

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand Immunologie: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig**

Die Rolle T – regulatorischer Zellen in der Pathogenese der Präeklampsie

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorgelegt von
Maria Luise Richarts
aus Trier**

Würzburg, Juli 2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Koreferentin: Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2012

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	PRÄEKLAMPSIE.....	1
1.1.1	Relevanz.....	1
1.1.2	Klinische Präsentation.....	1
1.1.3	Ätiologie.....	2
1.2	DAS IMMUNSYSTEM.....	4
1.2.1	Allgemeines.....	4
1.2.2	Toleranz.....	8
1.2.2.1	Zentrale und periphere Toleranz.....	8
1.2.3	T - regulatorische Zellen (Tregs).....	9
1.2.3.1	Entstehung und Herkunft T-regulatorischer Zellen.....	9
1.2.3.2	Charakterisierung T-regulatorischer Zellen.....	9
1.2.3.3	Mechanismen der Suppression.....	11
1.2.3.4	Klinische Bedeutung regulatorischer T-Zellen.....	12
1.2.3.5	Bedeutung von Tregs in der Schwangerschaft und Präeklampsie.....	15
1.2.4	Immunologische Veränderung in der Schwangerschaft.....	16
1.3	FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	MATERIAL.....	21
2.1.1	Antibiotika.....	21
2.1.2	Antikörper.....	21
2.1.2.1	Durchflusszytometrie.....	21
2.1.3	Geräte.....	21
2.1.4	Puffer und Medien.....	22
2.1.5	Seren.....	22
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.7	Vorgefertigte Lösungen.....	22
2.2	METHODEN.....	23
2.2.1	Charakterisierung des Untersuchungskollektivs.....	23
2.2.2	Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (B/T Lymphozyten, Makrophagen, NK Zellen).....	24
2.2.3	Gewinnung decidualer Lymphozyten.....	25
2.2.4	Oberflächen- /intrazelluläre Färbung.....	25
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	28
2.2.5.1	Isotypkontrolle.....	29
2.2.5.1.1	Isotypkontrolle der Oberflächenfärbung.....	30
2.2.5.1.2	Isotypkontrolle der Intrazellulärfärbung.....	30
2.2.6	Statistische Analyse.....	31

3	ERGEBNISSE	33
3.1	BASELINECHARAKTERISTIKA.....	33
3.2	FREQUENZEN T-REGULATORISCHER ZELLEN.....	33
3.2.1	Frequenzen T-regulatorischer Zellen im peripheren Blut	33
3.2.2	Frequenz T-regulatorischer Zellen im deciduellen Gewebe.....	37
3.2.2.1	CD38 Expression maternalen und fetaler PBMZ sowie decidueller mononukleärer Zellen gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie	37
3.2.3	Vergleich der Frequenz peripherer mit deciduellen T-regulatorischer Zellen von gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie	41
3.3	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG PERIPHERER UND DECIDUALER NON-TREGS UND TREGS IN GESUNDEN SCHWANGEREN UND SCHWANGEREN MIT PRÄEKLAMPSIE	43
3.3.1	CD45RA Expression	43
3.3.2	CCR7 Expression.....	46
4	DISKUSSION	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	LITERATUR	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen - presenting cell
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation: Oberflächenantigene von Leuko- und Thrombozyten
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
Cy	Cychrom
DC	Dendritic cell
DG	Deciduales Gewebe
DMSO	Dimethylsulfoxide
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	Forkhead box protein P3
GCSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GITR	Glucocorticoid induces TNFR-related protein
GvHD	Graft versus Host Disease
hCG	Human chorionic gonadotropin
HLA	Human leukocyte antigen
IDO	Indolamin - 2,3 - Dioxygenase
IFN-γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Major histocompatibility complex
MNC	Mononuclear cells
N	Anzahl
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

PBMZ	Peripheres Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PIGF	Placental growth factor
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sFLT-1	Soluble fms-like tyrosine kinase
sem	Standard error of mean
SSC	Side scatter
SSW	Schwangerschaftswoche
T-eff	T-Effektorzelle
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	T-regulatorische Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Präeklampsie

1.1.1 Relevanz

Präeklampsie ist die vermutlich wichtigste Erkrankung in der Schwangerschaft. Sie gehört zu den weltweit häufigsten Ursachen maternaler, fetaler und neonataler Morbidität und Mortalität und tritt in 5-10% aller Schwangerschaften auf (Baumwell and Karumanchi 2007). Daneben ist Präeklampsie für 25% aller Frühgeburten verantwortlich (Schulz and Wacker 2002).

1.1.2 Klinische Präsentation

Präeklampsie ist eine Multisystemerkrankung, welche sich ab der 20. Gestationswoche manifestiert. Als Diagnosekriterien gelten die von der US National Institutes of Health working group on hypertension in pregnancy festgelegten Kriterien:

- ein Blutdruckanstieg, welcher in der 2. Schwangerschaftshälfte (> 20. SSW) erfolgt, von > 30 mmHg systolisch und/oder > 15 mmHg diastolisch gegenüber vergleichenden Messungen in der Frühschwangerschaft bzw., wenn diese fehlen, ein Blutdruck > 140/90 mmHg
- eine Proteinurie (> 300mg/24 h) bei gleichzeitigem Ausschluss einer Harnwegsinfektion
- vollständige Normalisierung der beiden erstgenannten Symptome nach Entbindung. (Brown, Hague et al. 2000)

Daneben kann fast jedes Organ der Mutter betroffen sein. In unterschiedlichem Ausmaß kann es zu schweren Nieren- und Leberschädigungen sowie zu neurologischen Ausfällen, Störungen des hämatopoetischen und kardiovaskulären Systems kommen.

Auf fetaler Seite ist die Präeklampsie häufig mit einer Wachstumsretardierung und einer verminderten Fruchtwassermenge aufgrund einer sich entwickelnden Plazentainsuffizienz assoziiert (Brown, Lindheimer et al. 2001).

Zwei Sonderformen der Präeklampsie sind besonders gefürchtet: Die Eklampsie ist durch das Auftreten von schweren neurologischen Störungen mit durch Vasospasmen hervorgerufenen tonisch-klonischen Krämpfen gekennzeichnet. Das HELLP (Hämolyse, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets) Syndrom geht mit einer Thrombozytopenie mit daraus folgender Blutgerinnungsstörung, Hämolyse sowie einer massiven Leberschädigung einher.

1.1.3 Ätiologie

Über die Ätiologie der Präeklampsie ist bisweilen wenig bekannt, obwohl sich seit mehreren Jahrzehnten zahlreiche Forschungsgruppen mit dem Thema auseinandersetzen. Verschiedene Ansätze werden diskutiert; besondere Aufmerksamkeit gilt vaskulären sowie immunologischen Hintergründen.

Präeklampsie ist eine Erkrankung, die schwangerschaftsspezifisch ist und nur auftritt, wenn eine Plazenta vorhanden ist. Daher werden plazentare Dysfunktionen für die Entstehung einer Präeklampsie mitverantwortlich gemacht. So zeigen histopathologische Untersuchungen schon frühzeitig, d.h. vor der klinischen Manifestation, eine unzureichende Invasion fetaler Zytotrophoblastenzellen in maternale deziduale Gefäße. Dies führt zu einem beeinträchtigten Remodelling der plazentaren Spiralarterien und daraus resultierender unzureichender Dilatation und damit verminderter Kapazität. Folglich kommt es zu einer verminderten Perfusion der Plazenta und damit zu einer Beeinträchtigung der fetalen Entwicklung sowie Frühgeburtlichkeit (Roberts, Taylor et al. 1989). Als Grundlage dessen wird eine Verminderung angiogenetischer Faktoren im ersten Trimester im Blut schwangerer Frauen mit Präeklampsie diskutiert (Zhou, McMaster et al. 2002). Zu diesen angiogenetischen Faktoren zählen vascular endothelial growth factor (VEGF) und placental growth factor (PlGF) sowie deren Inhibitor sFlt1. Letzterer bindet VEGF und PlGF und inhibiert deren endothelstabilisierende Funktionen. Ein erhöhter Serumspiegel

von sFlt1 findet sich in Schwangerschaften mit Präeklampsie und wird für die unzureichende Plazentation und auch die systemischen Symptome (Bluthochdruck, Nierenfunktionsstörungen) mitverantwortlich gemacht (Maynard, Min et al. 2003).

Neben diesen frühzeitig auftretenden lokalen plazentaren Veränderungen ist die klinische Manifestation mit den oben genannten Organdysfunktionen durch eine generalisierte Endotheldysfunktion mit einer Verminderung vasodilatativer Faktoren (Prostacyclin, Stickstoffmonoxid) des maternalen Organismus charakterisiert.

2006 wurde festgestellt, dass antiangiogenetische Proteine, wie Endoglin, in Schwangerschaften mit Präeklampsie um ein Vielfaches erhöht sind (Levine, Lam et al. 2006). Endoglin ist ein löslicher TGF- β Korezeptor, der die Umwandlung von Kapillaren verhindert und vaskuläre Permeabilität sowie Hypertension induziert (Venkatesha, Toporsian et al. 2006). Inwiefern Endoglin und sFlt1 in Zusammenhang in der Pathogenese der Präeklampsie stehen, ist bisher nicht bekannt.

Für eine vaskuläre Beteiligung spricht auch, dass bestimmte Krankheiten wie Diabetes mellitus und das Anti-Phospholipidsyndrom Risikofaktoren für die Entstehung einer Präeklampsie darstellen (Pattison, Chamley et al. 1993; Lee, Hsieh et al. 2000).

Daneben liefert ein weiterer Ansatz Hinweise auf eine autoimmune Genese der Präeklampsie. Verschiedene Forschungsgruppen entdeckten im Blut schwangerer Frauen mit Präeklampsie hohe Titer rezeptoraktivierender Autoantikörper gegen Angiotensin, einem vasokonstriktorisches wirksamen Protein. Im Mausmodell konnten durch einen Transfer von diesen Antikörpern präeklampsieähnliche Symptome ausgelöst werden und durch Angiotensin – Rezeptorantagonisten verhindert werden (Wallukat, Homuth et al. 1999; Zhou, McMaster et al. 2002).

Auch genetische Faktoren scheinen in der Pathogenese der Präeklampsie eine Rolle zu spielen. So ist das Erkrankungsrisiko bei Gebärenden mit positiver Familienanamnese um ein Vielfaches höher (Carr, Epplein et al. 2005). Bei Präeklampsie in einer vorherigen Schwangerschaft ist das Risiko in darauffolgenden Schwangerschaften bei dem selben Vater deutlich erhöht (Duckitt and Harrington 2005).

All diese Erkenntnisse liefern jedoch keine Erklärung dafür, wieso es zu diesen Veränderungen überhaupt kommt.

Fakt ist, dass eine Therapie des Krankheitsbildes Präeklampsie zur Zeit ausschliesslich in Form der meist vorzeitig eingeleiteten Geburt des Kindes besteht. Durch „Entfernen“ des Kindes wird eine sofortige Verbesserung des klinischen Zustandes der Mutter erreicht. Daher wird angenommen, dass die Ursache in einer Pathologie der fetomaternalen Beziehung liegt. Auffallend ist, dass Nullipara ein deutlich erhöhtes Risiko für Präeklampsie haben als Multipara, die denselben Partner hatten (Tubbergen, Lachmeijer et al. 1999). Bei Partnerwechsel hingegen beträgt das Risiko einer Multipara wieder das einer Nullipara (Tuffnell, Jankowicz et al. 2005). Da der Fetus mit seinen paternalen Allelen einen haploiden Allograft im mütterlichen Organismus darstellt, muss in einer erfolgreichen Schwangerschaft eine Toleranz gegenüber diesen, dem mütterlichen Immunsystem fremden Antigenen, entstehen. Diese Erkenntnis wurde erstmals von Medawar 1953 postuliert (Billingham, Brent et al 1953). Gleichzeitig muss das maternale Immunsystem mögliche pathogene Erreger weiterhin erkennen und abwehren. Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass in Partnerschaften mit bereits länger bestehendem ungeschütztem Sexualkontakt ein vermindertes Risiko für Präeklampsie besteht. Dies wird mit einer zunehmenden Gewöhnung des mütterlichen Immunsystems an paternale Antigene durch kontinuierliche Samenexposition erklärt (Robillard, Hulsey et al. 1994; Koelman, Coumans et al. 2000).

Im Falle der Präeklampsie könnte also eine Art Abstossungsreaktion des mütterlichen Immunsystems gegen den semiallogenen Fötus vorliegen.

1.2 Das Immunsystem

1.2.1 Allgemeines

Dem Immunsystem kommen entscheidende Funktionen zuteil, die die Integrität des Organismus sicherstellen. Es schützt den Körper vor Mikroorganismen, Schadstoffen und Toxinen sowie vor malignen Zellen.

Zwei Systeme werden unterschieden, die immunologische Funktionen ausüben: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zu ersterem zählen Barrieremechanismen der Haut, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie auf zellulärer

Einleitung

Ebene Granulozyten, Makrophagen, sowie natürliche Killerzellen. Zum adaptiven Immunsystem werden T- und B-Lymphozyten gezählt, die hochspezifisch auf bestimmte Antigene reagieren, klonal expandieren und eine Gedächtnisreaktion hervorrufen. Eine weitere Einteilung unterscheidet die humorale von der zellulären Abwehr. Beide Formen lassen sich sowohl im angeborenen als auch adaptivem Immunsystem finden. Im adaptiven Immunsystem übernehmen die B-Zellen die Funktion der humoralen Abwehr durch Produktion der Immunglobuline während die T-Zellen Träger der zellulären Abwehr sind (Murphy, Travers et al. 2009, Kapitel 1).

Eine Immunreaktion wird ausgelöst, wenn eine immunologische Zelle ein fremdes Antigen erkennt.

Präsentiert werden Antigene auf sogenannten MHC (major histocompatibility complex)- Transmembranproteinen. Unterschieden wird zwischen MHC I und MHC II Molekülen. MHC I Moleküle sind auf jeder kernhaltigen Zelle vorhanden und präsentieren von der Zelle synthetisierte Peptide als Abbild der zelleigenen DNA. Normalerweise wird eine Zelle, die körpereigene Peptide präsentiert, als körpereigen erkannt und nicht vom Immunsystem angegriffen. Ist nun eine Zelle von Viren oder von sich intrazellulär vermehrenden Bakterien befallen oder die DNA mutiert, wird körperfremdes Material auf den MHC I Molekülen präsentiert. Dieses fremde Protein wird von spezifischen T-Zellen, den zytotoxischen T Zellen erkannt. Diese greifen die Zelle an und zerstören sie.

MHC II Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen, u.a. Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen, exprimiert. Präsentiert werden in die Zelle aufgenommene Proteine, die spezifisch von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (Murphy, Travers et al. 2009, Kapitel 3). Nach Antigenkontakt steuern und regulieren sie durch die Produktion einer Vielzahl von Zytokinen die Immunantwort.

Die T-Zellen werden folglich unterteilt in CD4⁺-T-Zellen, die mit MHC II und CD8⁺ Zellen, die mit MHC I Molekülen interagieren.

CD4⁺ - T Zellen differenzieren sich nach Aktivierung in Effektorzellen, deren Zytokinprofil entweder einem Th1 oder Th2 Profil entspricht. Th1 Zellen entstehen durch Interaktion mit dendritischen Zellen und sezernieren vor allem Interferon – γ

(IFN- γ) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α). Diese Zytokine stimulieren Makrophagen, die wiederum eine zelluläre Immunantwort einleiten. Eine Th1 dominierte Immunantwort spielt vor allem eine Rolle bei der Eliminierung mikrobieller Pathogene und mutierter Zellen (Kitze, Pette et al. 1988).

Th2 Zellen hingegen, die vor allem Zytokine wie IL-4 und IL-13 produzieren, sind in die humorale Immunantwort und die Elimination von extrazellulären Pathogenen involviert. Sie stimulieren die B-Zell-Differenzierung (Minty, Chalon et al. 1993). Ein Th2 Profil ist vorherrschend bei Wurminfektionen (Pearce, Kane et al. 2004; rezensiert von Mosman and Sad, 1996).

Beide Systeme hemmen sich gegenseitig. Ein Ungleichgewicht dieser Systeme kann zu gravierenden Erkrankungen führen. Ein Th1-dominiertes Zytokinprofil ist z.B. mitverantwortlich für eine akute Allograftabstossung (Krenger, Snyder et al. 1995). Des Weiteren spielt es eine Rolle in der Pathogenese des juvenilen Diabetes mellitus sowie des Systemischen Lupus erythematoses. Ein Th2-dominiertes Zytokinprofil ist bei Allergien und atopischen Asthma vorherrschend (Robinson, Hamid et al., 1992; Mazzeo, Bianco et al. 2000). Erst kürzlich wurde eine weitere proinflammatorische T-Zell-Population entdeckt: Interleukin- (IL-)17-produzierende Th17-Zellen.

Th17-Zellen vermitteln zwar ähnlich den IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen proentzündliche Effekte, ihre Bedeutung liegt aber eher bei den chronisch-entzündlichen Immunprozessen (Oukka 2007; Stromnes, Cerretti et al. 2008). So werden effiziente Th1 (IFN- γ)-Immunantworten durch IL-17 unterdrückt, was zur Persistenz des Erregers oder Antigens und somit zur Chronifizierung der Immunreaktion (Chronische Infektion, Autoimmunerkrankungen) führt. In Anwesenheit von IL6 und TGF- β differenzieren sich naive CD4 Zellen in Th17 Zellen (rezensiert von Korn, Bettelli et al. 2009).

Neben diesen drei Effektorzelltypen können sich naive CD4 Zellen auch in Tregs differenzieren, die regulatorisch wirksam werden und eine Immunantwort unterdrücken.

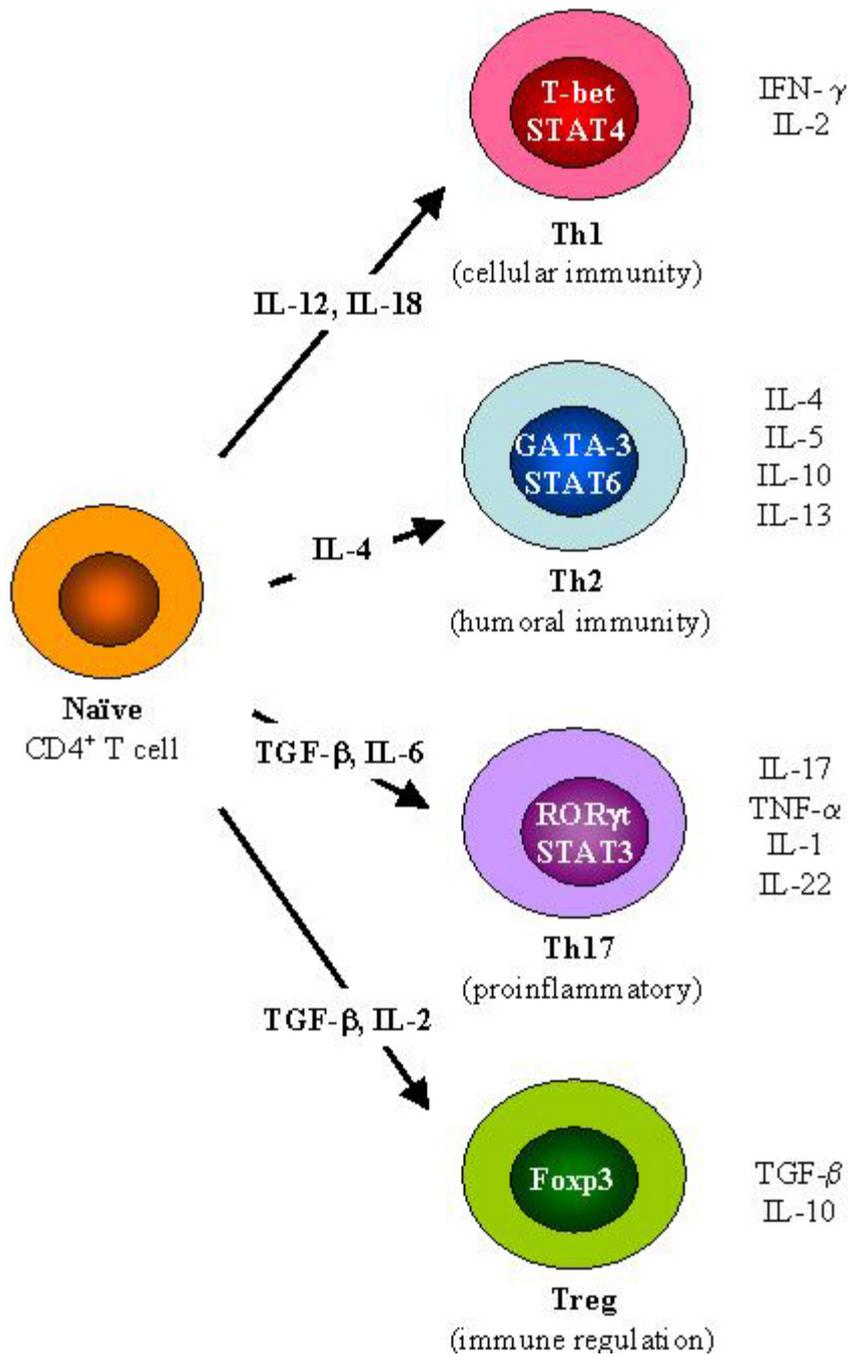


Abb.1. Schematische Darstellung der möglichen Differenzierung naiver T Zellen in Th1, Th2, Th17 und Treg Zellen und die darin involvierten Zytokine. In den Zellen

wird der Transkriptionsfaktor angegeben sowie rechts die durch die verschiedenen Zellen sezernierten Zytokine. (La Cava 2009) (<http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3247/figures.htm>)

Neben der Bekämpfung von Angriffen auf den Organismus ist es eine wesentliche Aufgabe, eigene Zellen als selbst zu erkennen und diese nicht zu zerstören. Diese Prozesse werden als Selbsttoleranz bezeichnet.

1.2.2 Toleranz

Eine zentrale Frage in der Immunologie ist folglich, wie der Organismus zwischen Selbst- und Fremdanigenen unterscheidet, erstere toleriert und letztere bekämpft werden. Dabei sind zwei Mechanismen relevant: die zentrale und periphere Toleranz.

1.2.2.1 Zentrale und periphere Toleranz

T-Zellen erkennen ihre Antigene über spezifische T-Zell-Rezeptoren. Diese bestehen aus zwei Transmembranproteinen mit verschiedenen Segmenten, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Während der T-Zell-Entwicklung entsteht durch somatische Rekombination dieser verschiedenen Gensegmente eine enorme Diversität der Rezeptoren (Chien, Gascoigne et al. 1984).

T-Zellen erkennen das Antigen aber nur, wenn es von körpereigenen MHC Molekülen präsentiert wird. Während der Thymusreifung durchlaufen die T-Zellen eine positive und negative Selektion. Positive Selektion bezeichnet die Proliferation derjenigen T-Zellen, die eine Affinität zu körpereigenen MHC Molekülen aufweisen. Daneben werden im Thymus körpereigene Antigene exprimiert. Erkennt nun eine T-Zelle körpereigene Antigene, wird sie apoptotisch. Dieser Mechanismus verhindert die Entwicklung autoreaktiver T-Zellen und wird als negative Selektion bezeichnet (Rothenberg 1992; Van Parijs and Abbas 1998).

Trotz dieser Mechanismen können im Blut Zellen gefunden werden, die Autoantigene erkennen und so potentiell gefährlich sind. Erstaunlicherweise werden diese Zellen aber nicht immer aktiv, sondern ruhen im Körper, ohne das eigene Gewebe zu destruieren

(Naquet, MacDonald et al. 1988; Kitzke, Pette et al. 1988). Dies lässt vermuten, dass neben der zentralen Toleranz auch später im Leben andere Mechanismen vorhanden sind, die solche autoreaktiven Zellen in Schach halten.

Dieses Phänomen wird als periphere Toleranz bezeichnet.

Unter anderem wird dafür eine T-Zell Subpopulation verantwortlich gemacht, die regulatorische Funktion hat: die T-regulatorischen Zellen (Danke, Koelle et al. 2004).

Erstmals wurde diese Subpopulation in den 70er Jahren unter dem Namen suppressorische T-Zellen beschrieben. Seit Anfang der neunziger Jahre sind diese Zellen unter dem Namen regulatorische T-Zellen erneut Gegenstand der Forschung.

1.2.3 T - regulatorische Zellen (Tregs)

T-regulatorische Zellen sind eine bestimmte Population von T-Zellen, die die immunologische Homöostase aufrechterhalten. So stellen sie die Toleranz der peripheren T-Zellen gegenüber Selbst-Antigenen sicher, um Autoimmunkrankheiten zu vermeiden.

1.2.3.1 Entstehung und Herkunft T-regulatorischer Zellen

Zwei Gruppen T-regulatorischer Zellen werden unterschieden:

1. natürlich vorkommende Tregs und
2. induzierbare Tregs.

Erstere werden im Thymus gebildet und machen ca. 5-10% der peripheren CD4⁺- T-Zellpopulation aus (Papiernik, Leite de Moraes et al. 1998). Die induzierbaren T-regulatorischen Zellen entstehen in der Peripherie aus aktivierten CD4⁺- T-Zellen. Die Idee, dass T-regulatorische Zellen im Thymus entstehen könnten, wurde schon früh geäußert. Eine Studie zeigte, dass Mäuse, die am 2-4. Lebensstag thymektomiert werden, an verheerenden Autoimmunkrankheiten leiden (Zwar, van Driel et al. 2006).

1.2.3.2 Charakterisierung T-regulatorischer Zellen

A) Identifizierungsmarker

Lange Zeit galt ausschliesslich CD25 in hoch exprimierter Form neben CD4 als Kennzeichen für Tregs (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Doch auch aktivierte Zellen exprimieren in hohem Maße CD25 (Baecher-Allan, Brown et al, 2001; Seddiki, 2006). Daher erlaubt CD25 keine sichere Identifizierung von Zellen mit suppressiver Funktion. Zum anderen wurden auch Zellen gefunden, die kein CD25 exprimieren, trotzdem aber suppressive Funktion ausüben und in der Lage sind die Expansion von T-Zellen zu unterdrücken.

Erst 2003 gelang es einen für Tregs spezifischen Marker zu identifizieren. Dabei handelte es sich um den Transkriptionsfaktor forkhead-winged-helix family (foxp3) (Hori, Nomura et al. 2003).

Weil foxp3 als Transkriptionsfaktor natürlicherweise intrazellulär vorliegt, somit die Zellen zur Detektion von foxp3 permeabilisiert werden müssen und keine funktionellen Tests mehr möglich sind, wurde in jüngerer Vergangenheit nach weiteren Oberflächenmarkern gesucht, die Tregs eindeutig charakterisieren und funktionelle Tests trotzdem erlauben. Weitere Oberflächenmarker, die T-regulatorische Zellen charakterisieren, sind GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor) (Shimizu, Yamazaki et al. 2002) und CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte activation-4, CD152) (Hori, Nomura et al. 2003). Auch diese sind wiederum nicht spezifisch, da sie auch von aktivierten T Zellen exprimiert werden.

2006 gelang es, einen weiteren Oberflächenmarker zu identifizieren, nämlich CD127 (IL-7 Rezeptor) (Liu, Putnam et al. 2006; Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Während foxp3 auf Tregs hoch exprimiert wird, wird CD127 nur gering (low) exprimiert. CD127^{low} charakterisiert regulatorische T-Zellen spezifisch.

Die Grösse der Population CD25+ Zellen beträgt etwa am Gesamtteil der zirkulierenden CD4+ Zellen 3% wohingegen bis um 6% foxp3+ sind.

B) Subpopulationen

Des weiteren wurde versucht, verschiedene Subpopulationen von T-regulatorischen Zellen zu identifizieren. Der Oberflächenrezeptor CD45RA charakterisiert naive Zellen, die noch kein Antigen gesehen haben, wohingegen das Oberflächenmolekül CD45RO

bzw CD45RA⁻-Zellen sogenannte memory Zellen charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass Tregs im Nabelschnurblut fast ausschließlich CD45RA positiv sind, während im Laufe des Lebens eine Verschiebung zu CD45RA⁻ Tregs erfolgt (Santner-Nanan, Seddiki et al. 2008).

Zudem weisen gewisse Krankheiten, wie z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, einen Mangel an antigenerfahrenen, also CD45RA⁻ Tregs auf (Takahashi, Nakamura et al. 2006).

Daneben sind weitere Oberflächenantigene interessant, die abhängig vom Aktivierungsgrad der Tregs exprimiert werden. Auf der Basis der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 werden memory (CD45RA⁻) Tregs weiter in effektor (CCR7⁻) und zentrale (CCR7⁺) Tregs unterschieden. CCR 7 steuert die Migration der Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe (Sallusto, Lenig et al. 1999).

1.2.3.3 Mechanismen der Suppression

Der genaue Mechanismus, über den aktivierte Tregs suppressiv wirken, ist bisher nicht bekannt. Diskutiert werden zum einen die Sekretion suppressiver Cytokine wie IL10 und TGF- β . Jedoch wurde festgestellt, dass auch Tregs IL10- und TGF- β - defizienter Mäuse suppressiv wirksam werden können. Dies legt das Vorhandensein weiterer Mechanismen nahe. Auch über Zell-Zell Kontakte scheinen Tregs T – effector Zellen (Teff) erfolgreich zu supprimieren (von Boehmer 2005). Diskutiert wird hier die Interaktion zwischen CTLA-4 (Treg) und CD80/86-Rezeptor der Zielzelle. Daneben spielt die Induktion von Indolamin-2,3-Desoxygenase (IDO) eine Rolle. Dieses Enzym baut die für die T-Zellfunktion essentielle Aminosäure Tryptophan ab und macht die Teff so unwirksam.

1.2.3.4 Klinische Bedeutung regulatorischer T-Zellen

Sowohl quantitative als auch qualitative Mängel T-regulatorischer Zellen spielen bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle (s. Abb.2).

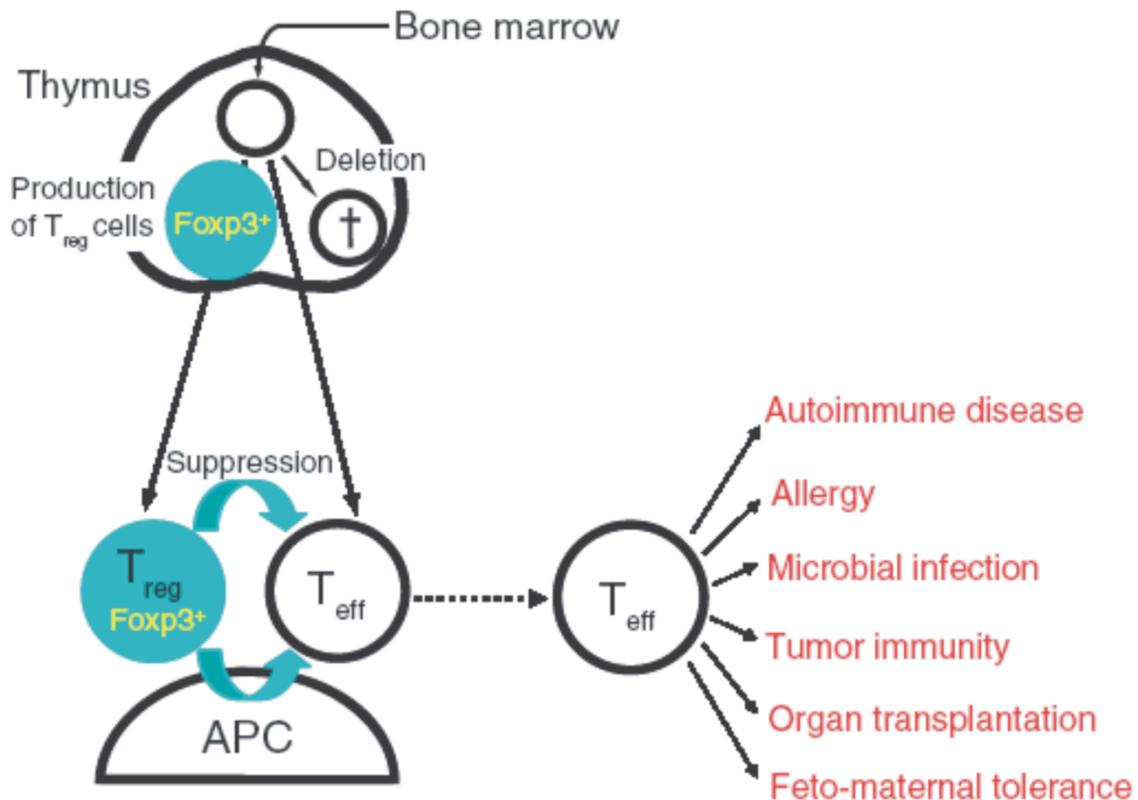


Abb. 2. Herkunft und Bedeutung T-regulatorischer Zellen

Ein Grossteil T-regulatorischer Zellen (Treg) stammen aus dem Thymus, die natürlichen Tregs. Diese foxp3+ Zellen sind in der Lage T-Effektorzellen (Teff) zu suprimieren und spielen eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten, Allergien, Infektionen, Tumorphagenese, Transplantationen und der feto-maternalen Toleranz (Sakaguchi 2005).

Eine besondere Bedeutung haben T-regulatorische Zellen bei in der Entstehung von Autoimmunkrankheiten.

Das Immundefizienz Syndrom IPEX (X-linked immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy) wird verursacht durch Mutationen im Foxp3 Gen mit der Folge des völligen Fehlens von T-regulatorischen Zellen. Klinisch gekennzeichnet ist es durch immunologische Dysregulation, Polyendocrinopathie sowie Enteropathie. Zudem ist es assoziiert mit Autoimmunkrankheiten multipler endokriner Organe (wie Diabetes mellitus Typ I und autoimmuner Thyreoditis), inflammatorischen Darmerkrankungen und schweren Allergien samt atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelallergien sowie nicht zuletzt mit fatalen Infektionen (Gambineri, Torgerson et al. 2003). Ein vergleichbares Syndrom durch eine Mutation im murinen foxp3 liegt bei der Scurfy Maus vor. Desweiteren fehlen foxp3-defizienten Mäusen CD25⁺CD4⁺ Tregs. Sie leiden an inflammatorischen Erkrankungen, die durch Transfer von CD25⁺CD4⁺ Tregs verhindert werden können (Fontenot, Gavin et al. 2003).

Autoimmunkrankheiten

Viele Autoimmunkrankheiten sind zeitlich mit dem Auftreten von Infektionskrankheiten assoziiert. Es wird davon ausgegangen, dass ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren herrscht. So wird möglicherweise der juvenile Diabetes mellitus (Typ I) durch ein Ungleichgewicht zwischen T-reg und T-eff mit verursacht (Bach and Chatenoud 2001). Der Typ I Diabetes mellitus wird durch autoreaktive T-Zellen, welche die insulinproduzierenden Zellen im Pankreas destruieren, ausgelöst. Im Mausmodell für Diabetes (NOD) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Injektion von foxp3⁺ Tregs eine Heilung hervorrief (Jaeckel, von Boehmer et al. 2005).

Desweiteren korreliert die Frequenz von Tregs invers mit der Krankheitsaktivität von Colitis ulzerosa (Takahashi, Nakamura et al. 2006). Auch scheinen Tregs den Krankheitsverlauf einer juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) (de Kleer, Wedderburn et al. 2004) sowie multipler Sklerose (Haas, Fritzsching et al. 2007) positiv zu beeinflussen.

Transplantation

Daneben sind Tregs von Bedeutung in der Transplantationsimmunologie. Sie unterdrücken den Angriff von T-Zellen auf den Allograft und vermitteln Toleranz des Körpers dem fremden Organ gegenüber, so dass eine Abstossung ausbleibt (Hara, Kingsley et al. 2001). Zudem spielen sie eine Rolle bei der Graft versus Host Krankheit (Hoffmann, Ermann et al. 2002).

Tumor

Neben diesen positiven Effekten regulatorischer T-Zellen im Rahmen von Autoimmunkrankheiten und Transplantationsmedizin ist die Rolle bei der Tumorummunologie entgegengesetzt. Hier scheinen Tregs die Immunogenität der Tumore zu verschlechtern, was zu einer abgeschwächten Immunabwehr führt und damit zum unkontrollierten Wachstum einiger Tumore beiträgt. Dabei ist vor allem die lokale Wirkung von Tregs entscheidend (Yu, Lee et al. 2005). Hohe Frequenzen T-regulatorischer Zellen wurden in Patienten mit Lungen-, Pankreas-, Brust-, Leber- und Hautkrebs gefunden (Liyanage, Moore et al. 2002; Ormandy, Hillemann et al. 2005). Mögliche zukünftige Therapieansätze liegen hier in der Inaktivierung der Tregs (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001).

Infektionen

Regulatorische Zellen limitieren überschüssige Immunantworten gegen infektiöse Erreger. So spielen Tregs eine Rolle bei der Helicobacter pylori-assoziierten Gastritis. Infizierte Patienten weisen eine höhere Frequenz von $CD4^+CD25^+foxp3^+$ T Zellen in der Magenschleimhaut auf. Dieses wird für die Aufrechterhaltung und Chronifizierung der Infektion verantwortlich gemacht (Lundgren, Stromberg et al. 2005).

Allergien

Auch in der Pathogenese von Allergien haben Tregs eine Bedeutung. So ist die suppressorische Kapazität T-regulatorischer Zellen in allergischen Patienten während der Pollensaison erniedrigt (Grindebacke, Wing et al. 2004).

Einleitung

T-regulatorische Zellen sind Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsprojekte und bieten potentielle neue Therapieansätze.

positive Effekte		negative Effekte	
Verhinderung von:	Transplantatabstossung	Herabsetzung von:	Tumorimmunität
	GvHD		Infektionsimmunität
	Autoimmunkrankheiten		
	Allergie		
	Abort? Präeklampsie?		

Tabelle 1: Positive und negative Effekte T-regulatorischer Zellen (Wood and Sakaguchi 2003)

1.2.3.5 Bedeutung von Tregs in der Schwangerschaft und Präeklampsie

Da, wie oben bereits erwähnt, der Fetus einen Allograft im mütterlichen Organismus darstellt, liegt eine Transplantationssituation vor. Die Funktion T-regulatorischer Zellen könnte eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer gesunden Schwangerschaft darstellen, so dass eine Defizienz T-regulatorischer Zellen zu Erkrankungen in der Schwangerschaft führen könnte.

Aluvihare et al. postulierten erstmals, dass regulatorische T-Zellen im Rahmen der fetomaternalen Toleranz eine Rolle spielen (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004).

Zwei Studien berichten, dass eine erfolgreiche Schwangerschaft mit einer erhöhten Frequenz von peripheren CD25^{hi}CD4⁺ Zellen einhergeht (Somerset, Zheng et al. 2004; Saito, Sasaki et al. 2005). Daneben stellten Zenclussen et al. im murinen Modell fest, dass bei einem Spontanabort eine abnorme T-zell Reaktivität gegenüber paternalen Antigenen vorliegt. In ihrer Studie konnte ein Abort durch Injektion von CD25^{hi}CD4⁺ regulatorischen T-Zellen verhindert werden (Zenclussen, Gerlof et al. 2005).

Bei der Annahme, dass für die Aufrechterhaltung und den Erfolg einer Schwangerschaft T-regulatorische Zellen notwendig sind, könnte bei einer verminderten Frequenz oder

verminderten funktionellen und damit suppressorischen Kapazität von Tregs eine Präeklampsie als Ausdruck einer sukzessiven Abstossung entstehen. Während die Untersuchungen von Paschke et al keine Erniedrigung von T-regulatorischen Zellen (Paeschke, Chen et al. 2005), charakterisiert als $CD25^{hi}CD4^{+}$ Zellen, zeigten, beschreiben Sasaki et al eine Erniedrigung dieser Zellen im peripheren Blut (Sasaki, Darmochwal-Kolarz et al. 2007).

Interessant ist auch die lokale Verteilung regulatorischer T-Zellen am feto-maternalen Grenzgebiet der Plazenta. Darüber ist bisher wenig bekannt. Sasaki et al stellten eine Erhöhung $CD25^{hi}CD4^{+}$ Zellen in der Plazenta gegenüber peripherem Blut in gesunden Schwangerschaften fest (Sasaki, Darmochwal-Kolarz et al. 2007). Desweiteren zeigten sie eine Erniedrigung der deciduellen foxp3 Expression in Schwangerschaften mit Präeklampsie verglichen mit gesunden Schwangerschaften.

Neben diesen Veränderungen auf der Ebene der T-regulatorischen Zellen charakterisieren weitere Veränderungen eine Schwangerschaft, die mögliche Mechanismen zur Toleranzentwicklung gegenüber dem haploiden Fötus darstellen.

1.2.4 Immunologische Veränderung in der Schwangerschaft

Die Plazenta (Abb. 2.) ist ein schwangerschaftsspezifisches Organ, welches die unmittelbare Grenzfläche zwischen Fetus und mütterlichem Organismus bildet. Da hier das maternale Immunsystem unmittelbar in Kontakt mit fetalen alloantigenetischen Zellen kommt, wird diesem Gewebe eine besondere Rolle zugesprochen. Die Plazenta setzt sich aus einem fetalem sowie einem maternalen, aus der Dezidua basalis abstammenden Anteil, zusammen.

Die Funktion besteht neben Hormonproduktion in der Ernährung des Feten durch mütterliches Blut, welches in der Dezidua basalis aus den mütterlichen Kapillaren tritt und in den intervillösen Raum gelangt. Unter hohem Druck umspült es dann die Kotyledone, durch Septen entstandene Läppchen, die jeweils aus mindestens zwei fetalen Stammzotten bestehen.

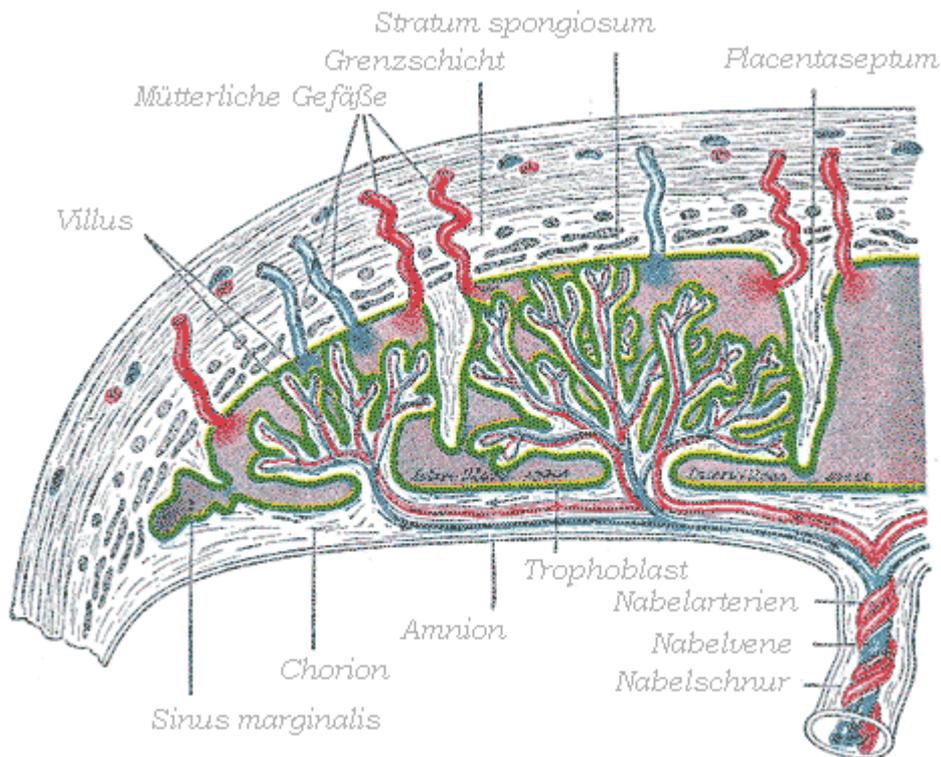


Abb. 3. Die Plazenta

Schematische Darstellung des Aufbaus der Plazenta, der feto-maternalen Grenzschicht.

(<http://de.wikipedia.org/wiki/Plazenta>)

Wie dem Auge und dem Hoden werden der Plazenta besondere immunologische Eigenschaften zugeschrieben. Diese werden als immunprivilegierte Organe bezeichnet. Mehrere Mechanismen vermitteln in der Plazenta immunologische Toleranz. So werden keine klassischen MHC I oder II Moleküle exprimiert. Es wird vermutet, dass dadurch eine Erkennung fremder paternaler Antigene durch mütterliche Zellen vermieden wird und folglich ein Angriff auf die fremden Antigene sowie die Zerstörung der Zellen ausbleibt.

Jedoch wird HLA-G vom fetalen Gewebe, dem extravillösen Trophoblasten, exprimiert. HLA-G kommt ausschliesslich dort vor und ist aufgrund dieser Sonderstellung Bestandteil zahlreicher Studien (Carosella, Rouas-Freiss et al. 1999; Hunt, Langat et al. 2006). HLA-G ist ein nicht klassisches MHC I Molekül (HLA A, B). HLA-G interagiert

mit natürlichen Killerzellen (NK Zellen) und inhibiert diese (Apps, Gardner et al. 2008). Natürlichen Killerzellen wird ebenfalls eine Sonderstellung in der Schwangerschaft zugesprochen (King, Loke et al, 1997; Koopman, 2003). Natürliche Killerzellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Im Uterus sind im ersten Trimester 70% der Leukozyten natürliche Killerzellen (10% Lymphozyten, 20% Monozyten). Die uterinen Killerzellen unterscheiden sich jedoch zu denen des peripheren Blutes. Sie sind weniger zytotoxisch wirksam sondern eher sekretorisch. Deziduale Nk Zellen sind potente Sekretoren von angiogenetischen Faktoren, die die Vaskulisierung der Dezidua induzieren. Phänotypisch unterscheiden sie sich von denen des peripheren Blutes durch hohe Expression von CD56 (Hanna, Goldman-Wohl et al. 2006). Da Präeklampsie mit einer pathologischen Trophoblasteninvasion einhergeht, könnten Funktionsstörungen der NK Zellen in der Pathogenese der Präeklampsie eine Rolle spielen. Auch Pathologien der HLA-G Interaktionen werden in der Aetiologie von Präeklampsie diskutiert (Hiby, Walker et al. 2004).

Interessanterweise wird das Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) von Makrophagen sowie uteriner Schleimhaut und dem fetalen Syncytiotrophoblasten unter Einfluss von IFN - γ hoch exprimiert. Dieses Enzym katabolisiert die essentielle Aminosäure Tryptophan und entzieht sie den T Zellen. Diese sind allerdings ohne Tryptophan nicht abwehrfähig (Munn, Zhou et al. 1998). Als weiterer möglicher Mechanismus wird CD95L vom fetalen Gewebe stark exprimiert, was zur Apoptose von maternalen CD95 exprimierenden T-Zellen führt (Bamberger, Schulte et al. 1997).

In der Pathogenese der Präeklampsie werden auch plazentare Störungen beschrieben. Dong et al konnte eine Dysbalance des Th1/Th2 Profils zugunsten des zellzerstörenden Th1 Profils auch in plazentarem Gewebe von Schwangeren mit Präeklampsie feststellen (Dong, He et al. 2005). Rieger et al. konnten eine Verminderung spezifischer Subpopulationen von decidualen Leukozyten bei Schwangeren, die an Präeklampsie leiden, aufzeigen. (Rieger, Segerer et al.)

Eine entscheidende Erkenntnis lieferte Wegmann et al 1993, dass in einer erfolgreichen Schwangerschaft ein Th2 Profil des Immunsystems vorherrscht (Wegmann, Lin et al. 1993). Sie zeigten, dass eine Injektion von Th1 typischen Zytokinen (IL-2, IFN- γ and

TNF- α) in eine schwangere Maus einen Abort zur Folge hat. Auch die hormonellen Veränderungen während einer Schwangerschaft, nämlich hohe Serumlevel an humanem Choriongonadotropin (hCG) in der Frühschwangerschaft, gefolgt von hohen Serumleveln an Progesteron, scheinen Einfluss auf das Immunsystem zu haben. Hohe Serumlevel an Progesteron, wie sie in einer erfolgreichen Schwangerschaft zu finden sind, hemmen das Th1 Zytokinprofil (Miyaura, Iwata et al 2002). Aborte sind dagegen mit niedrigen Progesteronleveln assoziiert. Segerer et al. zeigten, dass sowohl hCG als auch Estradiol die T-Zell Stimulationsfähigkeit decidualer dendritischer Zellen herabsetzen (Segerer, Müller et al 2009).

Ein weiterer Aspekt, der auf eine Beteiligung des maternalen Immunsystems und die Relevanz der Th1/Th2 These hindeutet ist, dass bestimmte Autoimmunkrankheiten, wie die rheumatoide Arthritis (Ostensen and Villiger 2007) und Multiple Sklerose (Lorenzi and Ford 2002), während der Schwangerschaft in Remission gehen, andere, wie z.B. Lupus erythematodes sich hingegen verschlechtern. Erklärt wird dieses Phänomen mit der Tatsache, dass bei der rheumatoiden Arthritis ein Th1-Profil, beim Lupus erythematodes hingegen ein Th2 Profil vorherrschend ist und durch ein in der Schwangerschaft bestimmendes Th2 Profil folglich Aktivitätsänderung der Krankheit hervorgerufen werden.

1.3 Fragestellungen dieser Arbeit

1. Findet in einer normalen Schwangerschaft gegenüber nicht schwangeren eine Expansion T regulatorischer Zellen statt? Gibt es Unterschiede auf verschiedenen Markerebenen für T-regulatorische Zellen (CD127^{low}, foxp3⁺, CD25^{high})?
2. Haben Patientinnen mit Präeklampsie im peripheren Blut weniger Tregs als normale Schwangere?
3. Wie verhält sich die Frequenz von Tregs in gesunden Schwangerschaften systemisch (im peripheren Blut) versus lokal (Decidua)? Wie sieht dieses Verhältnis bei Patientinnen mit Präeklampsie aus?
4. Gibt es Unterschiede in der weiteren phänotypischen Charakterisierung (CD45RA, CCR7) zwischen gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Penicillin	Invitrogen
Streptomycin	Invitrogen

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Firma
Anti-CD4 FITC	RPAT4	BD Bioscience
Anti-CD4 PE	RPAT4	BD Bioscience
Anti-CD4 (L3T4) bio	RPAT4	eBioscience
Anti-CD38 FITC	HB7	BD Bioscience
Anti-CD127 PE	hIL-7RM21	BD Pharmingen
Anti-CD127 unconjugiert	hIL-7RM21	BD Pharmingen
Anti-CD25 PE	4E3	Miltenyi
Anti-CD25 APC	M-A251	Becton Dickinson
Anti-CD45RA bio	HT100	BD Pharmingen
Anti-CD27-APC	323	eBioscience
Anti-CCR7 Alexa Flour 647	3D12	BD Pharmingen
Anti-foxp3 PE	PCH101	eBioscience
Simultest control IgG1/IgG2a		BD Pharmingen
Pe conjugated Rat IgG2a Isotype control	eBR2a	eBioscience
Streptavidin per CP	Streptavidin	BD Pharmingen

2.1.3 Geräte

FACS	BD <i>FACS</i> Calibur. Becton Dickinson
Kühlschrank -80°	Sanyo
Pipetten	Eppendorf
Skalpel	Swann Morton
Stickstoff Tank	Taylor Wharton
Vortex	Selby
Neubauer - Zählkammer	American Optical

Material und Methoden

Zentrifuge

Sorvall

2.1.4 Puffer und Medien

PBS, Phosphate Saline buffer, pH 7.4,

Sigma-Aldrich

1L: 0.01M phosphate buffered saline, NaCl – 0.138M; KCl – 0.0027M

RPMI Medium 1640 +-L-Glutamin,

Gibco

Einfrriermedium:

40% RPMI (10ml)

40% FCS (10ml)

20% DMSO (5ml)

2.1.5 Seren

FCS (fötales Kälberserum)

Invitrogen

BSA (Rinderserumalbumin)

Sigma

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

FACS Röhrchen 4ml

Falcon, BD Biosciences

Pipettenspitzen 2.5ul, 100ul, 1ml

Eppendorf

Skalpellsklingen

Swann Morton

Plastikröhrchen 15ml, 50ml

Falcon, BD Biosciences

Zellsieb, BD Falcon, 70um Nylon

BD Biosciences

2.1.7 Vorgefertigte Lösungen

Ficoll-Paque™ Plus

Amersham Bioscience

FACS buffer: PBS + 0.05% BSA + 0.02% Na-Azid

2.2 Methoden

2.2.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs

Drei Gruppen bildeten die Grundlage des Untersuchungskollektivs: nicht-schwangere Frauen zwischen 18 und 25 Jahren, schwangere Frauen und Frauen mit Präeklampsie. Bei allen drei Gruppen wurden die Frequenz T-regulatorischer Zellen bestimmt. Neben der systemischen Reaktion, gemessen im peripher-venösen Blut wurde auch die lokale Reaktion, gemessen an deciduellen Zellen gesunder schwangerer Frauen und Frauen mit Präeklampsie bestimmt. Dazu wurde peripher venöses Blut von schwangeren Frauen (n=24) und Frauen mit Präeklampsie (n= 13) 2- 5 Stunden vor der Entbindung sowie peripher venöses Blut nicht-schwangerer Frauen (n=23) abgenommen. Um die Verunreinigung der Decidua mit fetalen Zellen zu kontrollieren, wurde zudem Nabelschnurblut des zu der jeweiligen Schwangeren gehörigen Neugeborenen entnommen.

Als Diagnosekriterien für Präeklampsie galten die von der *US National Institutes of Health working group on hypertension in pregnancy* festgelegten Kriterien (49, 149):

- ein Blutdruckanstieg - welcher in der 2. Schwangerschaftshälfte (> 20. SSW) erfolgte - von > 30 mmHg systolisch und/oder > 15 mmHg diastolisch gegenüber vergleichenden

Messungen in der Frühschwangerschaft bzw., wenn diese fehlten, ein Blutdruck > 140/90 mmHg

- eine Proteinurie (> 300mg/24 h) bei gleichzeitigem Ausschluss einer Harnwegsinfektion
- vollständiger Normalisierung der beiden erstgenannten Symptome nach Entbindung.

(Brown, Hague et al. 2000)

Ausschlusskriterien waren ein bekannter Diabetes mellitus, Schwangerschaftsdiabetes, Erkrankungen der Niere, chronische Hypertonie sowie Infektionskrankheiten.

Die Studie wurde gemäss der Deklaration von Helsinki durch das Ethikkomitee des Western Sydney Area Health Services, Australia genehmigt. Des Weiteren gaben alle Studienteilnehmer Ihre schriftliche Zustimmung vor der Blutentnahme.

2.2.2 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (B/T Lymphozyten, Makrophagen, NK Zellen)

Peripher venöses Blut des Untersuchungskollektivs sowie das Nabelschnurblut wurden in Lithium-Heparin beschichtete Röhrchen abgenommen. Danach wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt. In ein neues Röhrchen wurde nun 1 Teil Ficoll-Hypaque vorgelegt und mit 2 Teilen der PBS-Blut Mischung überschichtet. Durch eine 30minütige Ficoll-Dichte-Gradient-Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse erfolgte die Auftrennung des Blutes in Erythrozyten, Plasma und mononukleäre Zellen. Am Boden des Röhrchens sedimentieren die Erythrozyten aufgrund ihrer hohen Dichte, während die mononukleären Zellen (MNC) die Interphase zwischen Ficoll (unten) und Plasma (oben) bilden. Diese aus mononukleären Zellen bestehende Trennschicht wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen transferiert. Es folgte die Auffüllung mit PBS/FCS 0.4% und Zentrifugation bei 1300 rpm mit Bremse für 10 Minuten. Anschliessend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet gelöst und erneut mit PBS/FCS 0.4% aufgefüllt und bei 1200 rpm für zehn Minuten mit Bremse zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Zwischen den beiden Waschvorgängen erfolgte die Zellzählung. Dazu wurden zu 50 μ l der Zelllösung 50 μ l einer 1:2-verdünnten Trypanblau-PBS Mischung zugegeben und anschliessend ein Teil in die Neubauer Zählkammer überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen der Zellen innerhalb der 16 Quadrate (= 4 Großquadrate) unter dem Mikroskop.

Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung bei einem Volumen von 0,1 μ l pro Großquadrat:

$$\text{Gesamtzellzahl der Ausgangslösung} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ml (ml der Zellsuspension)}$$

Anschliessend wurden die Zellen gefärbt, eingefroren oder in Nährmedium 24 Stunden bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Beim Einfrieren der mononukleären Zellen wurde wie folgt vorgegangen: Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm für vier Minuten mit Bremse zentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 500µl 4° kaltes Medium (Zellzahl: 3×10^7 /ml Endvolumen) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen transferiert. Die Lagerung erfolgte für die ersten 24 Stunden in einem –80° C Gefrierschrank gefolgt von der Überführung in einen –196° C Gefrierschrank in einem stickstoffgefüllten Tank.

2.2.3 Gewinnung deciduärer Lymphozyten

Gewebe der Decidua wurde im direkten Anschluss an die Geburten (vaginale sowie Kaiserschnitte) aus der Plazenta gewonnen, wie vorbeschrieben (Darmochwal-Kolarz, Rolinski et al. 2000) (Sindram-Trujillo, Scherjon et al. 2004). Zusammengefasst wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Auf der maternalen Seite der Decidua wurde an einem intakten Bereich mittels eines Skalpels oberflächliches Gewebe abgeschabt, mit PBS abgewaschen und in einen mit PBS gefüllten Plastikbehälter transferiert. Danach wurden die gewonnenen deciduellen Gewebestücke durch ein Zellsieb gedrückt und die dadurch gewonnene Suspension erneut mit PBS gewaschen. Darauf folgte wie unter 2.2.2 beschrieben die Isolation der mononukleären Zellen mit Hilfe der Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation.

2.2.4 Oberflächen- /intrazelluläre Färbung

Mononukleäre Zellen wurden in Zellfärbungspuffer (PBS mit 0.1% FCS und 0.2% Natriumazid) resuspendiert und mit folgenden Antikörpern gefärbt: FITC-, PE oder biotin-konjugiertes Anti-CD4, anti-CD25-FITC, -PE oder –allophycocyanin, anti-CD27

APC, anti-CD38-FITC, anti-CD127 unkonjugiert oder -PE, anti-CD45RA-biotin, anti-CD95 APC und anti-CCR7-AlexaFluor647, anti-foxp3 PE sowie die Negativkontrolle Simultest control G1G2A für die oberflächlichen Färbungen und PE konjugiertes Ratten IgG2a Isotypkontrolle für die intrazelluläre Färbungen.

Zunächst wurden 100 µl der präparierten Zellen ($2-5 \times 10^5$ or $1-2 \times 10^6$) in jedes FACS-Röhrchen gegeben und die adäquaten Mengen Antikörper gegen die Oberflächenantigene (CD4, CD25, CD45RA, CD127, CD38, CCR7, CD27, Simultest control G1G2A) hinzugefügt und durchmischt. Nach Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen folgte die Zugabe von FACS Puffer (PBS + 0.05% BSA + 0.02% Natriumazid) und die Zentrifugation bei 1600rpm mit Bremse für 4 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 2 ml FACS Puffer resuspendiert.

Für die CD45RA Färbung waren zwei Schritte notwendig: Zunächst wurden die Zellen in einem ersten Schritt mit Biotin-konjugiertem Anti-CD45RA für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und anschliessend nach einem Waschvorgang mit einem weiteren, diesmal fluoreszierenden Antikörper gegen Biotin, Streptavidin PerCP, markiert (Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen, Waschen und Dekantieren des Überstandes).

Die intrazellulären Färbungen mit foxp3 wurde mit dem anti-humanen foxp3 Färbungsset und Protokoll von ebioscience durchgeführt (BioLegend). Das Zellpellet wurde nach der Oberflächenfärbung mittels Pulsavortex resuspendiert und anschliessend 1ml Fix/Perm Puffer zugefügt. Diese Zellsuspension wurde für 30 Minuten im Dunklen bei 4° inkubiert und danach mit Zellfärbungspuffer einmal gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen resuspendiert und mit 2ml 1x Permeabilisationspuffer gewaschen. Es folgte die Blockierung mit 2 µl Rattenserum bei 4° C für 15 Minuten und danach wurden die Zellen ohne Waschvorgang mit 20µl anti-human foxp3 (PCH 101) Antikörper bei 4° für 30 Minuten inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml Permeabilisationspuffer gewaschen und in Durchflusszytometrie Färbungs Puffer resuspendiert. Die nun sowohl intrazellulär als auch an der Oberflächen gefärbten Zellen wurden nun an einem FACS Calibur Gerät (Becton Dickinson) aufgenommen.

Fluoreszenz Nummer	FITC	PE	perCP	APC
1	CD4	CD127	CD45RA	CD25
2	CD38	CD4		
3		Simultest control G1G2A (Isotypkontrolle)		
4	CD4	Foxp3	CD45RA	CCR7
5		Ratten IgG2a (Isotypkontrolle)		

Tabelle 2 : Darstellung der durchgeführten Oberflächen- und intrazellulären Färbungen.

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut und decidualen Gewebe wurden mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, wie im Methodenteil unter 2.2.3 beschrieben, gefärbt. Nummer 1-3 sind Oberflächenfärbungen, während Nummer 4 eine Kombination aus Oberflächenfärbung und intrazellulärer Färbung darstellen und Nummer 5 eine reine intrazelluläre Färbung ist.

Die CD38/CD4 Färbung wurde durchgeführt, um eine mögliche Kontamination der Decidua mit fetalem Blut zu kontrollieren. Dazu wurde mütterliches Blut, fetales Blut (Nabelschnurblut) sowie deciduales Gewebe mit CD38 und CD4 Antikörpern gefärbt. Fetalblut exprimiert hoch CD38, während mütterliches Blut wenig CD38 positive Zellen aufweist. Ist nun deciduales Gewebe hoch positiv für CD38 spricht dies für eine Kontamination durch fetale Zellen.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Zellzählung erfolgte mittels FACS, einem fluoreszenz-aktivierten Zellsorter. Bei einer gewöhnlichen Durchflusszytometrie werden die Zellen durch eine vibrierende Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichtes. Die Vorwärts-Lichtstreuung (FCS) korreliert mit der Grösse der Zellen, die seitliche Lichtstreuung mit der Granularität bzw der Plasma-Kern Relation (SSC). So können Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten durch ihr unterschiedliches Verhalten in der Durchflusszytometrie als unterschiedliche Populationen visualisiert werden (Abb.4.).

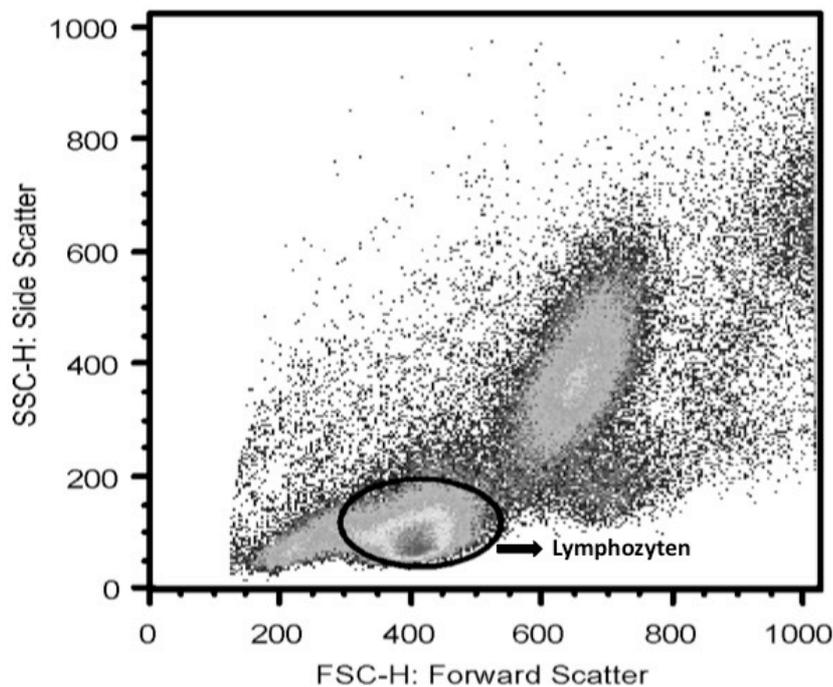


Abb. 4.: Verteilung mononukleärer Zellen in der FACS Analyse

Granularität, gemessen durch Side Scatter (SSC) auf der y-Achse aufgetragen gegenüber der Grösse der Zellen, gemessen durch Forward Scatter (FSC) auf der x-Achse. Hervorgehoben die Lymphozytenpopulation.

Sind die Zellen mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert, wird dieser bei einer bestimmten für ihn charakteristischen Wellenlänge angeregt, woraufhin energieärmeres Licht ausgestrahlt wird. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl vorhandener Bindungsstellen für den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper und damit ein Maß für die Quantität der Expression des jeweiligen Antigens. Diese wird im FACS gemessen, durch einen Sperrfilter gelassen und durch einen Farbleiter dem Betrachter dargestellt. Mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die in ihren Emissionsmaxima differieren, gelingt es, gleichzeitig mehrere Oberflächenantigene einer Zelle zu identifizieren.

So können Populationen, die die markierten Antigene exprimieren, visualisiert und deren Frequenz bestimmt werden. Ist kein Antigen vorhanden, wird keine Fluoreszenz gemessen. Bei dem hier verwendeten FACS Gerät standen vier verschiedene Fluoreszenzkanäle zur Verfügung, so dass maximal vier verschiedene Antigene einer Zelle markiert und dargestellt werden konnten.

Zur Datenanalyse diente das Programm CellQuest der Firma Becton Dickinson. Dies erlaubt eine Auftragung der verschiedenen Fluoreszenzen in graphischen Darstellungen. In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem die Darstellung des sogenannte Dot Plot verwendet. Dabei werden zwei Fluoreszenzen gegeneinander auf zwei Achsen aufgetragen und die aufgenommenen Zellen gemäss vorhandener Antigene dargestellt.

2.2.5.1 Isotypkontrolle

Die Isotypkontrolle zeigt das Ausmass einer möglichen unspezifischen Bindung eines Antikörpers, was zu falsch positiven Ergebnissen der mit Antikörper gefärbten Oberflächenantigene führt.

2.2.5.1.1 Isotypkontrolle der Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbungen wurde eine Negativkontrolle bei jeder Probe (schwangerer Frauen, deren Feten und decidualem Gewebe) mit dem Isotyp IgG₁/IgG_{2a} Antikörper durchgeführt. Dabei konnte nur eine sehr geringe, vernachlässigbare unspezifische Bindung dargestellt werden, >99.7% der Zellen konnten nicht mit dem Antikörper gefärbt werden, zeigten also keine unspezifische Bindungen (s. Abb 5).

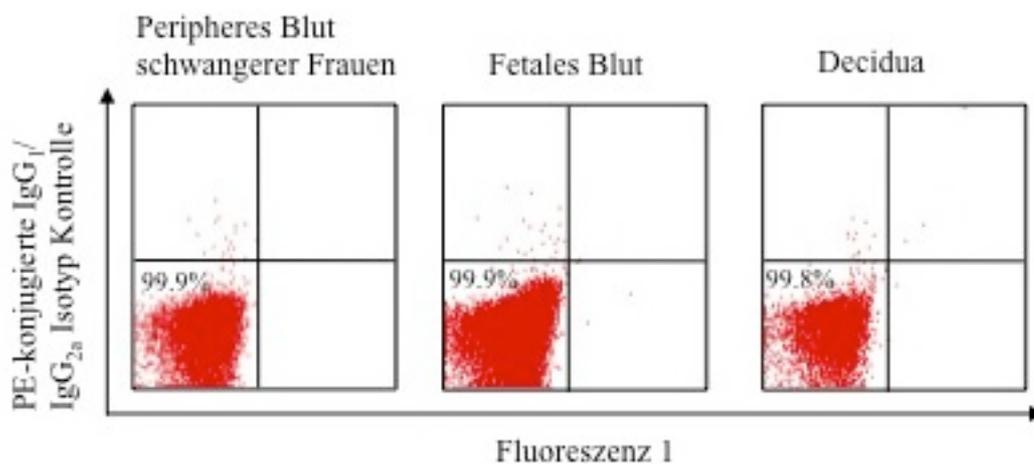


Abb. 5: Negativkontrolle der Oberflächenfärbungen durch Isotypmarkierung maternaler, fetaler und deciduärer Lymphozyten

PBMZ schwangerer Frauen und der Feten sowie mononukleäre Zellen aus decidualem Gewebe wurden mit PE-konjugiertem Isotyp IgG₁/IgG_{2a} Kontrolle gefärbt und mit Hilfe des FACS Gerätes analysiert. Dargestellt ist eine Dot Plot Analyse mit Quadrantenstatistik. Aufgetragen ist die Fluoreszenz 1 (x-Achse) gegenüber PE-konjugiertem Isotyp IgG₁/IgG_{2a} Kontrolle (y-Achse). In den Quadranten sind die Prozentzahlen der jeweils von dem Antikörper positiv gefärbten Zellen angegeben. >99.7% der Zellen zeigten keine unspezifische Bindung.

2.2.5.1.2 Isotypkontrolle der Intrazellulärfärbung

Da mit maternalen und deciduellen Zellen intrazelluläre Färbungen durchgeführt wurden, erfolgten auch hier intrazelluläre Isotypkontrollen. Dabei wurden nur kleinste, vernachlässigbare Mengen unspezifischer Bindungen festgestellt (s. Abb. 6).

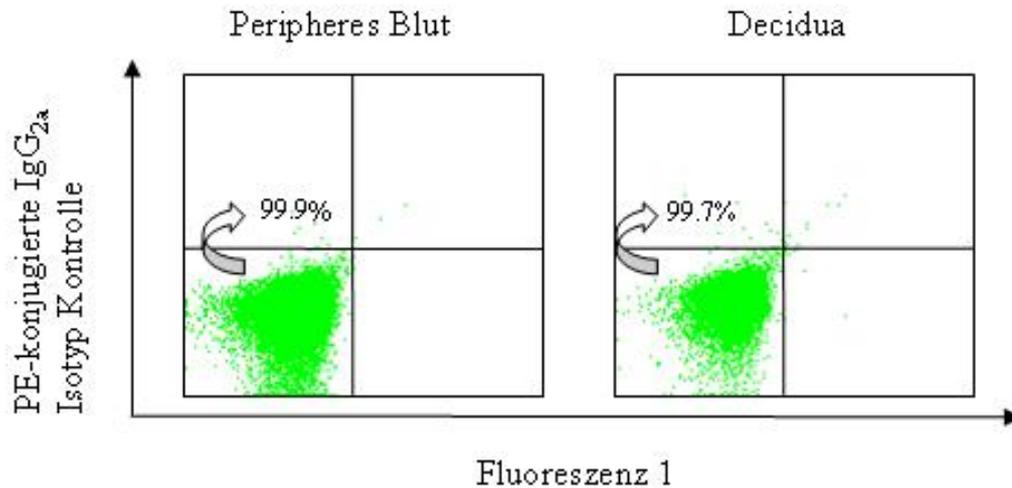


Abb. 6: Negativkontrolle der intrazellulären Färbungen durch Isotypmarkierung maternaler und deciduärer Lymphozyten

PBMZ schwangerer Frauen und mononukleäre Zellen aus deciduellem Gewebe wurden mit PE konjugiertem Rat IgG2a gefärbt und mit Hilfe des FACS Gerätes analysiert. Dargestellt ist eine Dot Plot Analyse mit Quadrantenstatistik. Aufgetragen ist die Fluoreszenz 1 (x-Achse) gegenüber PE konjugiertem Rat IgG2a (y-Achse). In den Quadranten sind die Prozentzahlen der für die jeweilige Fluoreszenz positiv detektierten Zellen angezeigt. >99.7% der Zellen zeigten keine unspezifische Bindung.

2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 15.0 Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurde mittels des Levene's Test auf Normalverteilung geprüft und aufgrund nicht normal verteilter Variablen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney U Test benutzt, um die Signifikanz von Unterschieden zwischen zwei Kohorten zu ermitteln. Die Signifikanz von gepaarten Stichproben wurde mit Hilfe des Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben berechnet. Angegeben ist der Median +/- Standardfehler des Median (mean +/- sem). Die

Irrtumswahrscheinlichkeit (P-Wert) wurde mit $P < 0.05$ als signifikant und $P < 0.01$ als hochsignifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Baselinecharakteristika

Das Durchschnittsalter der gesunden Frauen war 30.5 Jahre vs 30.0 Jahre in der Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie, das durchschnittliche Gestationsalter war 39 Wochen vs 36 Wochen und das durchschnittliche Geburtsgewicht lag bei 3705g vs 2141g (s. Tabelle 3).

	Nicht Schwangere n=28	Gesunde Schwangere n=24	Schwangere mit Präeklampsie n=15	
Alter der Patientinnen in Jahren	27 (26-28)	30.5 (20 - 41)	30 (17 - 37)	ns
Gestationsalter in Wochen		39 (35 - 41)	36 (29 - 39)	**
Geburtsgewicht in Gramm		3705 (2700 - 4795)	2141 (855 - 4180)	**
Parität		3 (1 - 6)	1 (1 - 5)	*
Gravität		3 (1 - 7)	2 (1 - 8)	ns
Organbeteiligung		–	15	
Renal		–	15	
Neurologisch		–	6	
Hepatisch		–	4	
Männlicher Fetus		14	7	
Intensivpflichtige Neugeborene		0	10	

Tab. 3: Klinische Daten der Patientinnen der drei Gruppen mit Angabe der Signifikanzen

3.2 Frequenzen T-regulatorischer Zellen

3.2.1 Frequenzen T-regulatorischer Zellen im peripheren Blut

Frequenzen T-regulatorischer Zellen im peripheren Blut gesunder Schwangerer verglichen mit nicht-Schwangeren

Verglichen mit nicht-Schwangeren ist im peripheren Blut von gesunden Schwangeren die Frequenz T-regulatorischer Zellen signifikant erhöht. Dies wurde für die

Ergebnisse

Charakterisierung von Tregs durch die alte Markerkombination $CD25^{hi}CD4^{+}$ sowie die neue Oberflächenmarkerkombination $CD127^{low}CD25^{hi}CD4^{+}$ festgestellt. Hingegen zeigte sich keine signifikante Veränderung in der *foxp3* Expression (s. Abb. 7).

Frequenz T-regulatorischer Zellen im peripheren Blut von Patientinnen mit Präeklampsie verglichen mit gesunden Schwangeren sowie nicht-Schwangeren

Im peripheren Blut von Schwangeren mit Präeklampsie wurde kein signifikanter Unterschied in der Frequenz von $CD25^{hi}CD4^{+}$ Zellen zu der Frequenz bei gesunden schwangeren Frauen festgestellt. Dagegen bestand eine signifikante Verminderung der $CD127^{low}CD25^{hi}CD4^{+}$ Zellen und der *foxp3* Expression bei Schwangeren mit Präeklampsie (s. Abb. 7).

Im Vergleich zu nicht-Schwangeren konnte auf *foxp3* Ebene eine Verminderung dargestellt werden. Bei den anderen beiden Markerkombinationen, $CD25^{hi}CD4^{+}$ sowie $CD127^{low}CD25^{hi}CD4^{+}$ lag kein signifikanter Unterschied zwischen nicht-Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie vor (s. Abb. 7).

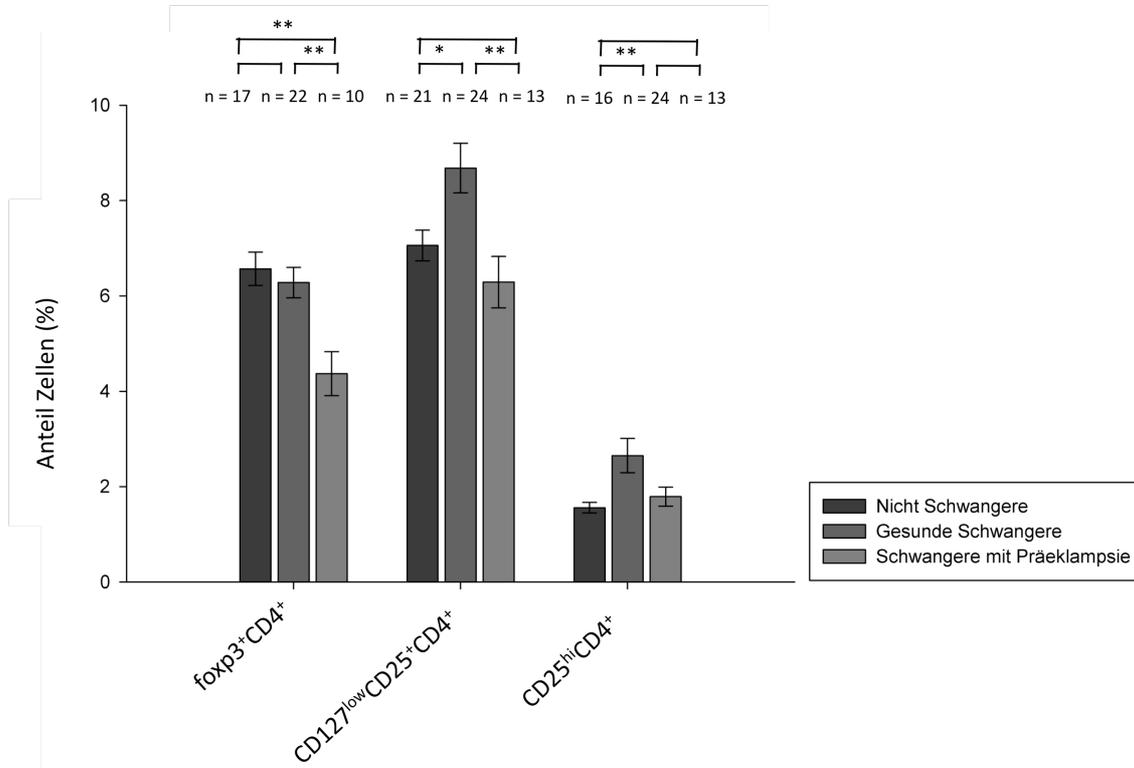


Abb. 7.: Vergleich der Frequenzen von Tregs im peripheren Blut nicht-Schwangerer, gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von nicht-Schwangeren, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie wurden mit anti-CD4, anti CD25 und anti-CD127 gefärbt. Ein Teil der Zellen wurde nach der Oberflächenfärbung fixiert und anschliessend mit anti-foxp3 intrazellulär gefärbt. Detektiert wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Die Daten wurden auf CD4 gated und die Frequenz von foxp3⁺CD4⁺, CD127^{low}CD25^{hi}CD4⁺ Zellen und CD25^{hi}CD4⁺ berechnet. Die Daten sind dargestellt als Mediane +/- sem. P- Werte (angegeben als * - P <0.05, ** - P <0.01) wurden mit Hilfe des Mann-Withney U Test berechnet.

Ergebnisse

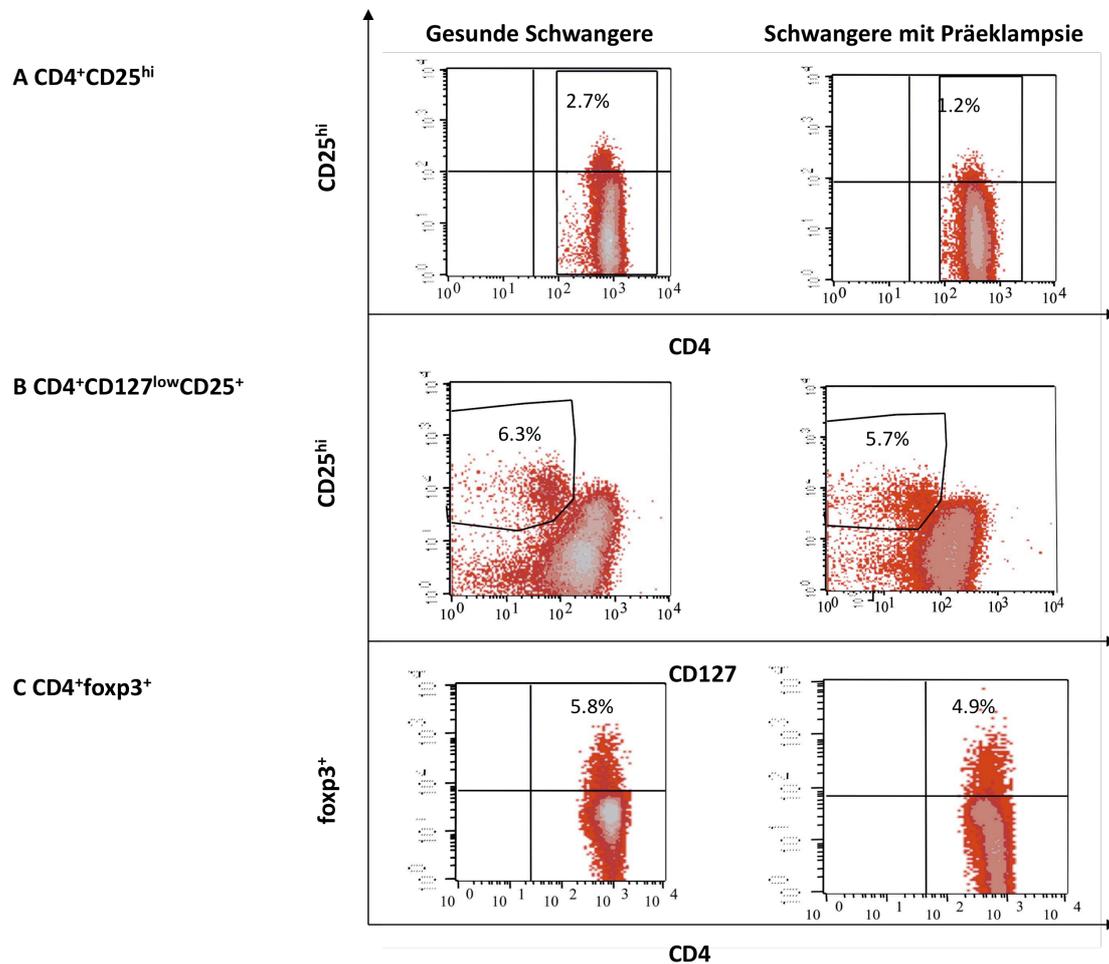


Abb. 8.: Frequenzen T-regulatorischer Zellen im peripheren Blut gesunder Schwangerer verglichen mit Schwangeren mit Präeklampsie

Lymphozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Schwangerer (links) und Schwangerer mit Präeklampsie (rechts) isoliert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie.

A: Dot Plot Analyse der mit anti-CD25 (y-Achse) und anti-CD4 (x-Achse) gefärbten Lymphozyten mit Quadrantenstatistik. Im oberen rechten Quadranten ist der prozentuale Anteil CD25^{hi}CD4⁺ T-Zellen angegeben.

B: Dot Plot Analyse der mit anti-CD4, anti-CD25 (y-Achse) und anti-CD127 (x-Achse) gefärbten Lymphozyten. Zunächst wurde auf CD4 gated und dann CD25

gegen CD127 aufgetragen. Im Gate ist die Prozentszahl der $CD127^{lo}CD25^{+}CD4^{+}$ T-Zellen angegeben.

C: Dot Plot Analyse der mit anti-CD4 oberflächlich und anti-foxp3 intrazellulär gefärbten Lymphozyten mit Quadrantenstatistik. Im rechten oberen Quadranten ist die Prozentszahl der $foxp3^{+}CD4^{+}$ T-Zellen angegeben.

3.2.2 Frequenz T-regulatorischer Zellen im deciduellen Gewebe

Ziel dieser Arbeit ist es, neben Veränderungen der Treg - Frequenzen auf systemischer Ebene, also im peripheren Blut, auch mögliche lokale Veränderungen auf plazentarer Ebene zu zeigen. Dazu wurde deciduales Gewebe der maternalen Seite der Plazenta mittels der unter 3.3. beschriebenen Kratztechnik gewonnen, sodann wurden nach Lymphozytenisolation und Färbung die Frequenz T-regulatorischer Zellen im deciduellen Gewebe gesunder schwangerer Frauen sowie schwangerer Frauen mit Präeklampsie bestimmt.

Da die Decidua als Teil der Plazenta die fetomaternale Grenzschicht bildet und maternales Blut in direktem Kontakt mit fetalem Blut steht, ist eine Kontamination des maternalen deciduellen Gewebes mit fetalem Blut möglich. Das Interesse dieser Arbeit galt aber gerade den Treg - Frequenzen des maternalen und nicht fetalen deciduellen Gewebes, weshalb eine übermäßige Kontamination der Proben mit fetalem Blut und damit fetalen Tregs ausgeschlossen werden musste. Bei der Unterscheidung der Herkunft der mononukleären Zellen (maternal vs fetal) ist die unterschiedliche CD38 Expression hilfreich.

3.2.2.1 CD38 Expression maternaler und fetaler PBMZ sowie deciduärer mononukleärer Zellen gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

CD38 ist ein Aktivationsmarker von Lymphozyten. $CD4^{+}$ Zellen des adulten peripheren Blutes zeigen eine geringe CD38 Expression, wohingegen fetale $CD4^{+}$ Zellen CD38 hoch exprimieren. Mononukleäre Zellen des deciduellen Gewebes maternalen Herkunft

Ergebnisse

sollten dem maternalen Muster der CD38 Expression entsprechen und somit CD38 niedrig exprimieren.

Um eine Kontamination des deciduellen Gewebes durch fetales Blut auszuschliessen, wurde jeweils ein Satz Proben, bestehend aus peripheren mononukleären Zellen maternaler und fetaler Herkunft sowie maternalem deciduellem Gewebe bezüglich der CD38 Expression verglichen. Zeigte nun eine Probe deciduellem Gewebes eine Frequenz $>20\%$ $CD38^+CD4^+$ Zellen, wurde diese als mit fetalem Blut kontaminiert betrachtet und nicht in die Auswertung eingeschlossen.

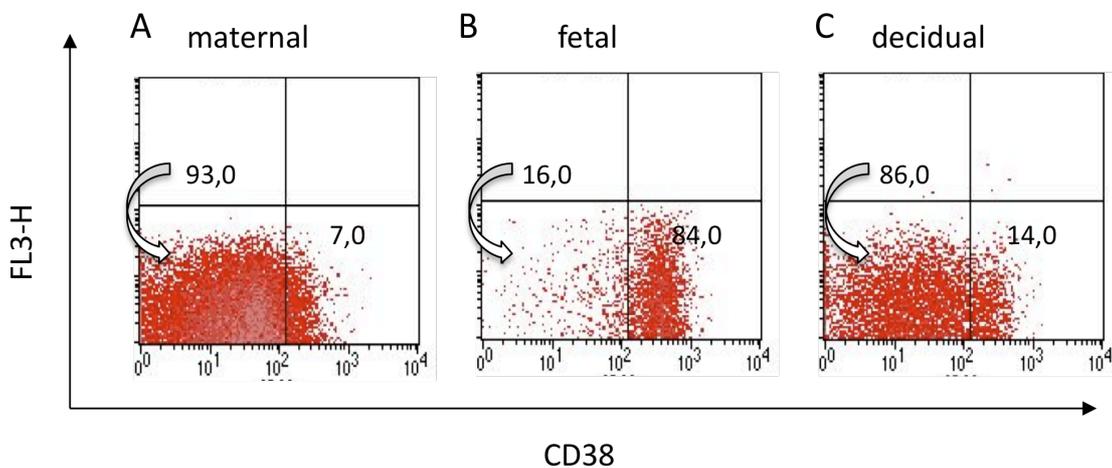


Abb. 9: CD38 Expression maternalen, fetaler und deciduellen $CD4^+$ Lymphozyten

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes einer Schwangeren, des dazugehörigen fetalen Blutes und deciduellen Gewebes wurden isoliert und mit anti-CD38 (x-Achse) und anti-CD4 (y-Achse) gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Dargestellt sind Dot Plot Analysen der CD38 Expression mit Quadrantenstatistik

A maternaler PBMZ,

B fetaler PBMZ

C deciduellen mononukleärer Zellen.

Unter den fetalen $CD4^+$ Lymphozyten (B) sind 84% für CD38 positiv, während unter den maternalen (A) nur 7% CD38 positiv reagieren. Die Färbung deciduellen $CD4^+$ Lymphozyten (C) zeigt 14% CD38 positive Zellen. Das Bild der deciduellen CD38

Ergebnisse

Expression entspricht somit dem maternalen Muster. Es liegt folglich nur eine geringe Kontamination deciduärer Zellen mit fetalem Blut vor.

Frequenz T-regulatorischer Zellen in der Decidua gesunder Schwangerer verglichen mit Schwangeren mit Präeklampsie

Im deciduellen Gewebe ist die Frequenz von $CD127^{low}CD25^{hi}CD4^{+}$ Zellen signifikant niedriger bei schwangeren Frauen mit Präeklampsie (8.18% +/- 0.54) als bei gesunden Schwangeren (10.12% +/- 0.69). Kein Unterschied konnte für die Markerkombinationen $CD25^{hi}CD4^{+}$ (4.54% +/- 0.57 bei gesunden Schwangeren und 4.19% +/- 0.56 bei der Präeklampsiegruppe) sowie $foxp3^{+}CD4^{+}$ (7.59% +/- 0.55 bei gesunden Schwangeren und 6.57% +/- 0.62 bei Schwangeren mit Präeklampsie) gezeigt werden (s. Abb. 10/11).

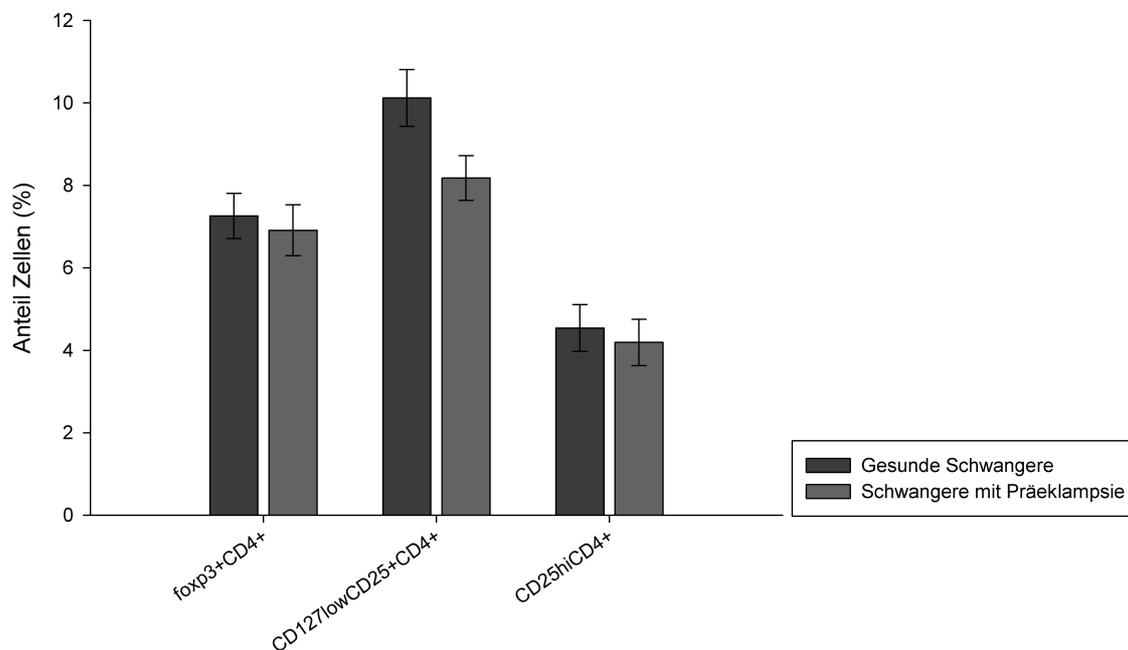


Abb. 10.: Frequenzen deciduärer regulatorischer T-Zellen gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

Deciduales Gewebe wurde mittels Kratztechnik gewonnen und mit anti-CD4 (FITC), anti-CD25 (APC) und anti-CD127 (PE) gefärbt. Ein Teil der Zellen wurde nach der

Ergebnisse

anti-CD4 und anti-CD25 Oberflächenfärbung fixiert und anschliessend mit anti-foxp3 intrazellulär gefärbt. Detektiert wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Die Daten wurden auf CD4 gated und die Frequenz von $\text{foxp3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD127}^{\text{low}}\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$ Zellen und $\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$ berechnet. Dunkelgraue Säulen repräsentieren die Gruppe der gesunden Schwangeren und hellgraue die der Schwangeren mit Präeklampsie (Angabe der Anzahl der Proben der einzelnen Gruppen (n)). Die Daten sind dargestellt als Mediane +/- sem. P- Werte (angegeben als *) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Test berechnet.

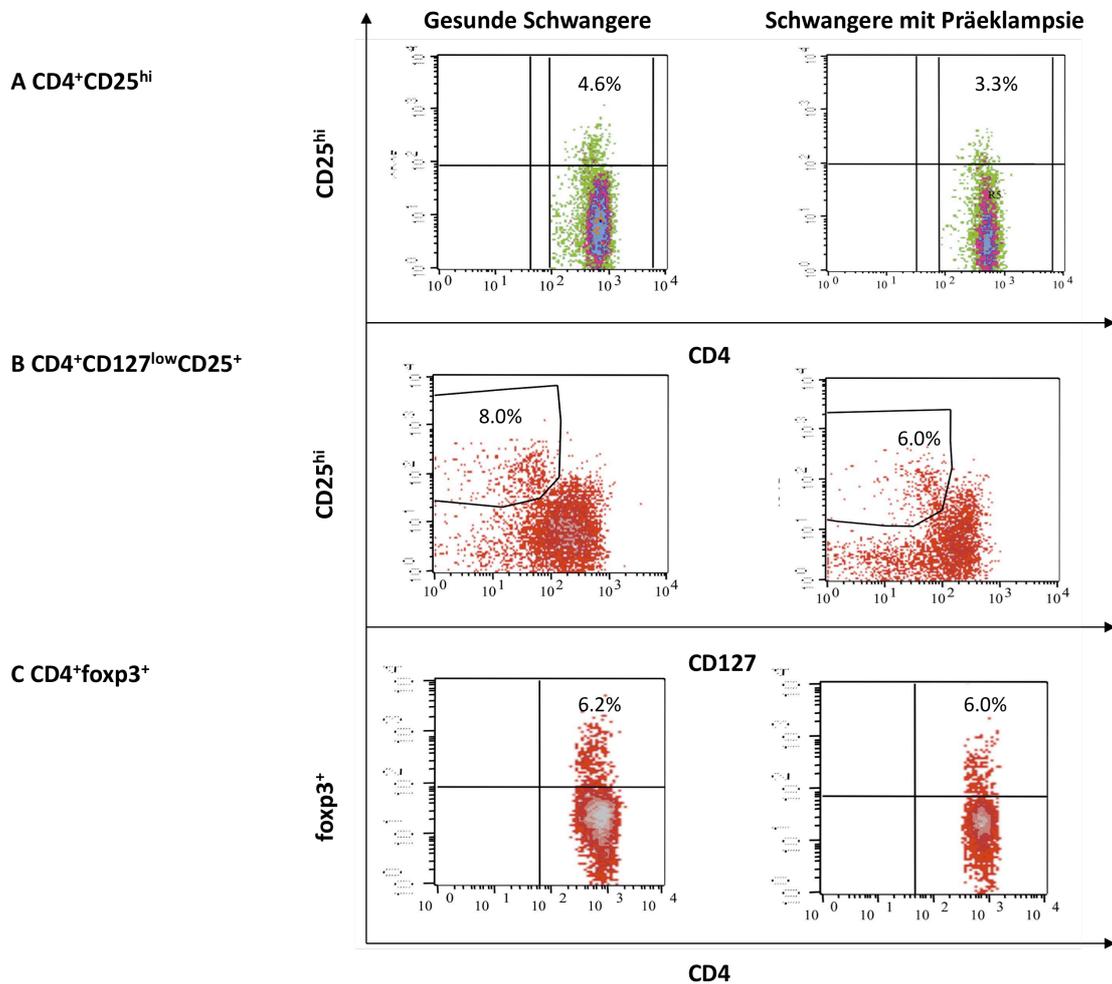


Abb. 11: Frequenzen deciduärer regulatorischer T-Zellen gesunder Schwangerer verglichen mit Schwangeren mit Präeklampsie

Ergebnisse

Lymphozyten wurden aus maternalen deciduellen Gewebe gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie mittels der Kratztechnik gewonnen, isoliert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie.

A: Dot Plot Analyse der mit anti-CD25 (y-Achse) und anti-CD4 (x-Achse) gefärbten Lymphozyten mit Quadrantenstatistik. Im oberen rechten Quadranten ist die Prozentzahl $CD25^{hi}CD4^{+}$ T-Zellen angegeben.

B: Dot Plot Analyse der mit anti-CD4, anti-CD25 (y-Achse) und anti-CD127 (x-Achse) gefärbten Lymphozyten. Zunächst wurde auf CD4 gated und dann CD25 gegen CD127 aufgetragen. Im Gate ist die Prozentzahl der $CD127^{low}CD25^{+}CD4^{+}$ T-Zellen angegeben.

C: Dot Plot Analyse der mit anti-CD4 oberflächlich und anti-foxp3 intrazellulär gefärbten Lymphozyten mit Quadrantenstatistik. Im rechten oberen Quadranten ist die Prozentzahl der $foxp3^{+}CD4^{+}$ T-Zellen angegeben.

3.2.3 Vergleich der Frequenz peripherer mit deciduellen T-regulatorischer Zellen von gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

Die Frequenz T-regulatorischer Zellen ist in allen drei Markerkombinationen ($CD127^{low}CD25^{hi}CD4^{+}$, $CD25^{hi}CD4^{+}$ sowie $foxp3^{+}CD4^{+}$) bei schwangeren Frauen in der Decidua im Vergleich zum peripheren Blut signifikant erhöht. Dies wurde auch bei Frauen mit Präeklampsie festgestellt, wobei keine Signifikanz bei der foxp3 Expression decidueller $CD4^{+}$ Lymphozyten gefunden wurde. Lediglich bei einer der sieben Probandinnen mit Präeklampsie liess sich keine Erhöhung der foxp3 Expression decidueller $CD4^{+}$ Lymphozyten zeigen (s. Abb. 12 C).

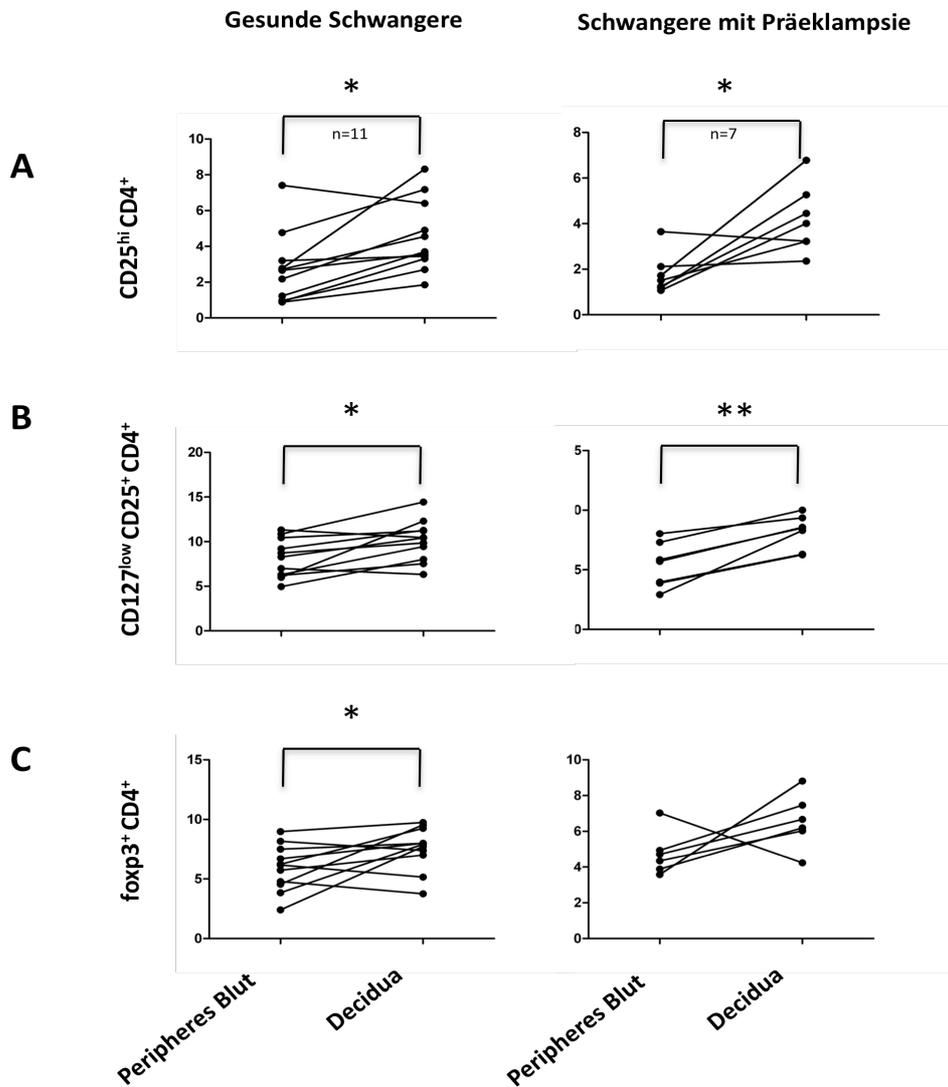


Abb. 12: Vergleich der Treg Frequenzen des peripheren Blutes mit denen des decidualen Gewebes (DG) gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

PBMZ und Lymphozyten des decidualen Gewebes (DG) gesunder Schwangerer (rechts) und Schwangerer mit Präeklampsie (links) wurden mit verschiedenen oberflächlichen und intrazellulären Antikörpern gefärbt (anti-CD4, anti-CD25, anti- CD127, foxp3) und in der Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Treg Frequenzen für die jeweilige Markerkombination:

A CD25^{hi}CD4⁺, **B** CD127^{low}CD25⁺CD4⁺ und **C** foxp3⁺CD4⁺ Zellen. Der P-Wert wurde mittels des Wilcoxon Signed Ranks Test ermittelt (* - P<0.05, ** - P < 0.01).

3.3 Phänotypische Charakterisierung peripherer und deciduärer non-Tregs und Tregs in gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

3.3.1 CD45RA Expression

Im peripheren Blut schwangerer Frauen verglichen mit Frauen mit Präeklampsie gibt es keine Unterschiede in der CD45RA Expression bei non-Tregs und Tregs. Dabei wurde in der CD4/CD127/CD45RA/CD25 Färbung zunächst die auf CD4 gateden Lymphozyten in CD127^{low} gegen CD25^{hi} dargestellt und dann auf Non-Tregs und Tregs (CD127 low) gated und diese zwei Populationen auf deren CD45RA Expression untersucht.

Dagegen wurden Unterschiede bei dieser Darstellung bei decidualem Gewebe festgestellt. Frauen mit Präeklampsie haben signifikant mehr naive (CD45RA⁺) Nontregs und Tregs im deciduellen Gewebe als gesunde schwangere Frauen (s. Abb. 13, 14).

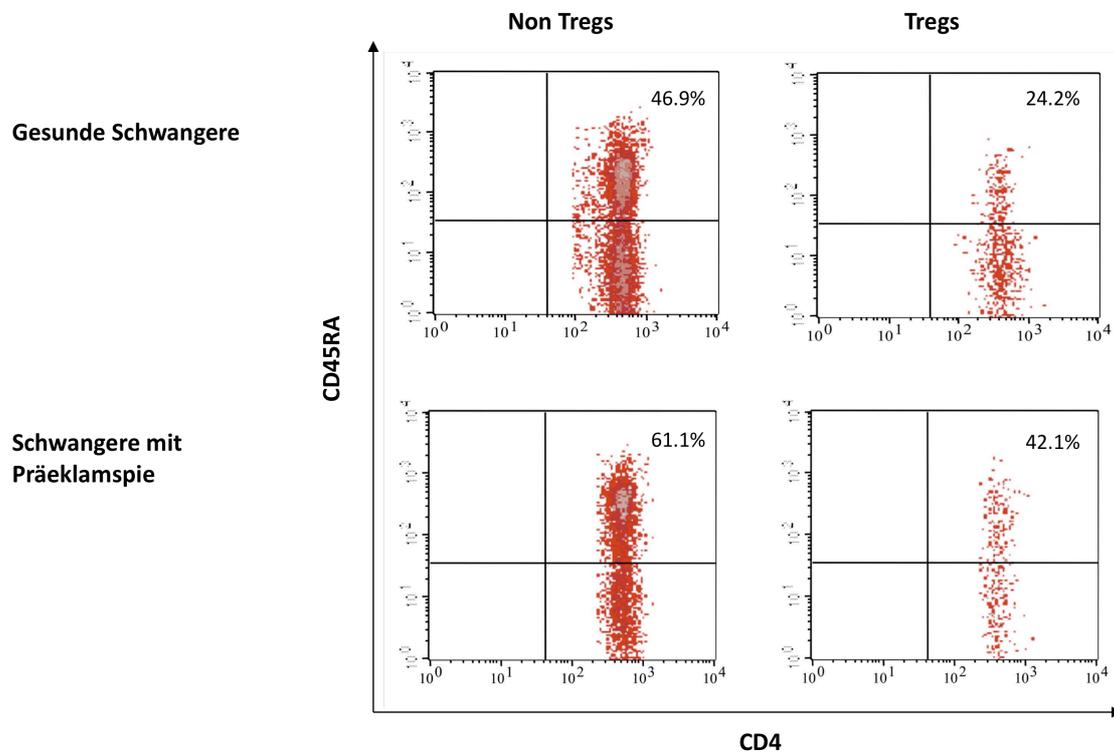


Abb. 13: Frequenzen CD45RA⁺ decidualer Nontregs und Tregs gesunder Schwangerer verglichen mit Schwangeren mit Präeklampsie

Lymphozyten wurden aus maternalen decidualen Gewebe gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie mittels der Kratztechnik gewonnen, isoliert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Zunächst wurden Tregs (CD127^{low}) und Nontregs mittels CD127 Expression gegatet und anschliessend die CD45RA Expression untersucht. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Dot Plot Analysen der mit anti-CD45 (y-Achse) und anti-CD4 (x-Achse) gefärbten Nontregs (links) und Tregs (rechts) einer gesunden Schwangeren (A) und einer Schwangeren mit Präeklampsie (B) mit Quadrantenstatistik. Im oberen rechten Quadranten ist die Prozentzahl CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen angegeben.

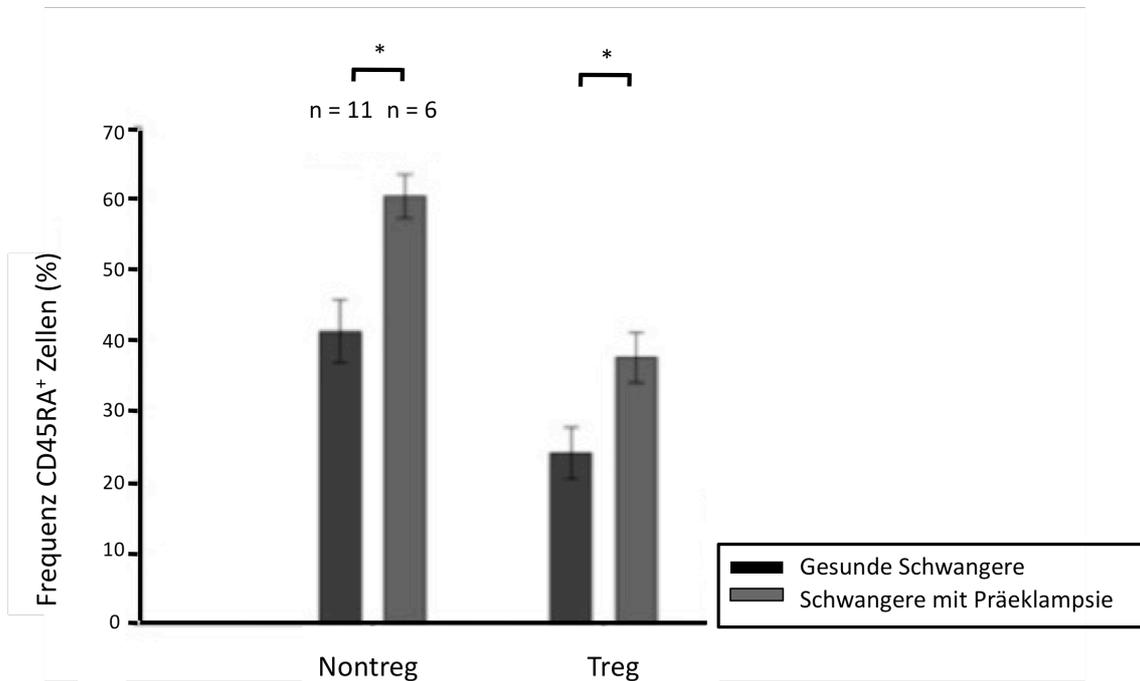


Abb. 14: Vergleich der Frequenzen von CD45RA⁺ Nontregs und Tregs im deciduellen Gewebe gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

Lymphozyten wurden aus maternalen deciduellen Gewebe gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie mittels der Kratztechnik gewonnen, isoliert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Zunächst wurden Tregs (CD127^{low}) und Nontregs mittels CD127 Expression getaget und anschliessend die CD45RA Expression untersucht. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie.

Desweiteren hat deciduales Gewebe verglichen mit dem peripheren Blut schwangerer Frauen signifikant weniger naive Tregs und Nontregs, während diese Veränderungen bei der Präeklampsiegruppe nicht festgestellt wurden (s. Abb 15).

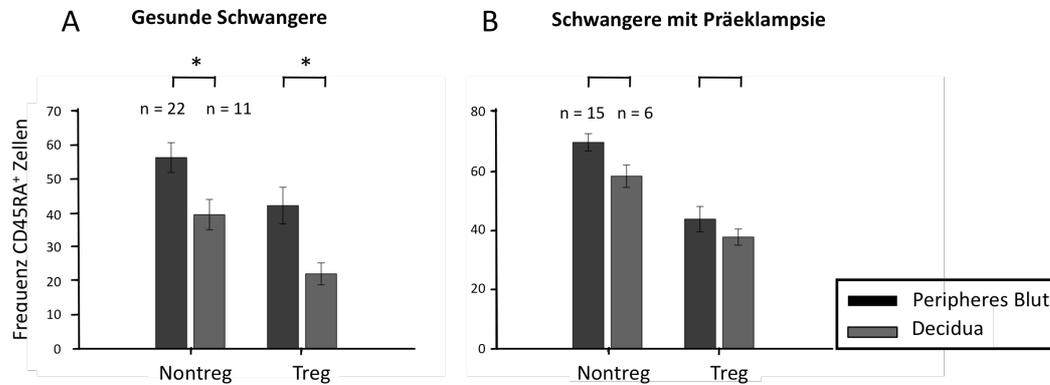


Abb. 15: Vergleich der Frequenzen von CD45RA+ non Tregs und Tregs in der Decidua und im peripheren Blut gesunder Schwangerer sowie Frauen mit Präeklampsie

Deciduales Gewebe wurde mittels Kratztechnik gewonnen und wie auch das periphere Blut mit anti-CD4, anti-CD127, anti-CD25 und anti CD45RA gefärbt. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie. Aufgetragen ist auf der x-Achse die Frequenz von CD45RA+ Zellen, wobei peripheres Blut (dunkelgraue Säulen) mit Decidua (hellgraue Säulen) verglichen wurde sowie Nontregs und Tregs von gesunden Schwangeren (A) und Schwangeren mit Präeklampsie (B). Die Daten sind dargestellt als Mediane +/- sem. P- Werte (angegeben als ns, *) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Test berechnet.

3.3.2 CCR7 Expression

Die CCR7 Expression wurde in einer Vierfachfärbung zusammen mit den Markern CD4, foxp3 und CD45RA untersucht. Dabei werden drei Populationen unterschieden, nämlich die naiven ($CD45RA^+CCR7^{+/-}$), central memory ($CD45RA^-CCR7^+$) und effector memory ($CD45RA^-CCR7^-$) T - Zellen. Mittels der foxp3 Expression können zudem diese Populationen innerhalb der foxp3⁻CD4⁺ (Nontregs) und foxp3⁺CD4⁺ (Tregs) dargestellt werden.

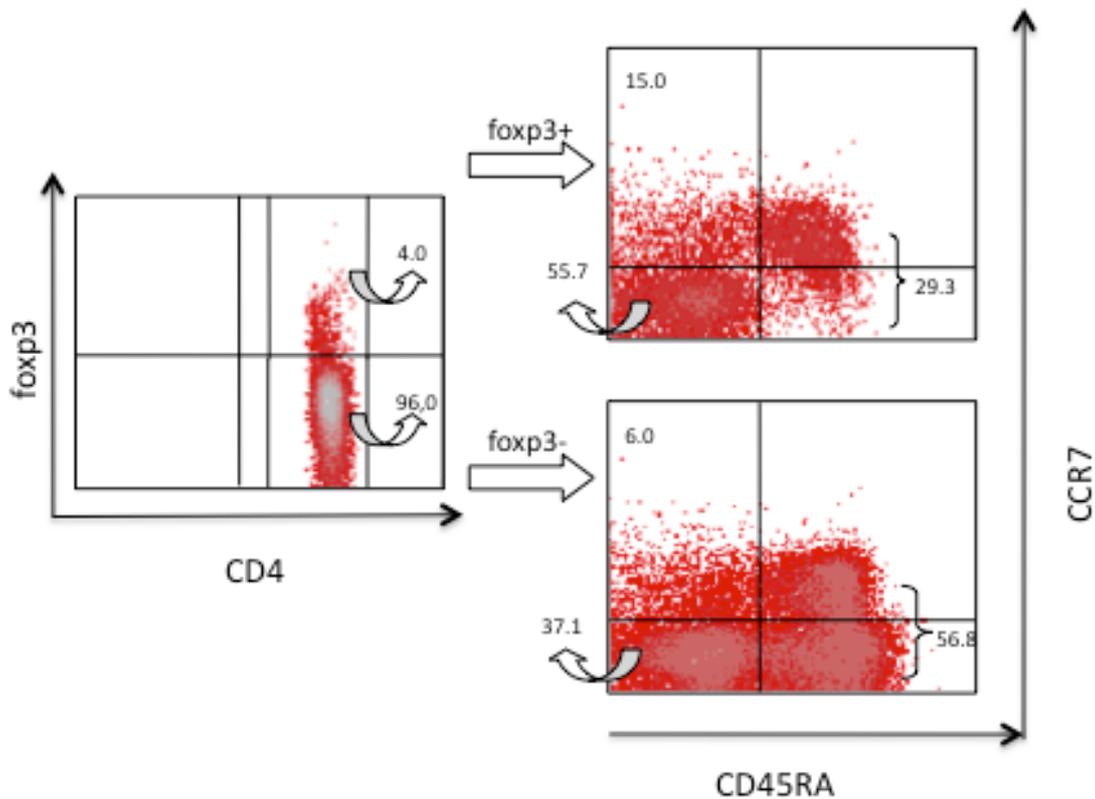


Abb. 16 CCR7 und CD45RA Expression foXP3+ und foXP3- CD4+ Zellen im peripheren Blut

PBMZ wurden mit anti-CD4, anti-CD45RA und anti-CCR7 gefärbt, fixiert und dann intrazellulär mit anti-foXP3 gefärbt. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie. Auf der linken Seite wird die foXP3 Expression der CD4+ Zellen dargestellt. Anschliessend wurde auf die foXP3+ sowie foXP3- Zellen gegatet und deren Expression von CCR7 (x-Achse) und CD45RA (y-Achse) untersucht. Dabei entstehen drei Populationen: CCR7-CD45RA-, CCR7+CD45RA-, CCR7+/-CD45RA+ mit Quadrantenstatistik.

Im peripheren Blut der drei Untersuchungskollektive gibt es keine signifikanten Unterschiede der drei Populationen weder auf Nontreg noch auf T-reg Ebene (Abb. 17).

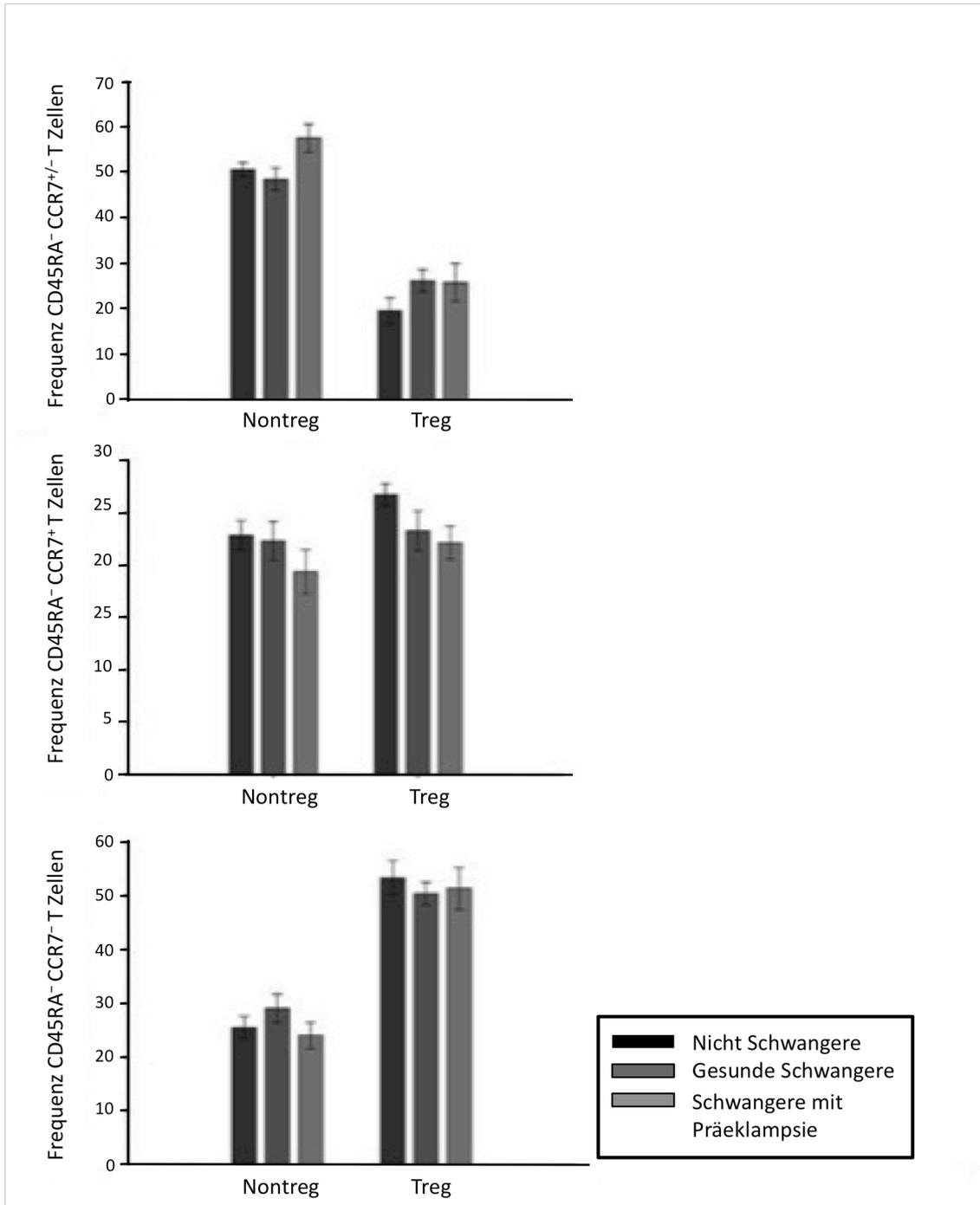


Abb. 17 Frequenzen naiver, central memory und effector memory Nontregs und Tregs im peripheren Blut nicht Schwangerer, gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

Ergebnisse

PBMZ wurde mit anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR7 gefärbt und anschliessend permeabilisiert und intrazellulär foxp3 gefärbt. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie. Die Verteilung der drei Populationen CD45RA⁺CCR7^{+/-}, CD45RA⁻CCR7⁺ und C CD45RA⁻CCR7⁻ wurde auf foxp3⁺ (Treg) und foxp3⁻ (Nontreg) Zellen bei Nicht Schwangeren (dunkelgraue Säulen), gesunden Schwangeren (hellgraue Säulen) und Schwangeren mit Präeklampsie (weisse Säulen) aufgetragen. Die Daten sind dargestellt als Mediane +/- sem. Mittels des Mann-Whitney U Test konnten keine Signifikanzen aufgezeigt werden.

Im deciduellen Gewebe gesunder Schwangerer zeigten sich mehr effektor memory Nontregs und Tregs als bei Frauen mit Präeklampsie. Hochsignifikante Werte wurden für Nontregs erreicht; eine Erhöhung ohne Signifikanz auf Ebene der Tregs (Abb. 18).

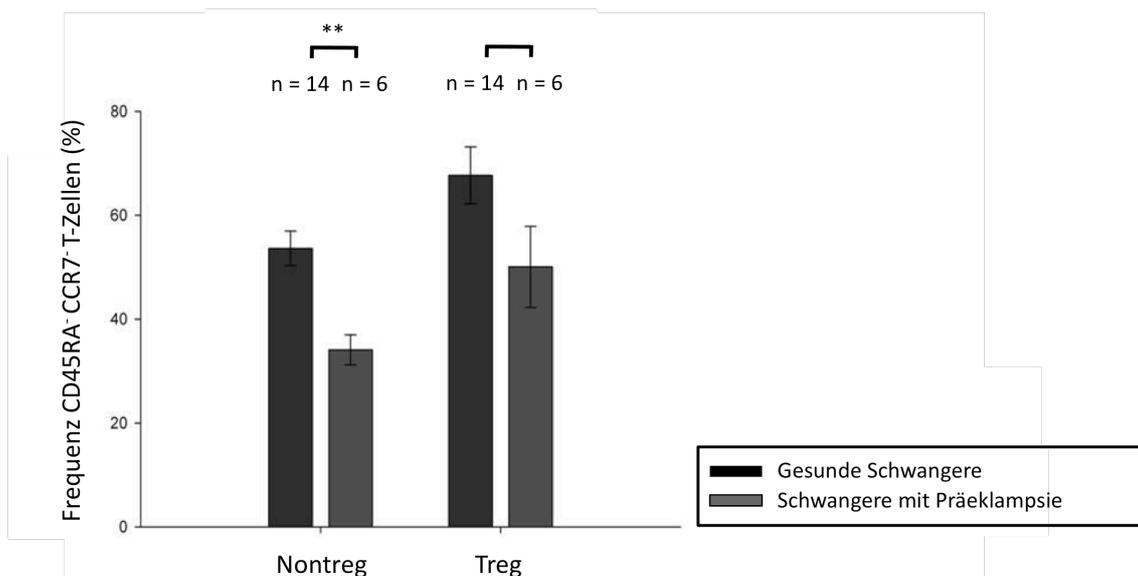


Abb. 18: Frequenzen CD45RA⁺CCR7⁻ (effektor memory) Nontregs und Tregs im deciduellen Gewebe schwangerer Frauen (n=14) verglichen mit Schwangeren mit Präeklampsie (n=6)

Deciduales Gewebe wurde mittels Kratztechnik gewonnen mit anti-CD4, anti-CD25, anti CD45RA sowie anti-CCR7 gefärbt. Anschliessend wurde die intrazelluläre Färbung mit anti-foxp3 durchgeführt. Detektiert wurde mittels Durchflusszytometrie. Die foxp3⁺

Ergebnisse

(Tregs) und foxp3⁻ (Nontregs) CD4⁺ T-Zellen wurden gegatet und auf die CD45RA/CCR7 Expression untersucht. Dunkelgraue Säulen repräsentieren gesunde Schwangere, hellgraue Säulen die Gruppe der Schwangeren mit Präeklampsie (Angabe der Anzahl der Proben der einzelnen Gruppen (n)). Die Daten sind dargestellt als Mediane +/- sem. P- Werte (angegeben als **) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Test berechnet.

4 DISKUSSION

In den vergangenen Jahren wurde intensiv über die Toleranzmechanismen des mütterlichen Organismus, die zu einer erfolgreichen Schwangerschaft beitragen, geforscht. Im Rahmen dessen wurde jüngst T-regulatorischen Zellen (Tregs) eine Bedeutung in der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft zugesprochen. Es wird postuliert, dass Tregs im peripheren Blut einer gesunden Schwangeren verglichen mit nicht-Schwangeren erhöht sind.

Im Falle einer Schwangerschaft, die durch das Krankheitsbild Präeklampsie kompliziert wird, könnte durch eine Verminderung der Tregs eine unzureichende Toleranz des mütterlichen Organismus gegenüber dem haploiden Allograft, dem Fetus, vorliegen und somit eine sukzessive Abstossung dessen bedingen.

In der vorliegenden Arbeit wurden T-regulatorische Zellen im peripheren Blut nicht-Schwangerer, gesunder Schwangerer und Schwangerschaften mit Präeklampsie sowie T-regulatorische Zellen im deciduellen Gewebe gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie untersucht. Dabei wurden verschiedene Markerkombinationen benutzt, die Tregs charakterisieren: $CD4^+CD25^{hi}$, $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ sowie $foxp3^+CD4^+$.

Dies dürfte die erste Studie sein, in der drei verschiedene Markerkombinationen, die Tregs charakterisieren, untersucht werden. Vorherige Studien untersuchten v.a. Tregs mit Hilfe der Markerkombination $CD4^+CD25^{hi}$, wobei eine klare Abgrenzung von Tregs gegenüber aktivierten $CD4^+$ T-Lymphozyten aufgrund der willkürlichen Gatingstrategien schwierig ist (Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006; Roncarolo and Gregori 2008). Zudem ist ein Grossteil $foxp3^+CD4^+$ Zellen in dieser Population nicht enthalten. Wahrscheinlich ist dies auch ein Grund, weshalb unterschiedliche Forschungsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen bzgl. der Frequenz von Tregs in Schwangerschaften, die durch Präeklampsie kompliziert wurden (Hu, Chen et al. 2008; Steinborn, Haensch et al. 2008), gekommen sind.

DISKUSSION

Paeschke et al sowie Hu postulierten 2005 keine Unterschiede zwischen der Frequenz von T- regulatorischen Zellen, charakterisiert als $CD4^+CD25^{hi}$, in gesunden Schwangerschaften und Präeklampsie (Paeschke, Chen et al. 2005). Inzwischen wurde jedoch $CD4^+CD25^{hi}$ als suffizienter Marker für T-Zellen mit supressorischer Funktion in Frage gestellt und nach neuen Markern geforscht. In den letzten Jahren konnten mehrere Forschungsgruppen unabhängig voneinander eine Verminderung von Tregs in Präeklampsie zeigen basierend auf Detektion von *foxp3* als Charakterisierungsmerkmal von regulatorischen T-Zellen.

Allerdings wurde auch *foxp3* jüngst als alleiniger Marker für Tregs angezweifelt, seitdem beobachtet wurde, dass konventionelle $CD4^+$ T - Zellen nach Aktivierung *foxp3* exprimieren (Roncarolo and Gregori 2008). Inwiefern konventionelle $CD4^+$ T - Zellen auch in der $foxp3^+$ Population zu finden sind, bleibt unklar.

Studien über Tregs in Präeklampsie, die die neue Markerkombination $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ als Treg Marker verwenden, gab es bisher nicht. Im Gegensatz zu *foxp3*, was einen intrazellulären Marker für Tregs darstellt, ist CD127 ein Oberflächenmolekül und erlaubt daher das Sortieren dieser Zellen und somit funktionelle Tests.

Diese Studie zeigt, dass Tregs in gesunden Schwangerschaften im peripheren Blut gegenüber nicht schwangeren Frauen vermehrt sind. Signifikante Unterschiede wurde hier sowohl für die Markerkombination $CD4^+CD25^{hi}$ als auch $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ festgestellt, eine Tendenz in diese Richtung jedoch ohne Erreichen von Signifikanz lag auch bei der *foxp3* Expression vor. Diese Studie bestätigt folglich für alle Markerkombinationen das vormals durch verschiedene Forschungsgruppen für einzelne Markerkombinationen gezeigte Ergebnis, dass eine gesunde Schwangerschaft mit einer erhöhten Frequenz von Tregs einhergeht.

DISKUSSION

In der Präeklampsiegruppe fand sich kein Unterschied in der Frequenz von Tregs gemessen mit den Kombinationen $CD4^+CD25^{hi}$ und $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ gegenüber nicht schwangeren, jedoch eine verminderte Expression von foxp3. In der Präeklampsiegruppe verglichen mit der gesunden Schwangerengruppe zeigten die Markerkombinationen $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ und foxp3 eine signifikante Verminderung der Frequenz von Tregs in der Präeklampsiegruppe verglichen mit der gesunden Schwangeren. Somit konnten die Ergebnisse von Paeschke et al, dass $CD4^+CD25^{hi}$ Zellen nicht vermindert sind in Präeklampsie, bestätigt werden. Der Schluss, dass damit Tregs nicht in Präeklampsie vermindert sind und folglich ein Mangel an Tregs nicht für die dysfunktionellen Toleranzmechanismen bei Präeklampsie verantwortlich ist, ist jedoch aufgrund der unzureichenden Charakterisierung von Tregs durch $CD4^+CD25^{hi}$ nicht korrekt.

Der aktuelle Forschungsstand befürwortet aufgrund der zuletzt erschienenen Studien, dass eine verminderte Frequenz von Tregs in Präeklampsie eine Rolle in deren Pathogenese spielt (Sasaki, Darmochwal-Kolarz et al. 2007).

Bisher sind die Mechanismen, über die Tregs suppressiv wirken, unklar.

Kürzlich wurde beschrieben, dass Präeklampsie mit erhöhten Leveln an Endoglin einhergeht (Levine, Lam et al. 2006). Endoglin ist ein antiangiogenetisches Protein und verhindert die Ausreifung der plazentaren Kapillaren. Jüngst konnte ein Zusammenhang zwischen der verminderten Frequenz von Tregs und der erhöhten Endoglinkonzentration im Blut Schwangerer Frauen mit Präeklampsie aufgezeigt werden. Endoglin ist ein Inhibitor von TGF- β (Cheifetz, Bellon et al. 1992). TGF- β seinerseits ist für die Differenzierung der T-regulatorischen Zellen verantwortlich (Chen, Jin et al. 2003) und inhibiert gleichzeitig die proinflammatorische TH17 Antwort. Wenn nun Endoglin in Präeklampsie erhöht ist, ist gleichzeitig TGF- β erniedrigt und dadurch ebenfalls die Differenzierung der T-regulatorischen Zellen beeinträchtigt. Dass TGF- β eine Rolle in der Implantation spielt und für eine normale plazentare Entwicklung und Funktion elementar ist, konnte schon gezeigt werden (Xuan, Choi et al. 2007). Santner Nanan et al wiesen auf, dass gesunde

DISKUSSION

Schwangerschaften mit einem erhöhten Quotienten aus foxp3 und Th17 einhergeht, während dies in Präeklampsie nicht der Fall ist (Santner-Nanan, Peek et al. 2009). Auch in der Pathogenese anderer Erkrankungen (Multiple Sklerose) spielt eine Imbalance Th17/Treg zugunsten Th17 eine Rolle.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Tregs zum einen für die Aufrechterhaltung einer gesunden Schwangerschaft wichtig sind, zum anderen in der Pathogenese der Präeklampsie eine Rolle spielen und daher vielleicht einmal therapeutischer Angriffspunkt der Präeklampsieerkrankung werden können.

In dieser Arbeit wurde auch Veränderung von Tregs auf lokaler Ebene, der Decidua, untersucht. In beiden Gruppen wurde eine erhöhte Frequenz von Tregs, gemessen mit den drei Markerkombinationen, gegenüber der Peripherie festgestellt. An der fetomaternalen Grenzfläche scheint folglich eine Anreicherung der Tregs stattzufinden. Im Gegensatz zu Sasaki et al, die eine verminderte foxp3 Expression in decidualem Gewebe schwangerer Frauen mit Präeklampsie verglichen mit gesunden Schwangeren fanden, wurde in dieser Studie eine gleiche Frequenz von Tregs in decidualem Gewebe gesunder Schwangerer verglichen mit Schwangeren mit Präeklampsie gefunden. Dabei ist zu beachten, dass Sasaki et al Biopsien von decidualem Gewebe benutzten und dort foxp3 anfärbten. Ob jedoch eine Biopsie eines Ortes der Decidua die gesamte Plazenta widerspiegelt, bleibt fragwürdig; zumal in einigen Biopsien gar kein foxp3 detektiert werden konnte. Tregs könnten schliesslich einfach verpasst worden sein. In dieser Studie wurden mittels der Kratzmethode deciduale Lymphozyten eines grossen Gebietes der plazentaren Oberfläche gesammelt und die foxp3 Expression auf dem single-cell Niveau gemessen. Jedoch bleibt offen, ob dies eine geeignete Methode ist, da eine grosse Breite von foxp3 Expression gemessen wurde. Obwohl die Frequenz von Tregs in der Decidua sich in den beiden Gruppen nicht unterschieden, ist das Verhältnis von Tregs decidualer Lymphozyten zu peripheren Lymphozyten aufgrund der verminderten Frequenz im peripheren Blut bei Präeklampsie im Vergleich zu gesunden

DISKUSSION

Schwangeren erhöht. Ob dies ein Kompensationsmechanismus ist, bleibt unklar und bedarf weiterer Studien.

Wie es jedoch in einer Schwangerschaft zu einer erhöhten Frequenz an Tregs kommt, ist bisher unklar. Da es in der Schwangerschaft zu Hormonveränderungen kommt, wurden sie als eine mögliche Ursache für die Treg-Expansion angesehen. Interessanterweise konnten erst kürzlich Schumacher et al zeigen, dass β -HCG, ein Hormon, das besonders den Anfang einer Schwangerschaft charakterisiert, für die Treg Migration in die Decidua mitverantwortlich ist.

Dass Tregs eine wichtige Rolle in der Schwangerschaft allgemein spielen, wird auch dadurch deutlich, dass sie in Spontanaborten vermindert sind. Zenclussen et al konnten zudem durch Transfer von Treg in Treg-deficient Mäuse Aborte verhindern. Zudem wurde in einer anderen Studie durch Injektion von TFG- β bei Mäusen eine Reduktion von Fehlgeburten erreicht. Des weiteren wurde in einer Studie GCSF (Granulozyten-stimulierender Faktor) in den ersten 30 Tagen einer Schwangerschaft Frauen mit wiederholten Aborten injiziert (Scarpellini and Sbracia 2009), was die Insidenz von Aborten verminderte. Auch bei Infertilität wurde eine im Endometrium erniedrigte foxp3 Expression gefunden, was auf einen Zusammenhang von verminderter Migration von Tregs in den Uterus oder reduzierter Differenzierung uteriner T-Zellen in Tregs mit Infertilität schliessen lässt (Jasper, Tremellen et al. 2006).

Auch in Transplantationssituationen benötigt der Körper Toleranzmechanismen, um das Transplant nicht abzustossen. Da der Fetus Antigene des Vaters besitzt, stellt dieser ein haploides Transplantat im mütterlichen Organismus dar. Eine Schwangerschaft wird somit als eine natürliche Transplantatsituation angesehen wird.

Verschiedene Forschungsgruppen konnten die Bedeutung von Tregs in der Toleranz von allogenen Transplantaten zeigen. Zunächst konnte in Mausmodellen durch den Transfer von CD4+CD25+ Tregs eine Graft versus Host Krankheit verhindert und so die Rolle von Tregs in Transplantationssituationen aufgezeigt werden. Wurden

DISKUSSION

CD4⁺CD25⁺ T Zellen transferiert, kam es zu GvHD (Taylor, Lees et al. 2002). Auch andere Gruppen zeigten die Bedeutung von Tregs in Transplantationssituationen (Hara, Kingsley et al. 2001)

Dass die Frequenz von Tregs in Präeklampsie vermindert ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Es wird vermutet, dass eine Vielzahl autoimmuner Erkrankungen nicht nur mit einer verminderten Frequenz sondern auch mit einer reduzierten Funktionalität von Tregs einhergeht, wie z.B. SLE. Im weiteren Verlauf dieser Studie wurden ebenfalls funktionale Tests durchgeführt. Es konnten jedoch keine funktionalen Defizite der Tregs bei Schwangeren Frauen mit Präeklampsie festgestellt werden.

Da bei verschiedene Erkrankungen neben verminderter Frequenz von Tregs und / oder deren Funktion Veränderungen in bestimmten Subpopulationen beschrieben wurden, wurde neben der Frequenz von Tregs in gesunden Schwangerschaften sowie Präeklampsie daher verschiedene Subpopulationen von Tregs in dieser Arbeit untersucht. Für multiple Sklerose konnte neben einer verminderten Frequenz und Funktionalität von Tregs eine verminderte Frequenz von naiven CD45RA⁺ Tregs beschrieben werden (Venken, Helings et al, 2008). Auch für inflammatorische Darmerkrankungen konnte eine Veränderung auf Subpopulationsebene von Tregs gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Subpopulationen waren naive/memory Tregs sowie central und effector memory Zellen auf der Basis von CCR7 und CD45RA Expression. Für diese Oberflächenmarker konnten keine Unterschiede im peripheren Blut gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie dargestellt werden. Auf deciduärer Ebene fanden sich jedoch mehr naive (CD45RA⁺) T-Zellen sowie weniger effektor memory T-Zellen (CD45RA⁻CCR7⁻). Möglicherweise werden zwar vermehrt naive (CD45RA⁺) T-Zellen aus der Peripherie in die Decidua rekrutiert, bekommen jedoch kein Signal, um sich in effektor memory (CD45RA⁻CCR7⁻) T-Zellen umzuwandeln.

DISKUSSION

Zusammenfassend ist dies die erste Studie, die die kompletten Datensätze aller bisher verwendeten Treg Markerkombinationen, $\text{foxp3}^+\text{CD4}^+$ und $\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$, bei nicht-Schwangeren, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie untersucht hat. Zudem wurde erstmalig $\text{CD127}^{\text{low}}\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$ als Treg Markerkombination im Zusammenhang mit Schwangerschaften untersucht. Vorherige Studien charakterisierten Tregs v.a. als $\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$ T-Zellen, wobei dieser Marker nach neuesten Erkenntnissen nicht spezifisch Tregs kennzeichnet. Bisher herrschte aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse vorangegangener Studien Uneinigkeit über die Bedeutung von T-regulatorischen Zellen in der Pathogenese der Präeklampsie. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Ergebnisse älterer Studien, dass eine gesunde Schwangerschaft mit einer erhöhten Frequenz von T - regulatorischen Zellen ($\text{foxp3}^+\text{CD4}^+$) einhergeht. Neu ist diese Erkenntnis jedoch für die Markerkombination $\text{CD127}^{\text{low}}\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$. Des Weiteren wurde eine Verminderung der Tregs in Schwangerschaften mit Präeklampsie gefunden. Dies gilt für die Markerkombinationen $\text{foxp3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD127}^{\text{low}}\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$. Bestätigt wiederum wurden die Ergebnisse von Paeschke et al, welche unveränderte Frequenzen von $\text{CD25}^{\text{hi}}\text{CD4}^+$ bei Schwangeren mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren zeigten. Die Verminderung von T-regulatorischen Zellen bei Präeklampsiepatientinnen könnte aufgrund einer Th17 dominierten Immunantwort und damit einem Ungleichgewicht von Th17/Treg entstehen. Ob jedoch die proinflammatorische Immunantwort mit einhergehender Verminderung von Tregs ursächlich oder konsekutiv in der Pathogenese der Präeklampsie eine Rolle spielt, bleibt weiter zu erforschen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Präeklampsie ist einer der Hauptgründe für maternale und fetale Mortalität und Morbidität. Obwohl die Aetiologie weitgehend unklar ist, wird angenommen, dass eine mangelnde Toleranz von Seiten des mütterlichen Organismus gegenüber dem Fetus und dadurch dessen sukzessive Abstossung ursächlich sein könnte. T regulatorischen Zellen wurde in der Vergangenheit eine mögliche Rolle in der Aufrechterhaltung einer gesunden Schwangerschaft mit erfolgreicher Integration des Fetus, eines durch die paternalen Antigene charakterisierten semi-haploiden Allografts, zugesprochen. In dieser Arbeit wurden T regulatorische Zellen am Ende des dritten Trimesters im peripheren Blut nicht-Schwangerer, gesunder Schwangerer sowie Schwangerer mit Präeklampsie untersucht. Zusätzlich wurden T-regulatorische Zellen in decidualem Gewebe bestimmt. Aufgrund der verschiedenen Ergebnisse vorangegangener Studien und der Uneinigkeit über die Identifizierung T regulatorischer Zellen wurden T regulatorische Zellen in dieser Arbeit mittels der drei gängigsten Markerkombinationen (foxp3^+ , $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}$ sowie $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}}\text{CD25}^+$) charakterisiert. Im peripheren Blut gesunder Schwangerer gab es signifikant mehr T regulatorische Zellen als im peripheren Blut nicht-Schwangerer gemessen mit den Markerkombinationen $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}$ sowie $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}}\text{CD25}^+$. In Schwangerschaften mit Präeklampsie zeigten sich eine verminderte Frequenz von T regulatorischer Zellen verglichen mit gesunden Schwangerschaften für die Markerkombinationen foxp3^+ und $\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{lo}}\text{CD25}^+$. Auf lokaler Ebene, der Decidua, wurde bei gesunden Schwangerschaften sowie Schwangerschaften mit Präeklampsie eine erhöhte Frequenz gegenüber dem peripheren Blut gemessen. T-regulatorische Zellen scheinen also eine Rolle in der Aufrechterhaltung gesunder Schwangerschaften zu spielen, während sie in Schwangerschaften mit Präeklampsie vermindert sind.

6 Literatur

- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, et al. (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." Nat Immunol 5(3): 266-271.
- Apps, R., L. Gardner, et al. (2008). "A critical look at HLA-G." Trends Immunol 29(7): 313-321.
- Bach, J. F. and L. Chatenoud (2001). "Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes." Annu Rev Immunol 19: 131-161.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol 167(3): 1245-1253.
- Bamberger, A. M., H. M. Schulte, et al. (1997). "Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells." J Clin Endocrinol Metab 82(9): 3173-3175.
- Baumwell, S. and S. A. Karumanchi (2007). "Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms." Nephron Clin Pract 106(2): c72-81.
- Billingham R. E., L. Brent, et al. (1953): "Actively acquired tolerance of foreign cells." Nature 172 (4379): 603-606; republished J Immunol 2010; 184 (1): 5-8.
- Brown, M. A., W. M. Hague, et al. (2000). "The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement." Aust N Z J Obstet Gynaecol 40(2): 139-155.
- Brown, M. A., M. D. Lindheimer, et al. (2001). "The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)." Hypertens Pregnancy 20(1): 9-14.
- Carosella, E. D., N. Rouas-Freiss, et al. (1999). "HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex." Immunol Today 20(2): 60-62.
- Carr, D. B., M. Epplein, et al. (2005). "A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia." Am J Obstet Gynecol 193(3 Pt 2): 965-972.

- Cheifetz, S., T. Bellon, et al. (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." J Biol Chem 267(27): 19027-19030.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med 198(12): 1875-1886.
- Chien, Y. H., N. R. Gascoigne, et al. (1984). "Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene." Nature 309(5966): 322-326.
- Danke, N.A., D.M. Koelle, et al. (2004). "Autoreactive T cells in healthy individuals." J Immunol 172: 5967-5972.
- Darmochwal-Kolarz, D., J. Rolinski, et al. (2000). "Fas antigen expression on the decidual lymphocytes of pre-eclamptic patients." Am J Reprod Immunol 43(4): 197-201.
- de Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, et al. (2004). "CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis." J Immunol 172(10): 6435-6443.
- Dong, M., J. He, et al. (2005). "Placental imbalance of Th1- and Th2-type cytokines in preeclampsia." Acta Obstet Gynecol Scand 84(8): 788-793.
- Duckitt, K. and D. Harrington (2005). "Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies." BMJ 330(7491): 565.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol 4(4): 330-336.
- Gambineri, E., T. R. Torgerson, et al. (2003). "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis." Curr Opin Rheumatol 15(4): 430-435.

- Grindebacke, H., K. Wing, et al. (2004). "Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season." Clin Exp Allergy 34(9): 1364-1372.
- Haas, J., B. Fritzsching, et al. (2007). "Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis." J Immunol 179(2): 1322-1330.
- Hanna, J., D. Goldman-Wohl, et al. (2006). "Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface." Nat Med 12(9): 1065-1074.
- Hara, M., C. I. Kingsley, et al. (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." J Immunol 166(6): 3789-3796.
- Hiby, S. E., J. J. Walker, et al. (2004). "Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success." J Exp Med 200(8): 957-965.
- Hoffmann, P., J. Ermann, et al. (2002). "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." J Exp Med 196(3): 389-399.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science 299(5609): 1057-1061.
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Plazenta>
- <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3247/figures.htm>
- <http://www.bio.umass.edu/micro/immunology/facs542/plan.htm>
- Hu, D., Y. Chen, et al. (2008). "Alteration of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia." Acta Obstet Gynecol Scand 87(2): 190-194.
- Hunt, J. S., D. K. Langat, et al. (2006). "The role of HLA-G in human pregnancy." Reprod Biol Endocrinol 4 Suppl 1: S10.
- Jaeckel, E., H. von Boehmer, et al. (2005). "Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes." Diabetes 54(2): 306-310.

- Jasper, M. J., K. P. Tremellen, et al. (2006). "Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue." Mol Hum Reprod 12(5): 301-308.
- King, A., Y. W. Loke, et al. (1997). "NK cells and reproduction." Immunol Today 18(2): 64-66.
- Kitze, B., M. Pette, et al. (1988). "Myelin-specific T lymphocytes in multiple sclerosis patients and healthy individuals." J Neuroimmunol 20(2-3): 237.
- Koelman, C. A., A. B. Coumans, et al. (2000). "Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid?" J Reprod Immunol 46(2): 155-166.
- Koopman, L.A., H.D. Kopcow, et al. (2003) "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential." J Exp Med 198 (8): 1201-1212.
- Korn, T, L. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol 27: 485-517.
- Krenger, W., K. M. Snyder, et al. (1995). "Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease." J Immunol 155(2): 585-593.
- Lee, C. J., T. T. Hsieh, et al. (2000). "Risk factors for pre-eclampsia in an Asian population." Int J Gynaecol Obstet 70(3): 327-333.
- Levine, R. J., C. Lam, et al. (2006). "Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia." N Engl J Med 355(10): 992-1005.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med 203(7): 1701-1711.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol 169(5): 2756-2761.
- Lorenzi, A. R. and H. L. Ford (2002). "Multiple sclerosis and pregnancy." Postgrad Med J 78(922): 460-464.

- Lundgren, A., E. Stromberg, et al. (2005). "Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in Helicobacter pylori-infected patients." Infect Immun 73(1): 523-531.
- Maynard, S. E., J. Y. Min, et al. (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest 111(5): 649-658.
- Mazzarella G, A. Bianco et al. (2000). "Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma." Allergy 55: 6-9.
- Minty, A., P. Chalon, et al. (1993). "Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses." Nature 362(6417): 248-250.
- Miyaura, H., M. Iwata (2002). "Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesteron and glucocorticoids." J Immunol 168: 1087-1094.
- Mosman, T.R., S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today 17(3): 138-146.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science 281(5380): 1191-1193.
- Murphy, K. M., P. Travers et al. (2009). "Janeway Immunologie." Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage.
- Naquet, P., H. R. MacDonald, et al. (1988). "A novel T cell-activating molecule (THAM) highly expressed on CD4-CD8- murine thymocytes." J Immunol 141(12): 4101-4109.
- Ormandy, L. A., T. Hillemann, et al. (2005). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma." Cancer Res 65(6): 2457-2464.
- Ostensen, M. and P. M. Villiger (2007). "The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy." Semin Immunopathol 29(2): 185-191.
- Oukka, M. (2007). "Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells." Ann Rheum Dis 66 Suppl 3: iii87-90.

- Paeschke, S., F. Chen, et al. (2005). "Pre-eclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood." Am J Reprod Immunol 54(6): 384-389.
- Papiernik, M., M. Leite des Moraes, et al (1998). "Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2 α chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency." Int. Immunol 10: 371-378.
- Pattison, N. S., L. W. Chamley, et al. (1993). "Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations." Br J Obstet Gynaecol 100(10): 909-913.
- Pearce, E. J., C. M. Kane, et al. (2004). "Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*." Immunol. Rev. 201: 117-126
- Rieger, L., S. Segerer et al. (2009). "Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia - a prospective observational study." Reprod Biol Endocrinol 7:132.
- Roberts, J. M., R. N. Taylor, et al. (1989). "Preeclampsia: an endothelial cell disorder." Am J Obstet Gynecol 161(5): 1200-1204.
- Robillard, P. Y., T. C. Hulse, et al. (1994). "Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception." Lancet 344(8928): 973-975.
- Robinson, D.S., Q. Hamid et al. (1992). "Predominant Th2-like bronchialalveolar T-Lymphocyte population in atopic asthma." N Engl J Med 326: 298-304.
- Roncarolo, M. G. and S. Gregori (2008). "Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells?" Eur J Immunol 38(4): 925-927.
- Rothenberg EV. (1992). "The development of functionally responsive T cells." Adv. Immunol 51:85-214.
- Saito, S., Y. Sasaki, et al. (2005). "CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy." J Reprod Immunol 65(2): 111-120.

- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol 6(4): 345-352.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol 155(3): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." Immunol Rev 182: 18-32.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature 401(6754): 708-712.
- Santner-Nanan, B., M. J. Peek, et al. (2009). "Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia." J Immunol 183(11): 7023-7030.
- Santner-Nanan, B., N. Seddiki, et al. (2008). "Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype." Int Immunol 20(3): 375-383.
- Sasaki, Y., D. Darmochwal-Kolarz, et al. (2007). "Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia." Clin Exp Immunol 149(1): 139-145.
- Scarpellini, F. and M. Sbracia (2009). "Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial." Hum Reprod 24(11): 2703-2708.
- Schulz, M. and J Wacker (2002). "Epidemiologie der Präeklampsie". In Heilmann L, Rath W (Hrsg): "Schwangerschaftshochdruck." Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 215-222.

- Schumacher A., N. Brachwitz, et al. (2009). "Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy." J Immunol 182(9): 5488-5497.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, et al. (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med 203(7): 1693-1700.
- Segerer, S., N. Müller et al. (2009). "Impact of female sex hormones and the maturation and function of human dendritic cells." Am J Reprod Immunol 62 165-173.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol
- Sindram-Trujillo, A. P., S. A. Scherjon, et al. (2004). "Comparison of decidual leukocytes following spontaneous vaginal delivery and elective cesarean section in uncomplicated human term pregnancy." J Reprod Immunol 62(1-2): 125-137.
- Somerset, D. A., Y. Zheng, et al. (2004). "Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset." Immunology 112(1): 38-43.
- Steinborn, A., G. M. Haensch, et al. (2008). "Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia?" Clin Immunol 129(3): 401-412.
- Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, et al. (2008). "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells." Nat Med 14(3): 337-342.
- Takahashi, M., K. Nakamura, et al. (2006). "An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis." Dig Dis Sci 51(4): 677-686.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood 99(10): 3493-3499.

- Tubbergen, P., A. M. Lachmeijer, et al. (1999). "Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women?" J Reprod Immunol 45(1): 81-88.
- Tuffnell, D. J., D. Jankowicz, et al. (2005). "Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003." BJOG 112(7): 875-880.
- Van Parijs, L and A. K. Abbas (1998). "Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off." Science 28: 243-248.
- Venkatesha, S., M. Toporsian, et al. (2006). "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia." Nat Med 12(6): 642-649.
- Venken K, N. Hellings et al. (2008) "Compromised CD4CD25regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level." Immunology 123(1):79-89.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol 6(4): 338-344.
- Wallukat, G., V. Homuth, et al. (1999). "Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor." J Clin Invest 103(7): 945-952.
- Wegmann, T. G., H. Lin, et al. (1993). "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?" Immunol Today 14(7): 353-356.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol 3(3): 199-210.
- Xuan, Y. H., Y. L. Choi, et al. (2007). "Expression of TGF-beta signaling proteins in normal placenta and gestational trophoblastic disease." Histol Histopathol 22(3): 227-234.
- Yu, P., Y. Lee, et al. (2005). "Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors." J Exp Med 201(5): 779-791.
- Zenclussen, A. C., K. Gerlof, et al. (2005). "Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-

induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model." Am J Pathol 166(3): 811-822.

Zhou, Y., M. McMaster, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome." Am J Pathol 160(4): 1405-1423.

Zwar, T. D., I. R. van Driel, et al. (2006). "Guarding the immune system: suppression of autoimmunity by CD4+CD25+ immunoregulatory T cells." Immunol Cell Biol 84(6): 487-501.

Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Schematische Darstellung der möglichen Differenzierung naiver T Zellen in Th1, Th2, Th17 und Treg Zellen und die darin involvierten Zytokine.

La Cava, A. (2009). „Natural Tregs and autoimmunity.“ Front Biosci 14: S. 333-343.
(<http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3247/figures.htm>)

Abb. 2. Herkunft und Bedeutung T-regulatorischer Zellen

Sakaguchi, S. (2005). „Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non self.“ Nat Immunol 6(4): S. 346

Abb. 3. Die Plazenta

(<http://de.wikipedia.org/wiki/Plazenta>)