der Schwangerschaft vermittelt.

Weiter konnten wir zeigen, dass sHLA-G zu einer Induktion von MDSC aus PBMC führt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit drei Studien bei Mäusen, die ebenfalls einen positiven Einfluss von HLA-G auf die Induktion von MDSC beschreiben. Zhang et al. konnten zeigen, dass die Zugabe von HLA-G bei Mäusen via ILT2 zu einer Induktion von MDSC führte und hierdurch das Überleben eines allogenen Hauttransplantats verlängert werden konnte (Zhang et al. 2008). Agaugué et al. zeigten in einem Tiermodell, in dem Mäuse unter einem HLA-G-exprimierenden Tumor litten, dass es durch HLA-G zu einer Zunahme von MDSC im peripheren Blut der Mäuse kam und hierdurch eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort unterdrückt wurde (Agaugué et al. 2011). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Loumagne et al., die ebenfalls im Mausmodell zeigten, dass von Tumorzellen gebildetes, lösliches HLA-G5 zu einer Induktion von funktionell aktiven MDSC führte (Loumagne et al. 2014).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass HLA-G in verschiedenen Situationen, wie z.B. nach Transplantationen oder im Rahmen von Tumorerkrankungen, MDSC induzieren kann. Wir konnten nun erstmals zeigen, dass HLA-G auch beim Menschen *in vitro* zu einer Zunahme von MDSC führt. Physiologisch kommt es während einer unkomplizierten Schwangerschaft zu einer Zunahme des HLA-G-Spiegels im Serum (Hunt et al. 2000; Alegre et al. 2007) sowie zu einer Zunahme von GR-MDSC im peripheren Blut der Schwangeren (Köstlin et al. 2014). Hingegen sind verminderte Spiegel an HLA-G und eine gestörte Akkumulation von MDSC während der Schwangerschaft mit Schwangerschaftskomplikationen wie Aborten, Präeklampsie und Frühgeburtlichkeit assoziiert (Dahl et al. 2014; Keskin et al. 2013; Yie et al. 2004; Nair et al. 2015). Damit liegt die Vermutung nahe, dass während der Schwangerschaft von Trophoblastzellen gebildetes HLA-G MDSC induzieren kann und hierüber zur Vermittlung der feto-maternalen Toleranz und damit zum unkomplizierten Verlauf der Schwangerschaft beiträgt.

Zuletzt konnten wir durch Versuche mit blockierenden Antikörpern zeigen, dass die Induktion von MDSC durch HLA-G über den Rezeptor ILT4 vermittelt wird.

Bislang ist wenig über die Funktion des Rezeptors ILT4 auf myeloiden Zellen bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass HLA-G mittels des Rezeptors ILT4 Phagozytosefunktionen durch reife Neutrophile hemmt (Baudhuin et al. 2013) und dass die Ausreifung dendritischer Zellen durch eine Interaktion zwischen HLA-G und ILT4 gestört wird (Liang et al. 2008). Ristich et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass in transgenen Mäusen, die den Rezeptor ILT4 auf myeloiden dendritischen Zellen exprimierten, das Überleben eines allogenen Hauttransplantats verlängert war (Ristich et al. 2007). Außerdem scheint sHLA-G über ILT4 in myeloiden dendritischen Zellen einen toleranzfördernden Phänotyp zu induzieren, was dann wiederum zu einer Induktion von Tregs führt (Alsahebhosoul et al. 2015). Die einzigen uns bisher bekannten Studien zu MDSC und HLA-G zeigen *in vivo* in Mäusen eine stimulierende Wirkung von HLA-G über den Rezeptor ILT2 (Zhang et al. 2008). Unsere Ergebnisse deuten nun darauf hin, dass HLA-G via ILT4 auf die Induktion von MDSC beim Menschen wirkt. Dies passt zu der Beobachtung, dass die von Trophoblastzellen gebildete Isoform von HLA-G bevorzugt an den Rezeptor ILT4 bindet (Rouas-Freiss et al. 2014). Möglicherweise sind verschiedene Isoformen von HLA-G mit unterschiedlicher Affinität für die Rezeptoren ILT2 und ILT4 dafür verantwortlich, dass je nach Kontext die Wirkung mehr über den einen oder den anderen Rezeptor vermittelt wird.

4.3 Wirkung einer Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 auf die Induktion und Funktion von MDSC

Der engste Kontakt zwischen mütterlichen und kindlichen Zellen findet im Bereich der Plazenta statt. Eine wichtige Zellpopulation, von der immunmodulatorische Eigenschaften bereits bekannt sind, sind Trophoblastzellen (Göhner et al. 2017; Zhou et al. 2008). Wir konnten zeigen, dass eine Ko-Kultur von PBMC mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 zu einer funktionellen Induktion von MDSC führte. Analog konnten Poloski et al. zeigen, dass eine Ko-Kultur mit JEG-3 Tregs induzierte. In dieser Studie war der Effekt über HCG vermittelt (Poloski et al. 2016). Als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus der MDSC-Induktion

über JEG-3 konnte unsere Arbeitsgruppe in weiterführenden Untersuchungen zeigen, dass es auf JEG-3 induzierten MDSC zu einer Heraufregulation des Rezeptors CXCR4 kam und dass eine pharmakologische Blockade von CXCR4 mittels des Inhibitors AMD3100 die suppressive Aktivität der induzierten MDSC reduzierte (Köstlin et al. 2016). CXCL12, der Ligand für CXCR4, wird von Trophoblastzellen exprimiert (Piao et al. 2012; Hanna et al. 2003) und eine Assoziation einer erhöhten CXCL12-Expression und einer MDSC-Akkumulation im Uterus konnte bereits von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden (Zhao et al. 2015). Die Blockade von CXCR4 führte allerdings nur zu einer teilweisen Aufhebung der suppressiven Funktion von MDSC, so dass davon auszugehen ist, dass weitere Mechanismen hier eine Rolle spielen. Hier könnte z.B. die Expression von HLA-G durch Trophoblastzellen relevant sein (s.o.).

4.4 Wirkung von Progesteron, Östrogen und HCG auf die Induktion von MDSC

Die Steroidhormone Progesteron und Östrogen liegen in der Schwangerschaft in deutlich erhöhten Konzentrationen vor, das Glykoprotein HCG ist unter physiologischen Bedingungen nur während der Schwangerschaft vorhanden. Daher untersuchten wir im Weiteren die Wirkung dieser drei Hormone auf die Akkumulation von MDSC. Wir konnten zeigen, dass Progesteron, Östrogen und HCG weder allein noch in Kombination mit GM-CSF in den von uns eingesetzten Konzentrationen eine quantitative Induktion von MDSC bewirken konnten.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte eine andere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass die Serumkonzentrationen an Östrogen und Progesteron in der humanen Schwangerschaft positiv mit der Zellzahl an MO-MDSC im peripheren Blut korrelieren und dass 17β -Östradiol *in vitro* MO-MDSC induziert (Pan et al. 2016a). Die in dieser Studie eingesetzten Hormonkonzentrationen lagen mit 1-20 μ M in dem auch von uns untersuchten Konzentrationsbereich. Allerdings wurde der Kultur zusätzlich zu einer wesentlich höheren als von uns verwendeten Konzentration an GM-CSF noch IL-6 zugesetzt, was ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte. Die Diskrepanz der Ergebnisse in

Bezug auf den vorherrschenden MDSC-Subtyp (MO-MDSC vs. GR-MDSC) erklären die Autoren der Studie durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund oder möglicherweise unterschiedliche Zytokinmilieus. Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte *in vivo*, dass 17 β -Östradiol zu einer Induktion von MDSC in Mäusen führt und dass dies über TNF- α vermittelt wird (Dong et al. 2015). Svoronos et al. konnten zudem zeigen, dass Östrogen in verschiedenen Tumormodellen die immunsuppressiven Fähigkeiten von MDSC *in vivo* steigerte (Svoronos et al. 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zwischenzeitlich durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen Hinweise darauf gibt, dass Östrogen eine Rolle bei der Akkumulation und Funktion von MDSC spielt. Dass in unserer Studie diese Effekte nicht nachgewiesen werden konnten, könnte an unterschiedlichen Kulturmethode, an abweichenden Phänotypisierungsmethoden und an der Kombination mit anderen, sich positiv auf die Induktion von MDSC auswirkenden Substanzen liegen. Inwieweit die Wirkung von Östrogen auf die Anzahl und Funktion von MDSC therapeutisch genutzt werden könnte, sollte Inhalt weiterer Studien sein.

In Bezug auf Progesteron fanden wir ebenfalls keine quantitative Beeinflussung von MDSC. Unseres Wissens existiert bislang nur eine Studie, die an humanen Zellen die Wirkung von Progesteron auf eine Induktion von MDSC untersucht hat. Hier konnte äquivalent zu unseren Ergebnissen keine quantitative Induktion von MDSC aus humanen PBMC durch Progesteron gezeigt werden (Pan et al. 2016b). Jedoch zeigte die gleiche Arbeitsgruppe im Mausmodell, dass es bei trächtigen Mäusen zu einer Zunahme von GR-MDSC im peripheren Blut kam und dass Progesteron *in vitro* GR-MDSC aus murinem Knochenmark induzieren konnte (Pan et al. 2016b). Diese Progesteron-induzierten MDSC hatten eine erhöhte suppressive Aktivität und eine verstärkte ROS-Produktion (Pan et al. 2016b). Die hier verwendeten Progesteron-Konzentrationen lagen im gleichen Bereich wie die von uns eingesetzten Konzentrationen. Eine weitere Studie zeigte an Brustkrebs-tragenden Mäusen, dass Medroxyprogesteronacetat (MPA) indirekt über eine Wirkung auf die Tumorzellen eine quantitative Induktion von

MDSC bewirkte und dass MDSC, die aus Mäusen nach Gabe von MPA isoliert wurden, über stärkere immunsuppressive Eigenschaften verfügten (Spallanzani et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Progesteron *in vivo* Effekte auf die Menge und Funktion von MDSC hat, diese jedoch *in vitro* nur schwer nachvollziehbar sind, was durch eine Interaktion mit weiteren Zelltypen erklärt werden könnte.

Hinsichtlich des Einflusses von HCG auf die Menge und Funktion von MDSC existieren unseres Wissens nach bisher keine weiteren Untersuchungen. Die von uns verwendeten Konzentrationen lagen mit 0,1-100 U/ml innerhalb der in der Schwangerschaft physiologisch vorliegenden Konzentrationen. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Stimulation mit HCG *in vitro* zu einer Zunahme von humanen Tregs führte (Poloski et al. 2016). In Anbetracht der Daten zu Progesteron und Östrogen scheint es sinnvoll, die Wirkung von HCG auf die MDSC-Induktion und -Funktion ebenfalls im Tiermodell weiter zu untersuchen.

4.5 Methodenkritik und Limitationen unseres Systems

Im Rahmen der Abortstudie wurde der Anteil von GR-MDSC in der Plazenta von Patientinnen mit stattgehabtem Spontanabort und Frauen mit elektivem Schwangerschaftsabbruch durchflusszytometrisch bestimmt. In Bezug auf das Alter gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientinnen mit Abort und den Frauen mit Interruptio. Im Vergleich zwischen den beiden Gruppen erfolgte der Eingriff jedoch bei der Kontrollgruppe früher (9. SSW (Interruptio) vs. 11. SSW (Abort)), was einen nicht berücksichtigten Einfluss auf die Menge an MDSC im Gewebe haben könnte. Außerdem war die Zeitspanne zwischen Abort und Eingriff – ebenfalls ein möglicher Einflussfaktor - bei vielen Frauen nicht bekannt. Funktionelle Untersuchungen der aus dem Ausschabungsmaterial gewonnenen MDSC waren aufgrund der geringen Mengen leider nicht möglich, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob ein Unterschied in der suppressiven Aktivität zwischen MDSC von Abortpatientinnen und MDSC von Frauen mit intakter Schwangerschaft besteht. Untersuchungen zu der Frage, ob GR-MDSC aus der Plazenta oder dem peripheren Blut von Patientinnen mit Abort

zusätzlich in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, sollten Gegenstand weiterer Studien sein.

Für die Induktionsversuche wurden PBMC von gesunden, nicht-schwangeren Erwachsenen verwendet, für die Versuche mit plaGR-MDSC Plazenten von reifen Neugeborenen. Hierbei gilt zu beachten, dass es stets zu interindividuellen Unterschieden kommen kann und diese Unterschiede statistisch nicht vollständig ausgeglichen werden können. Bei der Durchführung der Induktionsversuche orientierten wir uns an etablierten Protokollen, so dass die Ergebnisse vergleichbar sind mit bereits vorhandener Literatur. Die Verarbeitung der Plazentaprobe erfolgte rein mechanisch. Auf den Einsatz von Enzymen wurde bewusst verzichtet, um eine mögliche Aktivierung von Granulozyten durch die Behandlung mit Kollagenasen oder DNAsen zu verhindern, welche dann unter Umständen in der PBMC-Fraktion sedimentieren könnten, was eine Abgrenzung zu MDSC sehr schwierig machen würde. Zur durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils an MDSC nach der Zellkultur im Rahmen der Induktionsversuche erfolgte eine Oberflächenfärbung des Antigens CD33. Da CD33 ein allgemeiner Marker myeloider Zellen ist und bei der Quantifizierung auch andere Zellen als MDSC miterfasst werden könnten, wurden zusätzlich zu den quantitativen Messungen bei den meisten Versuchen im Anschluss funktionelle Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass es sich tatsächlich um MDSC handelte. Eine Färbung mit CD66b, wie sie üblicherweise zur durchflusszytometrischen Messung von GR-MDSC durchgeführt wird, ist bei den Induktionsversuchen nicht möglich, da CD66b nach mehrtägiger Zellkultur nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Zur Bestimmung der suppressiven Fähigkeiten von MDSC wendeten wir einen T-Zell-Proliferationsassay an und bestimmten die Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Zugabe von MDSC. Weitere Untersuchungen wie ein Nachweis der Produktion von IL-2 oder Interferon- γ durch aktivierte T-Zellen mittels ELISA wären ergänzend möglich gewesen.

Für die Versuche zur Induktion von MDSC fokussierten wir uns in dieser Arbeit auf die schwangerschaftsassozierten Hormone Progesteron, Östrogen und HCG

sowie auf das Molekül HLA-G. Es gibt zahlreiche weitere – überwiegend aus pathologischen Situationen bekannte – Faktoren, von denen man annimmt, dass sie ebenfalls zu einer Akkumulation oder funktionellen Aktivierung von MDSC führen können (Zhao et al. 2016). Hier sind unter anderem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Lechner et al. 2011; Nakamura et al. 2013) und IL-6 (Lechner et al. 2011) zu nennen. Diese Botenstoffe kommen auch im Rahmen einer Schwangerschaft vor und könnten damit ebenso eine Rolle bei der Induktion von MDSC in der Schwangerschaft spielen.

Als Weiterentwicklung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird aktuell in unserer Arbeitsgruppe die Wirkung von HLA-G bzw. dessen murinem Korrelat Qa2 (Comiskey et al. 2003) auf die MDSC-Akkumulation während der Schwangerschaft und den Schwangerschaftserhalt *in vivo* untersucht. Die bisherigen Ergebnisse deuten sehr darauf hin, dass die *in vitro* nachgewiesenen Effekte auch *in vivo* relevant sind. Möglicherweise könnte die Interaktion von HLA-G mit MDSC während der Schwangerschaft als Ziel für eine zellbasierte Therapie von immunologischen Schwangerschaftskomplikationen dienen.

4.6 Schlussfolgerung

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Bedeutung von GR-MDSC für die feto-maternale Toleranz und einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf weiter untermauert werden: Wir konnten im Rahmen unserer Abortstudie zeigen, dass die Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta bei Patientinnen mit Abort im Vergleich zu Patientinnen mit intakter Schwangerschaft vermindert ist. Dies verdeutlicht indirekt, wie wichtig das Vorhandensein von MDSC für die Vermittlung und Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz ist, indem MDSC den semiallogenen Fetus vor einer Abstoßungsreaktion durch mütterliche Immunzellen schützen. Zudem konnten wir zeigen, dass eine Interaktion zwischen HLA-G und MDSC im Sinne einer Induktion von MDSC durch HLA-G stattfindet und damit einen bislang unbekanntem Mechanismus der Toleranzinduktion über HLA-G beschreiben. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die HLA-G-Rezeptoren ILT2 und ILT4 auf MDSC während

der Schwangerschaft reguliert werden und dass die Wirkung von HLA-G auf MDSC überwiegend über den Rezeptor ILT4 vermittelt wurde. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, die immunologischen Vorgänge während der Schwangerschaft besser verstehen und erklären zu können. Diese neuen Erkenntnisse können Ansatzpunkte für neue, zellbasierte Therapiestrategien bei Schwangerschaftskomplikationen wie (habituellen) Aborten, Präeklampsie und Frühgeburtlichkeit liefern. Darüber hinaus können mit dem besseren Verständnis der Funktion von MDSC und deren funktioneller Beeinflussung durch HLA-G neue therapeutische Optionen für andere Situationen, in denen die Funktionen von MDSC eine Rolle spielen, wie Organtransplantationen, Tumorerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen entwickelt werden.

5. Zusammenfassung

In der Schwangerschaft steht das mütterliche Immunsystem vor einer besonderen Herausforderung: Einerseits darf es nicht zu einer Abstoßungsreaktion gegen den semiallogenen Fetus kommen, andererseits muss weiterhin eine suffiziente Immunabwehr gewährleistet sein. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren und Jahrzehnten sind die zugrundeliegenden Mechanismen bislang nur teilweise verstanden.

In der jüngsten Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass myeloide Suppressorzellen (MDSC) und insbesondere granulozytäre MDSC (GR-MDSC) eine wichtige Bedeutung für die Vermittlung der feto-maternalen Toleranz haben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob GR-MDSC in der Plazenta von Frauen mit Spontanabort im Vergleich zu Frauen mit intakter Schwangerschaft vermindert sind. Zudem wurden mögliche Mechanismen der MDSC-Induktion während der Schwangerschaft *in vitro* untersucht. Hierzu wurde ein etabliertes Kulturmodell gewählt, in dem mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut nicht-schwangerer Erwachsener mit verschiedenen schwangerschafts-assoziierten Substanzen – dem löslichen MHC Klasse I Molekül sHLA-G, den Hormonen Östrogen, Progesteron und HCG oder mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 ko-kultiviert wurden und dann die Expression von MDSC und deren Funktion durchflusszytometrisch untersucht wurde.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Rahmen von Aborten die Akkumulation von GR-MDSC in der Plazenta vermindert war. Weiter konnte gezeigt werden, dass das MHC Klasse I-Molekül sHLA-G *in vitro* eine quantitative und funktionelle Induktion von MDSC bewirkte und dass dieser Effekt über den Rezeptor ILT4 vermittelt wurde. Auch eine Ko-Kultur mit der humanen Trophoblastzelllinie JEG-3 führte zu einer funktionellen Induktion von MDSC. Die schwangerschafts-assoziierten Hormone Östrogen, Progesteron und HCG hatten dagegen *in vitro* in unseren Versuchen keinen relevanten Effekt auf die Induktion von MDSC.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass (GR-) MDSC eine besondere Rolle bei der Vermittlung der feto-maternalen Toleranz zukommt. Diese Ergebnisse könnten Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer zellbasierter Therapiestrategien bei immunologischen Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, Aborten oder Frühgeburtlichkeit bieten.

Liste der Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Köstlin, Natascha; Hofstädter, Kathrin; Ostermeir, Anna-Lena; Spring, Bärbel; Leiber, Anja; Haen, Susanne; Abele, Harald; Bauer, Peter; Pollheimer, Jürgen; Hartl, Dominik; Poets, Christian F.; Gille, Christian (2016): Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (3), S. 1132–1145. DOI: 10.4049/jimmunol.1500340.

Köstlin, Natascha; Ostermeir, Anna-Lena; Spring, Bärbel; Schwarz, Julian; Marmé, Alexander; Walter, Christina B.; Poets, Christian F.; Gille, Christian (2017): HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. In: *European journal of immunology* 47 (2), S. 374–384. DOI: 10.1002/eji.201646564.

Ostermeir, Anna-Lena; Spring, Bärbel; Marmé, Alexander; Poets, Christian F.; Gille, Christian; Köstlin, Natascha (2016): HLA-G modulates accumulation and activation of myeloid-derived suppressor cells during pregnancy. Posterbeitrag. Pediatric Academic Societies (PAS) 2016 Annual Meeting. Baltimore.

Literaturverzeichnis

Agagué, Sophie; Carosella, Edgardo D.; Rouas-Freiss, Nathalie (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. In: *Blood* 117 (26), S. 7021–7031. DOI: 10.1182/blood-2010-07-294389.

Alegre, Estibaliz; Díaz-Lagares, Angel; LeMaout, Joel; López-Moratalla, Natalia; Carosella, Edgardo D.; González, Alvaro (2007): Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy. Longitudinal study during pregnancy. In: *Human immunology* 68 (8), S. 661–667. DOI: 10.1016/j.humimm.2007.04.007.

Alegre, Estibaliz; Rizzo, Roberta; Bortolotti, Daria; Fernandez-Landázuri, Sara; Fainardi, Enrico; González, Alvaro (2014): Some basic aspects of HLA-G biology. In: *Journal of immunology research* 2014, S. 657625. DOI: 10.1155/2014/657625.

Alsahebhosoul, Fereshteh; Hosseini, Ahmad Zavarani; Salehi, Rasoul; Etemadifar, Masood; Esmail, Nafiseh; Jamshidian, Azam (2015): Evaluation of Soluble Human Leukocyte Antigen-G (sHLA-G) Isoforms and Regulatory T Cells in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. In: *Iran J Allergy Asthma Immunol* 14 (3), S. 298–305, zuletzt geprüft am 18.09.2017.

Ando, Noriko; Hirahara, Fumiki; Fukushima, Jun; Kawamoto, Susumu; Okuda, Kenji; Funabashi, Toshiya; Gorai, Itsuo; Minaguchi, Hiroshi (1998): Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 40 (1), S. 48–56. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1998.tb00388.x.

Apps, Richard; Murphy, Shawn P.; Fernando, Raymond; Gardner, Lucy; Ahad, Tashmeeta; Moffett, Ashley (2009): Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. In: *Immunology* 127 (1), S. 26–39. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03019.x.

ATCC: JEG-3 (ATCC® HTB-36) Homo sapiens placenta choriocarcinoma. Online verfügbar unter https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-36.aspx?geo_country=de#characteristics, zuletzt geprüft am 04.01.2020.

Ayatollahi, Maryam; Geramizadeh, B.; Samsami, Alamtaj (2005): Transforming growth factor beta-1 influence on fetal allografts during pregnancy. In: *Transplantation proceedings* 37 (10), S. 4603–4604. DOI: 10.1016/j.transproceed.2005.11.023.

Baudhuin, Jeremy; Migraine, Julie; Faivre, Valerie; Loumagne, Laure; Lukaszewicz, Anne-Claire; Payen, Didier; Favier, Benoit (2013): Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (44), S. 17957–17962. DOI: 10.1073/pnas.1221535110.

Billingham, Rupert E.; Brent, Leslie; Medawar, Peter B. (1953): Actively acquired tolerance of foreign cells. In: *Nature* 172 (4379), S. 603–606. DOI: 10.1038/172603a0.

Brandau, Sven; Trellakis, Sokratis; Bruderek, Kirsten; Schmaltz, Dominik; Steller, Gabriele; Elian, Motaz; Suttman, Henrik; Schenck, Marcus; Welling, Jürgen; Zabel, Peter; Lang, Stephan (2011): Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. In: *Journal of leukocyte biology* 89 (2), S. 311–317. DOI: 10.1189/jlb.0310162.

Bronte, Vincenzo; Brandau, Sven; Chen, Shu-Hsia; Colombo, Mario P.; Frey, Alan B.; Greten, Tim F.; Mandruzzato, Susanna; Murray, Peter J.; Ochoa, Augusto; Ostrand-Rosenberg, Suzanne; Rodriguez, Paulo C.; Sica, Antonio; Umansky, Viktor; Vonderheide, Robert H.; Gibrilovich, Dmitry I. (2016): Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. In: *Nature communications* 7, S. 12150. DOI: 10.1038/ncomms12150.

Cheng, Shi-Bin; Sharma, Surendra (2015): Interleukin-10: A pleiotropic regulator in pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N. Y. : 1989)* 73 (6), S. 487–500. DOI: 10.1111/aji.12329.

Comiskey, Martina; Goldstein, Carmit Y.; Fazio, Sally R. de; Mammolenti, Michele; Newmark, Judith A.; Warner, Carol M. (2003): Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product. In: *Human immunology* 64 (11), S. 999–1004. DOI: 10.1016/j.humimm.2003.08.352.

Corzo, Cesar A.; Cotter, Matthew J.; Cheng, Pingyan; Cheng, Fendong; Kusmartsev, Sergei; Sotomayor, Eduardo; Padhya, Tapan; McCaffrey, Thomas V.; McCaffrey, Judith C.; Gibrilovich, Dmitry I. (2009): Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (9), S. 5693–5701. DOI: 10.4049/jimmunol.0900092.

Crow, John P. (1997): Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are Sensitive Indicators of Peroxynitrite in Vitro: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. In: *Nitric Oxide* 1 (2), S. 145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.

Cubro, Hajrunisa; Kashyap, Sonu; Nath, Meryl C.; Ackerman, Allan W.; Garovic, Vesna D. (2018): The Role of Interleukin-10 in the Pathophysiology of Preeclampsia. In: *Current hypertension reports* 20 (4), S. 1–15. DOI: 10.1007/s11906-018-0833-7.

Dahl, Mette; Djuricic, Snezana; Hviid, Thomas Vauvert F. (2014): The many faces of human leukocyte antigen-G. Relevance to the fate of pregnancy. In: *Journal of immunology research* 2014, S. 591489. DOI: 10.1155/2014/591489.

Delano, Matthew J.; Scumpia, Philip O.; Weinstein, Jason S.; Coco, Dominique; Nagaraj, Srinivas; Kelly-Scumpia, Kindra M.; O'Malley, Kerri A.; Wynn, James L.; Antonenko, Svetlana; Al-Quran, Samer Z.; Swan, Ryan; Chung, Chun-Shiang; Atkinson, Mark A.; Ramphal, Reuben; Gibrilovich, Dmitry I.; Reeves,

Wesley H.; Ayala, Alfred; Phillips, Joseph; Laface, Drake; Heyworth, Paul G.; Clare-Salzler, Michael; Moldawer, Lyle L. (2007): MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (6), S. 1463–1474. DOI: 10.1084/jem.20062602.

Dimova, Tanya; Nagaeva, Olga; Stenqvist, Ann-Christin; Hedlund, Malin; Kjellberg, Lennart; Strand, Magnus; Dehlin, Eva; Mincheva-Nilsson, Lucia (2011): Maternal Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua. A phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 66 Suppl 1, S. 44–56. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01046.x.

Dong, Guanjun; You, Ming; Fan, Hongye; Ji, Jianjian; Ding, Liang; Li, Pengfei; Hou, Yayi (2015): 17 β -estradiol contributes to the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in blood by promoting TNF- α secretion. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47 (8), S. 620–629. DOI: 10.1093/abbs/gmv053.

Dugast, Anne-Sophie; Haudebourg, Thomas; Coulon, Flora; Heslan, Michele; Haspot, Fabienne; Poirier, Nicolas; Vuillefroy de Silly, Romain; Usal, Claire; Smit, Helga; Martinet, Bernard; Thebault, Pamela; Renaudin, Karine; Vanhove, Bernard (2008): Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Kidney Allograft Tolerance and Specifically Suppress Effector T Cell Expansion. In: *The Journal of Immunology* 180 (12), S. 7898–7906. DOI: 10.4049/jimmunol.180.12.7898.

Ehrentraut, Stefanie; Sauss, Karoline; Neumeister, Romy; Luley, Lydia; Oettel, Anika; Fettke, Franziska; Costa, Serban-Dan; Langwisch, Stefanie; Zenclussen, Ana Claudia; Schumacher, Anne (2019): Human Miscarriage Is Associated With Dysregulations in Peripheral Blood-Derived Myeloid Dendritic Cell Subsets. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2440. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02440.

Ernerudh, Jan; Berg, Göran; Mjösberg, Jenny (2011): Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 66 Suppl 1, S. 31–43. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01049.x.

Fainaru, Ofer; Paz, Gili; Hantisteanu, Shay; Hallak, Mordechai (2014): Myeloid cell alterations in the mouse placenta precede the onset of labor and delivery. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 210 (1), 73.e1-7. DOI: 10.1016/j.ajog.2013.09.018.

Fettke, Franziska; Schumacher, Anne; Canellada, Andrea; Toledo, Natalia; Bekeredjian-Ding, Isabelle; Bondt, Albert; Wuhrer, Manfred; Costa, Serban-Dan; Zenclussen, Ana Claudia (2016): Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy. Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 495. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00495.

- Fillatreau, Simon; Sweenie, Claire H.; McGeachy, Mandy J.; Gray, David; Anderton, Stephen M. (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. In: *Nature immunology* 3 (10), S. 944–950. DOI: 10.1038/ni833.
- Fournier, Thierry; Guibourdenche, Jean; Evain-Brion, Danièle (2015): Review. HCGs: different sources of production, different glycoforms and functions. In: *Placenta* 36 Suppl 1, S60-5. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.02.002.
- Gabrilovich, Dmitry I.; Nagaraj, Srinivas (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (3), S. 162–174. DOI: 10.1038/nri2506.
- Ghaebi, Mahnaz; Nouri, Mohammad; Ghasemzadeh, Aliyeh; Farzadi, Laya; Jadidi-Niaragh, Farhad; Ahmadi, Majid; Yousefi, Mehdi (2017): Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 88, S. 61–73. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.016.
- Göhner, Claudia; Plösch, Torsten; Faas, Marijke M. (2017): Immune-modulatory effects of syncytiotrophoblast extracellular vesicles in pregnancy and preeclampsia. In: *Placenta* 60 Suppl 1, S41-S51. DOI: 10.1016/j.placenta.2017.06.004.
- Greten, Tim F.; Manns, Michael P.; Korangy, Firouzeh (2011): Myeloid derived suppressor cells in human diseases. In: *International immunopharmacology* 11 (7), S. 802–807. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.01.003.
- Groux, Hervé; O'Garra, Anne; Bigler, Mike; Rouleau, Matthieu; Antonenko, Svetlana; Vries, Jan E. de; Roncarolo, Maria Grazia (1997): A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. In: *Nature* 389, S. 737–742, zuletzt geprüft am 29.07.2017.
- Guleria, Indira; Sayegh, Mohamed H. (2007): Maternal acceptance of the fetus: True Human Tolerance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (6), S. 3345–3351. DOI: 10.4049/jimmunol.178.6.3345.
- Hackmon, Rinat; Hallak, Mordechai; Krup, Margalit; Weitzman, Dahlia; Sheiner, Eyal; Kaplan, Boris; Weinstein, Yacob (2004): HLA-G antigen and parturition. Maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. In: *Fetal diagnosis and therapy* 19 (5), S. 404–409. DOI: 10.1159/000078992.
- Hanna, Jacob; Goldman-Wohl, Debra; Hamani, Yaron; Avraham, Inbal; Greenfield, Caryn; Natanson-Yaron, Shira; Prus, Diana; Cohen-Daniel, Leonor; Arnon, Tal I.; Manaster, Irit; Gazit, Roi; Yutkin, Vladimir; Benharroch, Daniel; Porgador, Angel; Keshet, Eli; Yagel, Simcha; Mandelboim, Ofer (2006): Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. In: *Nature medicine* 12 (9), S. 1065–1074. DOI: 10.1038/nm1452.
- Hanna, Jacob; Wald, Ori; Goldman-Wohl, Debra; Prus, Diana; Markel, Gal; Gazit, Roi; Katz, Gil; Haimov-Kochman, Ronit; Fujii, Nobutaka; Yagel, Simcha; Peled, Amnon; Mandelboim, Ofer (2003): CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. In: *Blood* 102 (5), S. 1569–1577. DOI: 10.1182/blood-2003-02-0517.

Herz, U.; Renz, Harald (2001): Fetomaternale Immunität. Neue Konzepte zur Plastizität des Immunsystems während der Schwangerschaft. In: *Gynäkologe* (34), S. 494–502, zuletzt geprüft am 11.04.2021.

Hofstädter, Kathrin (2016): Myeloide Suppressorzellen an der humanen fetomaternalen Grenzschicht und ihre Bedeutung für die immunologische Toleranz zwischen Mutter und Fetus, zuletzt geprüft am 28.12.2020.

Hunt, Joan S.; Jadhav, Lalita; Chu, Wenjiang; Geraghty, Daniel E.; Ober, Carole (2000): Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 183 (3), S. 682–688. DOI: 10.1067/mob.2000.106762.

Hunt, Joan S.; Petroff, Margaret G.; McIntire, Ramsey H.; Ober, Carole (2005): HLA-G and immune tolerance in pregnancy. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (7), S. 681–693. DOI: 10.1096/fj.04-2078rev.

Jensen, Federico; Muzzio, Damián; Soldati, Rocío; Fest, Stefan; Zenclussen, Ana Claudia (2013): Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. In: *Biology of reproduction* 89 (4), S. 90. DOI: 10.1095/biolreprod.113.110791.

Kalkunte, Satyan; Nevers, Tania; Norris, Wendy E.; Sharma, Surendra (2011): Vascular IL-10: A protective role in preeclampsia. In: *Journal of reproductive immunology* 88 (2), S. 165–169. DOI: 10.1016/j.jri.2011.01.009.

Keskin, Fatih; Karatas, Ahmet; Albayrak, Mustafa; Biyik, Müserref Erkan; Demirin, Hilmi; Dilbaz, Serdar (2013): Maternal Serum Soluble HLA-G Levels in Missed Abortions. In: *Medicina (Kaunas)* 49 (10), S. 435–438, zuletzt geprüft am 31.07.2017.

Klitkou, Louise; Dahl, Mette; Hviid, Thomas Vauvert F.; Djuricic, Snezana; Piosik, Zofia Maria; Skovbo, Peter; Møller, Anna Margrethe; Steffensen, Rudi; Christiansen, Ole B. (2015): Human leukocyte antigen (HLA)-G during pregnancy part I. Correlations between maternal soluble HLA-G at midterm, at term, and umbilical cord blood soluble HLA-G at term. In: *Human immunology* 76 (4), S. 254–259. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.01.013.

Köstlin, Natascha; Hofstädter, Kathrin; Ostermeir, Anna-Lena; Spring, Bärbel; Leiber, Anja; Haen, Susanne; Abele, Harald; Bauer, Peter; Pollheimer, Jürgen; Hartl, Dominik; Poets, Christian F.; Gille, Christian (2016): Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (3), S. 1132–1145. DOI: 10.4049/jimmunol.1500340.

Köstlin, Natascha; Kugel, Hellen; Spring, Bärbel; Leiber, Anja; Marmé, Alexander; Henes, Melanie; Rieber, Nikolaus; Hartl, Dominik; Poets, Christian F.; Gille, Christian (2014): Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. In: *European journal of immunology* 44 (9), S. 2582–2591. DOI: 10.1002/eji.201344200.

Köstlin, Natascha; Ostermeir, Anna-Lena; Spring, Bärbel; Schwarz, Julian; Marmé, Alexander; Walter, Christina B.; Poets, Christian F.; Gille, Christian

(2017): HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. In: *European journal of immunology* 47 (2), S. 374–384. DOI: 10.1002/eji.201646564.

Kudo, Yoshiki; Boyd, C.A.R.; Sargent, Ian L.; Redman, Christopher W.G. (2003): Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 188 (3), S. 719–726. DOI: 10.1067/mob.2003.156.

Kugel, Hellen (2018): Untersuchungen zur Expression von Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) in der humanen Schwangerschaft und ihre Bedeutung für die materno-fetale Toleranz, zuletzt geprüft am 28.12.2020.

Kwiatek, Maciej; Gęca, Tomasz; Krzyżanowski, Arkadiusz; Malec, Agnieszka; Kwaśniewska, Anna (2015): Peripheral Dendritic Cells and CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells in the First Trimester of Normal Pregnancy and in Women with Recurrent Miscarriage. In: *PLoS ONE* 10 (5), e0124747. DOI: 10.1371/journal.pone.0124747.

Lash, Gendie E. (2015): Molecular Cross-Talk at the Feto-Maternal Interface. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 (12), S. 1–14. DOI: 10.1101/cshperspect.a023010.

Latifi, Zeinab; Nejabati, Hamid R.; Abroon, Sina; Mihanfar, Aynaz; Farzadi, Laya; Hakimi, Parvin; Hajipour, Hamed; Nouri, Mohammad; Fattahi, Amir (2019): Dual role of TGF- β in early pregnancy: clues from tumor progression. In: *Biology of reproduction* 100 (6), S. 1417–1430. DOI: 10.1093/biolre/iox024.

Lechner, Melissa G.; Megiel, Carolina; Russell, Sarah M.; Bingham, Brigid; Arger, Nicholas; Woo, Tammy; Epstein, Alan L. (2011): Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. In: *Journal of translational medicine* 9, S. 90. DOI: 10.1186/1479-5876-9-90.

Lee, Cheuk-Lun; Guo, YiFan; So, Kam-Hei; Vijayan, Madhavi; Guo, Yue; Wong, Vera H. H.; Yao, YuanQing; Lee, Kai-Fai; Chiu, Philip C. N.; Yeung, William S. B. (2015): Soluble human leukocyte antigen G5 polarizes differentiation of macrophages toward a decidual macrophage-like phenotype. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 30 (10), S. 2263–2274. DOI: 10.1093/humrep/dev196.

Lee, Jee H.; Lydon, John P.; Kim, Chang H. (2012a): Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. In: *European journal of immunology* 42 (10), S. 2683–2696. DOI: 10.1002/eji.201142317.

Lee, Jee H.; Ulrich, Benjamin; Cho, Jungyoon; Park, Jeongho; Kim, Chang H. (2011): Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (4), S. 1778–1787. DOI: 10.4049/jimmunol.1003919.

- Lee, Sung Ki; Kim, Jee Yun; Lee, Millina; Gilman-Sachs, Alice; Kwak-Kim, Joanne (2012b): Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 67 (4), S. 311–318. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2012.01116.x.
- Liang, Siyuan; Baibakov, Boris; Horuzsko, Anatolij (2002): HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. In: *Eur. J. Immunol.* 32 (9), S. 2418–2426. DOI: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2418::AID-IMMU2418>3.0.CO;2-L.
- Liang, Siyuan; Ristich, Vladimir; Arase, Hisashi; Dausset, Jean; Carosella, Edgardo D.; Horuzsko, Anatolij (2008): Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (24), S. 8357–8362. DOI: 10.1073/pnas.0803341105.
- Lin, Hui; Mosmann, Tim R.; Guilbert, Larry; Tuntipopipat, Siriporn; Wegmann, Thomas G. (1993): Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. In: *J Immunol* 151 (9), S. 4562–4573.
- Lissauer, David; Eldershaw, Suzy A.; Inman, Charlotte F.; Coomarasamy, Aravinthan; Moss, Paul A. H.; Kilby, Mark D. (2015): Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. In: *European journal of immunology* 45 (10), S. 2858–2872. DOI: 10.1002/eji.201445404.
- Loumagne, Laure; Baudhuin, Jeremy; Favier, Benoit; Montespan, Florent; Carosella, Edgardo D.; Rouas-Freiss, Nathalie (2014): In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance. In: *International journal of cancer* 135 (9), S. 2107–2117. DOI: 10.1002/ijc.28845.
- Luo, C. Y.; Wang, L.; Sun, C.; Li, D. J. (2011): Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. In: *Cellular & molecular immunology* 8 (1), S. 50–58. DOI: 10.1038/cmi.2010.54.
- Luyckx, Ariane; Schoupe, Elio; Rutgeerts, Omer; Lenaerts, Caroline; Koks, Carolien; Fevery, Sabine; Devos, Timothy; Dierickx, Daan; Waer, Mark; van Ginderachter, Jo A.; Billiau, An D. (2012): Subset characterization of myeloid-derived suppressor cells arising during induction of BM chimerism in mice. In: *Bone marrow transplantation* 47 (7), S. 985–992. DOI: 10.1038/bmt.2011.207.
- Lynge Nilsson, Line; Djuricic, Snezana; Hviid, Thomas Vauvert F. (2014): Controlling the Immunological Crosstalk during Conception and Pregnancy. HLA-G in Reproduction. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 198. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00198.
- Makarenkova, Valeriya P.; Bansal, Vishal; Matta, Benjamin M.; Perez, Lori Ann; Ochoa, Juan B. (2006): CD11b+/Gr-1+ Myeloid Suppressor Cells Cause T Cell Dysfunction after Traumatic Stress. In: *The Journal of Immunology* 176 (4), S. 2085–2094. DOI: 10.4049/jimmunol.176.4.2085.

Medawar, Peter B. (1953): Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. In: *Symposia of the Society for Experimental Biology*.

Miltenyi Biotec GmbH (2020): Magnetic cell separation. Online verfügbar unter <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macshandbook/macstechnologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html>, zuletzt geprüft am 30.03.2020.

Mociornita, Amelia G.; Adamson, Mitchell B.; Tumiati, Laura C.; Ross, Heather J.; Rao, Vivek; Delgado, Diego H. (2018): Effects of everolimus and HLA-G on cellular proliferation and neutrophil adhesion in an in vitro model of cardiac allograft vasculopathy. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 18 (12), S. 3038–3044. DOI: 10.1111/ajt.15015.

Moffett, Ashley; Colucci, Francesco (2014): Uterine NK cells. Active regulators at the maternal-fetal interface. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (5), S. 1872–1879. DOI: 10.1172/JCI68107.

Moffett-King, Ashley (2002): Natural killer cells and pregnancy. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (9), S. 656–663. DOI: 10.1038/nri886.

Munn, David H.; Zhou, Min; Attwood, John T.; Bondarev, Igor; Conway, Simon J.; Marshall, Brendan; Brown, Corrie; Mellor, Andrew L. (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5380), S. 1191–1193.

Nagaraj, Srinivas; Schrum, Adam G.; Cho, Hyun-Il; Celis, Esteban; Gabilovich, Dmitry I. (2010): Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (6), S. 3106–3116. DOI: 10.4049/jimmunol.0902661.

Nair, Rohini R.; Sinha, Pratima; Khanna, Anuradha; Singh, Kiran (2015): Reduced Myeloid-derived Suppressor Cells in the Blood and Endometrium is Associated with Early Miscarriage. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 73 (6), S. 479–486. DOI: 10.1111/aji.12351.

Nakamura, Izumi; Shibata, Masahiko; Gonda, Kenji; Yazawa, Takashi; Shimura, Tatsuo; Anazawa, Takayuki; Suzuki, Satoshi; Sakurai, Kenichi; Koyama, Yoshihisa; Ohto, Hitoshi; Tomita, Ryouichi; Gotoh, Mitsukazu; Takenoshita, Seiichi (2013): Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. In: *Oncology letters* 5 (5), S. 1682–1686. DOI: 10.3892/ol.2013.1231.

Ng, Siu Chui; Gilman-Sachs, Alice; Thaker, Poonam; Beaman, Kenneth D.; Beer, Alan E.; Kwak-Kim, Joanne (2002): Expression of Intracellular Th1 and Th2 Cytokines in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, Implantation Failures after IVF/ET or Normal Pregnancy. In: *Am J Reprod Immunol* 48 (2), S. 77–86. DOI: 10.1034/j.1600-0897.2002.01105.x.

Ni, Nan; Li, Qinglei (2017): TGF β superfamily signaling and uterine decidualization. In: *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 15 (84), S. 1–9. DOI: 10.1186/s12958-017-0303-0.

Ostrand-Rosenberg, Suzanne; Sinha, Pratima; Figley, Chas; Long, Ramses; Park, DoHwan; Carter, Darryl; Clements, Virginia K. (2017): Frontline Science. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal-fetal tolerance in mice. In: *Journal of leukocyte biology* 101 (5), S. 1091–1101. DOI: 10.1189/jlb.1HI1016-306RR.

Paiva, Premila; Hannan, Natalie J.; Hincks, Cassandra; Meehan, Kate L.; Pruyers, Enid; Dimitriadis, Eva; Salamonsen, Lois A. (2011): Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 26 (5), S. 1153–1162. DOI: 10.1093/humrep/der027.

Pan, T.; Zhong, L.; Wu, S.; Cao, Y.; Yang, Q.; Cai, Z.; Cai, X.; Zhao, W.; Ma, N.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhou, J. (2016a): 17 β -Oestradiol enhances the expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells via signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 signalling in human pregnancy. In: *Clinical and experimental immunology* 185 (1), S. 86–97. DOI: 10.1111/cei.12790.

Pan, Ting; Liu, Yufeng; Zhong, Li Mei; Shi, Mao Hua; Duan, Xiao Bing; Wu, Kang; Yang, Qiong; Liu, Chao; Wei, Jian Yang; Ma, Xing Ru; Shi, Kun; Zhang, Hui; Zhou, Jie (2016b): Myeloid-derived suppressor cells are essential for maintaining feto-maternal immunotolerance via STAT3 signaling in mice. In: *Journal of leukocyte biology* 100 (3), S. 499–511. DOI: 10.1189/jlb.1A1015-481RR.

Papenfuss, Tracey L.; Powell, Nicole D.; McClain, Melanie A.; Bedarf, Ashley; Singh, Amber; Gienapp, Ingrid E.; Shawler, Todd; Whitacre, Caroline C. (2011): Estriol generates tolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (6), S. 3346–3355. DOI: 10.4049/jimmunol.1001322.

Perrier d'Hauterive, Sophie; Charlet-Renard, Chantal; Berndt, Sarah; Dubois, Michel; Munaut, Carine; Goffin, Frederic; Hagelstein, M.-T.; Noel, A.; Hazout, Andre; Foidart, Jean-Michel; Geenen, Vincent (2004): Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. In: *Human Reproduction* (19), S. 2633–2643, zuletzt geprüft am 26.03.2020.

Piao, Hai-Lan; Tao, Yu; Zhu, Rui; Wang, Song-Cun; Tang, Chuan-Ling; Fu, Qiang; Du, Mei-Rong; Li, Da-Jin (2012): The CXCL12/CXCR4 axis is involved in the maintenance of Th2 bias at the maternal/fetal interface in early human pregnancy. In: *Cellular & molecular immunology* 9 (5), S. 423–430. DOI: 10.1038/cmi.2012.23.

Poehlmann, Tobias G.; Schaumann, Andreas; Busch, Susann; Fitzgerald, Justine S.; Aguerre-Girr, Marise; Le Bouteiller, Philippe; Schleussner, Ekkehard;

- Markert, Udo R. (2006): Inhibition of term decidua NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 56 (5-6), S. 275–285. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2006.00420.x.
- Poloski, Eileen; Oettel, Anika; Ehrentraut, Stefanie; Luley, Lydia; Costa, Serban Dan; Zenclussen, Ana Claudia; Schumacher, Anne (2016): JEG-3 Trophoblast Cells Producing Human Chorionic Gonadotropin Promote Conversion of Human CD4+FOXP3- T Cells into CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells and Foster T Cell Suppressive Activity. In: *Biology of reproduction* 94 (5), S. 106. DOI: 10.1095/biolreprod.115.135541.
- Poras, Isabelle; Yaghi, Layale; Martelli-Palomino, Gustavo; Mendes-Junior, Celso T.; Muniz, Yara Costa Netto; Cagnin, Natalia F.; Sgorla de Almeida, Bibiana; Castelli, Erick C.; Carosella, Edgardo D.; Donadi, Eduardo A.; Moreau, Philippe (2017): Haplotypes of the HLA-G 3' Untranslated Region Respond to Endogenous Factors of HLA-G+ and HLA-G- Cell Lines Differentially. In: *PLoS ONE* 12 (1), e0169032. DOI: 10.1371/journal.pone.0169032.
- Prieto, G. Aleph; Rosenstein, Yvonne (2006): Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. In: *Immunology* 118 (1), S. 58–65. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02339.x.
- Prins, Jelmer R.; Boelens, Hendrik M.; Heimweg, Janneke; van der Heide, Sicco; Dubois, Anthony E.; van Oosterhout, Antoon J.; Erwich, Jan Jaap H. M. (2009): Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. In: *Hypertension in pregnancy* 28 (3), S. 300–311. DOI: 10.1080/10641950802601237.
- Raghupathy, Raj (1997): Th 1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. In: *Immunology Today* 18 (10), S. 478–482. DOI: 10.1016/S0167-5699(97)01127-4.
- Rai, Raj; Regan, Lesley (2006): Recurrent miscarriage. In: *The Lancet* 368 (9535), S. 601–611. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69204-0.
- Rebmann, Vera; da Silva Nardi, Fabiola; Wagner, Bettina; Horn, Peter A. (2014): HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. In: *Journal of immunology research* 2014, S. 297073. DOI: 10.1155/2014/297073.
- Ristich, Vladimir; Zhang, Wei; Liang, Siyuan; Horuzsko, Anatolij (2007): Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. In: *Human immunology* 68 (4), S. 264–271. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.11.008.
- Rodriguez, Paulo C.; Ernstoff, Marc S.; Hernandez, Claudia; Atkins, Michael; Zabaleta, Jovanny; Sierra, Rosa; Ochoa, Augusto C. (2009): Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. In: *Cancer research* 69 (4), S. 1553–1560. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1921.
- Rolle, Luise; Memarzadeh Tehran, Maryam; Morell-García, Anselm; Raeva, Yanitsa; Schumacher, Anne; Hartig, Roland; Costa, Serban-Dan; Jensen, Federico; Zenclussen, Ana Claudia (2013): Cutting edge. IL-10-producing

regulatory B cells in early human pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 70 (6), S. 448–453. DOI: 10.1111/aji.12157.

Roth, Iris; Corry, David B.; Locksley, Richard M.; Abrams, John S.; Litton, Mark J.; Fisher, Susan J. (1996): Human Placental Cytotrophoblasts Produce the Immunosuppressive Cytokine Interleukin 10. In: *The Journal of experimental medicine* 184 (2), S. 539–548, zuletzt geprüft am 11.04.2021.

Rouas-Freiss, Nathalie; Marchal, Rachel E.; Kirszenbaum, Marek; Dausset, Jean; Carosella, Edgardo D. (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? In: *The National Academy of Sciences of the USA* (94), S. 5249–5254, zuletzt geprüft am 06.09.2017.

Rouas-Freiss, Nathalie; Moreau, Philippe; LeMaout, Joel; Carosella, Edgardo D. (2014): The dual role of HLA-G in cancer. In: *Journal of immunology research* 2014, S. 359748. DOI: 10.1155/2014/359748.

Rowe, Jared H.; Ertelt, James M.; Xin, Lijun; Way, Sing Sing (2012): Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. In: *Nature* 490 (7418), S. 102–106. DOI: 10.1038/nature11462.

Safarzadeh, Elham; Orangi, Mona; Mohammadi, Hamed; Babai, Farhad; Baradaran, Behzad (2017): Myeloid-derived Suppressor Cells. Important contributors to tumor progression and metastasis. In: *Journal of cellular physiology*. DOI: 10.1002/jcp.26075.

Santillan, Mark K.; Pelham, Christopher J.; Ketsawatsomkron, Pimonrat; Santillan, Donna A.; Davis, Deborah R.; Devor, Eric J.; Gibson-Corley, Katherine N.; Scroggins, Sabrina M.; Grobe, Justin L.; Yang, Baoli; Hunter, Steven K.; Sigmund, Curt D. (2015): Pregnant mice lacking indoleamine 2,3-dioxygenase exhibit preeclampsia phenotypes. In: *Physiological reports* 3 (1). DOI: 10.14814/phy2.12257.

Santner-Nanan, Brigitte; Peek, Michael John; Khanam, Roma; Richarts, Luise; Zhu, Erhua; Fazekas de St Groth, Barbara; Nanan, Ralph (2009): Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (11), S. 7023–7030. DOI: 10.4049/jimmunol.0901154.

Sasaki, Yasushi; Darmochwal-Kolarz, Dorota; Suzuki, D.; Sakai, M.; Ito, M.; Shima, T.; Shiozaki, Arihiro; Rolinski, Jacek; Saito, Shigeru (2007): Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. In: *Clinical and experimental immunology* 149 (1), S. 139–145. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x.

Sasaki, Yoshikazu; Sakai, Masatoshi; Miyazaki, Satomi; Higuma, Subaru; Shiozaki, Arihiro; Saito, Satoshi (2004): Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. In: *Molecular human reproduction* 10 (5), S. 347–353. DOI: 10.1093/molehr/gah044.

Schumacher, Anne; Brachwitz, Nadja; Sohr, Sindy; Engeland, Kurt; Langwisch, Stefanie; Dolaptchieva, Maria; Alexander, Tobias; Taran, Andrei; Malfertheiner, Sara Fill; Costa, Serban-Dan; Zimmermann, Gerolf; Nitschke, Cindy; Volk, Hans-Dieter; Alexander, Henry; Gunzer, Matthias; Zenclussen, Ana Claudia (2009): Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (9), S. 5488–5497. DOI: 10.4049/jimmunol.0803177.

Schumacher, Anne; Dauven, Dominique; Zenclussen, Ana C. (2017): Progesterone-driven local regulatory T cell induction does not prevent fetal loss in the CBA/JxDBA/2J abortion-prone model. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 77 (3). DOI: 10.1111/aji.12626.

Schumacher, Anne; Heinze, Kristina; Witte, Jeanette; Poloski, Eileen; Linzke, Nadja; Woidacki, Katja; Zenclussen, Ana C. (2013): Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (6), S. 2650–2658. DOI: 10.4049/jimmunol.1202698.

Seyfizadeh, Narges (2016): Immune Dysfunction Induced by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Lymphoma. In: *Cancer Cell Microenviron.* DOI: 10.14800/ccm.1111.

Sojka, Dorothy K.; Yang, Liping; Yokoyama, Wayne M. (2019): Uterine Natural Killer Cells. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 960. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00960.

Somerset, David A.; Zheng, Yong; Kilby, Mark D.; Sansom, David M.; Drayson, Mark T. (2004): Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. In: *Immunology* 112 (1), S. 38–43. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x.

Spallanzani, Raúl Germán; Dalotto-Moreno, Tomás; Raffo Iraolagoitia, Ximena Lucía; Ziblat, Andrea; Domaica, Carolina Inés; Avila, Damián Ezequiel; Rossi, Lucas Ezequiel; Fuertes, Mercedes Beatriz; Battistone, María Agustina; Rabinovich, Gabriel Adrián; Salatino, Mariana; Zwirner, Norberto Walter (2013): Expansion of CD11b(+)Ly6G (+)Ly6C (int) cells driven by medroxyprogesterone acetate in mice bearing breast tumors restrains NK cell effector functions. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 62 (12), S. 1781–1795. DOI: 10.1007/s00262-013-1483-x.

Spieles, Helen (2018): Der postpartal steigende Sauerstoffpartialdruck hemmt myeloide Suppressorzellen (MDSC) und reguliert die Immunadaptation des Neugeborenen, zuletzt geprüft am 28.12.2020.

Srivastava, Akhilesh; Sengupta, Jayasree; Kriplani, Alka; Roy, Kallol K.; Ghosh, Debabrata (2013): Profiles of cytokines secreted by isolated human endometrial cells under the influence of chorionic gonadotropin during the window of embryo implantation. In: *Reproductive Biology and Endocrinology* (11), zuletzt geprüft am 26.03.2020.

Svoronos, Nikolaos; Perales-Puchalt, Alfredo; Allegrezza, Michael J.; Rutkowski, Melanie R.; Payne, Kyle K.; Tesone, Amelia J.; Nguyen, Jenny M.; Curiel, Tyler J.; Cadungog, Mark G.; Singhal, Sunil; Eruslanov, Evgeniy B.; Zhang, Paul; Tchou, Julia; Zhang, Rugang; Conejo-Garcia, Jose R. (2017): Tumor Cell-Independent Estrogen Signaling Drives Disease Progression through Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. In: *Cancer discovery* 7 (1), S. 72–85. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0502.

Sykes, Lynne; MacIntyre, David A.; Yap, Xiao J.; Teoh, Tiong Ghee; Bennett, Phillip R. (2012): The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. In: *Mediators of inflammation* 2012, S. 967629. DOI: 10.1155/2012/967629.

Tacke, Robert S.; Lee, Hai-Chon; Goh, Celeste; Courtney, Jeremy; Polyak, Stephen J.; Rosen, Hugo R.; Hahn, Young S. (2012): Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (2), S. 343–353. DOI: 10.1002/hep.24700.

Thaxton, Jessica E.; Sharma, Surendra (2010): Interleukin-10. A multi-faceted agent of pregnancy. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 63 (6), S. 482–491. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x.

Theofanakis, Charalampos; Drakakis, Petros; Besharat, Alexandros; Loutradis, Dimitrios (2017): Human Chorionic Gonadotropin. The Pregnancy Hormone and More. In: *International journal of molecular sciences* 18 (5). DOI: 10.3390/ijms18051059.

Tilburgs, Tamara; Crespo, Ângela C.; van der Zwan, Anita; Rybalov, Basya; Raj, Towfique; Stranger, Barbara; Gardner, Lucy; Moffett, Ashley; Strominger, Jack L. (2015): Human HLA-G+ extravillous trophoblasts: Immune-activating cells that interact with decidual leukocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (23), S. 7219–7224. DOI: 10.1073/pnas.1507977112.

Tilburgs, Tamara; Roelen, Dave L.; van der Mast, Barbara J.; de Groot-Swings, Godelieve M.; Kleijburg, Carin; Scherjon, Sicco A.; Claas, Frans H. (2008): Evidence for a Selective Migration of Fetus-Specific CD4+CD25bright Regulatory T Cells from the Peripheral Blood to the Decidua in Human Pregnancy. In: *The Journal of Immunology* 180 (8), S. 5737–5745. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5737.

Toldi, Gergely; Saito, Shigeru; Shima, Tomoko; Halmos, Amrita; Veresh, Zoltán; Vásárhelyi, Barna; Rigó, János; Molvarec, Attila (2012): The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. In: *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 68 (2), S. 175–180. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2012.01145.x.

Toldi, Gergely; Svec, Peter; Vásárhelyi, Barna; Mészáros, Gergő; Rigó, János; Tulassay, Tivadar; Treszl, András (2008): Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. In: *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 87 (11), S. 1229–1233. DOI: 10.1080/00016340802389470.

Umansky, Viktor; Blattner, Carolin; Gebhardt, Christoffer; Utikal, Jochen (2016): The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. In: *Vaccines* 4 (4). DOI: 10.3390/vaccines4040036.

Wang, Ji-meng; Zhao, Hong-xi; Wang, Li; Gao, Zhi-ying; Yao, Yuan-qing (2013): The human leukocyte antigen G promotes trophoblast fusion and β -hCG production through the Erk1/2 pathway in human choriocarcinoma cell lines. In: *Biochemical and biophysical research communications* 434 (3), S. 460–465. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.004.

Wang, Wen-Juan; Hao, Cui-Fang; Yi-Lin; Yin, Guang-Jie; Bao, Shi-Hua; Qiu, Li-Hua; Lin, Qi-De (2010): Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. In: *Journal of reproductive immunology* 84 (2), S. 164–170. DOI: 10.1016/j.jri.2009.12.003.

Wegmann, Thomas G.; Lin, Hui; Guilbert, Larry; Mosmann, Tim R. (1993): Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship. Is successful pregnancy a TH2 phenomenon? In: *Immunology Today* 14 (7), S. 353–356. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90235-D.

Weiner, Howard L. (2001): Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. In: *Immunol Rev* 182 (1), S. 207–214. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820117.x.

Xu, Li; Dong, Bilin; Wang, Hui; Zeng, Zhiliang; Liu, Weihuang; Chen, Na; Chen, Jinbo; Yang, Jing; Li, Dongsheng; Duan, Yiqun (2013): Progesterone suppresses Th17 cell responses, and enhances the development of regulatory T cells, through thymic stromal lymphopoietin-dependent mechanisms in experimental gonococcal genital tract infection. In: *Microbes and infection* 15 (12), S. 796–805. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.06.012.

Yie, Shang-mian; Li, Liang-hong; Li, Yue-mei; Librach, Clifford (2004): HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 191 (2), S. 525–529. DOI: 10.1016/j.ajog.2004.01.033.

Yu, Jinpu; Du, Weijiao; Yan, Fang; Wang, Yue; Li, Hui; Cao, Shui; Yu, Wenwen; Shen, Chun; Liu, Juntian; Ren, Xiubao (2013): Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (7), S. 3783–3797. DOI: 10.4049/jimmunol.1201449.

Zea, Arnold H.; Rodriguez, Paulo C.; Atkins, Michael B.; Hernandez, Claudia; Signoretti, Sabina; Zabaleta, Jovanny; McDermott, David; Quiceno, David; Youmans, Amanda; O'Neill, Anne; Mier, James; Ochoa, Augusto C. (2005): Arginase-Producing Myeloid Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Patients: A Mechanism of Tumor Evasion. In: *Cancer research* (65: (8.)April 15, 2005), S. 3044–3048, zuletzt geprüft am 31.07.2017.

Zhang, Wei; Liang, Siyuan; Wu, Juan; Horuzsko, Anatolij (2008): Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+

myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. In: *Transplantation* 86 (8), S. 1125–1134. DOI: 10.1097/TP.0b013e318186fccd.

Zhao, Ai-Min; Xu, Hai-Jing; Kang, Xiao-Min; Lu, Li-Ming (2016): New insights into myeloid-derived suppressor cells and their roles in fetomaternal immune cross-talk. In: *Journal of reproductive immunology* 113, S. 35–41. DOI: 10.1016/j.jri.2015.11.001.

Zhao, Hui; Kalish, Flora; Schulz, Stephanie; Yang, Yang; Wong, Ronald J.; Stevenson, David K. (2015): Unique roles of infiltrating myeloid cells in the murine uterus during early to midpregnancy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (8), S. 3713–3722. DOI: 10.4049/jimmunol.1401930.

Zhou, Wen-Hui; Du, Mei-Rong; Dong, Lin; Yu, Jing; Li, Da-Jin (2008): Chemokine CXCL12 promotes the cross-talk between trophoblasts and decidual stromal cells in human first-trimester pregnancy. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 23 (12), S. 2669–2679. DOI: 10.1093/humrep/den308.

Zhu, Bing; Bando, Yoshio; Xiao, Sheng; Yang, Kaiyong; Anderson, Ana C.; Kuchroo, Vijay K.; Khoury, Samia J. (2007): CD11b + Ly-6C hi Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: *The Journal of Immunology* 179 (8), S. 5228–5237. DOI: 10.4049/jimmunol.179.8.5228.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen Abteilung IV Neonatologie unter Betreuung von Herrn PD Dr. Gille durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte unter der Federführung von Frau Dr. Köstlin-Gille mit meiner Beteiligung. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Dr. Köstlin-Gille eigenständig durch mich.

Die den Abschnitten 3.1 bis einschließlich 3.2.5 sowie 3.3 und 3.4 zugrundeliegenden Versuche sowie deren Auswertung erfolgten nach Einarbeitung durch Frau Dr. Spring und Frau Dr. Köstlin-Gille eigenständig durch mich. Die Ergebnisse zu Abschnitt 3.2.6 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Köstlin-Gille zur Verfügung gestellt.

Der o.g. Veröffentlichung Köstlin et al. 2017 liegen größtenteils die von mir aufbereiteten Daten aus den von mir durchgeführten Versuchen zugrunde. Die englischsprachige Veröffentlichung wurde federführend von Frau Dr. Köstlin-Gille verfasst und beinhaltet die von mir im Rahmen der Datenauswertung erstellten Abbildungen. Auch für die Veröffentlichung Köstlin et al. 2016 wurden die von mir durchgeführten Versuche und deren Auswertung herangezogen. Auch hier erfolgte die Erstellung des englischsprachigen Manuskripts überwiegend durch Frau Dr. Köstlin-Gille.

Ich versichere, das hier vorliegende Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Anna-Lena Janina Ostermeir

Leonberg, den 11.10.2020

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, mit deren Hilfe und Unterstützung ich diese Arbeit erstellen konnte.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Dr. Köstlin-Gille und Herrn PD Dr. C. Gille für die gute Betreuung und die lehrreiche Zeit im Labor, in der sie mich stets unterstützt haben und jederzeit für meine Fragen zur Verfügung standen.

Weiterhin bedanke ich mich beim Laborteam des Neolab und hierbei insbesondere bei Frau Dr. Spring, bei den Kolleginnen und Kollegen der Universitätsfrauenklinik Tübingen für die Bereitstellung von Probenmaterial, die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit zur Nutzung verschiedener Geräte wie bspw. das FACS-Gerät sowie dem Team des Labors der Kinderklinik für die Nutzung des autoMACS. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Marmé für das Akquirieren von Probandinnen und Proben für unsere Untersuchungen.

Für die Unterstützung im Rahmen der Abort-Studie möchte ich mich stellvertretend für alle beteiligten Kolleginnen und Kollegen der Pathologie bei Frau Dr. Haen bedanken.

Herrn Dr. Jürgen Pollheimer und seiner Forschungsgruppe an der Medizinischen Universität Wien danke ich für den wissenschaftlichen Austausch.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, meine Freunde und ganz besonders an meinen Partner für die anhaltende Ermutigung und Unterstützung – ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen!