

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

Untersuchungen zur Expression von Myeloiden
Suppressorzellen (MDSC) in der humanen
Schwangerschaft und ihre Bedeutung für die materno-fetale
Toleranz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Kugel, Hellen Anna

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Gille
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger
Tag der Disputation: 15.12.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das Immunsystem in der Schwangerschaft.....	4
1.1.1	Immunologische Anpassung und Komplikationen	4
1.1.2	T-Zellen in der Schwangerschaft	4
1.2	Myeloide Suppressorzellen (MDSC)	5
1.2.1	Mechanismen der T-Zell-suppressiven Wirkung von MDSC	6
1.3	Ziel dieser Arbeit	6
2	Material	8
2.1	Patientenkollektiv	8
2.2	Chemikalien und Puffer.....	8
2.2.1	Kommerziell erworbene Puffer.....	8
2.2.2	Sonstige Chemikalien.....	8
2.2.3	Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie	9
2.2.4	Antikörper für die Isolierung der MDSC	10
2.3	Glas- und Plastikmaterialien	10
2.4	Geräte und Software	11
3	Methoden.....	13
3.1	Zellisolation	13
3.1.1	Aufreinigung von PBMC aus peripherem Blut	13
3.1.2	Aufreinigung von MDSC aus PBMC	14
3.2	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	14
3.2.1	Färbung der Zellen für die Phänotypisierung.....	14
3.2.2	Durchflusszytometrie	15
3.3	Funktionelle Versuche	16
3.3.1	ROS-Produktion.....	16

3.3.2	T-Zell-Proliferationsversuche	16
3.4	Auswertung	17
3.4.1	Auswertung der durchflusszytometrischen Versuche	17
3.4.2	Statistische Auswertung	17
3.4.2.1	Unverbundene Stichproben.....	18
3.4.2.2	Verbundene Stichproben.....	18
4	Ergebnisse	19
4.1	GR-MDSC, nicht jedoch MO-MDSC sind im peripheren Blut gesunder Schwangerer am Entbindungstermin erhöht	19
4.2	GR-MDSC sind über die gesamte Schwangerschaft hinweg erhöht und fallen nach der Geburt wieder ab	22
4.3	GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer exprimieren die Effektorenzyme Arg1 und iNOS	24
4.4	GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer produzieren große Mengen an ROS	30
4.5	GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer hemmen die T-Zell-Proliferation.....	31
4.6	GR-MDSC sind bereits 14 Tage nach einem Embryonentransfer bei assistierter Reproduktionsbehandlung im peripheren Blut erhöht.....	38
5	Diskussion.....	41
5.1	Schlussfolgerung	47
6	Zusammenfassung	49
7	Verzeichnisse.....	50
7.1	Literaturverzeichnis.....	50
7.2	Abbildungsverzeichnis	56
7.3	Tabellenverzeichnis	57
8	Veröffentlichungen	58

9 Erklärungen zum Eigenanteil	59
10 Anhang	60
10.1 Dank.....	60
10.2 Lebenslauf	61

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ArgI	Arginase I
CD14	(engl. „cluster of differentiation“) Oberflächenprotein CD14; wird von MO-MDSC exprimiert
CD15	(engl. „cluster of differentiation“) Oberflächenprotein CD15; wird von GR-MDSC exprimiert
CD66b	(engl. „cluster of differentiation“) Oberflächenprotein CD66b; wird von GR-MDSC exprimiert
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DHR	Dihydrorhodamin 123
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	(engl. fluorescence activated cell sorting) Durchflusszytometer
FCS	(engl. fetal calf serum) Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GR-MDSC	Granulozytäre Myeloide Suppressorzellen
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase (NO: Stickstoffmonooxid)
IUGR	(engl. intrauterine growth restriction) Intrauterine Wachstumsverzögerung
IVF	in vitro Fertilisation
MACS	(engl. magnetic activated cell sorting) Magnetisch aktiviertes Trennverfahren für Zellen
MDSC	(engl. myeloid derived suppressor cells) Myeloide Suppressorzellen
MFI	(engl. median fluorescence intensity) Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	(engl. major histocompatibility complex)

	Haupthistokompatibilitätskomplex
MO-MDSC	Monozytäre Myeloide Suppressorzellen
n	Probenanzahl
NaN3	Natriumazid
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
NS	nicht schwangere Kontrollgruppe
OKT3	Anti-CD3-Antikörper
PBMC	(engl. peripheral blood, mononuclear cells) Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	(engl. phosphate buffered saline) Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll
PMA	Phorbol-12-myristat,-13-azetat
PP	postpartale Probandinnengruppe
ROS	(engl. reactive oxygen species) Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute, daher RPMI)
s	signifikant
S	schwängere Probandinnengruppe
T1	1. Trimenon
T2	2. Trimenon
T3	3. Trimenon
Th	T-Helfer-Zellen
Th1	T-Helfer-Zellen, Subgruppe 1
Th17	T-Helfer-Zellen, Subgruppe 17

Th2	T-Helfer-Zellen, Subgruppe 2
Treg	regulatorische T-Zellen
VLE	engl. very low endotoxin

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem in der Schwangerschaft

1.1.1 Immunologische Anpassung und Komplikationen

Habituelle Aborte und extreme Frühgeburtlichkeit gehören zu den wichtigsten Schwangerschaftskomplikationen. Ungewollte Kinderlosigkeit oder die hohe Gefahr für perinatale Morbidität oder Mortalität für das Kind können die Folgen sein (1, 2). Die Ursachen für diese Schwangerschaftskomplikationen sind vielfältig und reichen von anatomischen Besonderheiten bei der Mutter über Infektionen bis hin zu genetischen Erkrankungen des Feten. Eine wesentliche Rolle scheinen aber auch Fehlregulationen des Immunsystems und damit eine unzureichende Ausbildung der materno-fetalen Toleranz zu sein (3, 4).

Während einer Schwangerschaft sind die Anforderungen an das Immunsystem erhöht. Das mütterliche Immunsystem muss nun so reguliert werden, dass es einen semiallogenen Fetus toleriert und wachsen lässt, ohne dass eine Abstoßungsreaktion ausgelöst wird aber gleichzeitig die Fähigkeit zur adäquaten Infektabwehr erhalten bleibt (4).

In einer Arbeit von 1953 postulierte Peter Medawar erstmals drei grundsätzliche Mechanismen für die Aufrechterhaltung der fetomaternalen Immuntoleranz:

- 1) Eine anatomische Barriere zwischen Mutter und Fetus, dargestellt durch den Trophoblasten, verhindert einen direkten Kontakt zwischen mütterlichen Immunzellen und fetalen Antigenen.
- 2) Fetale Immunzellen meiden eine Expression allogener Antigene.
- 3) Das mütterliche Immunsystem wird durch die Induktion von Anergie- oder Toleranz-Mechanismen in Immunzellen daran gehindert, eine adäquate Immunantwort auf fetale Antigene zu erzeugen (5).

1.1.2 T-Zellen in der Schwangerschaft

Bis heute sind T-Helfer-Zellen (Th) die am besten charakterisierten Immunzellen in der Schwangerschaft; sie scheinen eine essentielle Rolle für die materno-fetale Immuntoleranz zu spielen (6-8). Ein wesentlicher Mechanismus ist hier eine Veränderung des Zytokin-Profiles der T-Helfer-Zellen hin zu einer Th2-getragenen Immunantwort mit reduzierten Th1-Antworten während der

Schwangerschaft (9). Für einige wichtige Schwangerschaftskomplikationen wie rezidivierende Spontanaborte oder die Präeklampsie konnte bereits eine Assoziation mit gestörtem Th2-Shift und vermehrter Th1-Antwort beschrieben werden (10, 11). Allerdings scheint es auch Hinweise darauf zu geben, dass die Th2-Dominanz in der Schwangerschaft nicht immer erforderlich ist.

In den letzten Jahren wurde das Bild der Anpassungsprozesse in der Schwangerschaft von einem reinen Th1-/ Th2-Shift durch die Beschreibung der Funktionen von regulatorische T-Zellen (Treg) und Th17-Zellen erweitert (8, 12). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die die T-Zell-Aktivität und Funktion während der Schwangerschaft steuern, sind jedoch noch unzureichend verstanden.

1.2 Myeloide Suppressorzellen (MDSC)

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind eine heterogene Zellpopulation myeloider Vorläuferzellen, die sich durch suppressive Wirkung auf andere Immunzellen, insbesondere T-Zellen auszeichnen. Sie sind nach Zentrifugation über einem Dichtegradienten in der Schicht der mononukleären Zellen zu finden. MDSC können in zwei Subgruppen unterteilt werden: Granulozytäre MDSC (GR-MDSC) und monozytäre MDSC (MO-MDSC). Während MO-MDSC über die Expression des Oberflächenproteins CD14 charakterisiert werden, tragen GR-MDSC die granulozytären Oberflächenmarker CD15 und CD66b. Beide Subpopulationen exprimieren das MHC-II-Molekül HLA-DR nicht (13-15). Eine systemische Akkumulation von MDSC wurde erstmals in Mäusen mit Tumoren und bei Krebspatienten beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass MDSC das Tumorstadium durch Hemmung der Tumor-spezifischen T-Zell-Antwort fördern (16-18). Seither wurden eine Reihe weiterer pathologischer, nicht-maligner Zustände beschrieben, wie zum Beispiel Infektionen und Sepsis, Traumata oder Transplantationsreaktionen, während derer es zu einer Ansammlung von MDSC kommt (19-23). In den meisten dieser Fälle haben MDSC eine schädliche Funktion indem sie die effektive Immunabwehr gegen einen pathologischen Prozess im Körper verhindern.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass MDSC auch im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener und damit unter physiologischen Bedingungen in erhöhter Zahl vorkommen und einen hemmenden Einfluss auf T-Zellen und natürliche Killer-Zellen (NK) ausüben (24). Es stellte sich daher die Frage, ob ähnliche Veränderungen während der Schwangerschaft auch im mütterlichen Organismus stattfinden und ob diese eine Bedeutung für die materno-fetale Toleranz haben.

1.2.1 Mechanismen der T-Zell-suppressiven Wirkung von MDSC

MDSC üben ihre T-Zell-suppressive Wirkung über verschiedene Mechanismen aus. Die wichtigsten und bisher am besten untersuchten Mechanismen sind ein Eingreifen in den Arginin-Metabolismus über die Expression der Effektorenzyme Arginase I (ArgI) und induzierbare NO-Synthase (iNOS), sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

Die Depletion der essentiellen Aminosäure L-Arginin durch die Enzyme ArgI und iNOS führt zu einem Substratmangel im T-Zell-Stoffwechsel und hemmt damit die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen. In mehreren Arbeiten konnte eine enge Verbindung zwischen der ArgI- und iNOS-Expression der MDSC und ihrer T-Zell-supprimierenden Eigenschaft festgestellt werden (14, 17, 25, 26). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der ROS-Produktion bei MDSC aus Tumor-tragenden Mäusen ihre T-Zell-suppressive Eigenschaft komplett aufhebt (27, 28). Außerdem scheint die Produktion von ROS durch MDSC insbesondere die antigen-spezifische Immunantwort zu hemmen (27, 29).

1.3 Ziel dieser Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Akkumulation von MDSC in der komplikationslosen humanen Schwangerschaft und eine mögliche Bedeutung für die materno-fetale Toleranz untersucht werden. Dazu wurde zunächst analysiert, ob MDSC in erhöhter Anzahl im peripheren Blut Schwangerer im Vergleich zu nicht Schwangeren vorkommen. Außerdem wurden MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer auf ihre T-Zell-suppressiven Eigenschaften

hin untersucht. Es wurde die Expression der Effektorenzyme Arg1 und iNOS, sowie die ROS-Produktion bestimmt und die Fähigkeit zur Hemmung der T-Zell-Proliferation ermittelt und mit MDSC aus dem peripheren Blut von Kontrollpersonen verglichen. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Aspekt der komplexen Mechanismen der Immunregulation in der Schwangerschaft beleuchtet. Weitere mögliche Ziele könnten eine zellorientierte, therapeutische Beeinflussung immunologischer Schwangerschaftskomplikationen wie Aborte oder Präeklampsie sein.

2 Material

2.1 Patientenkollektiv

Die Rekrutierung der Probandinnen zur Bestimmung der MDSC-Zahl im peripheren Blut gesunder Schwangerer erfolgte von Oktober 2011 bis Juli 2013 über die Schwangerenambulanz und die Wöchnerinnen-Station der Universitäts-Frauenklinik Tübingen sowie über den niedergelassenen Gynäkologen Dr. Alexander Marmé in Tübingen.

Zur Bestimmung der MDSC-Zahl im peripheren Blut von Patientinnen nach assistierter Reproduktionsbehandlung wurden Probandinnen über die Kinderwunsch-Abteilung der Universitäts-Frauenklinik Tübingen rekrutiert. Alle Blutentnahmen erfolgten im Rahmen von Routineblutentnahmen. Als Kontrolle wurde Blut von nicht schwangeren, gesunden Frauen im gebärfähigen Alter verwendet. Das Alter der Probandinnen lag zwischen 17 und 47 Jahren.

Die Frauen wurden zuvor über die Studie aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Versuche wurden durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen begutachtet und bewilligt (Ethikvotum Nr. 178/2011BO1).

2.2 Chemikalien und Puffer

2.2.1 Kommerziell erworbene Puffer

Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml)	Fa. Biochrom, Berlin
Cytofix/Cytoperm	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PBS-Dulbecco (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Fa. Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Fa. Biochrom, Berlin

2.2.2 Sonstige Chemikalien

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetal bovine serum (FCS)	Fa. Biochrom, Berlin

Heparin-Natrium (5000 I.E. / 0,5 ml)	Fa. B. Braun, Melsungen
Interleukin 2 (IL-2)	Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt
Natriumazid	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
OKT3	Fa. Janssen-Cilag, Neuss
Polyglobin (10%)	Fa. Bayer, Leverkusen

2.2.3 Antikörper und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Alexa Fluor 647 Mouse IgG1 IC	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Human Arginase 1 gelabelt mit DY-485XL	Fa. Hycultec, Beutelsbach Fa. Dyomics, Jena
APC Mouse Anti-Human CD8	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
APC MΦP9 CD14	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)	Fa. Invitrogen, Heidelberg
DY-485XL Mouse IgG1 IC	Fa. Dyomics, Jena
FITC Mouse Anti-Human CD66b	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
NOS2 (C-11) Alexa Fluor 647	Fa. Santa Cruz Biotechnology,

PE (P67,6) CD33	Heidelberg Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti-Human CD14	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti-Human CD4	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PerCP Cy5.5 Mouse Anti-Human HLA-DR	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

2.2.4 Antikörper für die Isolierung der MDSC

Anti-FITC MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach
FITC Mouse Anti-Human CD66b	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Glas- und Plastikmaterialien

15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24 und 48 well Cell culture Cluster, f bottom	Fa. Corning, Amsterdam, Niederlande
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
96 well cell culture Plate, f und u bottom	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppendorf-Cup Reaction Tubes	Fa. Greiner Bio-One

Neubauer-Zählkammer	GmbH, Frickenhausen Fa. Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Pipettenspitzen blau (500-1000 µl) und gelb (20-200 µl)	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen farblos (10 µl)	Viozym Scientific, Oldendorf
Safety Multifly Set	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette 9 ml	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette 9 ml mit 1,6 mg EDTA / ml Blut	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

2.4 Geräte und Software

8-Kanal-Transferpipette (20-200 µl)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Abzugs-Bank HeraSafe HS12	Heraeus Instruments, Stuttgart
Auto Macs pro	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach
Brutschrank (5% CO ₂ , 37°C)	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Durchflusszytometer FACScalibur	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien,

	USA
Kühlschrank „Bosch economic“	Fa. Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Fa. Olympus, Hamburg
Microsoft Excel 2002	Fa. Microsoft Corporation, Unterschleißheim, München
Microsoft Word 2002	Fa. Microsoft Corporation, Unterschleißheim, München
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Software CellQuest Pro	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Sysmex Zellzähler	Fa. Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Vortex	Fa. Bender & Hobein AG, USA
Zentrifuge Rotanta 460 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

3 Methoden

3.1 Zellisolation

Für die Quantifizierung von MDSC wurde EDTA-Blut (Ethylendiamintetraacetat-versetztes Blut) verwendet, welches innerhalb von 6 Stunden verarbeitet wurde. Für die funktionellen Versuche zur T-Zell-suppressiven Wirkung von MDSC wurde Natrium-Heparin-Blut verwendet und unmittelbar nach der Abnahme weiterverarbeitet.

3.1.1 Aufreinigung von PBMC aus peripherem Blut

Zur Isolierung der mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden 5 ml EDTA-Vollblut mit 5 ml phosphate buffered saline (PBS) gemischt und auf 5 ml Biocoll in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen, pipettiert. Anschließend wurde das Röhrchen 25 Minuten bei 20°C und mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 400 rcf ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer geringen Dichte lassen sich mithilfe dieser Methode die PBMC, welche sich nach der Zentrifugation in einem dünnen Ring oberhalb des Biocoll sammeln, von den dichteren Granulozyten und Erythrozyten trennen. Die PBMC wurden dann mit einer 10 ml Pipette vorsichtig abgesaugt, in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und zweimal mit 15 ml PBS gewaschen.

Vor dem zweiten Waschschrift wurden zur Bestimmung der Zellzahl 100 µl der Zellsuspension in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt und mit dem Sysmex-Zellzählgerät die Konzentration der PBMC ermittelt. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Konzentration in PBS gelöst.

Für die Versuche zum Einfluss von MDSC auf die T-Zell-Proliferation wurden die PBMC unter sterilen Bedingungen aufgereinigt.

3.1.2 Aufreinigung von MDSC aus PBMC

Für die Versuche zur Untersuchung des Einflusses von MDSC auf die T-Zell-Proliferation wurden reine MDSC benötigt. Diese wurden mithilfe des Verfahrens des magnetic activated cell sorting (MACS) aufgereinigt. Dazu wurden die wie oben beschrieben steril aufgereinigten PBMC im letzten Waschschrift statt mit PBS mit 4°C kaltem Running Buffer gewaschen und auf eine Zellzahl von 4×10^7 bis 1×10^8 pro 50µl in einem 1:1-Gemisch aus Polyglobin und Running Buffer eingestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten streng auf Eis. Zu je 4×10^7 Zellen wurden 5µl anti-CD66b-FITC-Antikörper gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift zum Entfernen der ungebundenen Antikörper erfolgte die 15minütige Inkubation mit anti-FITC-gekoppelten magnetischen Beads. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500µl running buffer aufgenommen und im Automacs über zwei Säulen in einer Positiv-Selektion sortiert (siehe Abbildung 1).

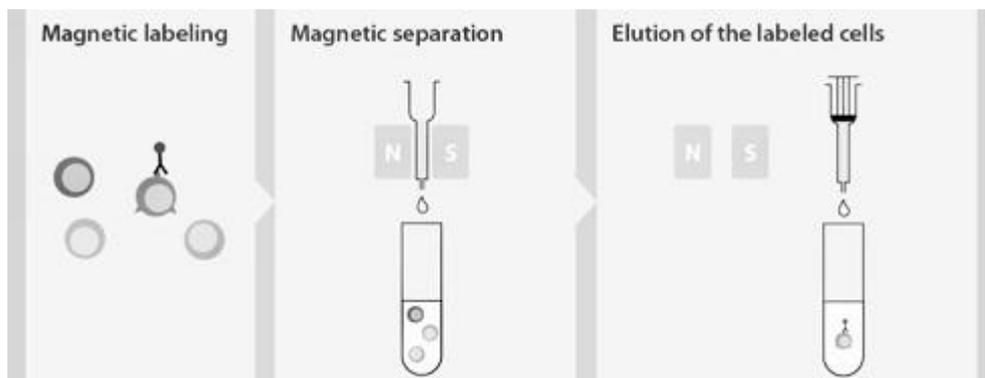


Abbildung 1: Positiv-Selektion mittels magnetic activated cell sorting (MACS) – System. Die magnetisch gelabelten Zellen werden zwischen den Magneten gehalten während die anderen Zellen nach unten in ein Auffanggefäß durchfließen. Nach Entfernung aus dem Magneten werden die Zellen in ein separates Auffanggefäß gegeben. Abbildung entnommen aus der Homepage von Miltenyi Biotec.

3.2 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

3.2.1 Färbung der Zellen für die Phänotypisierung

Die durchflusszytometrische Färbung der Zellen erfolgte in einer 96er u-well Platte. Dazu wurden pro Probe 6 wells mit je 50µl einer auf 4×10^6 Zellen/ ml

eingestellten Zellsuspension gefüllt und nach dem in Tabelle 1 dargestellten Pipettierschema gefärbt.

	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6
Extrazelluläre Antikörper	Keine	1,5 µl anti-CD66b FITC				
		0,5 µl anti-HLA-DR PerCP Cy5				
		1 µl CD14 APC	1 µl CD14 APC	1 µl CD14 APC	1 µl CD14 PE	1 µl CD14 PE
Intrazelluläre Antikörper	Keine	Keine	1,5 µl Isotyp Arginase	3 µl anti-Arginase 1	1 µl Isotyp iNOS	2 µl anti-iNOS2 Alexa Fluor

Tabelle 1: Pipettierschema für die Färbung zur Phänotypisierung

Zunächst erfolgte die Extrazellulär-Färbung der Zellen durch Zugabe der entsprechenden Antikörper und 15minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4°C. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer (PBS + 1% FCS + 0,1% NaN₃) wurde die nur extrazellulär gefärbte Probe aus well 2 bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Kühlschrank gelagert. Die übrigen Proben wurden durch Zugabe von 100 µl Cytofix/Cytoperm und Inkubation für zehn Minuten bei 37°C fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die intrazellulär-Antikörper dazu gegeben und nochmals für 10 Minuten bei 37°C inkubiert (der erste Ansatz blieb ungefärbt, wurde jedoch wie die intrazellulär gefärbten Ansätze in well 3, 4, 5 und 6 behandelt). Auf die Färbung gegen CD33 wurde verzichtet, da sich in Vor-Versuchen gezeigt hatte, dass die CD66b-exprimierenden Zellen der PBMC-Fraktion CD33 exprimierten. Es folgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer und anschließendes Überführen der Zellen in FACS-Röhrchen. Die FACS-Röhrchen wurden bis zur Messung dunkel und bei 4°C gelagert.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine etablierte Methode zur quantitativen Erfassung der Zellen dar und bietet zusätzlich die Möglichkeit, Zellen nach ihrer

Größe, Granularität und Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulär-Antigenen zu charakterisieren (30).

3.3 Funktionelle Versuche

3.3.1 ROS-Produktion

Um zu untersuchen, ob GR-MDSC Schwangerer mehr ROS produzieren als GR-MDSC nicht schwangerer Kontrollprobandinnen wurden die PBMC auf eine Zellzahl von 4×10^5 Zellen/ ml eingestellt und in PBS mit Kalzium- und Magnesiumzusatz aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 10 μ l Dihydrohodamin 123 (DHR) pro ml Zellsuspension versetzt und für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10ng/ml Phorbol-12-myristat,-13-azetat (PMA) für 10 Minuten und 20 Minuten stimuliert und danach sofort auf Eis gelegt um die Stimulation zu stoppen. Oxidiertes DHR lässt sich nun als Rhodamin mittels Durchflusszytometrie nachweisen. Nach Gegenfärbung mit CD66b-Antikörper erfolgte die Messung im FACS.

3.3.2 T-Zell-Proliferationsversuche

Zur Untersuchung des Einflusses von MDSC auf die Proliferation von T-Zellen wurden PBMC von schwangeren und nicht schwangeren Probanden wie oben beschrieben steril isoliert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt. Die CFSE-gefärbten PBMC wurden dann in RPMI + 10% FCS aufgenommen und mit 100 U/ ml Interleukin-2 und 1 μ g/ ml OKT3 stimuliert.

Nach dem in Tabelle 2 abgebildeten Schema wurden dann ebenfalls steril aufgereinigte und in RPMI + 10% FCS gelöste MDSC hinzugegeben. Als Kontrollen dienten unstimulierte PBMC (Negativkontrolle) und stimulierte PBMC ohne Zugabe von MDSC (Positivkontrolle). Nach 96-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen abgeerntet und mit anti-CD4-PE und anti-CD8-APC gefärbt.

PBMC NS 6:1 MDSC NS	PBMC NS 2:1 MDSC NS	PBMC NS 6:1 MDSC S	PBMC NS 2:1 MDSC S	PBMC S 6:1 MDSC NS	PBMC S 2:1 MDSC NS	PBMC S 6:1 MDSC S	PBMC S 2:1 MDSC S
---------------------------	---------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	-------------------------	-------------------------

Tabelle 2: Schema zum Mischverhältnis PBMC zu MDSC für die funktionellen Versuche

S = Schwangere, NS = nicht schwangere Kontrolle

Anschließend wurde anhand einer Abnahme des CFSE-Signals der Anteil an proliferierten CD4- und CD8-T-Zellen bestimmt (siehe Abbildung 2). Der höchste Peak auf der rechten Seite stellt die Zellen zum Ausgangspunkt, also zum Zeitpunkt 0, dar. Jeder weitere Peak in Richtung links steht für eine Tochtergeneration, also für eine Zellteilung. Je mehr Peaks nach links zu sehen sind, desto häufiger haben sich die Zellen geteilt (Beispielabbildung: 61,25% proliferierte Zellen).

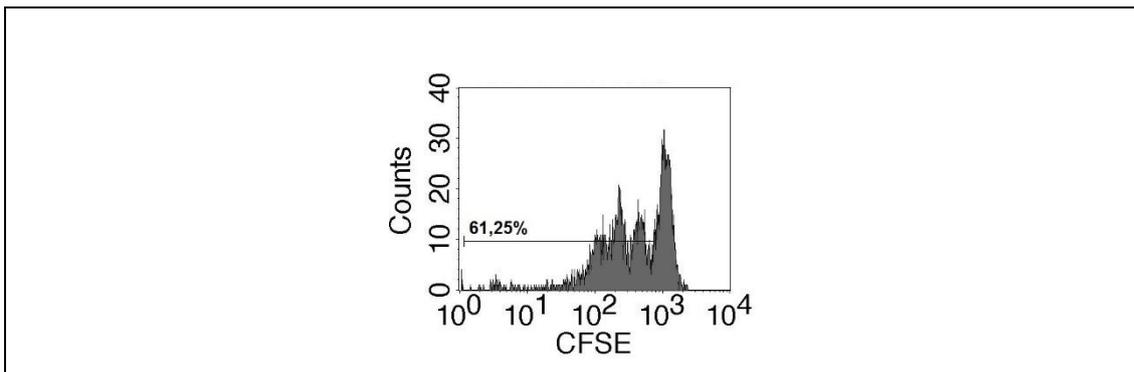


Abbildung 2: Beispielabbildung eines CFSE-Assays.

3.4 Auswertung

3.4.1 Auswertung der durchflusszytometrischen Versuche

Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Gerät FACScalibur, die Auswertung der Messungen mit der Software CellQuest Pro der Firma BD Biosciences.

3.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5.0.

3.4.2.1 Unverbundene Stichproben

Unverbundene Stichproben, wie beispielsweise in Abbildung 4, mit nur zwei Datengruppen wurden zunächst mithilfe des D'Agostino and Pearsons omnibus normality Tests auf Normalverteilung überprüft. Für Stichproben mit mehr als zwei Datengruppen, wie in Abbildung 6, wurde der Dunn's Multiple Comparison Test verwendet.

Die eigentliche Signifikanztestung erfolgte für unverbundene Stichproben mit zwei Datengruppen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, für Stichproben mit mehr als zwei Datengruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests, da keine der getesteten Stichproben in Normalverteilung vorlag.

Eine Besonderheit lag bei Abbildung 16 vor, da die Stichprobenanzahl noch zu gering war, um eine Testung auf Normalverteilung vorzunehmen. Daher wurde auf diesen Test verzichtet und von einer nicht normalverteilten Probe ausgegangen; der Signifikanztest erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.4.2.2 Verbundene Stichproben

Zur Auswertung der verbundenen Stichproben, beispielsweise in Abbildung 13, wurden zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt, um die ermittelten Werte mit dem Referenzwert zu vergleichen. Der Proliferationsindex, definiert als das Verhältnis der T-Zell-Proliferation unter Einfluss von GR-MDSC zur T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von GR-MDSC, wurde ermittelt.

Zur Signifikanztestung wurde anschließend der Wilcoxon matched-pairs signed rank Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 GR-MDSC, nicht jedoch MO-MDSC sind im peripheren Blut gesunder Schwangerer am Entbindungstermin erhöht

Zunächst wurde peripheres Blut von Schwangeren am Entbindungstermin (Gestationsalter >37 vollendete Schwangerschaftswochen) untersucht, der prozentuale Anteil von GR-MDSC und MO-MDSC innerhalb der PBMC-Fraktion durchflusszytometrisch ermittelt und mit dem Anteil an MDSC in PBMC von nicht schwangeren Kontrollen verglichen.

Abbildung 3 zeigt die Gating-Strategie für GR-MDSC und MO-MDSC.

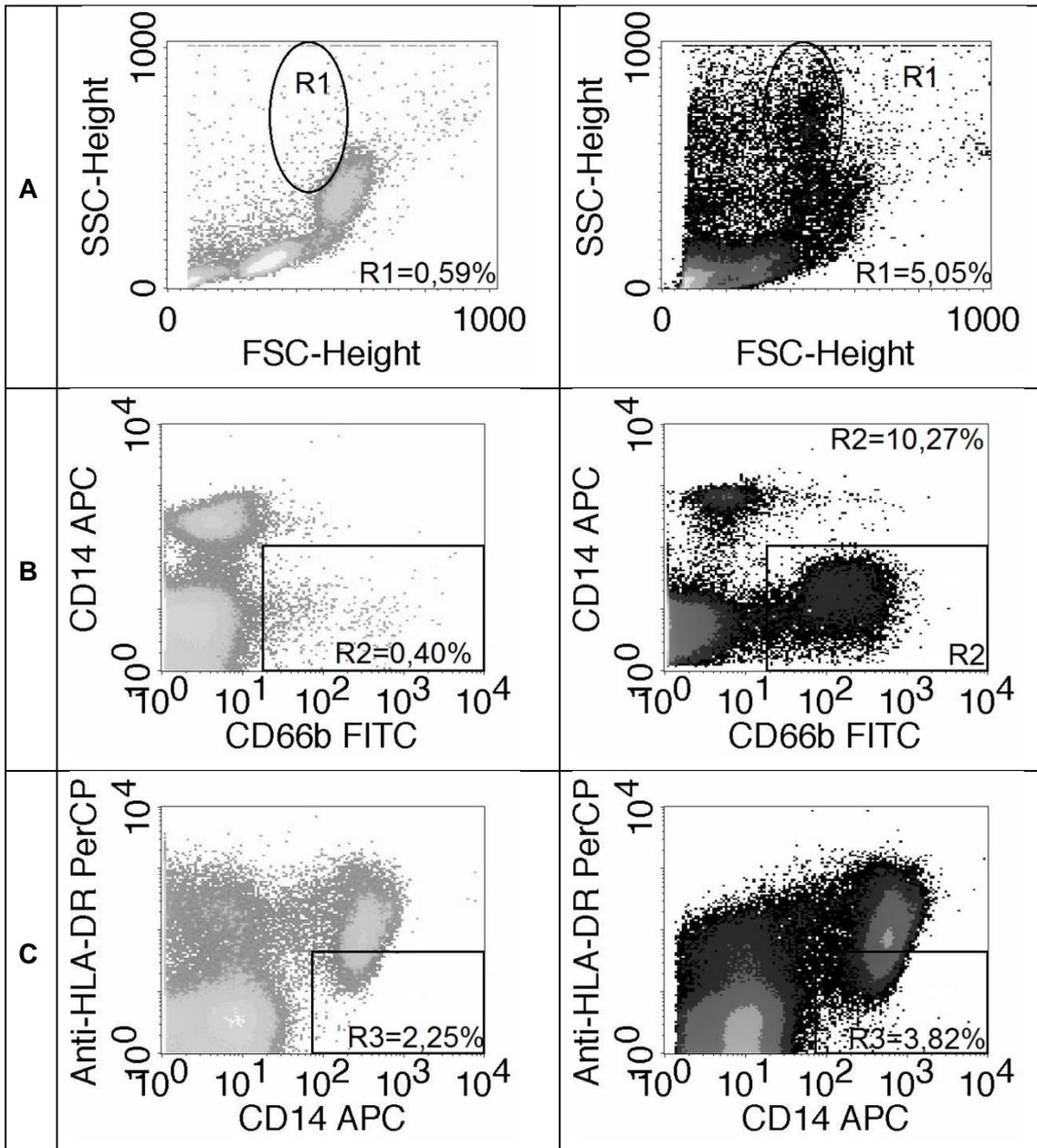
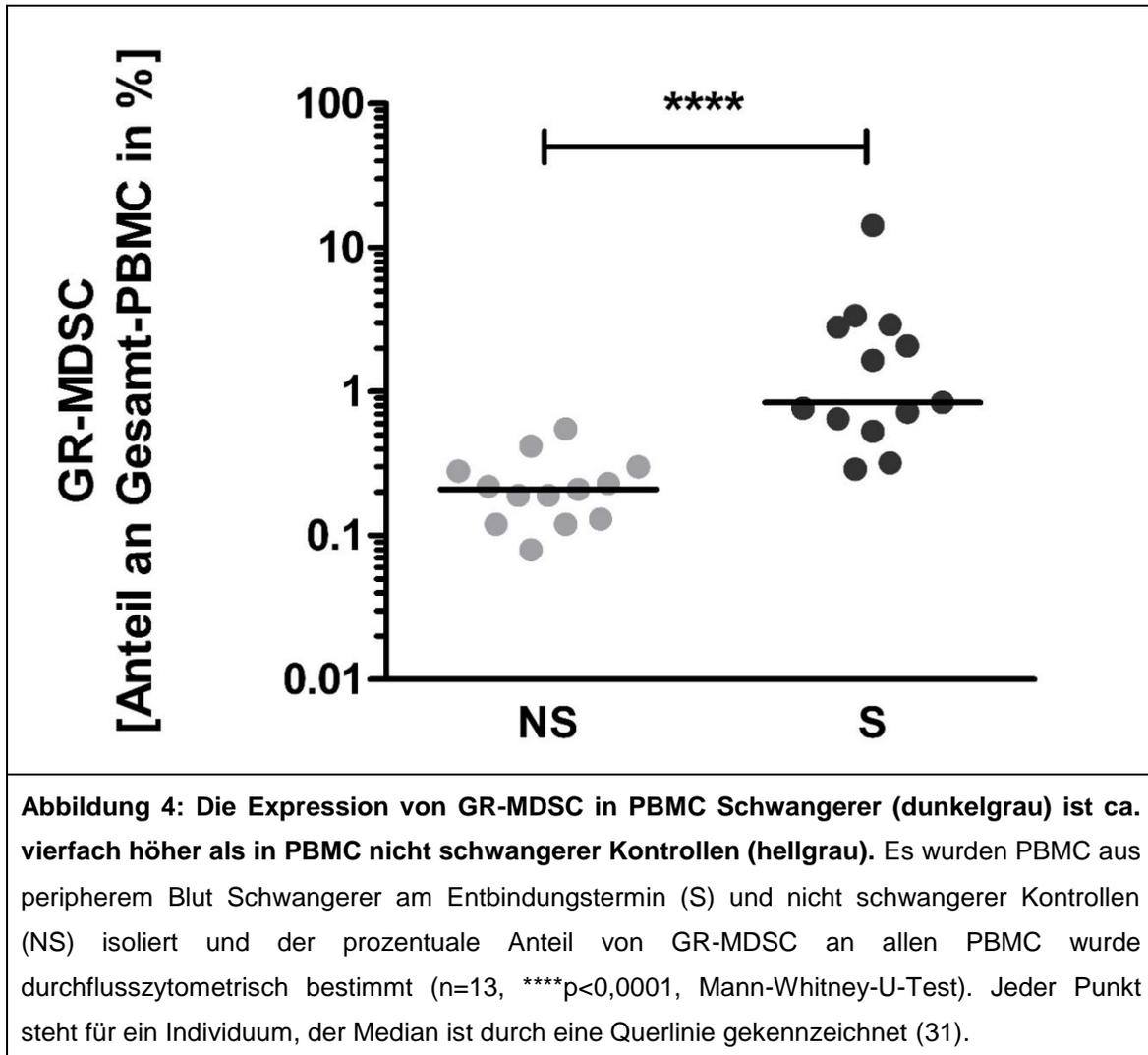


Abbildung 3: Gating-Strategie für GR-MDSC und MO-MDSC. PBMC wurden aus dem Blut einer schwangeren (dunkelgrau) und einer nicht schwangeren (hellgrau) Probandin isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. **A:** Forward-Side-Scatter Plots zweier Beispiel-Proben. GR-MDSC finden sich oberhalb der Monozyten-Population im Gate R1. **B:** Gating-Strategie für GR-MDSC. Sie werden definiert als CD66b-positive aber CD14-negative Zellen, zu finden hier im Gate R2. **C:** Gating-Strategie für MO-MDSC. Sie werden definiert als CD14-positive aber HLA-DR-negative Zellen, zu finden hier im Gate R3. (31)

Der Anteil von GR-MDSC an PBMC Schwangerer war ca. vierfach höher (0,84% (0,29-14,33%), n=13) als in PBMC nicht schwangerer Kontrollen (0,21% (0,08-0,55%), n=13, $p < 0,0001$, Abb. 4) (31).



Im Gegensatz dazu war der prozentuale Anteil an MO-MDSC innerhalb der PBMC-Fraktion in der Schwangeren- und Kontrollgruppe nicht unterschiedlich (1,13% (0,35-9,44%), n=12 in der Schwangeren-Gruppe, 1,61% (0,29-5,47%), n=12 in der Kontroll-Gruppe, $p = 0,06$, Abb. 5) (31).

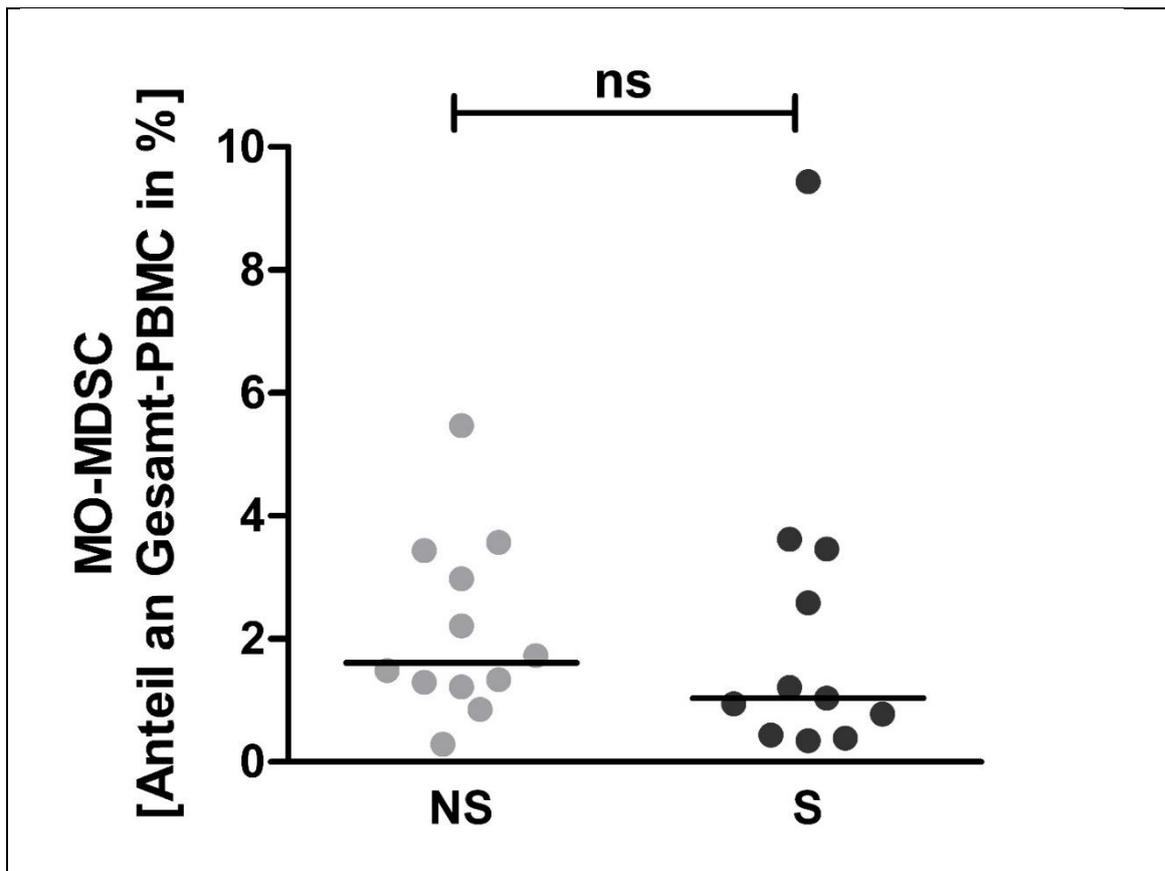


Abbildung 5: Die Expression von MO-MDSC zeigt keine Unterschiede in PBMC Schwangerer (dunkelgrau) und nicht schwangerer Kontrollen (hellgrau). Der prozentuale Anteil von MO-MDSC an allen PBMC wurde durchflusszytometrisch bestimmt (n=12, ns=nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet (31).

4.2 GR-MDSC sind über die gesamte Schwangerschaft hinweg erhöht und fallen nach der Geburt wieder ab

Viele immunologische Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise rezidivierende Aborte oder Präeklampsie, ereignen sich zu bestimmten Zeitpunkten in der Schwangerschaft (4, 32). Daher wurde als nächstes die Frage untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Gestationsalter und MDSC-Zahl besteht. Dazu wurde der Anteil an GR-MDSC und MO-MDSC in PBMC Schwangerer zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft (1. Trimenon (T1), 2. Trimenon (T2) und 3. Trimenon (T3)) analysiert.

In allen drei Trimenen war der prozentuale Anteil an GR-MDSC an der PBMC-Fraktion höher als bei nicht schwangeren Kontrollen (NS) (T1: 1,19% (0,11-

5,99%), T2: 3,57% (0,19-40,13%), T3: 3,92% (0,13-8,79%), NS: 0,21% (0,08-0,55%), n=12-16, alle $p < 0,05$, Abb. 6). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Trimenen festgestellt werden. Postpartal sank der Anteil an GR-MDSC innerhalb weniger Tage wieder auf das Level der nicht schwangeren Kontrollen (0,88% (0,25-4,83%), n=14, $p > 0,05$, Abb. 6) (31).

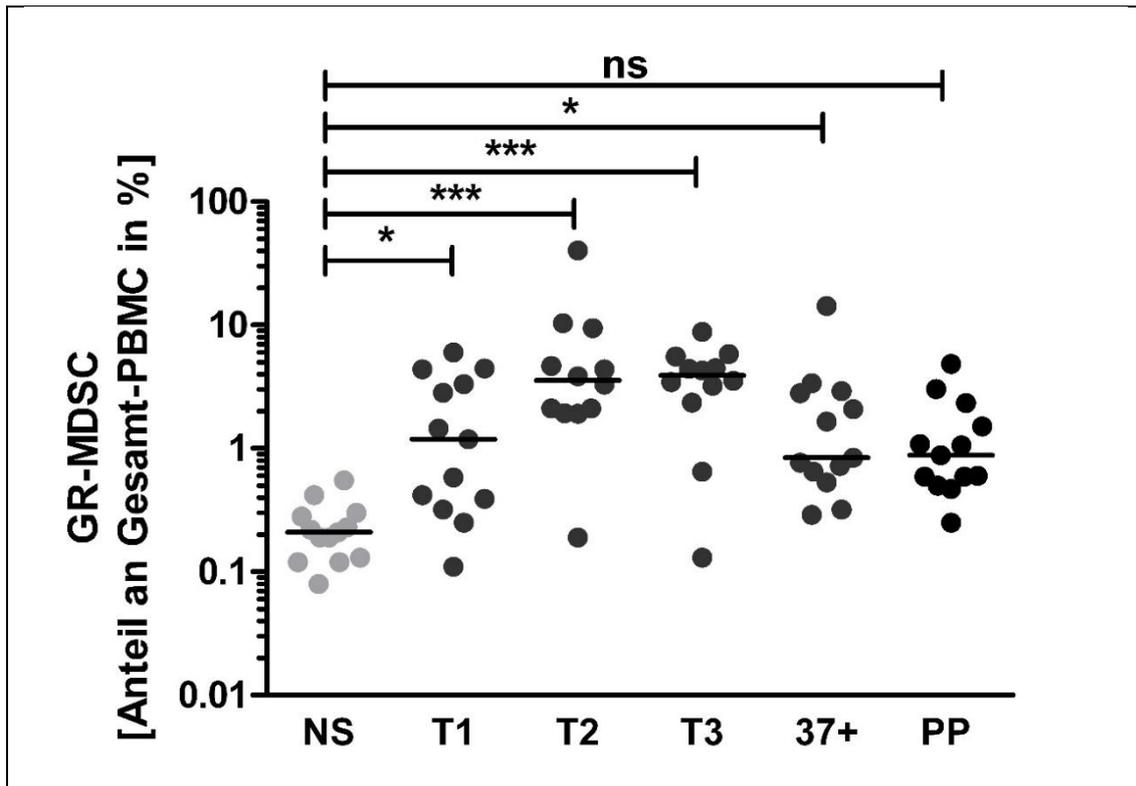


Abbildung 6: Der Anteil an GR-MDSC ist während der gesamten Schwangerschaft erhöht. Es wurden PBMC aus dem peripheren Blut Schwangerer im ersten (T1), zweiten (T2) und dritten Trimenon (T3) sowie aus Blut Schwangerer am Entbindungstermin (37+) und nach der Entbindung (PP) isoliert und der Anteil an GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt (n=12-16, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns=nicht signifikant, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet (31).

Der Anteil an MO-MDSC veränderte sich während der Schwangerschaft nicht (T1: 1,22% (0,41-13,12%), T2: 2,76% (1,39-9,72%), T3: 4,02% (0,68-7,31%), PP: 3,91% (0,54-8,29%), NS: 1,61% (0,29-5,47%), n=10-15, alle $p > 0,05$, Abb. 7) (31).

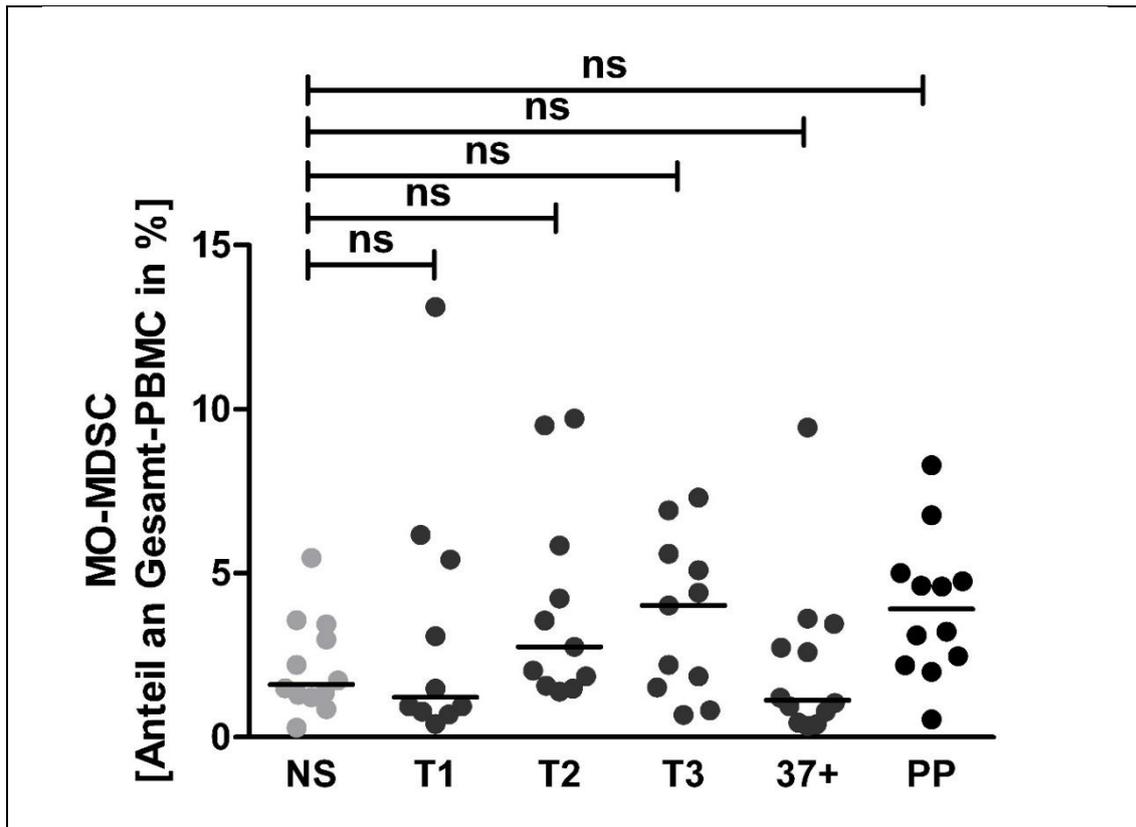


Abbildung 7: Der Anteil an MO-MDSC verändert sich über die Schwangerschaft hinweg nicht. Es wurden PBMC aus dem peripheren Blut Schwangerer im ersten (T1), zweiten (T2) und dritten Trimenon (T3) sowie aus Blut Schwangerer am Entbindungstermin (37+) und nach der Entbindung (PP) isoliert und der Anteil an MO-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt (n=10-15, ns=nicht signifikant, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet (31).

4.3 GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer exprimieren die Effektorenzyme Arg1 und iNOS

Einer der wichtigsten Wirkungsmechanismen, durch den MDSC ihre T-Zell-suppressive Aktivität vermitteln, ist die Verstoffwechslung der essentiellen Aminosäure L-Arginin durch die Enzyme Arg1 und iNOS (13). Daher wurde die Expression von Arg1 und iNOS in PBMC von Schwangeren im Vergleich zu PBMC nicht Schwangerer mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Während sich bei Schwangeren eine deutliche Population Arg1-positiver Zellen zeigte, war Arg1 in PBMC nicht schwangerer Probanden kaum vorhanden (siehe Abb. 8A). Eine Analyse der Oberflächenmarker der Arg1-positiven

Population zeigte, dass diese Zellen die Oberflächenmarker von GR-MDSC trugen (CD66b⁺, CD14⁺, HLA-DR⁺) (siehe Abb. 8B) (31).

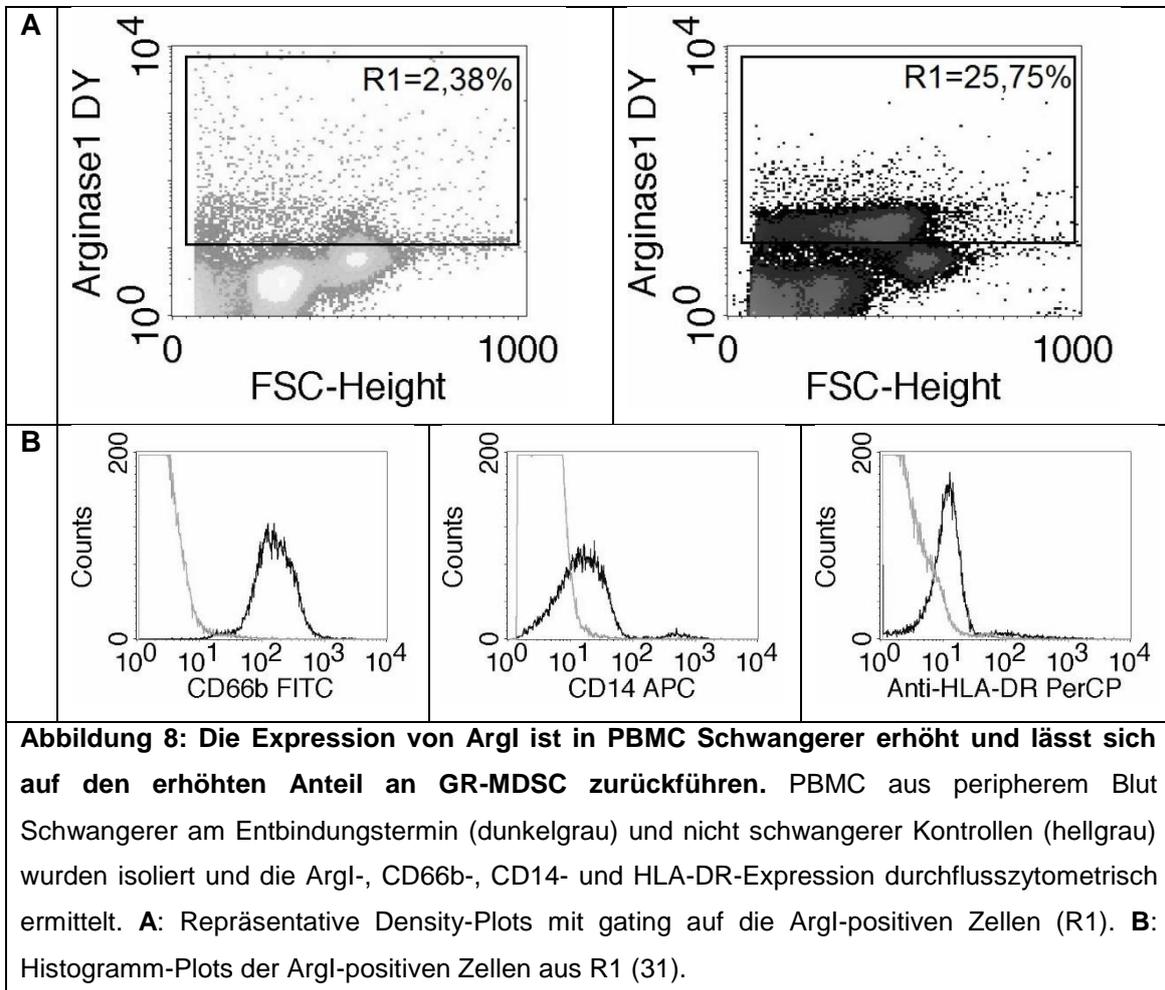
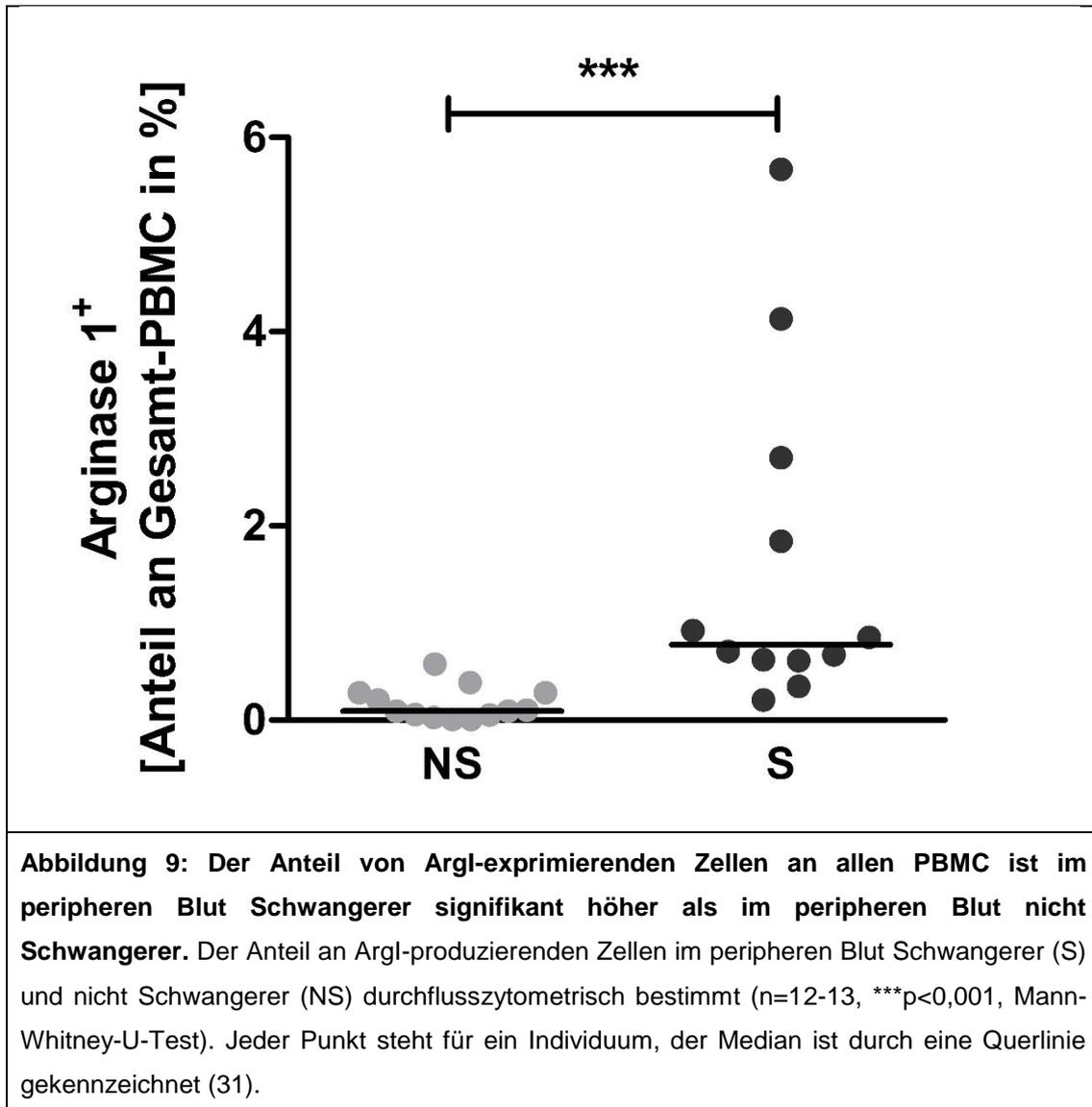


Abb. 9 zeigt die graphische Darstellung der Arg1-Expression in PBMC Schwangerer (0,78% (0,21-5,67%), n=12) im Vergleich zu PBMC nicht Schwangerer (0,09% (0,01-0,58%), n=13, p<0,0001) (31).

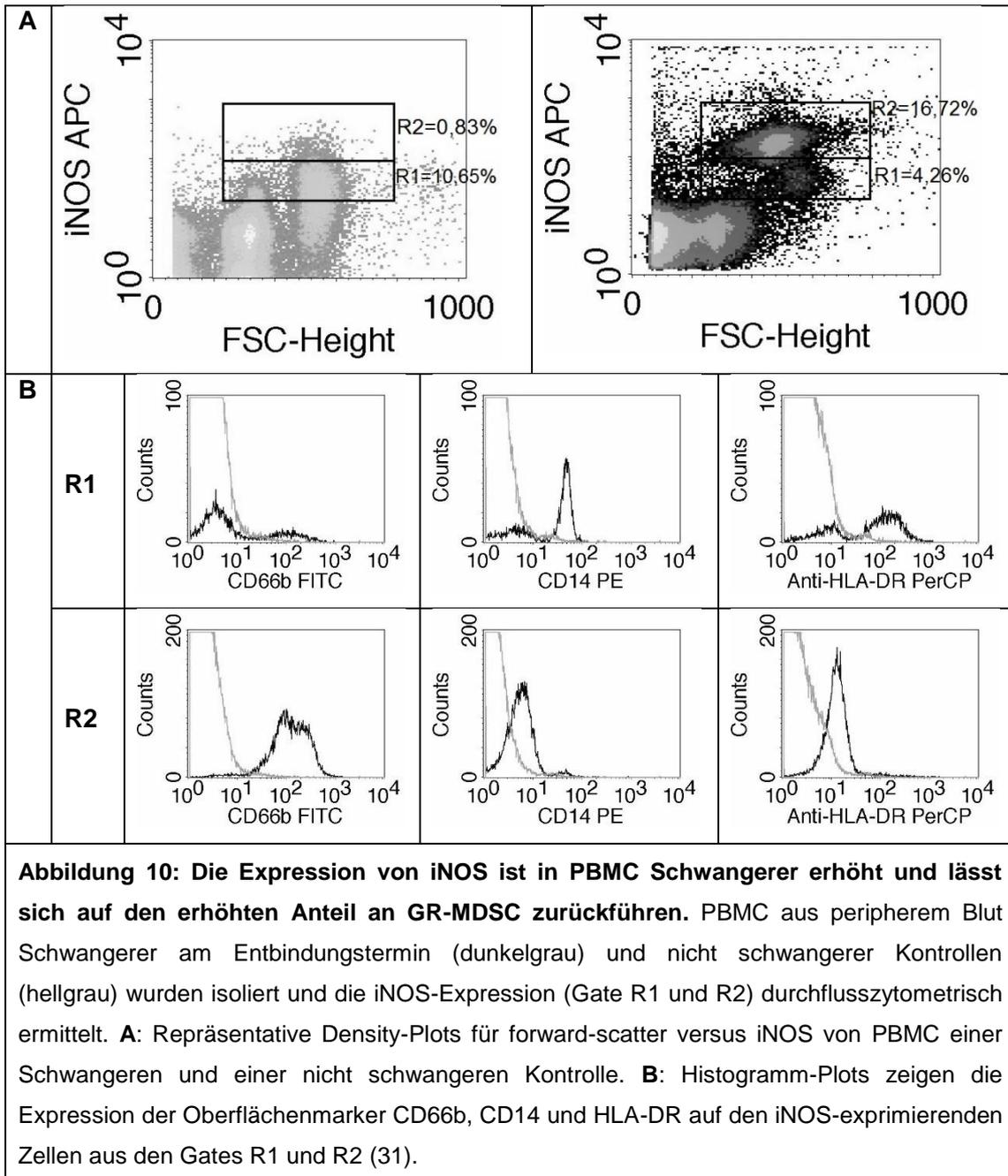


Analog dazu wurde die Expression von iNOS in PBMC Schwangerer und Nicht-Schwangerer miteinander verglichen. Auch hier zeigte sich, dass iNOS in signifikant mehr Zellen in PBMC Schwangerer (7,07% (2,69-14,44%), n=12) im Vergleich zu nicht schwangeren Kontrollen (2,71% (0,08-13,01%), n=13, p=0,002, Abb. 10 und 11) exprimiert wurde (31).

Es fanden sich zwei Populationen an iNOS-exprimierenden Zellen: Eine Population mit hoher iNOS-Expression (iNOS^{high}, medianer MFI 94,64) und eine Population mit niedrigerer iNOS-Expression (iNOS^{low}, medianer MFI 40,40, Abbildung 10A). Für die iNOS^{low}-Population konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Schwangeren (5,77% (1,99-9,55%), n=12) und nicht

Schwangeren (2,67% (0,05-12,8%), n=13, p=0,06) festgestellt werden. Die iNOS^{high}-Population hingegen war signifikant größer in PBMC Schwangerer (0,99% (0,45-18,06%), n=12) im Vergleich zu nicht Schwangeren (0,11% (0,02-0,72%), n=13, p=0,0001, Abb. 11) (31).

Eine Analyse der Oberflächenmarker der jeweiligen Populationen ergab für die iNOS^{low}-Zellen einen Phänotyp entsprechend dem von Monozyten (CD14⁺, HLA-DR⁺ und CD66b⁻) und für die iNOS^{high}-Zellen einen Phänotyp entsprechend dem von GR-MDSC (CD66b⁺, HLA-DR⁻ und CD14⁻) (Abb. 10B) (31).



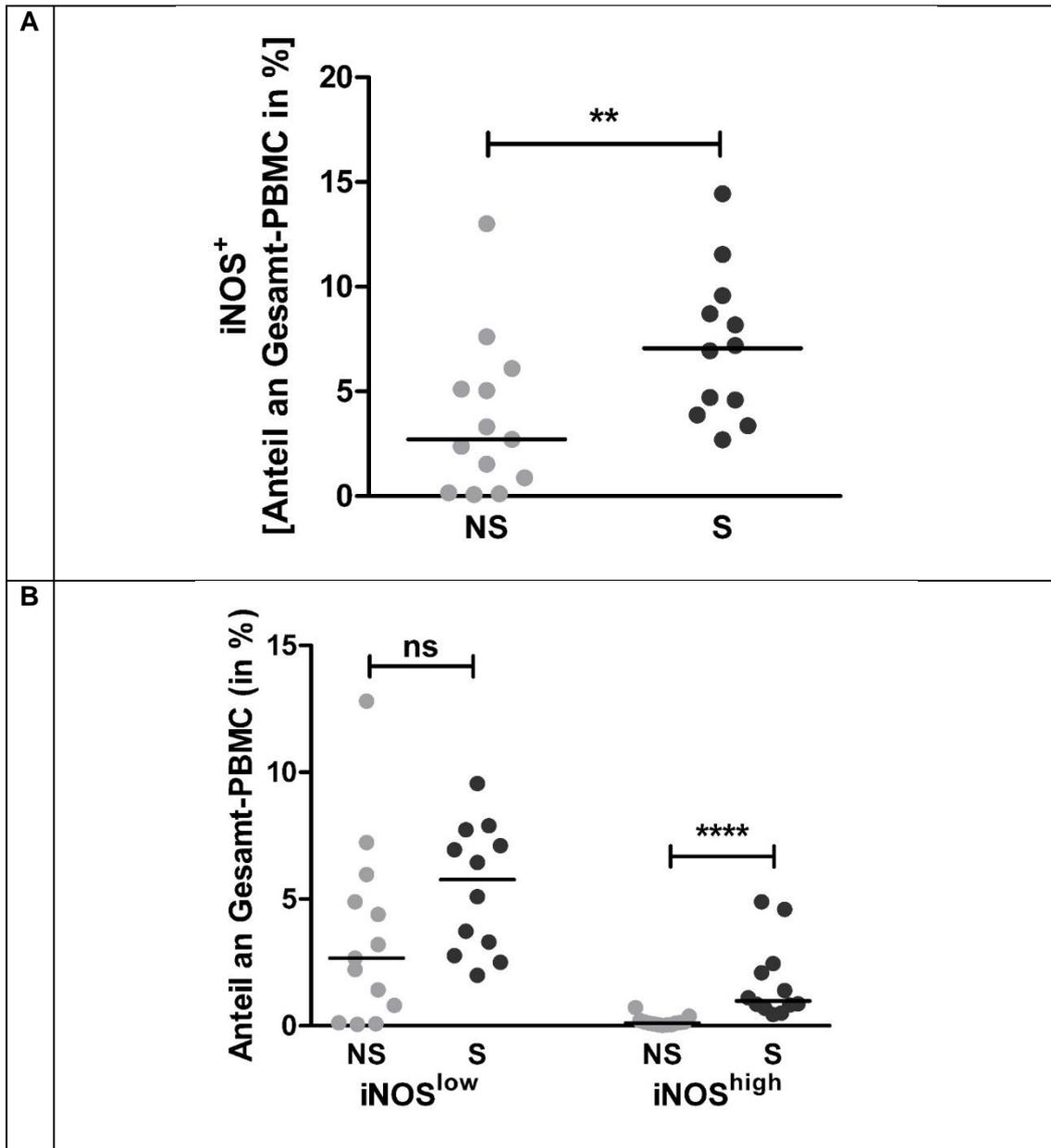


Abbildung 11: Der Anteil an iNOS-exprimierenden Zellen ist in PBMC Schwangerer signifikant erhöht und lässt sich auf den erhöhten Anteil an GR-MDSC zurückführen. PBMC aus peripherem Blut Schwangerer am Entbindungstermin (dunkelgrau) und nicht schwangerer Kontrollen (hellgrau) wurden isoliert und die iNOS-Expression (Gate R1 und R2) durchflusszytometrisch ermittelt. **A:** Es wurde die Gesamtheit aller iNOS-exprimierenden Zellen untersucht (n=12-13, **p=0,002, Mann-Whitney-U-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet. **B:** Getrennte Betrachtung der iNOS^{high} und der iNOS^{low}-Population (n=12-13, ****p<0,0001, ns=nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet (31).

4.4 GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer produzieren große Mengen an ROS

Die Fähigkeit zur ROS-Produktion ist eine bereits beschriebene Eigenschaft von MDSC (13, 18). Daher wurde die ROS-Produktion von PBMC aus Schwangerenblut mit der ROS-Produktion von PBMC aus dem Blut nicht schwangerer Kontrollen verglichen. Untersucht wurde dazu die Oxidation von DHR nach Stimulation der Zellen mit PMA. Der prozentuale Anteil wie auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an DHR-positiven Zellen war in PBMC Schwangerer signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (S: 13,3% (10,6-19,2%), NS: 7,0% (3,0-13,9%), n=5-6, p=0,03, Abb. 12 und 13) (31).

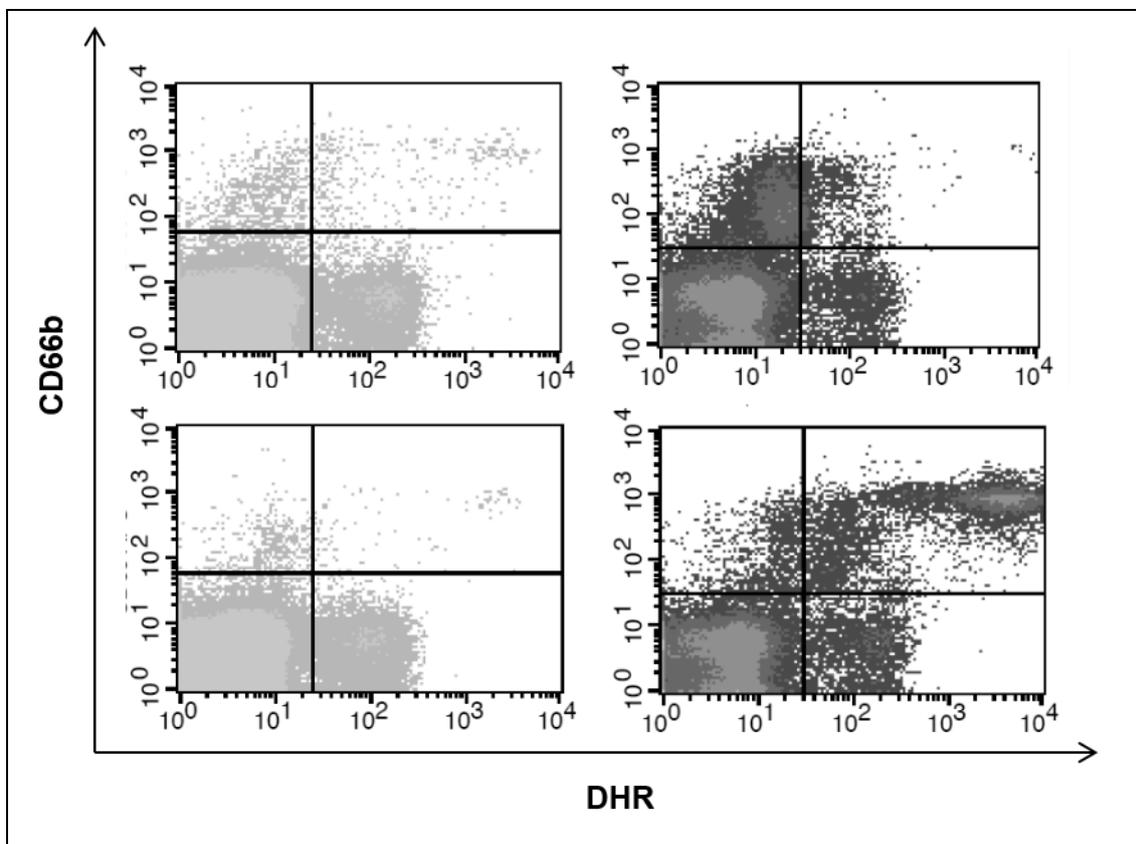


Abbildung 12: Repräsentative Density-Plots zum Nachweis der ROS-Produktion. In hellgrau dargestellt sind PBMC aus nicht schwangeren Kontrollprobandinnen; in dunkelgrau PBMC aus Schwangeren. Die oberen beiden Plots zeigen unstimulierte PBMC, die unteren beiden PBMC nach 20-minütiger Stimulation mit PMA. Die DHR-positiven und CD66b-positiven Zellen repräsentieren die ROS-Produktion von GR-MDSC und finden sich im rechten oberen Quadranten (31).

Dagegen produzierten unstimulierte PBMC Schwangerer und nicht Schwangerer gleiche Mengen an ROS (S: 9,1% (5,8-12,0%), NS: 6,0% (1,9-13,4%), *p=0,16, n=5-6, Abb. 13) (31).

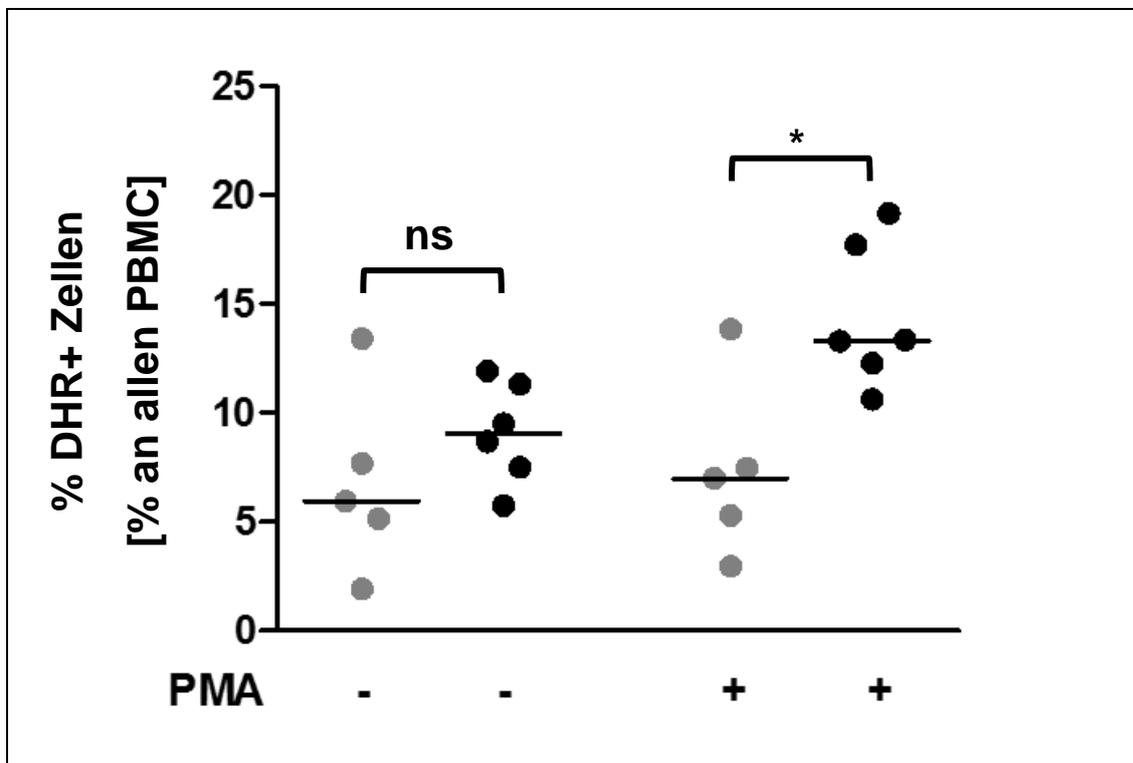


Abbildung 13: Stimulierte PBMC aus Schwangerenblut zeigen eine höhere ROS-Produktion als PBMC aus dem Blut nicht schwangerer Kontrollen. PBMC aus schwangeren (dunkelgrau) und nicht schwangeren (hellgrau) Probandinnen wurden isoliert und die ROS-Produktion mittels der Oxidation des Farbstoffes Dihydrorhodamin 123 durchflusszytometrisch analysiert. Punktediagramm zur Darstellung der ROS-Produktion von PBMC nicht schwangerer Kontrollen (hellgrau) und schwangerer Probandinnen (dunkelgrau) ohne Stimulation mit PMA (links) und nach 20-minütiger Stimulation mit PMA (rechts). (n=5-6, *p=0,16, ns=nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet (31).

4.5 GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer hemmen die T-Zell-Proliferation

Die bedeutendste Eigenschaft von MDSC ist ihre Fähigkeit zur Suppression der T-Zell-Funktionen. Diese Fähigkeit bei der im peripheren Blut Schwangerer gefundenen CD66b-positiven Zellpopulation wurde überprüft.

GR-MDSC aus Schwangerenblut hemmen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut nicht schwangerer Kontrollen auf 68±20% (PBMC:CD66b⁺=6:1, n=5, p<0,05); in der Konzentration von 2:1 tendenziell sogar noch stärker. Als Kontrolle dienten stimulierte PBMC ohne Zugabe von MDSC; die CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von MDSC wurde hier auf 100% festgesetzt (31).

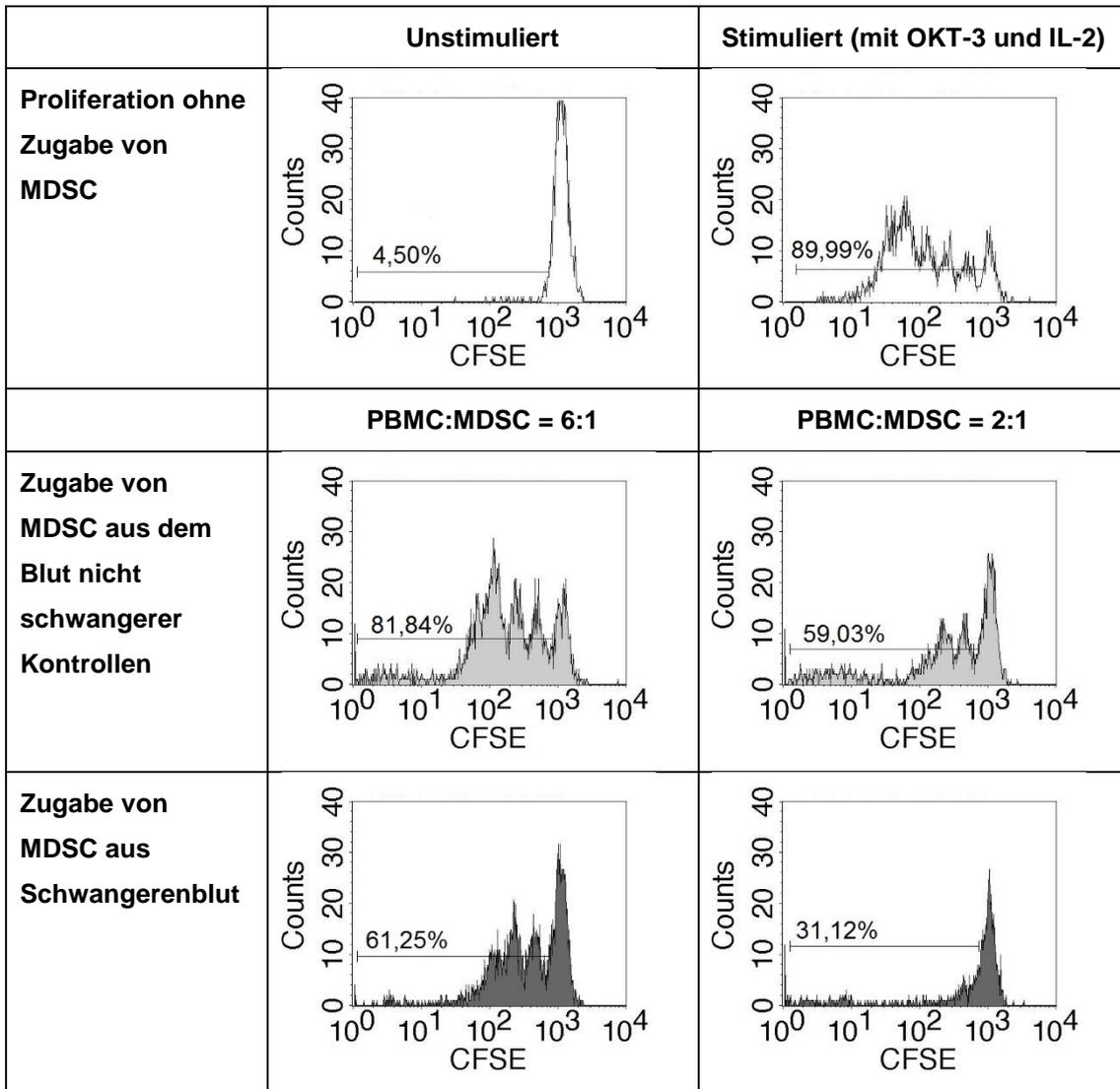


Abbildung 14: GR-MDSC aus Schwangerenblut hemmen die CD4⁺-T-Zell-Proliferation.

GR-MDSC wurden aus dem peripheren Blut Schwangerer und nicht schwangerer Kontrollen aufgereinigt und zu CFSE-gefärbten und mit IL-2 und OKT3-stimulierten PBMC eines nicht schwangeren Erwachsenen gegeben. Nach 96-stündiger Kultur wurde die CD4⁺ T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch ermittelt. Abgebildet sind repräsentative Histogramme eines Proliferationsversuchs. **Obere Zeile:** Unstimulierte (links) und mit OKT3 und IL-2 stimulierte (rechts) CD4⁺-T-Zellen ohne Zugabe von GR-MDSC. **Mittlere Zeile:** Zugabe von GR-MDSC aus dem Blut nicht Schwangerer im Verhältnis PBMC:MDSC 6:1 (links) und 2:1 (rechts). **Untere Zeile:** Zugabe von GR-MDSC aus dem Blut Schwangerer im Verhältnis PBMC:MDSC 6:1 (links) und 2:1 (rechts) (31).

Die T-Zell-suppressive Wirkung von GR-MDSC aus Schwangerenblut war tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant stärker als diejenige von GR-MDSC aus dem Blut nicht schwangerer Kontrollen (PBMC:CD66b⁺=6:1:

78±13%, n=5, p<0,05). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Zugabe von GR-MDSC zu PBMC aus Schwangerenblut (Tabelle 3) (31).

	PBMC NS MDSC NS	PBMC NS MDSC S	PBMC S MDSC NS	PBMC S MDSC S
1:6	78±13%	68±20%	73±20%	65±24%
p-Wert	*p<0,05	*p<0,05	*p<0,05	*p<0,05

Tabelle 3: Proliferationsindex der CD4⁺-T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC. Die Tabelle zeigt Mittelwert und Standardabweichung der CD4⁺ T-Zell-Proliferation in verschiedenen Kombinationen aus PBMC und MDSC. NS=nicht schwanger, S=schwanger. n=5 in allen Versuchen. p wird angegeben im Vergleich zur Proliferation von stimulierten CD4⁺-T-Zellen ohne Zugabe von MDSC (Wilcoxon matched-pairs signed rank Test) (31).

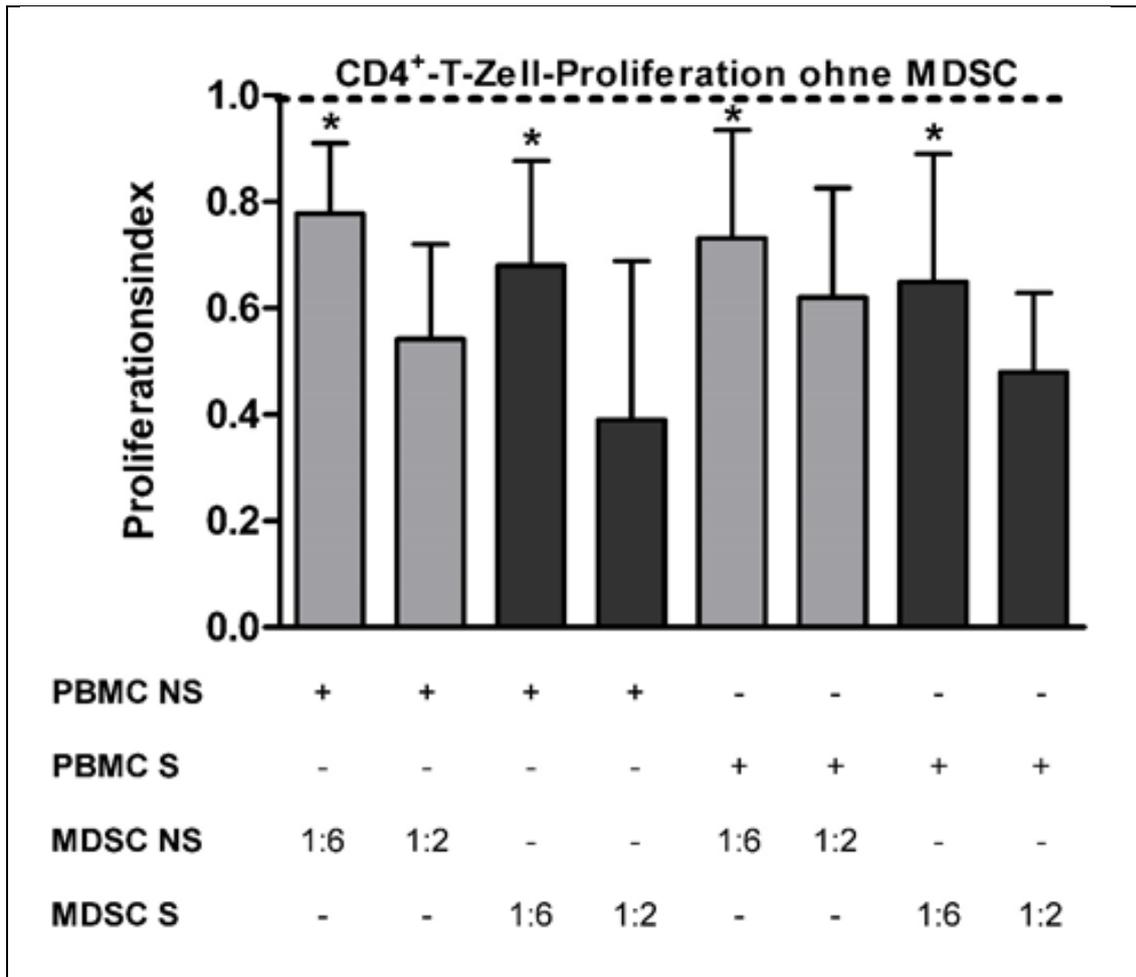


Abbildung 15: Balkendiagramm zur Darstellung der CD4⁺ T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC aus Schwangeren- und Kontroll-PBMC. Der Proliferationsindex gibt die relative Proliferationsrate der CD4⁺-T-Zellen nach Zugabe von GR-MDSC im Vergleich zu stimulierten CD4⁺-T-Zellen ohne Zugabe von MDSC (Proliferationsrate 1,0; gestrichelte Linie) an. Die ersten vier Balken zeigen den Einfluss von GR-MDSC isoliert aus Schwangeren (dunkelgraue Balken; MDSC S) und nicht Schwangeren (hellgraue Balken; MDSC NS) auf T-Zellen an, welche aus dem Blut nicht Schwangerer gewonnen wurden (PBMC NS). Die Balken fünf bis acht zeigen den Einfluss von GR-MDSC isoliert aus Schwangeren (dunkelgraue Balken; MDSC S) und nicht Schwangeren (hellgraue Balken; MDSC NS) auf T-Zellen, die aus dem Blut Schwangerer gewonnen wurden (PBMC S). n=5, p<0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test (31).

Ähnliche Ergebnisse wie für die CD4⁺-T-Zell-Proliferation zeigten sich auch für die Proliferation CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 16 und 17, Tabelle 4) (31).

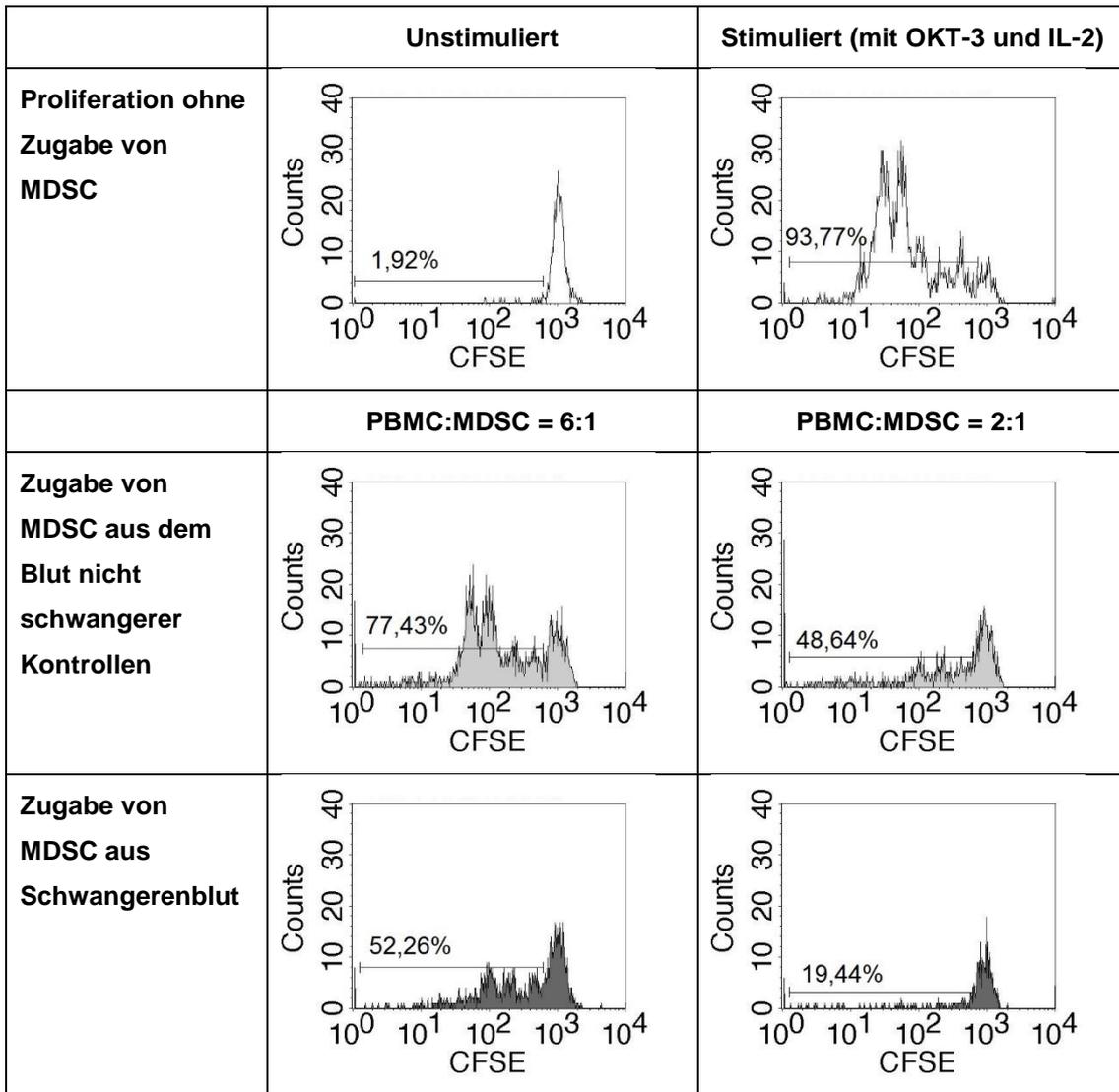


Abbildung 16: GR-MDSC aus Schwangerenblut hemmen die CD8⁺-T-Zell-Proliferation.

GR-MDSC wurden aus dem peripheren Blut Schwangerer und nicht schwangerer Kontrollen aufgereinigt und zu CFSE-gefärbten und mit IL-2 und OKT3-stimulierten PBMC eines nicht schwangeren Erwachsenen gegeben. Nach 96-stündiger Kultur wurde die CD8⁺ T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch ermittelt. Abgebildet sind repräsentative Histogramme eines Proliferationsversuchs. **Obere Zeile:** Unstimulierte (links) und mit OKT3 und IL-2 stimulierte (rechts) CD8⁺-T-Zellen ohne Zugabe von GR-MDSC. **Mittlere Zeile:** Zugabe von GR-MDSC aus dem Blut nicht Schwangerer im Verhältnis PBMC:MDSC 6:1 (links) und 2:1 (rechts). **Untere Zeile:** Zugabe von GR-MDSC aus dem Blut Schwangerer im Verhältnis PBMC:MDSC 6:1 (links) und 2:1 (rechts) (31).

	PBMC NS MDSC NS	PBMC NS MDSC S	PBMC S MDSC NS	PBMC S MDSC S
1:6	74±13%	70±24%	79±11%	70±18%
p-Wert	*p<0,05	*p<0,05	*p<0,05	*p<0,05

Tabelle 4: Proliferationsindex der CD8⁺-T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC. Die Tabelle zeigt Mittelwert und Standardabweichung der CD8⁺ T-Zell-Proliferation in verschiedenen Kombinationen aus PBMC und MDSC. NS=nicht schwanger, S=schwanger. n=5 in allen Versuchen. p wird angegeben im Vergleich zur Proliferation von stimulierten CD4⁺-T-Zellen ohne Zugabe von MDSC (Wilcoxon matched-pairs signed rank Test) (31).

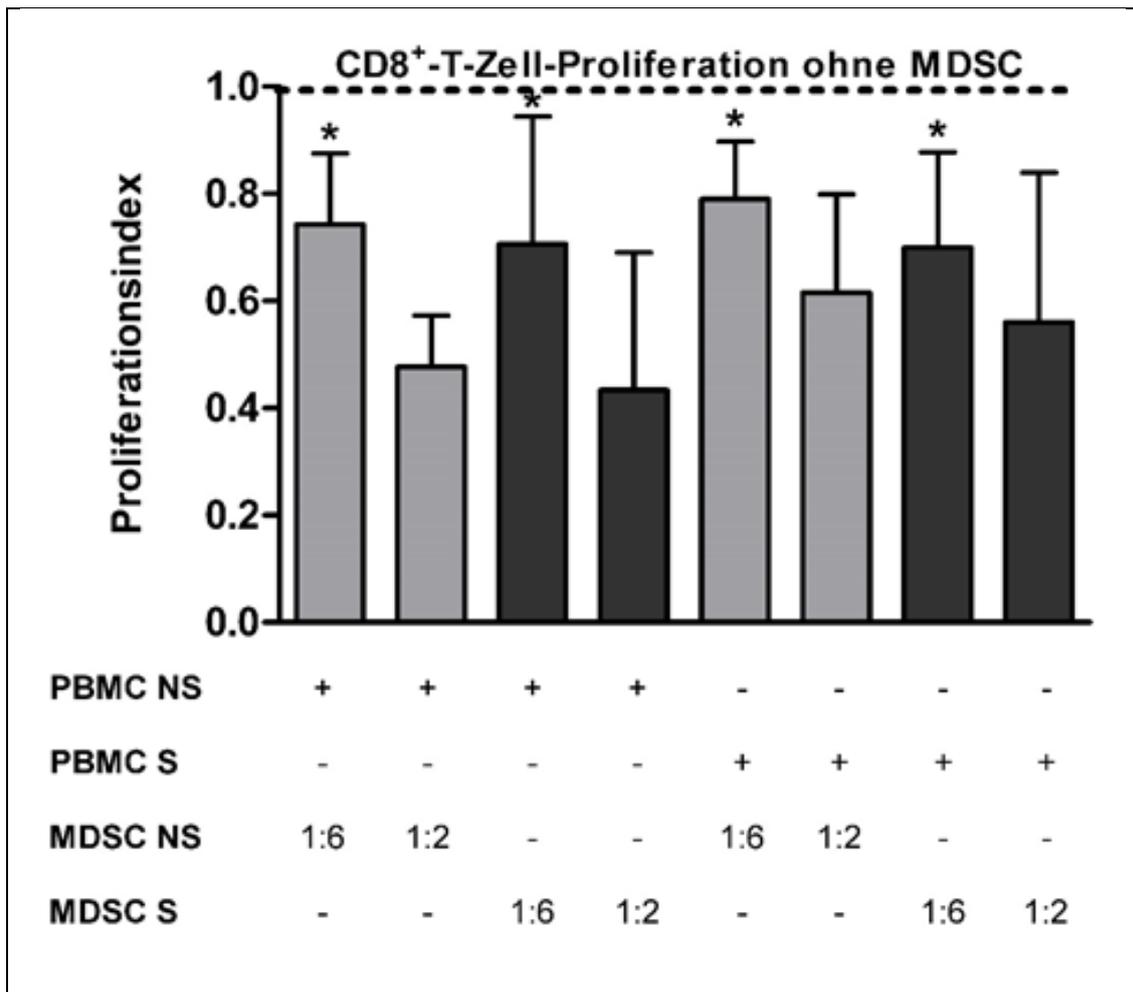


Abbildung 17: Balkendiagramm zur Darstellung der CD8⁺ T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC aus Schwangeren- und Kontroll-PBMC auf CD8-positive Zellen.

Der Proliferationsindex gibt die relative Proliferationsrate der CD8⁺-T-Zellen nach Zugabe von GR-MDSC im Vergleich zu stimulierten CD8⁺-T-Zellen ohne Zugabe von MDSC (Proliferationsrate 1,0; gestrichelte Linie) an. Die ersten vier Balken zeigen den Einfluss von GR-MDSC isoliert aus Schwangeren (dunkelgraue Balken; MDSC S) und nicht Schwangeren (hellgraue Balken; MDSC NS) auf T-Zellen an, welche aus dem Blut nicht Schwangerer gewonnen wurden (PBMC NS). Die Balken fünf bis acht zeigen den Einfluss von GR-MDSC isoliert aus Schwangeren (dunkelgraue Balken; MDSC S) und nicht Schwangeren (hellgraue Balken; MDSC NS) auf T-Zellen, die aus dem Blut Schwangerer gewonnen wurden (PBMC S). n=5, *p<0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank Test (31).

4.6 GR-MDSC sind bereits 14 Tage nach einem Embryonentransfer bei assistierter Reproduktionsbehandlung im peripheren Blut erhöht

Um herauszufinden, ob der Anteil an GR-MDSC bereits zu sehr frühen Zeitpunkten der Schwangerschaft erhöht ist, wurde zuletzt Blut von

Patientinnen 14 Tage nach einem Embryonentransfer untersucht, da diesen Patientinnen bereits zu diesem Zeitpunkt routinemäßig Blut für einen Schwangerschaftstest abgenommen wird. Es wurde unterschieden zwischen Patientinnen, bei denen es zum Eintritt einer Schwangerschaft gekommen war (IVF, S) und solchen, bei denen die Behandlung erfolglos blieb (IVF, NS).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten vier Proben je Gruppe zeigte sich, dass sowohl schwangere als auch nicht schwangere Patientinnen nach einer Reproduktionsbehandlung einen im Vergleich zu nicht schwangeren Probandinnen erhöhten Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut aufwiesen (Schwangere: 7,59% (4,18 – 10,17%), n=4, p=0,004; nicht Schwangere nach Reproduktionsbehandlung: 4,89% (1,96 – 6,83%), n=4, p=0,004; nicht Schwangere: 0,21% (0,08-0,55%), n=13, Abb. 18). Zwischen den beiden Gruppen (IVF, NS und IVF, S) war bei dieser geringen Fallzahl kein signifikanter Unterschied zu finden.

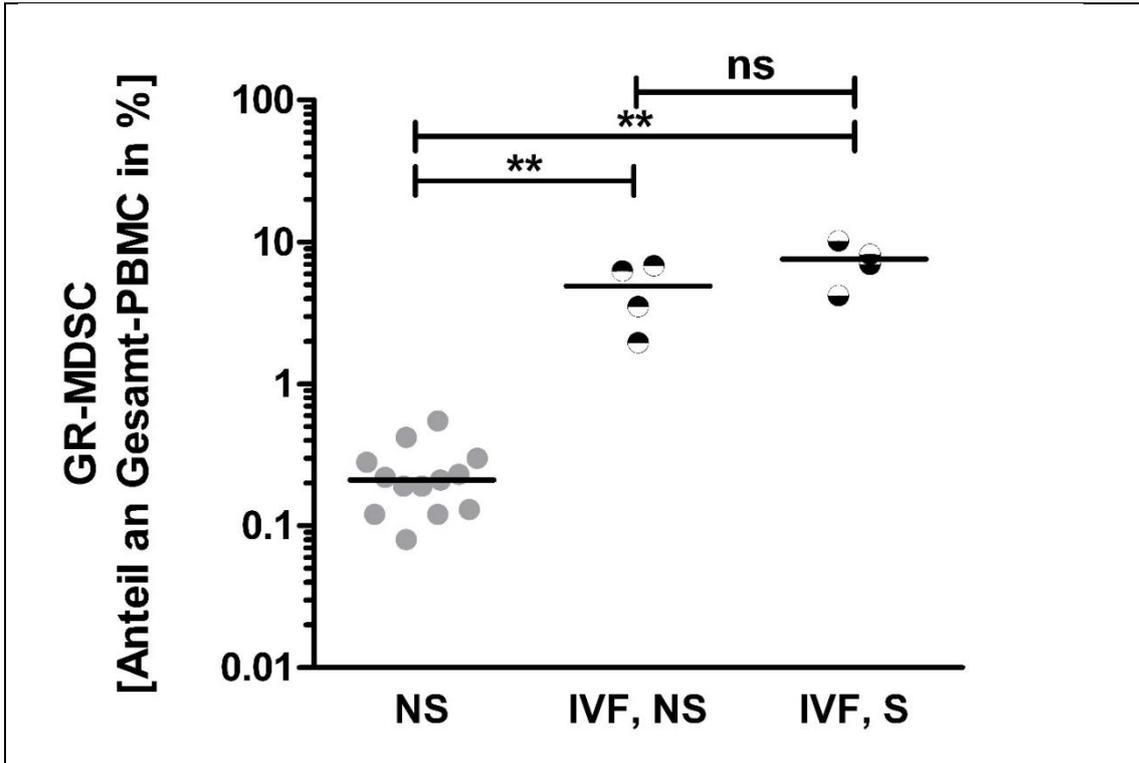


Abbildung 18: GR-MDSC sind bereits 14 Tage nach Embryonentransfer bei assistierter Reproduktionsbehandlung erhöht, unabhängig davon ob daraus eine Schwangerschaft resultierte oder nicht. PBMC wurden aus dem peripheren Blut von Patientinnen nach assistierter Reproduktionsbehandlung mit erfolgreich eingetretener Schwangerschaft (IVF, S) und ohne eingetretene Schwangerschaft (IVF, NS) sowie nichtschwangeren Kontrollprobanden (NS) isoliert und der Anteil an GR-MDSC durchflusszytometrisch ermittelt (n=4 bzw. n=13, **p<0,01, ns nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test). Jeder Punkt steht für ein Individuum, der Median ist durch eine Querlinie gekennzeichnet.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von MDSC für den Schwangerschaftserhalt untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass

- 1) GR-MDSC, nicht jedoch MO-MDSC im peripheren Blut zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft verglichen mit nicht schwangeren Erwachsenen in erhöhter Zahl vorkommen
- 2) der Anteil an GR-MDSC nach Entbindung rasch wieder auf das Niveau nicht schwangerer Erwachsener abfällt
- 3) GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer die Effektorenzyme Arg1 und iNOS exprimieren und
- 4) große Mengen an ROS produzieren
- 5) GR-MDSC sowohl die CD4⁺ - als auch die CD8⁺ - T-Zell-Proliferation *in vitro* hemmen und
- 6) GR-MDSC bereits 14 Tage nach Embryonentransfer im Rahmen einer assistierten Reproduktionsbehandlung in erhöhter Zahl im peripheren Blut vorliegen.

Eine Akkumulation von MDSC wurde bisher nur im Rahmen pathologischer Zustände wie Tumorerkrankungen, Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Transplantationsreaktionen beschrieben (13, 33, 34). Während es bei Tumoren durch die Expansion von MDSC zu einer Hemmung der gegen den Tumor gerichteten T-Zell-Toxizität und damit zu einem Voranschreiten der Erkrankung kommt, wirken sich die immunmodulatorischen Eigenschaften von MDSC nach einer Transplantation protektiv im Sinne einer Verlängerung des Transplantat-Überlebens und einer Verminderung von Abstoßungsreaktionen aus (35-38). Vor einiger Zeit konnte erstmals gezeigt werden, dass GR-MDSC im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener in erhöhter Zahl vorkommen (24), was bereits die Vermutung nahelegte, dass diese Zellen eine Rolle für die fetomaternalen Toleranz während der Schwangerschaft spielen könnten. Mit der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass GR-MDSC, nicht jedoch MO-MDSC auch im peripheren Blut gesunder Schwangerer akkumulieren (Abb. 4), was diese Hypothese weiter unterstützt. Die Ergebnisse

decken sich in ihrer Aussage mit denen der Arbeitsgruppe von Mauti et al., die in einer Untersuchung zur Metastasierung von Tumoren während der Schwangerschaft bereits eine erhöhte Anzahl an MDSC bei tragenden Mäusen nachweisen konnten (39). Die Mechanismen, die zur Erhöhung der Zahl an GR-MDSC während der Schwangerschaft führen, sind bisher noch ungeklärt. Mögliche daran beteiligte Faktoren könnten bestimmte Zytokine, Wachstumsfaktoren und Leukozytenantigene sein, deren Expression in der Schwangerschaft verändert ist und die gleichzeitig dafür bekannt sind, dass sie die Funktion und Akkumulation von MDSC beeinflussen können. Beispielsweise konnten Agague et al. anhand eines HLA-G-exprimierenden Tumormodells zeigen, dass das in Plazenta-Zellen hoch exprimierte MHC-I-Molekül HLA-G MDSC induzieren und aktivieren kann (40, 41). Die MDSC-induzierende Wirkung von HLA-G konnten in neueren Untersuchungen auch an humanen MDSC nachgewiesen werden (42). Auch für andere Faktoren, wie bestimmte Wachstumsfaktoren oder Zytokine gibt es bereits Daten die belegen, dass sie einerseits in der Schwangerschaftsimmunologie eine Rolle spielen (43, 44) und andererseits eine Akkumulation von MDSC und damit möglicherweise eine Hemmung der lokalen und systemischen Immunantwort induzieren (40, 45, 46). Ob, und falls ja welche dieser Faktoren die Akkumulation von MDSC während der Schwangerschaft verursachen, wird Inhalt zukünftiger Studien sein.

Unsere Untersuchungen konnten eine Erhöhung der GR-MDSC, nicht jedoch der MO-MDSC während der Schwangerschaft zeigen (Abb. 5). Bislang sind die unterschiedlichen Rollen dieser beiden Subpopulationen nur unvollständig verstanden. Untersuchungen an Tumor-tragenden Mäusen ergaben Hinweise darauf, dass GR-MDSC aus peripheren lymphatischen Organen eine antigenspezifische T-Zell-Hemmung vermitteln, wohingegen MO-MDSC, welche sich vorwiegend in der direkten Umgebung des Tumors fanden, eine unspezifische Hemmung der T-Zell-Antwort bewirkten (27, 29, 47). Vergleicht man den Feten mit einem wachsenden Tumor so könnte die von uns nachgewiesene Expansion von GR-MDSC im Blut der Schwangeren eine systemische Reaktion

auf das Vorhandensein fetaler Fremdantigene darstellen, welche das Kind vor einem Angriff durch mütterliche T-Zellen schützt.

Neben der Tatsache, dass GR-MDSC während der Schwangerschaft erhöht sind, konnte gezeigt werden, dass ihre Anzahl nach der Entbindung innerhalb weniger Tage wieder auf das Niveau nicht schwangerer Erwachsener abfiel (Abb. 6). Bemerkenswert dabei ist, dass sich der Anteil von GR-MDSC an der PBMC-Fraktion im Blut der Frauen nach Geburt nicht signifikant von den nicht schwangeren Kontrollpersonen unterschied, der Unterschied zu den Proben der Schwangeren in den verschiedenen Trimenen erreichte jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz. Die Wöchnerinnen befanden sich also in einer Art „Übergangsphase“. Aus der Literatur ist bekannt, dass bestimmte Autoimmunkrankheiten wie z.B. die Autoimmunthyreoiditis postpartal und insbesondere in der Stillzeit neu auftreten oder sich verschlechtern (48). Bei der Multiplen Sklerose bessert sich die Krankheitsaktivität während der Schwangerschaft um bis zu 70%, steigt aber nach Entbindung für ca. vier Monate um das Dreifache an (49, 50). Interessanterweise ist das Risiko für einen postpartalen Krankheitsschub bei stillenden Frauen mit Multipler Sklerose deutlich geringer als bei nicht stillenden Frauen (51). Die intermediär erhöhte Anzahl an GR-MDSC im peripheren Blut der Wöchnerinnen könnte einen Erklärungsansatz für die anhaltenden Veränderungen des Immunstatus postpartal liefern. Inwieweit das Stillen hier eine Rolle spielt sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Die unveränderte Anzahl an MO-MDSC während der Schwangerschaft macht einen Zusammenhang zwischen MO-MDSC und fetomaternaler Toleranz unwahrscheinlich, weshalb MO-MDSC in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Jedoch zeigten MO-MDSC einen leichten Anstieg nach der Geburt, was darauf hindeuten könnte, dass diese Zellen eine Rolle in der postpartalen Immunregulation spielen könnten.

Hinsichtlich der funktionellen Aktivität von GR-MDSC in der Schwangerschaft konnten wir zeigen, dass GR-MDSC die Effektorenzyme Arg1 und iNOS

exprimieren und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fähig waren (Abb. 9+11). Kropf et al. konnten ebenfalls eine gesteigerte Arg1-Expression in PBMC Schwangerer sowie in mononukleären Zellen aus der Plazenta nachweisen und zeigen, dass die erhöhte Arg1-Aktivität der Plazentazellen *in vitro* zu einer Herabregulierung von CD3 ζ auf T-Zellen und einer folgenden Abnahme der T-Zell-Proliferation führt. Bei der Analyse des Phänotyps der Arg1-exprimierenden Plazentazellen fanden sich die Oberflächencharakteristika neutrophiler Zellen (CD15+/CD14low/-), womit diese Zellen die Charakteristika von GR-MDSC besitzen. In der Studie von Kropf et al. fand sich jedoch keine hemmende Aktivität in den PBMC aus Schwangerenblut (52). In der vorliegenden Arbeit hingegen konnte gezeigt werden, dass GR-MDSC aus PBMC Schwangerer sehr effektiv eine Suppression der T-Zell-Proliferation *in vitro* bewirkten. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass der Anteil an GR-MDSC in PBMC verhältnismäßig gering ist, so dass es einer Anreicherung der Zellen bedarf, um eine *in vitro*-Suppression von T-Zellen zu erreichen. An der feto-maternalen Grenzschicht hingegen konnte gezeigt werden, dass sich GR-MDSC anreichern, so dass eine höhere Arg1-Expression und daraus resultierend eine effektivere T-Zell-Suppression durch die plazentaren Zellen erzielt werden kann (53). Kropf et al. zeigten weiterhin, dass die T-Zell-Suppression durch Plazenta-Zellen *in vitro* durch die Zugabe von Arg1-Inhibitoren oder L-Arginin zur Zellkultur aufgehoben werden konnte. In Zusammenschau mit dem für die Schwangerschaft bekannten relativen Arginin-Defizit (13, 54) ist es denkbar, dass die erhöhte Anzahl an GR-MDSC zu diesem Arginin-Defizit beiträgt.

Für NO konnte im Tierversuch ebenfalls bereits eine gesteigerte Produktion während der Schwangerschaft gezeigt werden (55). In tragenden Ratten führte eine Blockade der NO-Synthese zu mütterlicher Hypertonie und einer fetalen Wachstumsstörung (intrauterine growth restriction, IUGR) (56). In der bisherigen Forschung zu NO in der Schwangerschaft stand jedoch der vasodilatative Effekt dieses Moleküls und die lokale Expression von iNOS an der fetomaternalen Grenzschicht, besonders in Endothelzellen der Plazenta, im Vordergrund (57). Die Rolle von NO als immunmodulatorisch aktives Molekül in

der Schwangerschaft ist bisher kaum untersucht. Entsprechend unserer Daten konnten McCord et al. zeigen, dass iNOS in PBMC Schwangerer verstärkt exprimiert wird (58). Die vorliegende Arbeit kann nun ergänzen, dass die verstärkte iNOS-Expression in PBMC Schwangerer auf die erhöhte Anzahl an GR-MDSC zurückzuführen ist. Welchen Einfluss die erhöhte Expression von iNOS und eine dadurch möglicherweise erhöhte NO-Produktion durch GR-MDSC im peripheren Blut auf systemische immunologische Vorgänge in der Schwangerschaft haben, bleibt noch zu klären.

Neben der erhöhten Arg1- und iNOS-Expression konnte in dieser Arbeit auch eine erhöhte ROS-Produktion durch MDSC gezeigt werden (Abb. 13). Physiologische ROS-Level spielen eine wichtige Rolle für einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf, insbesondere bei der Implantation und der frühen Entwicklung von Fetus und Plazenta (59). Darüber hinaus gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen einem Ungleichgewicht von ROS und Antioxidantien und bestimmten Schwangerschaftskomplikationen wie IUGR, wiederholten Fehlgeburten, Präeklampsie und Frühgeburtslichkeit beschreiben (60, 61). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die erhöhte Anzahl an GR-MDSC zu einer vermehrten ROS-Produktion auf bestimmte Stimuli beitragen kann. Ob sich dies jedoch positiv oder negativ auf den Schwangerschaftsverlauf auswirkt ist unklar.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass GR-MDSC die IL-2/OKT3-induzierte T-Zell-Proliferation effektiv hemmten (Abb. 15). Der suppressive Effekt war dabei genauso stark, tendenziell sogar etwas stärker ausgeprägt wie der von GR-MDSC, die aus dem Blut nicht schwangerer Kontrollpersonen gewonnen wurden. Betrachtet man den deutlich erhöhten Anteil von GR-MDSC an PBMC Schwangerer ist es naheliegend, dass diese Zellen einen quantitativen Beitrag zur systemischen Immunsuppression während der Schwangerschaft leisten können. Wie bereits erwähnt wurde, konnte im Rahmen von Tumor-Erkrankungen gezeigt werden, dass GR-MDSC

in der Lage sind, nicht nur unspezifische T-Zell-Antworten, sondern auch die spezifische T-Zell-Antwort gegen vom Tumor exprimierte Antigene zu hemmen (40). Es stellt sich also die Frage, ob GR-MDSC aus dem Blut Schwangerer ebenfalls spezifische Immunantworten gegen paternale Antigene, die durch den Feten exprimiert werden, hemmen können. Erst kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass GR-MDSC auch im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener akkumulieren (24). Es liegt daher nahe, dass diese Zellen sowohl auf mütterlicher als auch auf fetaler Seite zur intrauterinen Immuntoleranz und zum komplikationslosen Verlauf der Schwangerschaft beitragen. In einem Maus-Modell der immunologisch bedingten Abortneigung konnte jüngst erstmals dargestellt werden, dass MDSC für den Schwangerschaftserhalt wichtig sind (62-64). Nach der Entbindung könnte der erhöhte Anteil an GR-MDSC im Blut des Neugeborenen dann zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen beitragen.

Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob bereits zu sehr frühen Zeitpunkten der Schwangerschaft eine Akkumulation von MDSC erfolgt, wurden Blutproben von Frauen 14 Tage nach Embryonentransfer im Rahmen einer assistierten Reproduktionsbehandlung, d.h. bei erfolgreicher Schwangerschaft in der 3. Schwangerschaftswoche analysiert. Dabei zeigte sich, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft ein erhöhter Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut vorlag (Abb. 18). Jedoch war der Anteil an GR-MDSC nicht nur bei den Frauen erhöht, bei denen durch die Behandlung tatsächlich eine erfolgreiche Schwangerschaft eingetreten war, sondern auch bei den Frauen, die nicht schwanger geworden waren.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Expansion von MDSC zumindest zu Beginn der Schwangerschaft nicht nur durch die Einnistung des Feten getriggert wird, sondern andere Einflussfaktoren existieren, die das biologische Verhalten von GR-MDSC modulieren und auch bei nicht erfolgreich behandelten IVF-Patientinnen vorliegen.

Ein möglicher Faktor, der hier eine Rolle spielen könnte, wäre die Vorbehandlung der Patientinnen durch unterschiedliche Stimulationsprotokolle

mit Geschlechtshormonen, was eine Reifung mehrerer Eizellen pro Zyklus begünstigt. Die Hypothese, dass bestimmte Hormone einen Einfluss auf das Immunsystem generell wie auch auf MDSC im Besonderen haben, wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Für Progesteron konnte bereits eine Akkumulation und Funktionssteigerung von MDSC unter Einfluss von Medroxyprogesteron beschrieben werden (65). Auch Östrogene besitzen eine immunsupprimierende Aktivität indem sie regulatorische T-Zellen, die ähnlich wie MDSC eine wichtige Rolle in der T-Zell-Regulation spielen, induzieren können (66, 67). Neben diesen Effekten könnten die schwangerschaftsassozierten Hormone auch die Akkumulation und Funktion von MDSC beeinflussen. Genauere Kenntnisse über den Zusammenhang zwischen diesen Hormonen und MDSC könnten nicht nur für das bessere Verständnis der Immunregulation während der Schwangerschaft, sondern auch für die Mechanismen, die zur MDSC-Induktion im Rahmen von hormonabhängigen Tumorerkrankungen wie dem Mamma-Karzinom oder Ovarialkarzinomen von großer Bedeutung sein.

5.1 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass GR-MDSC während der Schwangerschaft akkumulieren in vitro T-Zell-Antworten hemmen. Diese Vermehrung von MDSC könnte damit eine verstärkte suppressive Aktivität des Immunsystems während der Schwangerschaft bedingen. Ob MDSC tatsächlich zur maternofetalen Toleranz beitragen bleibt noch unklar.

Bisher wurden MDSC hauptsächlich unter *pathologischen* Bedingungen untersucht, wo sie eine „erwünschte“ Immunantwort gegen beispielsweise einen Tumor oder eine Infektion unterdrücken und so zu einer Eskalation der Krankheit beitragen. Im Gegensatz dazu konnte mit dieser Arbeit eine Expansion von MDSC unter *physiologischen* Bedingungen nachgewiesen werden. Während einer Schwangerschaft könnten MDSC eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der maternofetalen Toleranz und somit für eine regelrechte Entwicklung des Kindes und den erfolgreichen Verlauf der

Schwangerschaft spielen. Unsere Ergebnisse liefern damit einen weiteren Beitrag zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge während der Schwangerschaft. Eine Beeinflussung von MDSC in der Schwangerschaft könnte eine Vielzahl an therapeutischen Optionen zur günstigen Beeinflussung von immunologischen Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. der Präeklampsie oder dem HELLP-Syndrom aufweisen. Darüber hinaus kann ein besseres Verständnis der MDSC-Biologie Möglichkeiten zur Behandlung von Tumorerkrankungen oder Transplantationsreaktionen liefern.

6 Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft muss das mütterliche Immunsystem einen semiallogenen Organismus „tolerieren“ und gleichzeitig weiterhin eine adäquate Infektabwehr leisten. Gelingt dies nicht, kann es zu schwerwiegenden Schwangerschaftskomplikationen, wie Infektionen oder immunologischen Abstoßungsreaktionen gegen den Fetus kommen. Welche Regulationsmechanismen die maternofetale Toleranz gewährleisten ist bisher nur unzureichend verstanden.

Die vorliegende Promotionsarbeit befasste sich mit der Bedeutung von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) für die maternofetale Toleranz. Es wurden zunächst GR-MDSC im peripheren Blut Schwangerer durchflusszytometrisch quantifiziert und die Expression der Effektorenzyme Arg1 und iNOS sowie die Produktion von ROS durch GR-MDSC analysiert. Anhand eines in-vitro-Proliferationsassays wurde die suppressive Aktivität von GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen untersucht.

Wir konnten zeigen, dass GR-MDSC im Blut Schwangerer in bis zu hundertfach höheren Zahlen vorkommen als bei nicht schwangeren Kontrollen, dass diese GR-MDSC die Effektorenzyme Arg1 und iNOS exprimieren sowie ROS produzieren und dass sie in vitro effektiv die T-Zell-Proliferation hemmen können. Postpartal kam es zu einer raschen Abnahme der MDSC-Zahlen. Bei Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung konnte unabhängig vom Erfolg der Behandlung ebenfalls eine erhöhte Zahl an GR-MDSC nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen neuen Beitrag zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge in der Schwangerschaft. Die Akkumulation von GR-MDSC könnte einen Beitrag zur Suppression von gegen den Feten gerichteten Immunantworten leisten und eine komplikationslose Schwangerschaft ermöglichen. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie könnten durch gezielte Beeinflussung der MDSC-Anzahl oder -Funktion Strategien zur Prävention oder besseren Behandlung immunologischer Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, HELLP oder rezidivierenden Aborten entwickelt werden.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):75-84. PubMed PMID: 18177778.
2. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *The New England journal of medicine*. 1985 Jan 10;312(2):82-90. PubMed PMID: 3880598.
3. Bansal AS. Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *American journal of reproductive immunology*. 2010 Nov;64(5):307-15. PubMed PMID: 20528832.
4. Warning JC, McCracken SA, Morris JM. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction*. 2011 Jun;141(6):715-24. PubMed PMID: 21389077.
5. Medawar P. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1952;7:320-38.
6. Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature medicine*. 2013 May;19(5):548-56. PubMed PMID: 23652115.
7. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nature reviews Immunology*. 2013 Jan;13(1):23-33. PubMed PMID: 23237963.
8. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology*. 2010 Jun;63(6):601-10. PubMed PMID: 20455873.
9. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology today*. 1993 Jul;14(7):353-6. PubMed PMID: 8363725.
10. Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*. 1998 Sep;4(9):1020-4. PubMed PMID: WOS:000075804100034. English.
11. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology today*. 1997 Oct;18(10):478-82. PubMed PMID: 9357139.
12. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*. 2010 Feb;129(2):147-53. PubMed PMID: 19922424. Pubmed Central PMCID: 2814457.
13. Gaboritovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2009 Mar;9(3):162-74. PubMed PMID: 19197294. Pubmed Central PMCID: 2828349.
14. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research*.

2009 Feb 15;69(4):1553-60. PubMed PMID: 19201693. Pubmed Central PMCID: 2900845.

15. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research*. 2005 Apr 15;65(8):3044-8. PubMed PMID: 15833831.

16. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009 Jan;58(1):49-59. PubMed PMID: 18446337. Pubmed Central PMCID: 3401888.

17. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 2):721s-6s. PubMed PMID: 17255300.

18. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology*. 2008 Oct 15;181(8):5791-802. PubMed PMID: 18832739. Pubmed Central PMCID: 2575748.

19. Goni O, Alcaide P, Fresno M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *International immunology*. 2002 Oct;14(10):1125-34. PubMed PMID: 12356678.

20. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *International immunopharmacology*. 2011 Jul;11(7):802-7. PubMed PMID: 21237299. Pubmed Central PMCID: 3478130.

21. Luyckx A, Schouppe E, Rutgeerts O, Lenaerts C, Koks C, Fevery S, et al. Subset characterization of myeloid-derived suppressor cells arising during induction of BM chimerism in mice. *Bone marrow transplantation*. 2012 Jul;47(7):985-92. PubMed PMID: 22041852.

22. Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *Journal of immunology*. 2006 Feb 15;176(4):2085-94. PubMed PMID: 16455964.

23. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 2007 Oct 15;179(8):5228-37. PubMed PMID: 17911608.

24. Rieber N, Gille C, Kostlin N, Schafer I, Spring B, Ost M, et al. Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clinical and experimental immunology*. 2013 Oct;174(1):45-52. PubMed PMID: 23701226. Pubmed Central PMCID: 3784212.

25. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews Immunology*. 2005 Aug;5(8):641-54. PubMed PMID: 16056256.

26. Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological reviews*. 2008 Apr;222:180-91. PubMed PMID: 18364002.
27. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology*. 2004 Jan 15;172(2):989-99. PubMed PMID: 14707072.
28. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research*. 2001 Jun 15;61(12):4756-60. PubMed PMID: 11406548.
29. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine*. 2007 Jul;13(7):828-35. PubMed PMID: 17603493. Pubmed Central PMCID: 2135607.
30. Volk HD. Multiparameteranalysen von mononukleären Zellen mittels Durchflußzytofluorometrie. *Immunologische Arbeitsmethoden*. 1991;H. Friemel, Jena, Gustav Fischer Verlag:324-39.
31. Kostlin N, Kugel H, Spring B, Leiber A, Marme A, Henes M, et al. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *European journal of immunology*. 2014 Sep;44(9):2582-91. PubMed PMID: 24894988.
32. Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction*. 2010 Dec;16(12):886-95. PubMed PMID: 20847090.
33. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology*. 2001 Jan 1;166(1):678-89. PubMed PMID: 11123353.
34. Young MR, Lathers DM. Myeloid progenitor cells mediate immune suppression in patients with head and neck cancers. *International journal of immunopharmacology*. 1999 Apr;21(4):241-52. PubMed PMID: 10408632.
35. Dilek N, van Rompaey N, Le Moine A, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2010 Dec;15(6):765-8. PubMed PMID: 20881494.
36. Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *Journal of immunology*. 2008 Jun 15;180(12):7898-906. PubMed PMID: 18523253.
37. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood*. 2010 Dec 16;116(25):5738-47. PubMed PMID: 20807889. Pubmed Central PMCID: 3031417.
38. Zhang W, Liang S, Wu J, Horuzsko A. Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived

- suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation*. 2008 Oct 27;86(8):1125-34. PubMed PMID: 18946352. Pubmed Central PMCID: 2668611.
39. Mauti LA, Le Bitoux MA, Baumer K, Stehle JC, Golshayan D, Provero P, et al. Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Jul;121(7):2794-807. PubMed PMID: 21646719. Pubmed Central PMCID: 3223816.
40. Agaoglu S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokine balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7021-31. PubMed PMID: 21482709.
41. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005 May;19(7):681-93. PubMed PMID: 15857883.
42. Kostlin N, Ostermeier AL, Spring B, Schwarz J, Marme A, Walter CB, et al. HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. *European journal of immunology*. 2017 Feb;47(2):374-84. PubMed PMID: 27859042.
43. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Human reproduction update*. 2012 Jul;18(4):436-57. PubMed PMID: 22495259.
44. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human reproduction update*. 2005 Nov-Dec;11(6):613-30. PubMed PMID: 16006437.
45. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007 Jun 20;25(18):2546-53. PubMed PMID: 17577033.
46. Lechner MG, Megiel C, Russell SM, Bingham B, Arger N, Woo T, et al. Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *Journal of translational medicine*. 2011;9:90. PubMed PMID: 21658270. Pubmed Central PMCID: 3128058.
47. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, et al. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine*. 2010 Oct 25;207(11):2439-53. PubMed PMID: 20876310. Pubmed Central PMCID: 2964584.
48. Goldstein AL. New-onset Graves' disease in the postpartum period. *Journal of midwifery & women's health*. 2013 Mar-Apr;58(2):211-4. PubMed PMID: 23590488.

49. Conradi S, Malzahn U, Paul F, Quill S, Harms L, Then Bergh F, et al. Breastfeeding is associated with lower risk for multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*. 2013 Apr;19(5):553-8. PubMed PMID: 22951352.
50. Langer-Gould A, Beaver BE. Effects of pregnancy and breastfeeding on the multiple sclerosis disease course. *Clinical immunology*. 2013 Nov;149(2):244-50. PubMed PMID: 23434027.
51. Pakpoor J, Disanto G, Lacey MV, Hellwig K, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Breastfeeding and multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Journal of neurology*. 2012 Oct;259(10):2246-8. PubMed PMID: 22619059.
52. Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, et al. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *European journal of immunology*. 2007 Apr;37(4):935-45. PubMed PMID: 17330821. Pubmed Central PMCID: 2699382.
53. Kostlin N, Hofstadter K, Ostermeir AL, Spring B, Leiber A, Haen S, et al. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. *Journal of immunology*. 2016 Feb 01;196(3):1132-45. PubMed PMID: 26712947.
54. Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA, Ibarra I, Ahued R, et al. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *Bmj*. 2011;342:d2901. PubMed PMID: 21596735. Pubmed Central PMCID: 3100912.
55. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, et al. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1993 Apr 1;7(6):566-71. PubMed PMID: 7682524.
56. Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994 May;170(5 Pt 1):1458-66. PubMed PMID: 7909994.
57. Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2009;7:79. PubMed PMID: 19646248. Pubmed Central PMCID: 2739214.
58. McCord N, Ayuk P, McMahan M, Boyd RC, Sargent I, Redman C. System y+ arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension*. 2006 Jan;47(1):109-15. PubMed PMID: 16344361.
59. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*. 2008 Aug;10(8):1375-403. PubMed PMID: 18402550.
60. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*. 2003 Apr;79(4):829-43. PubMed PMID: 12749418.

61. Woods JR, Jr. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes-a review. *Placenta*. 2001 Apr;22 Suppl A:S38-44. PubMed PMID: 11312627.
62. Kang X, Zhang X, Liu Z, Xu H, Wang T, He L, et al. CXCR2-Mediated Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells' Functional Characterization and Their Role in Maternal Fetal Interface. *DNA and cell biology*. 2016 Jul;35(7):358-65. PubMed PMID: 27027573.
63. Kang X, Zhang X, Liu Z, Xu H, Wang T, He L, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain feto-maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4+CD25-T cells by activation of the TGF-beta/beta-catenin pathway. *Molecular human reproduction*. 2016 Jul;22(7):499-511. PubMed PMID: 27016139.
64. Pan T, Liu Y, Zhong LM, Shi MH, Duan XB, Wu K, et al. Myeloid-derived suppressor cells are essential for maintaining feto-maternal immunotolerance via STAT3 signaling in mice. *Journal of leukocyte biology*. 2016 Sep;100(3):499-511. PubMed PMID: 27203698.
65. Spallanzani RG, Dalotto-Moreno T, Raffo Iraolagoitia XL, Ziblat A, Domaica CI, Avila DE, et al. Expansion of CD11b(+)Ly6G (+)Ly6C (int) cells driven by medroxyprogesterone acetate in mice bearing breast tumors restrains NK cell effector functions. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013 Dec;62(12):1781-95. PubMed PMID: 24114144.
66. Nadkarni S, McArthur S. Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. *Current opinion in pharmacology*. 2013 Aug;13(4):576-81. PubMed PMID: 23731522.
67. Luo CY, Wang L, Sun C, Li DJ. Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cellular & molecular immunology*. 2011 Jan;8(1):50-8. PubMed PMID: 21200384. Pubmed Central PMCID: 4002989.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Positiv-Selektion mittels magnetic activated cell sorting-System

(Miltenyi Biotec [updated 02.08.2015]. Verfügbar über:

<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Cell%20Separation/mac-s-technology-cell-isolation-brochure.ashx>.)

Abbildung 2: Beispielabbildung eines CFSE-Assays

Abbildung 3: Gating-Strategie für GR-MDSC und MO-MDSC

Abbildung 4: Die Expression von GR-MDSC in PBMC Schwangerer ist ca. vierfach höher als in PBMC nicht schwangerer Kontrollen

Abbildung 5: Die Expression von MO-MDSC zeigt keine Unterschiede in PBMC Schwangerer und nicht schwangerer Kontrollen

Abbildung 6: Der Anteil an GR-MDSC ist während der gesamten Schwangerschaft erhöht

Abbildung 7: Der Anteil an MO-MDSC verändert sich über die Schwangerschaft hinweg nicht

Abbildung 8: Die Expression von Arg1 ist in PBMC Schwangerer erhöht und lässt sich auf den erhöhten Anteil an GR-MDSC zurückführen

Abbildung 9: Der Anteil von Arg1-exprimierenden Zellen an allen PBMC ist im peripheren Blut Schwangerer signifikant höher als im peripheren Blut nicht Schwangerer

Abbildung 10: Die Expression von iNOS ist in PBMC Schwangerer erhöht und lässt sich auf den erhöhten Anteil an GR-MDSC zurückführen

Abbildung 11: Der Anteil an iNOS-exprimierenden Zellen ist in PBMC Schwangerer signifikant erhöht und lässt sich auf den erhöhten Anteil an GR-MDSC zurückführen

Abbildung 12: Repräsentative Density-Plots zum Nachweis der ROS-Produktion

Abbildung 13: Stimulierte PBMC aus Schwangerenblut zeigen eine höhere ROS-Produktion als PBMC aus dem Blut nicht schwangerer Kontrollen

Abbildung 14: GR-MDSC aus Schwangerenblut hemmen die CD4⁺-T-Zell-Proliferation

Abbildung 15: Balkendiagramm zur Darstellung der CD4⁺ T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC aus Schwangeren- und Kontroll-PBMC

Abbildung 16: GR-MDSC aus Schwangerenblut hemmen die CD8⁺-T-Zell-Proliferation

Abbildung 17: Balkendiagramm zur Darstellung der CD8⁺ T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC aus Schwangeren- und Kontroll-PBMC

Abbildung 18: GR-MDSC sind bei Patientinnen nach assistierter Reproduktionsbehandlung bereits nach 14 Tagen erhöht, unabhängig davon ob daraus eine Schwangerschaft resultiert oder nicht

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für die Färbung zur Phänotypisierung

Tabelle 2: Schema zum Mischverhältnis PBMC zu MDSC für die funktionellen Versuche

Tabelle 3: Proliferationsindex der CD4⁺-T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC

Tabelle 4: Proliferationsindex der CD8⁺-T-Zell-Proliferation nach Zugabe von GR-MDSC

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits wie folgt publiziert:

Köstlin N, Kugel H, Spring B, Leiber A, Marme A, Henes M, Rieber N, Hartl D, Poets CF, Gille C. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. European Journal of Immunology. 2014 Sep;44(9):2582-91. PubMed PMID: 24894988.

9 Erklärungen zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die Versuche zu den Abbildungen 1 – 11 und 14 – 18 der vorliegenden Arbeit selbstständig durchgeführt habe. Die Versuche zu den Abbildungen 12 und 13 erfolgten durch Frau Dr. N. Köstlin. Sie sind mit ihrer Genehmigung in diese Dissertationsschrift mit aufgenommen worden, um ein kompletteres Bild über das Thema zu geben.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD. Dr. C. Gille und Frau Dr. N. Köstlin.

Herr PD Dr. C. Gille und Frau Dr. N. Köstlin haben die Arbeit betreut sowie das Manuskript korrigiert.

Herr PD Dr. C. Gille hat die Arbeit als Doktorvater betreut.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

10 Anhang

10.1 Dank

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, denen ich auf diesem Wege herzlich danken möchte.

Herrn Dr. Prof. Ch. F. Poets für die Annahme als Doktorandin und die aufmerksame Verfolgung der Arbeit über weite Strecken hinweg.

Herrn PD Dr. C. Gille zunächst für die Überlassung dieses spannenden Themas, später für die Übernahme als Doktorandin und die herausragende Betreuung meiner Arbeit. Die vielen Ideen, Gespräche und sein hohes Engagement haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. N. Köstlin als meiner direkten Betreuerin und Ansprechpartnerin gilt ein besonderer Dank, insbesondere für die immer neuen und spannenden Diskussionen, Erklärungen und für die Motivation und Unterstützung, wenn es nötig war. Ihre Begeisterung für das Thema und die Arbeit war ansteckend.

Frau Dr. B. Spring möchte ich für die geduldige Einarbeitung in die Methoden und Arbeitsweisen im Labor und ihre selbstverständliche Hilfsbereitschaft danken.

Dem gesamten Team des Neolabors und besonders meinem Doktoranden-Kollegen J. Schwarz, der viele Stunden im Labor verkürzt hat, möchte ich für das gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft untereinander und die entstandene Freundschaft danken.

Ein weiterer Dank gilt dem Praxisteam um Herrn Dr. A. Marmé sowie dem gesamten Team der Schwangerenambulanz und der IVF-Sprechstunde der Universitätsfrauenklinik in Tübingen für die Akquirierung der Patientinnen und die Bereitstellung der Proben.

Bei Marvin möchte ich mich bedanken für die immer wieder aufbauenden Worte und die große Unterstützung, die du mir bei allem entgegenbringst.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Christina und Rolf, dafür, dass ihr mir dieses wunderbare Studium ermöglicht habt und für die ständige Unterstützung. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Hellen Anna Kugel
Geburtsdatum 28.05.1989
Geburtsort Nagold

Schulbildung

1995 – 1999 Grundschule Wildberg
1999 – 2008 Otto-Hahn-Gymnasium; Abschluss mit dem Abitur 2008

Studium

2009 – 2016 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
August 2011 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2012 – 2017 Promotionsarbeit unter der Anleitung von Prof. Ch. F. Poets und PD Dr. C. Gille in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung Neonatologie in Tübingen
2015 – 2016 Praktisches Jahr
1. Tertial: Innere Medizin, Klinikum Sindelfingen-Böblingen
2. Tertial: Chirurgie, Spital Wattwil (Schweiz)
3. Tertial: Pädiatrie, Klinikum Böblingen
2013 Vortrag bei der Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin in Freiburg
16.04.2015 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.05.2016 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 15.08.2016 Tätigkeit als Ärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Böblingen, Klinikverbund Südwest