

Aus dem  
Charité Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik  
Direktor: Prof. Dr. med. Burghard F. Klapp

Habilitationsschrift

**Regulation der Immuntoleranz während der Frühschwangerschaft**

**Regulation of the immunotolerance during the early stages of pregnancy**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach „Experimentelle Immunologie“

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. nat. Sandra M. Blois**

Eingereicht: Februar 2009  
Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich  
Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. J Dietl aus Würzburg  
2. Herr Prof. Dr. C.J. Thaler aus München

*Phantasie ist wichtiger als Wissen. Wissen ist begrenzt,  
Phantasie aber umfasst die ganze Welt*

*Albert Einstein*

## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	5
I. Einleitung	6
I.1. Immunologische Adaptation während der Schwangerschaft	6
I.2. Kontrolle der Immunantwort durch dendritische Zellen (DZ)	8
I.2.1. Dendritische Zellen in der Schwangerschaft des Menschen und der murinen Gestation	8
I.3. Komplement, Crry, und Zytokine während der Schwangerschaft	9
I.4. Galektin in der Immunologie	12
I.5. Progesteron und Gestation	14
I.6. Stress und Folgen für die Schwangerschaft	15
II. Zielstellung der Arbeit	18
III. Ergebnisse	20
III.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	20
III.2. Die Depletion von CD8 <sup>+</sup> -Zellen hebt die Schwangerschaftsschutzwirkung der Progesteron-Substitution mit Dydrogesteron in Mäusen auf, indem das Th1/Th2 Zytokinprofil verändert wird. Blois, S.M., Joachim, R., Kandil, J., Margni, R., Tometten, M., Klapp, B.F., Arck, P.C. (2004). Depletion of CD8 <sup>+</sup> cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile, <i>J Immunol</i> , 172, 10, 5893-5899.	24
III.3. Der gegenseitige intrazelluläre Einfluss des Adhäsionsmoleküls 1/LFA-1 ist ein unmittelbarer Mediator, fähig die immunologische Integration und den Toleranzmechanismus an der fetomaternalen Schnittstelle in murinen Trächtigkeiten zu stören. <i>Blois, S.M., Tometten, M., Kandil, J., Hagen, E., Klapp, B.F., Margni, R.A., Arck, P.C. (2005). Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the feto-maternal interface in murine pregnancies, J Immunol, 174, 4, 1820-1829.</i>	32
III.4. Interaktion zwischen dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen während der murinen Schwangerschaft <i>Blois, S.M., Barrientos, G., Garcia, M.G., Orsal, A.S., Tometten, M., Cordo-Russo, R.I., Klapp, B.F., Santoni, A., Fernández, N., Terness, P., Arck, P.C. (2008). Interaction between dendritic cells and natural killer cells during pregnancy in mice, J Mol Med, 86, 7, 837-852.</i>	43
III.5. Die Depletion von dendritischen Zellen <i>in vivo</i> reduziert die Verpaarungseffizienz, beeinflusst den Implantationsprozess und die frühe plazentale Entwicklung in Mäusen <i>Krey, G., Frank, P., Shaikly, V., Barrientos, G., Cordo-Russo, R., Ringel, F., Moschansky, P., Chernukhin, I.V., Metodiev, M., Fernández, N., Klapp, B.F., Arck, P.C., Blois, S.M. (2008). In vivo DC depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice, J Mol Med, 86, 9, 999-1011.</i>	60

III.6. Eine maßgebende Rolle von Galektin-1 in der fetomaternalen Toleranz. Blois, S.M., Ilarregui, J.M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A.S., Cordo-Russo, R., Toscano, M.A., Bianco, G.A., Kobelt, P., Handjiski, B., Tirado, I., Markert, U.R., Klapp, B.F., Poirier, F., Szekeres-Bartho, J., Rabinovich, G.A., Arck, P.C. (2007). <i>A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance, Nat Med, 12, 1450-1457.</i>	74
IV. Diskussion	92
V. Bemerkungen für die Zukunft	98
VI. Zusammenfassung	99
VII. Abstract	102
VIII. Literatur	104
IX. Danksagung	109
X. Eidesstattliche Erklärung	111

## Verzeichnis der Abkürzungen

### Abkürzungen

AsialoGM1	glycolipid expressed on NK cells
CC	Chemokin
CD	cluster of differentiation antigens
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DZ	Dendritische Zellen
hCG	Human chorionic gonadotrophin
HLA	Humanes Leukozytenantigen (Human Leukocyte Antigen)
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
ICAM	Immunglobulin cellular adhesion molecules
KO	knockout
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Natürliche Killerzelle
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helferzelle (T helper)
Th1-Zytokine	T-Helfer-1- Zytokine: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12
Th2-Zytokine	T-Helfer-2-Zytokine: IL-4, IL-10
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	T- regulatorische Zellen

## **I. Einleitung**

Genetische, anatomische, immunologische oder mikrobiologische Ursachen erklären einen Teil von Schwangerschaftskomplikationen (z.B. Fehlgeburten). In den meisten Fällen von Fehlgeburten lassen sich jedoch keine kausalen Hinweise für die Ursache erbringen. In zahlreichen Fällen, so glaubt man, sind die Ursachen immunologischer Natur (Choudhury SR und Knapp LA, 2001). Die Erklärung hierfür liegt in der Beobachtung, dass die erfolgreiche Einnistung der Blastozyste mit nachfolgender Trophoblasteninvasion und Entwicklung der Plazenta komplexe regulatorische Mechanismen von übergeordneten Systemen erfordert. Hierbei spielt das Immun- und Hormonsystem eine wichtige Rolle.

### **I.1. Immunologische Adaptation während der Schwangerschaft**

Unter immunologischen Gesichtspunkten stellt der Fötus einen Fremdkörper dar (Medawar PB, 1953). Die Immunregulation ist deshalb als Garant der Akzeptanz des semiallogenen Fötus durch maternale Immunzellen notwendig. Allgemein kann das Immunsystem in zwei Systeme gegliedert werden. 1. Das adaptive System basiert auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex; MHC), Antigen exprimierenden Zielzellen und T-Zell-Rezeptor exprimierenden Lymphozyten. 2. Das angeborene Immunsystem ist hingegen deutlich einfacher in seiner biologischen Struktur. Hier fehlen im weitesten Sinne die Gedächtniszellen, es ist dennoch fähig auf verschiedene Stimuli zu antworten. Beide Systeme sind während der Schwangerschaft wichtig und werden stringend kontrolliert. Man geht davon aus, dass Fehler in der Kontrolle der maternalen Immunantwort gegen fötales Gewebe zu einer Beeinträchtigung des

Schwangerschaftsverlaufs führen und Komplikationen wie Fehlgeburten oder Präeklampsie verursachen.

Während der Schwangerschaft ist es beachtenswert, dass die lokale immunologische Mikroumgebung an der Implantationsseite von der systemischen Umgebung völlig verschieden sein kann. Zusätzlich können die Regulationsmechanismen in den verschiedenen Entwicklungsphasen der Schwangerschaft verschieden sein (Choudhury SR und Knapp LA, 2001). Lokal an der Plazenta gibt es normalerweise nur einige maternale T- und B-Zellen, diese sind die typische Zellpopulation der adaptiven Immunantwort. T- und B-Zellen werden für die normale Fortpflanzung als wichtig erachtet, weil das Fehlen von T-Zellen in Maus-Modellen zu Aborten sowie zu einem reduzierten Wachstum der Plazenta führt (Athanasakis I et al., 1987, Chaouat G et al., 1988). Natürliche Killer (NK)-Zellen sind in der Dezidua besonders reichlich zu beobachten. Sie können sowohl eigene als auch nicht-eigene Antigene erkennen, besonders, wenn die Zielzellen keine MHC-Moleküle exprimieren. Die biologischen Aufgaben von NK-Zellen in der Gebärmutter Schleimhaut (uterine NK, uNK) sind hingegen weitgehend unbekannt (Dosiou C und Giudice LC, 2005). Experimente mit NK-Zell-depletierten Knock-out-Mäusen sollen am Umbau der dezidualen Arterien beteiligt sein. In Knock-out-Mäusen ist die Plazentagröße vermindert und ein Absterben des Fötus kommt zum Zeitpunkt der Gestation bei mehr als 50% der Trächtigkeiten vor (Erlebacher A, 2001). Hierbei sollen die uNK-Zellen einen schädlichen Einfluss auf den Fötus haben, weil sie durch vom Fötus abstammenden Zellen aktiviert werden. Die vom Fötus abstammende Zellen exprimieren keine klassischen humanen Leukozytenantigene (HLA), daher ist es wichtig, ihre Aktivität im Gewebe lokal zu regeln.

Man nimmt heute an, dass verschiedene hemmende als auch aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen mit auf fötalen Zytotrophoblasten befindlichen HLA-G, -E und -C Molekülen interagieren können und hierbei die Lyse fötaler Zellen durch maternale Zellen verhindern können. Die Moleküle HLA-G, -E und -C werden besonders auf extravillösen Zytotrophoblasten exprimiert, welche ins maternale Gebärmuttergewebe eindringen, wenn die arterielle Versorgung zum Wachstum der Plazenta modelliert wird. Alternativ könnte die Wechselwirkung zwischen NK-Rezeptoren und HLA-Molekülen die Zytokinproduktion von NK-Zellen beeinflussen (Moffett-King A, 2002).

## **I.2. Kontrolle der Immunantwort durch dendritische Zellen (DZ)**

Dendritische Zellen sind zelluläre Schlüsselregulatoren von Immunreaktionen im Säugerorganismus, da diese Zellen die frühe angeborene Immunantwort kontrollieren, andauernde adaptive Immunität regeln sowie zum Erhalt der Selbsttoleranz beitragen. Durch ein vielseitiges angeborenes Antigen-Rezeptor-Repertoire kontrollieren diese Zellen ihre Umgebung und als Antwort auf Störungen erfolgt eine komplizierte genetische Neuprogrammierung, die zu einer kompletten Aktivierung der angeborenen und dann adaptiven Immunantworten führt.

### **I.2.1. Dendritische Zellen in der Schwangerschaft des Menschen und der murinen Gestation**

Pionierstudien in der Arbeitsgruppe von Kämmerer beschrieben erstmalig die Anwesenheit von CD83<sup>+</sup>- und CD1a<sup>+</sup>-Zellen mit der typischen Morphologie dendritischer Zellen in der Dezidua zu Beginn der Schwangerschaft beim Menschen (Kämmerer U, 2000).



Die CD83<sup>+</sup>-Zellen stellen etwa 0.3% der gesamten mononukleären dezidualen Zellfraktion dar und sind als vollständig gereifte HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen mit T-Zell allostimulatorischer Kapazität beschrieben worden. Des Weiteren gehört die große Mehrheit der dendritischen Zellen zu den CD11c<sup>+</sup>-Zellen von myeloischer Abstammung.

Kürzlich wurde der Phänotyp der dendritischen Zellen, in der Dezidua im ersten Trimenon unter Verwendung klassischer Marker wie HLA-DR<sup>low</sup> und HLA-DR<sup>mod</sup> ausgewertet (Kämmerer U et al., 2000). Sowohl die CD83<sup>+</sup>- und CD1a<sup>+</sup>-Zellen exprimieren hierbei den CD11c<sup>+</sup> Marker und repräsentieren insgesamt 0.9% der dezidualen mononukleären Zellen. Die Expression der unreifen myeloischen dendritischen Zellmarker, z.B. CD205<sup>low</sup>, war auf den dezidualen dendritischen Zellen vermindert. Bei einer HLA-DR<sup>high</sup>-Population von dezidualen dendritischen Zellen konnte eine vermehrte Expression von reifen Markern wie CD86 und CD40 beobachtet werden. Ergänzend ist die Anwesenheit einer kleinen Zahl von CD11c<sup>+</sup>-IL3R<sup>+</sup>-(CD123<sup>+</sup>)- plasmazytären dendritischen Zellen in der Dezidua beschrieben worden (Gardner L und Moffett A, 2003).

Das Wissen über die physiologische Rolle und Funktion von dezidualen dendritischen Zellen im Rahmen der Schwangerschaft ist gering, so ist in einer klinischen Studie beschrieben, dass bei Frauen die unter ungeklärten Mehrfachaborten leiden mehr deziduale CD83<sup>+</sup> dendritische Zellen in der achten Schwangerschaftswoche vorhanden waren als im Vergleich zur Kontrollgruppe (Askelund K et al., 2004). Diese Untersuchung würde eine umgekehrte Beziehung zwischen dem Reifegrad der dendritischen Zellen und den Erfolgsraten der Schwangerschaft implizieren.

### **I.3. Komplement, Crry und Zytokine während der Schwangerschaft**

Es gibt mehrere Bestandteile des angeborenen Immunsystems die an der fetomaternalen Schnittstelle geregelt werden müssen. Ein Mangel von Komplement-regulierende Proteinen könnte einen negativen Einfluss auf eine Schwangerschaft haben. Das murine Crry Protein reguliert C3- und C4-Komplementproteine. In Mäusen mit einem nicht funktionierenden Crry-Protein ist die Regulierung des Komplement stark betroffen und es kommt aufgrund des C3-Fixierens auf den Trophoblasten zum intrauterinen Fruchttod (Xu C et al., 2000). Im Gegensatz zu Nagern exprimieren menschliche Trophoblasten mehrere Komplement-regulierende Proteine (CD46 (Membran Co-Faktor Protein), CD55 (Decay Accelerator Faktor) und CD59 (Weetman AP, 1999)). Das Gleichgewicht zwischen mehreren pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, sowohl lokal im Gewebe als auch systemisch in der Blutzirkulation, kann während der Schwangerschaft eine kritische Bedeutung haben. Schwangerschaft ist als ein immunsuppressiver Zustand charakterisiert worden. Hierbei spielen die Th2-Zytokine eine besondere Rolle (Wegmann TG et al., 1993). Die Linderung von Th1-charakteristischen Symptome bei rheumatoider Arthritis von schwangeren Frauen wurde als klinisch relevanter Beweis zur Bedeutung der Th2-Zytokine angesehen (Shurin MR et al., 1999). Eine entgegengesetzte Wirkung der Schwangerschaft ist im systemischen Lupus erythematosus offensichtlich, eine Krankheit vom Th2-Typ der häufig während der Schwangerschaft aktiviert wird (Huizinga TW et al., 1999). Veränderungen von systemisch gelösten Immunmediatoren sind in normalen Schwangerschaften und bei Fehlgeburten beobachtet worden, obwohl hierzu auch einige widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (Choudhury SR und Knapp LA, 2001). Eine verminderte Konzentration des Makrophagen hemmenden

Zytokins 1 (MIC 1) im Serum verursacht oft Fehlgeburten. Das MIC 1-Molekül ist von seiner Wirkung vergleichbar mit dem Th2-Zytokin. Messungen der MIC 1-Konzentration in der frühen Schwangerschaft könnten vielleicht zur Einschätzung des Risikos für zukünftige Fehlgeburten verwendet werden (Tong S et al., 2004). Typische Th1/Th2- und anti-/pro-inflammatorische-Zytokine werden in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1. *Klassifikation der Zytokine* (Haimovici F und Anderson D, 1993).

Th1 cytokines	Th2 cytokines	Proinflammatory cytokines	Anti-inflammatory cytokines
IL-2	IL-4	IL-1beta	IL-4
IL-12	IL-5	IL-1alpha	IL-10
IL-15	IL-10	IL-6	TGF-beta
IL-18	IL-13	TNF-alpha	IL-1RA
IL-21		IL-12	IL-18BP
IFN-alpha		IL-18	
IFN-gamma		IFN-gamma	

Kürzlich wurde das Th1/Th2-Paradigma durch Ergebnisse in Frage gestellt, die zeigten, dass IL-10 und IL-4 defiziente Mäuse in der Vollendung der allogenen Schwangerschaft erfolgreich waren (Svensson L et al., 2001). Außerdem wurde herausgefunden, dass IFN- $\gamma$  (ein typisches Th1-Zytokin) bei Implantationen und Trächtigkeiten in Mäusen einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der Schwangerschaft hat (Ashkar AA und Croy BA, 1999; Ashkar AA et al., 2000). Die physiologische Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der Schwangerschaft ist ebenfalls in aktuellen Studien neu evaluiert worden. Hierbei scheint das die intrazelluläre Zytokinproduktion von PBMC mit dem Th2-Paradigma nicht zusammenpasst. PBMC-Moleküle werden offensichtlich exprimiert um das Th1-Zytokin IL-12, nach erfolgter LPS-Stimulation, zu

produzieren (Cozen W et al., 2004). Wahrscheinlich hat IL-12 eine günstige physiologische Bedeutung im Verlauf der Schwangerschaft, weil der periphere Plasmaspiegel von IL-12 in Frauen mit Fehlgeburten heruntergeregt wird (Zenclussen AC et al., 2002). Trotz dieser neuen und interessanten Ergebnisse, die das Th1/Th2-Paradigma in der Schwangerschaft beleuchten, gibt es viele Hinweise die darauf deuten, dass eine Verschiebung in Richtung einer Immunantwort vom Typ-Th2 für die erfolgreiche Schwangerschaft wichtig ist (Shurin MR et al., 1999).

#### **I.4. Galektin in der Immunologie**

Galektine werden durch eine konservierte Kohlenhydrat-erkennende Domäne (engl. *carbohydrate-recognition domain*; CRD) mit Affinität für  $\beta$ -Galactoside definiert (Leffler H et al., 2004; Camby I et al., 2006; Cooper DN et al., 1999). Bis heute sind 15 Galektine in Säugetieren identifiziert worden die in drei Klassen unterteilt werden: a) die single-CRD Prototyp Galektine, einschließlich der Galektine 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 und 15; b) die *tandem-repeat* Galektine, die zwei über ein Peptid von variabler Länge verbundene CRD enthalten, Galektin 4, 6, 8, 9, 12 und c) das einzigartige Galektin-3 vom Chimera-Typ welches eine einzelne CRD enthält. Die CRD entsteht durch das Verschmelzen von Tandem-Wiederholungen kurzer Aminosäureabfolgen (Leffler H et al., 2004; Cooper DN et al., 1999). Bemerkenswerterweise ist, dass Galektin-1 reichlich im weiblichen Fortpflanzungstrakt vorhanden ist und in der späten Sekretionsphase im Endometrium, in der Dezidua und in der Plazenta signifikant heraufgeregt wird (Phillips B et al., 1996; Maquoi E et al., 1997). Besonders bemerkenswert ist, dass Galektin-1 in menschlichen NK-Gebärmutterzellen deutlich überexprimiert wird (Koopman LA et al., 2003). Diese Beobachtungen, zusammen mit den

profunden Effekten von Galektin-1 in der Regulation der Homöostase der Immunzellen, deuten darauf hin, dass Galektin-1 eine fetomaternale Toleranz ähnlich anderer immunregulatorischer Mediatoren, einschließlich PD-L1 und Fas-L, regeln könnte (Polanczyk MJ et al., 2006). Galektin-1 hat zudem einen negativen Effekt auf die Synthese einiger pro-inflammatorischen Zytokine. Wir haben berichtet, dass rekombinantes Galektin-1 in niedrigen Konzentrationen die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon -  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), durch Aktivieren von T-Zellen ohne T-Zell-Apoptose zu induzieren, hemmen kann (Rabinovich GA et al., 1999). In dieser Studie wurde mit Hilfe selektiver Inhibition der Th1-Zytokinproduktion in einer lebensfähigen, nicht apoptotischen T-Zell-Population (Rabinovich GA et al., 2002) herausgefunden, dass mehrere Galektin-1-vermittelte Mechanismen agieren können, um Immunsuppression *in vivo* zu erreichen. Weiterhin berichteten van der Leij et al. (van der Leij J et al., 2007) eine markante Zunahme der IL-10 mRNA und Proteinkonzentration in nichtaktivierten und aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen im Anschluss an die Inkubation mit von rekombinantem Galektin-1. Eines der am meisten übereinstimmenden Ergebnisse in der Literatur ist sicher die Fähigkeit von Galektin-1 das Gleichgewicht von einer Th1- hin zu einer Th2- polarisierten Immunantwort in verschiedenen experimentellen Modellen (chronischen Entzündungen, Autoimmunität, Krebserkrankungen) zu verschieben (Rabinovich GA et al., 1999; Santucci L et al., 2000; Santucci L et al., 2003; Toscano MA et al., 2006; Perone MJ et al., 2006; Baum LG et al., 2003). Die Untersuchung der Zytokinbalance in mit einer Drainage versehenen Lymphknoten und Milzen von Mäusen, die mit rekombinantem Galektin-1 behandelt waren, offenbarte

verminderte Konzentration von IFN- $\gamma$  und IL-2 und einen hohen Anstieg der Produktion von IL-5, IL-10 und TGF- $\beta$ .

### **I.5. Progesteron und Gestation**

Während der Schwangerschaft tragen mehrere hormonale Faktoren zur Th2-Produktion bei. Hierbei ist insbesondere das Progesteron ein wichtiges immunmodulatorisches Molekül und seine Effekte werden durch ein von Lymphozyten abstammendes Protein, dem *Progesteron-induced Blocking Factor* (PIBF), vermittelt. In Mäusen veranlasst die Behandlung mit Antiprogesteron den Abort. Außerdem verursacht die Neutralisierung von PIBF durch PIBF-spezifische Antikörper Aborte in Mäusen. Die anti-abortive Wirkung von PIBF wird mittels Hemmung der NK-Zellaktivität vermittelt (Szekeres-Bartho J et al., 2001). Zusätzlich unterdrückt Progesteron direkt die T-Zell Differenzierung zu Th1-Zellen und erhöht die Entwicklung von IL-10 produzierenden Th2- Zellen (Miyaura H und Iwata M, 2002; Piccinni MP et al., 1995). Relaxin, Glycodelin und hCG sind andere Faktoren, die die Zytokinproduktion während der Schwangerschaft verändern können (Seppälä M et al., 2002; Mishan-Eisenberg G et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich zu den Ergebnissen der neuen Forschungsberichte sagen, dass das Th1/Th2-Paradigma, das bis heute als ein wertvolles Hilfsmittel in verschiedenen Forschungsbereichen gedient hat, in der Schwangerschaft eine zu starke Vereinfachung darstellt. Vor diesem Hintergrund wird es eine steigende Notwendigkeit geben sich auch auf die Rolle des angeborenen Immunsystems zu konzentrieren. Zusätzlich zur Bedeutung von Lymphozyten vom Typ-Th2 kann die systemische Aktivierung des

angeborenen Immunsystems wichtige biologische Implikationen während der Schwangerschaft haben (Chaouat G, 2003). Es scheint, dass ein günstiges Th1/Th2-Gleichgewicht für die einzelnen Entwicklungsphase der Schwangerschaft wichtig sind. Während der Implantation und frühen Entwicklungsphasen der Schwangerschaft sind Th1-Zytokine erforderlich. In den späteren Entwicklungsphasen hingegen überwiegt der schädliche Einfluss der Th1-Zytokine auf den Fötus. Hingegen sind sie während der Geburtswehen wieder erforderlich (Athanasakis I und Vassiliadis S, 2002).

### **I.6. Stress und Folgen für die Schwangerschaft**

In Hinblick auf die enorme Komplexität der regulatorischen Immunmechanismen einer erfolgreichen Reproduktion ist deutlich geworden, dass ein Abort kein monokausaler Zustand ist, sondern durch ein komplexes Versagen der Immunadaptation hervorgerufen wird. Dieses Scheitern könnte sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen durch hohe Stresspegel ausgelöst werden (Arck PC et al., 2007). Es ist bekannt, dass Stress das Immunsystem verändern und mit dem Reproduktionsprozess interferieren kann; so kann Stress etwa die Implantation sowie das fetale Wachstum beeinflussen, als auch zum Abort führen. Es ist beispielsweise möglich, die Abortrate durch Lärmstress in trächtigen Mäusen zu steigern. In diesem Stressmodell werden CBA/J-Weibchen mit DBA/2J-Männchen verpaart. Nach der Verpaarung erfolgt die Stressinduktion bei den weibchen Tieren mit Hilfe von Schallwellen (300 Hz, 70 dB im Intervall von 15 Sekunden). Bereits eine 24-stündige Exposition mit Ultraschall während der frühen Gestationsphase am Tag 5,5 der Trächtigkeit (Detektion des Vaginalpropfen am Tag 0,5) reicht aus, um ein signifikantes

Ansteigen der Abortrate zu induzieren (Clark DA et al., 1993; Arck PC et al., 1995).

Die Auffassung, dass Stress die Aborte begünstigt, indem er mit der immunologischen Balance interferiert, wird durch Ergebnisse gestützt die zeigen, dass durch Stress induzierte Aborte in Mäusen auf verschiedene Weise korrigiert werden können. Erstens durch die Immunisierung mit allogenen Lymphozyten, welche paternale *major histocompatibility complex* (MHC) Antigene (H-2d) tragen (Clark DA et al., 1993); Zweitens durch die Injektion von Antikörpern die gegen die asialoGM1-Determinante auf natürlichen Killerzellen gerichtet sind. Es konnte beobachtet werden, dass Stressexposition in der Periimplantationsphase die Aktivierung von T-Zellen, Mastzellen und Makrophagen via Substanz P auslöst. Ferner konnten in diesen Versuchen verminderte Plasmaspiegel von TGF- $\beta$ 2 und eine erhöhte Sekretion von TNF- $\alpha$  gemessen werden (Arck PC et al., 1995). Die Störung der endokrinen Balance wird auch als Auslöser für die hohen Abortraten in diesem Stressmodell diskutiert. Insbesondere verringerte Plasmakonzentration von Progesteron und dem *Progesteron-induced Blocking Factor* (PIBF) werden beobachtet, die dazu führen können, dass es zu einer gesteigerten Aktivierung von lymphokin aktivierten Killerzellen (LAK) kommt (Joachim R et al., 2003).

Eine Stressexposition während der frühen murinen Schwangerschaft führt zu einem besseren Funktionsverständnis im Rahmen der endogenen Regulation von antigenpräsentierenden Zellen, so führte die Exposition mit Stress zu einer Zunahme in der Anzahl reifer dendritischer Zellen. Ergänzend konnte in diesem Stressmodell eine Wiederherstellung der Mechanismen der fetalen Toleranz erreicht werden, indem entscheidende Liganden auf reifen dendritischen Zellen,



die zu einer T-Zell-Aktivierung führen, blockiert wurden (Blois SM et al., 2005). In dieser Hinsicht stellt das murine Stressmodell ein wichtiges Werkzeug für das Verständnis der immunologischen Mechanismen dar, die einer erfolgreichen Reproduktion zu Grunde liegen. Ein solches Stressmodell könnte die Identifikation von Schlüsselmolekülen im uterinen Signalnetzwerk sowie die Entwicklung von therapeutischen Strategien gegen spontane Aborte ermöglichen.

## II. Zielstellung der Arbeit

Trotz des beträchtlichen Fortschritts in der Aufklärung der Mechanismen, die am Aufrechterhalten einer erfolgreichen Schwangerschaft beteiligt sind, gibt es doch mehr Fragen als Antworten hinsichtlich der Hierarchie von Regulationswegen und der funktionellen Verbindung zwischen Mediatoren die das fötale Überleben begünstigen.

Die vorliegende Arbeit hat daher folgende Zielstellungen:

a) Basierend auf der Erkenntnis das Stresswahrnehmung zum Absinken des Progesteron-Niveaus führt, was der Reihe nach auf eine Th1>Th2-Prädominanz mit anschließendem Abort hinauslaufen kann, wurde die Rolle der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation und der Th1/Th2-Zytokin-abhängigen Mechanismen durch Progesteronsubstitution untersucht.

b) Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1 und ICAM-1, spielen eine wichtige Rolle während der Einleitung der Immunantwort. Daher war es unser Ziel die Expression von Adhäsionsmolekülen und deren physiologische Bedeutung in der Schwangerschaft zu charakterisieren.

c) Die Interaktion von dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen während des Implantationsprozesses ist weitgehend unbekannt und wurde daher in der murinen Schwangerschaft untersucht.

d) Die Bedeutung von dendritischen Zellen während des Implantationsprozesses sollte detailliert in der murinen Schwangerschaft untersucht werden.

e) Es ist unbekannt inwieweit Galektin-1 an Toleranz-Prozessen beteiligt ist. Daher haben wir die Rolle von Galektin-1 in der Regulierung der fetomaternalen Toleranz *in vivo* untersucht.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel

Im Kapitel III. 2 bemerkten wir, dass die Progesteronsubstitution den abortogenen Effekten der Stressexposition entgegen wirkt. Hierbei beobachteten wir, dass die Plasmakonzentrationen von abortogenen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  vermindert vorlagen. Dieser Beobachtung war in hohem Maße CD8-abhängig, da die Depletion von CD8 zum Beenden der schwangerschaftsschützenden Effekte der Progesteronsubstitution führte.

Kapitel III 3: Indem wir die ICAM-1/LFA-1-vermittelten interzellularen Adhäsionsereignisse blockiert haben, zeigten wir, dass die fötale immunologische Akzeptanz in Risiko-Schwangerschaften (z.B. starke Lärmbelastung) wieder hergestellt wird und der adoptive Transfer von LFA-1 Zellen in trächtigen Mäusen nur in für Abort anfälligen Maus-Modellen Abstoßungsreaktionen veranlasst. Die gegenseitige Beeinflussung von ICAM-1/LFA-1 führt zur vermehrter Rekrutierung von pro-inflammatorischen Zellen hin zur Implantationsseite, fördert die Zellreifung der dendritischen Zellen in der Dezidua und veranlasst anschließend zusätzlich eine lokale Th1-Polarisation über die reifen dendritischen Zellen. Außerdem legen unsere Beobachtungen dar, dass Mechanismen der fötalen Toleranz, wie die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase, die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> regulatorischer T-Zellen und die Synthese von asymmetrischen Antikörpern, ICAM-1/LFA-1 abhängig sind. Unsere Ergebnisse zeigen ein hierarchisches

Netz der immunologischen Integration an der fetomaternalen Schnittstelle. Die gegenseitige Beeinflussung von ICAM-1/LFA-1 ist offenkundig ein unmittelbarer Mediator und besitzt die Fähigkeit die erfolgreiche Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zu unterbrechen.

In Kapitel III.4 wird gezeigt, dass die Interaktionen von murinen NK Zellen mit dendritischen Zellen *in vitro* Gegenstand der Modulierung durch Trophoblasten sind. Diese Interaktion fördert ein Mikromilieu das durch eine Reduktion der Expression von Aktivierungsmarkern auf uNK- und uDZ-Zellen sowie einer Dominanz der Th2-Zytokine gekennzeichnet ist.

Die Interaktion von NK und dendritischen Zellen könnte ebenfalls die uterine Zellproliferation beeinflussen. Dieser Prozess könnte reguliert werden durch Signale die vom Trophoblasten ausgesendet werden.

Tatsächlich zeigte sich, während nach regulärer Kokultivierung mit direktem Kontakt zwischen uterinen Zellen und Trophoblasten nur geringe Proliferationsraten. Hingegen führte die Inkubation in einem Transwellsystem zu einem markanten Anstieg der Proliferation von uterinen Zellen. Das lässt vermuten, dass gelöste Faktoren als Schlüsselmediatoren im molekularen Dialog zwischen Mutter und Conceptus während der Etablierung der Schwangerschaft in der Maus dienen.

Unsere Daten zeigen, dass die regulatorischen Funktionen von Trophoblasten mit Toleranzinduktion in murinen Verpaarungen mit hoher fetaler Verlustrate beeinträchtigt sind. Interessanterweise haben wir beobachtet, dass die Sekretion von IL-12p70 aus uDZ durch die Anwesenheit von uNK-Zellen dramatisch herabgesetzt wird.

Zusammengefasst liefern unsere Ergebnisse die ersten Beweise, dass eine empfindliche Balance der Interaktionen zwischen NK-Zellen, DZ und Trophoblasten an der murinen maternalen Schnittstelle die erfolgreiche Schwangerschaft unterstützt.

Im Kapitel III.5 untersuchten wir die Rolle von dendritischen Zellen während des Implantationsprozesses. Es wurde ein transgenes Mausmodell genutzt (DTRtg), das durch den Einsatz von Diphtherietoxin die transiente Depletion von CD11c<sup>+</sup>-Zellen *in vivo* hervorrufen konnte.

Wir konnten beobachten, dass eine DZ Depletion den Implantationsprozess beeinträchtigte. Das führte zu einer verminderten Zuchteffizienz. Die Reife von uterinen NK-Zellen an den dendritischen Knockout-Implantationsstellen (DZKO) war ebenfalls betroffen, wie durch eine herabgesetzte Perforinexpression und eine reduzierte Anzahl an Periodsäure-Leukofuchsin (engl. Periodic acid-Schiff; PAS)- positiven Zellen demonstriert werden konnte. Diese Beobachtung wurde von Umordnungen in der dezidualen vaskulären Entwicklung begleitet. In der vorliegenden Studie konnten wir ein neues DC-abhängiges Protein identifizieren. Es handelt sich um das Phosphatidylinositol-Transfer-Protein  $\beta$  (PITP $\beta$ ), das in die Implantation und die Trophoblastenentwicklung involviert ist. DZKO-Mäuse wiesen substanzielle Anomalien in der Plazentaentwicklung auf, wie Hypozellularität der Spongiotrophoblasten und Labyrinthschichten sowie eine verringerte Anzahl an trophoblastischen Riesenzellen. Riesenzellen hatten auch die Expression von zwei charakteristischen Markern der Trophoblastendifferenzierung, plazentales Lactogen-1 und Proliferin, herabreguliert.

In Hinblick auf diese Ergebnisse scheinen sich dendritische Zellen als potenzielle Modulatoren in der Inszenierung der Ereignisse, die zur Etablierung und Erhaltung der Schwangerschaft führen, herauszustellen.

In Kapitel III 6 zeigten wir, dass Galektin-1 (Gal-1), ein immunregulatorisches, Glykan-bindendes Protein, eine ausschlaggebende Rolle beim Gewähren fetomaternaler Toleranz hat. Übereinstimmend mit einer markanten Abnahme der Gal-1-Expression während einer scheiternden Trächtigkeiten, wiesen Galektin-1-defiziente (Gal-1 KO) Mäuse vergrößerte Raten des fötalen Verlustes im Vergleich zu Mäusen des Wildtyps in allogenen Verpaarungen auf, wohingegen fötales Überleben in syngenen Verpaarungen unbeeinflusst blieb. Die Behandlung mit rekombinantem Gal-1 verhinderte den fötalen Verlust und stellte die Toleranz über mannigfaltige Mechanismen wieder her, einschließlich der Induktion von tolerogenen dendritischen Zellen, die der Reihe nach die Zunahme von IL-10 -sekretorischer regulatorischer T-Zellen *in vivo* förderten. Entsprechend wurden die Schutzeffekte von Gal-1 in Mäusen mit verminderten regulatorischen T-Zellen oder mit IL-10 Defizienz aufgehoben. Außerdem legen wir Beweise für die Synergie zwischen Gal-1 und Progesteron bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft vor. So ist Gal-1 ein ausschlaggebender Regulator der fetomaternalen Toleranz mit potenziellen therapeutischen Implikationen in bedrohten Schwangerschaften.

III.2. Die Depletion von CD8<sup>+</sup>-Zellen hebt die Schwangerschaftsschutzwirkung der Progesteron-Substitution mit Dydrogesteron in Mäusen auf, indem das Th1/Th2-Zytokinprofil verändert wird.

Blois, S.M., Joachim, R., Kandil, J., Margni, R., Tometten, M., Klapp, B.F., Arck, P.C. Depletion of CD8<sup>+</sup> cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. *J Immunol.* (2004) May 15;172(10):5893-5899.

PMID: 15128769 [PubMed - indexed for MEDLINE]



III.3. Der gegenseitige intrazelluläre Einfluss des Adhäsionsmoleküls-1/LFA-1 ist ein unmittelbarer Mediator, fähig die immunologische Integration und den Toleranzmechanismus an der fetomaternalen Schnittstelle in murinen Trächtigkeiten zu stören.

Blois, S.M., Tometten, M., Kandil, J., Hagen, E., Klapp, B.F., Margni, R.A., Arck, P.C. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the fetomaternal interface in murine pregnancies. *J Immunol.* (2005) Feb 15;174(4):1820-1829.

PMID: 15699108 [PubMed - indexed for MEDLINE]

#### III.4. Interaktion zwischen dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen während der murinen Schwangerschaft

Blois, S.M., Barrientos, G., Garcia, M.G., Orsal, A.S., Tometten, M., Cordo-Russo, R.I., Klapp, B.F., Santoni, A., Fernández, N., Terness, P., Arck, P.C. Interaction between dendritic cells and natural killer cells during pregnancy in mice. *J Mol Med.* (2008) Jul;86(7):837-852. Epub 2008 May 28.

PMID: 18506412 [PubMed - indexed for MEDLINE]

III.5. Die Depletion von dendritischen Zellen *in vivo* reduziert die Verpaarungseffizienz, beeinflusst den Implantationsprozess und die frühe plazentale Entwicklung in Mäusen

Krey, G., Frank, P., Shaikly, V., Barrientos, G., Cordo-Russo, R., Ringel, F., Moschansky, P., Chernukhin, I.V., Metodiev, M., Fernández, N., Klapp, B.F., Arck, P.C., Blois, S.M. In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice. *J Mol Med.* (2008) Sep;86(9):999-1011. Epub 2008 Jun 25.

PMID: 18575833 [PubMed - indexed for MEDLINE]

### III.6. Eine maßgebende Rolle für Galektin-1 in der fetomaternalen Toleranz

Blois, S.M., Illarregui, J.M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A.S., Cordo-Russo, R., Toscano, M.A., Bianco, G.A., Kobelt, P., Handjiski, B., Tirado, I., Markert, U.R., Klapp, B.F., Poirier, F., Szekeres-Bartho, J., Rabinovich, G.A., Arck, P.C. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med.* (2007) Dec;13(12):1450-1457. Epub 2007 Nov 18. Erratum in: *Nat Med.* (2009) May;15(5):584.

PMID: 18026113 [PubMed - indexed for MEDLINE]

#### **IV. Diskussion**

Der Embryo wird in der Literatur oft als ‚Produkt der Verpaarung histoinkompatibler Individuen‘ bezeichnet und folglich mit einem semi-allogenen Transplantat verglichen das im Laufe der gesamten Gestationsperiode durch das maternale Immunsystem toleriert wird (Medawar PB, 1953). Die Abstoßung des Fötus und die nachfolgende Fehlgeburt ist eine häufige Schwangerschaftskomplikation die 15-40% der menschlichen Schwangerschaften betrifft (Coulam CB, 1991; Clark DA et al., 1999). Zwangsläufig kann das fetoplazentare Transplantat entweder toleriert oder durch das maternale Immunsystem abgestoßen werden. Die Möglichkeiten der fötalen Toleranz scheinen zahlreich und die verschiedenen Entwicklungszeitpunkte der Schwangerschaft von Bedeutung zu sein. Faszinierend ist, dass diese Toleranz-Mechanismen sowohl systemisch auf das maternale Immunsystem wirken, als auch auf der lokaler Ebene an der Plazenta. Tatsächlich ist der Grad des Überlebens oder des Abstoßens des Fötus von den Ereignissen besonders abhängig die die Mutter gefährden, wie etwa umweltbedingte Parameter wie der Kontakt mit toxischen Substanzen, ansteckenden Agenzien oder psychoemotionaler Stress (Stray-Pedersen B und Stray-Pedersen S, 1984).

Weiterhin ist bekannt, dass Progesteron-vermittelte Effekte für den Beginn, die Entwicklung und den Erhalt der Schwangerschaft vorteilhaft sind (Wang MW et al., 1992; Graham JD und Clarke CL, 1997). Andererseits interferiert Stress mit dem Verlauf der Schwangerschaft und kann zu Aborten, möglicherweise über die Abnahme des Progesterons führen (Chrousos GP et al., 1998). Frühere Studien in unserem Laboratorium haben demonstriert, dass dem durch Stress

ausgelösten Abort mittels der Anwendung eines Progesteronderivats therapeutisch entgegengewirkt werden kann (Joachim R et al., 2003).

Im Kapitel III.2 zeigten wir Beweise, dass Stressexposition eine Abnahme von uterinen CD8<sup>+</sup>-Zellen innerhalb von 24 Stunden veranlasst. Diese Abnahme kann durch die Anwendung des Progesteronderivats Dydrogesteron rückgängig gemacht werden, eine Beobachtung, die klar in Übereinstimmung mit den Beobachtungen über die schwangerschaftsschützende CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation steht, die Abort verhindert und zwischen den Tagen 4,5 und 8,5 der Trächtigkeit präsent ist (Clark DA et al., 1999; Szekeres-Bartho J et al., 1991). Diese CD8<sup>+</sup>-Zellen, bei denen angenommen wird, dass sie die  $\gamma\delta$ -TCR koexprimieren, scheinen eine entscheidende Rolle im Th1/Th2-Gleichgewicht zu spielen (Clark DA et al., 1999; Szekeres-Bartho J et al., 1991), das den Erfolg und Misserfolg der Schwangerschaft bestimmt. Seitdem wir im Stande waren, diese Population durch Dydrogesteron wieder herzustellen, scheint es deutlich zu werden, dass diese Zellen durch eine entsprechende Konzentration von Progesteron hoch geregelt werden und Progesteron-Rezeptoren exprimieren. Als wir in unseren CD8-Depletionsexperimenten bemerkten, dass die schwangerschaftsschützende Wirkung der Dydrogesteron Behandlung in Bezug auf die Abortrate fast aufgehoben wird, schlussfolgerten wir, dass die Schutzwirkung des Progesterons und Dydrogesterons vorherrschend durch CD8<sup>+</sup> -Gebärmutterzellen vermittelt wird.

Hinsichtlich der Toleranz oder Abstoßung des Allotransplantats ‚Fetus‘ interferieren Adhäsionsmoleküle wahrscheinlich mit einem erfolgreichen Schwangerschaftsergebnis. Im Kapitel III.3 lieferten wir deutliche Beweise für

eine funktionelle Rolle von ICAM-1 und LFA-1 während der Periimplantationsperiode in Säugetierschwangerschaften. Durch die Hemmung von ICAM-1/LFA-1 zeigten wir, dass die fötale Annahme in Problemschwangerschaften, z.B. bei Stressexposition mittels Lärm, verbessert wird und der Adoptivtransfer von LFA-1 Zellen in trächtigen Mäusen Abstoßungen nur in den für Abort anfälligen Maus-Modellen veranlasst. Die gegenseitige Beeinflussung von ICAM-1/LFA-1 führt zu einer vermehrten Rekrutierung von abortogenen Th1 exprimierenden Zellen an der Implantationsseite, fördert die Reifung dendritischer Zellen und veranlasst anschließend eine zusätzliche Th1-Polarisation über das Reifen der dendritischen Zellen.

Weiterhin zeigten unsere Beobachtungen, dass Mechanismen der fötalen Toleranz, z.B. dieIDO-Expression und die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> sowie CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, ICAM-1/LFA-1-abhängig sind. Aus diesem Grund zeigen unsere Daten neue Erkenntnisse über ein hierarchisches Netz der immunologischen Integration an der fetomaternalen Schnittstelle, an der die gegenseitige Beeinflussung von ICAM-1/LFA-1 ein unmittelbarer Mediator ist, fähig, die erfolgreiche Schwangerschaftserhaltung zu stören. Diese Befunde zeigen, dass die Blockade der CD86-Kostimulation zu einer maternalen immunologischen Toleranz des Embryo-Antigens führt und so zu einer neuartigen immunregulatorischen Therapie bei unbekanntem Mehrfachabort beitragen könnte (Zhu XY et al., 2005)

Zahlreiche Ergebnisse lassen vermuten, dass uDC- und uNK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der maternalen Immunantwort gegen Trophoblastenantigene spielen. Obgleich eine enge topographische Nähe

zwischen diesen Subpopulationen in der humanen Dezidua beschrieben worden ist (Kämmerer U et al., 2003), haben sich zahlreiche Publikationen auf die potenziellen regulatorischen Funktionen von DZ- und uNK-Zellen konzentriert. Hier bleibt die Frage offen, ob die Interaktion dieser beiden Zelltypen tatsächlich zur Erhaltung einer Schwangerschaft beiträgt. In Kapitel III.4 legen wir Beweise vor, dass die räumliche Nähe zwischen DZ- und uNK-Zellen in der murinen Schwangerschaft beobachtet werden kann. Diese räumliche Beziehung könnte die maternale Immunantworten modulieren.

Welche gewebespezifischen Eigenschaften im Crosstalk von NK-Zellen und DZ gibt es an der maternalen fötalen Schnittstelle? Zuerst vermuteten wir, dass uNK-Zellen und DZ in die Kontrollmechanismen der uterinen Zellproliferation involviert sind. Während der frühen Schwangerschaft proliferieren und differenzieren uterine Zellen, die sich nahe der Implantationsstelle befinden, unter dem Einfluss von Steroidhormonen, um die Dezidua auszubilden (Norwitz ER et al., 2001). Wir zeigen hier, dass eine signifikante uterine Zellproliferation nur in Anwesenheit von uNK-Zellen und DZ induziert wurde. Dies lässt vermuten, dass dieser Prozess durch eine kontrollierte Aktion dieser Zellarten an der murinen maternalen fötalen Schnittstelle koordiniert wird. Interessanterweise wurde die Zellproliferation markant verstärkt, als es durch die Nutzung eines Transwellsystems zu keinem physischen Kontakt zwischen uterinen Zellen und murinen Trophoblasten kam. Folglich scheint es so, dass lösliche Faktoren die deziduale Zellproliferation und DZ/NK-Zellfunktionen an der murinen maternalen fötalen Schnittstelle kontrollieren und Zell-Zell-Kontakte mittels Oberflächenmolekülen diesen Prozess negativ beeinflussen. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die Etablierung einer Schwangerschaft in



Mäusen hinsichtlich der Regulation der uterinen Zellproliferation als ein dualer Prozess verstanden werden.

In der Anfangsphase könnte der Dialog zwischen dem Conceptus und dem maternalen Kompartiment durch lösliche Faktoren vermittelt werden, die die uterine Zellproliferation und Differenzierung fördern, um die Dezidua zu bilden. Anschließend, wenn Trophoblasten in das uterine Stroma eindringen und eine funktionale Plazenta bilden, könnten Zell-Zell-Kontakte mittels Oberflächensignalkomplexen zu verringerten dezidualen Zellproliferationsraten führen.

Es wird weitgehend angenommen, dass dendritische Zellen entscheidend für die föto-maternale Toleranz sind (Blois SM et al, 2004; 2007). Obgleich verschiedene Studien gezeigt haben, dass DZ hochpotente Regulatoren einer Schwangerschaft sind, fehlen jedoch immer noch experimentelle Beweise für eine besondere *in vivo* Funktion von DZ. In Kapitel III.5 nutzten wir das DZKO-System, das es erlaubt, die Depletion von CD11c<sup>+</sup>-DZ *in vivo* während einer Implantation zu induzieren.

Die Gesamtheit der hier aufgezeigten Experimente lassen vermuten, dass DZ eine Rolle während der Implantation in Mäusen spielen, da eine DZ-Depletion die uNK-Zelldifferenzierung sowie die vaskuläre/plazentale Entwicklung vermindert. Diese Daten stützen die Rolle, die die dendritischen Zellen bei der Inszenierung von Ereignissen, die zur Etablierung und Erhaltung einer Schwangerschaft führen, einnehmen.

Eine *in vivo* Behandlung mit Gal-1 unterdrückt die Th1-abhängige Entzündung in experimentellen Modellen der Autoimmunität, indem das Gleichgewicht zu einem Th2-dominierenden Zytokinprofil verlagert wird (Rabinovich GA et al.,

1999; Toscano MA et al., 2006; Perone MJ et al., 2006). Im Kapitel III.6 legten wir die ersten experimentellen Beweise vor, die eine entscheidende Rolle für Gal-1 in der Förderung fetomaternaler Toleranz anzeigen, und behaupten, dass ein potenzieller therapeutischer Ansatz darauf zielen sollte, immunologische Toleranz in scheiternden Schwangerschaften wieder herzustellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Gal-1 ein potenzieller therapeutische Ansatz ist und das Scheitern einer Schwangerschaft verhindern könnte.

## **VI. Bemerkungen für die Zukunft**

Noch sind keine endgültigen immunologischen Therapien für diejenigen verfügbar, die unter ungeklärten Aborten leiden, weil Schlüssel-immunologische Faktoren in Assoziation mit der Annahme/Abstoßung des fötalen Allografts noch weitestgehend unbekannt sind. Die positive Modulation des Immunsystems ist bisher bei ungeklärten Mehrfachaborten trotz beträchtlicher Forschungsanstrengungen wenig nützlich (Scott JR, 2003).

Neue technische Innovationen ermöglichen einen tieferen Einblick in die Mechanismen von Fortpflanzung und Unfruchtbarkeit. Möglicherweise kann mit Hilfe genetischer Studien auf viele der offenen Fragen bezüglich der Unfruchtbarkeit und des ungeklärten Mehrfachabortes eine Antwort gefunden werden.

Da ungeklärte Mehrfachaborte sehr starken psychologischen Stress und Verzweiflung bei den betroffenen Frauen verursacht (Klock SC et al., 1997), ist es wichtig die biologische Schlüsselfaktoren einer erfolgreichen Schwangerschaft zu analysieren. Diese Erkenntnisse von immunologischen Prozessen während der Schwangerschaft ermöglicht die Entwicklung von wirksamen Arzneimitteln gegen Kinderlosigkeit.

## VI. Zusammenfassung

Einer der beeindruckendsten Vorgänge hinsichtlich immunologischer Regulationsmechanismen ist die maternale Immuntoleranz gegenüber dem fetalen Semi-Allograft während der Schwangerschaft, auch titulierte als die „Schwangerschafts-Pause des Immunsystems“.

Das Tolerieren des Fötus durch das mütterliche Immunsystem ergibt sich aus einem komplexen Zusammenspiel von Steroidhormonen, Zytokinen und weiteren Faktoren, die die Funktion der Immunzellen an der fetalen-maternalen Grenzzone regulieren. Beispielsweise werden niedrige Progesteron- und Th2-Zytokinspiegel und hohe Th1-Zytokinspiegel mit einer erhöhten Fehlgeburtenrate in Verbindung gebracht. Dieses Hormon- und Zytokinprofil kann durch psychosozialen Stress getriggert werden. Interessanterweise können die abortogenen Effekte, induziert durch Stress, mit Hilfe von Dydrogesteron aufgehoben werden. Es handelt sich hierbei um ein Progesteron-Derivat mit hoher Selektivität für den Progesteron-Rezeptor, das die Abnahme abortogen wirkender Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-12 und IFN- $\gamma$  bewirkt. Die Abstossung des Fötus wird unter anderem vom Zusammenspiel zwischen ICAM-1, das von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, und seinem Liganden LFA-1 vermittelt: Die ICAM-1/ LFA-1-Interaktion führt zu einer interzellulärer Adhäsion, welche eine Rekrutierung von pro-inflammatorischer Zellen zur Implantationsstelle bewirkt sowie die Reifung von DZ in der Dezidua fördert. Schließlich wird durch die Reifung von DZ eine weitere Polarisierung des lokalen Zytokinprofils hin zum inflammatorischen Th1-Profil hervorgerufen. Die Blockade dieses Mechanismus resultiert in der Wiederherstellung von Immunakzeptanz in gestörten Schwangerschaften.

Gezeigt werden konnte, dass Progesteron in Synergie mit Gal-1, einem immunmodulatorischen, Glykan-bindenden Protein, agiert: Bei reduzierter Gal-1-Expression während der gestörten Schwangerschaft kann die Behandlung mit rekombinantem Gal-1 den Schwangerschaftsverlust verhindern. Die Immunakzeptanz wird über multiple Mechanismen wiederhergestellt, u. a. durch die Induktion toleranzbildender DZ, die wiederum *in vivo* die Expansion von IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen vermitteln.

An Schleimhautoberflächen wird die Immunantwort durch Antigen-präsentierende Zellen determiniert, hier findet der Erstkontakt mit dem fremden Antigen statt. In der Dezidua stellen die DC während der Schwangerschaft die entscheidende regulierende Population dar. Sie haben die Fähigkeit, mit anderen Komponenten des uterinen Signalnetzwerkes, z. B. den natürlichen Killerzellen, zu interagieren und die Immunantwort im Sinne einer stimulatorischen oder toleranzbildenden Art und Weise zu modulieren. Studien haben gezeigt, dass die DZ-NK-Interaktion in ein toleranzbildendes Spektrum resultieren kann. Dieses Spektrum ist charakterisiert durch herabregulierte Aktivierungsmarker auf uterinen NK-Zellen und DZ mit gleichzeitiger Dominanz Schwangerschafts-protektiver Th2-Zytokine. Die Interaktion von NK und DZ beeinflusst auch die uterine Zellproliferation. Dieser Prozess wird stark moduliert durch Signale die vom Trophoblasten ausgesendet werden.

Die wichtige Rolle von DZ während der frühen Schwangerschaft wurde zudem in *in vivo* Studien untersucht, die zeigten, dass die transiente Depletion von CD11c positiven Zellen (z. B. durch die Gabe von Diphtherie-Toxin) den Implantationsprozess in Mäusen stört und in einer reduzierten Zucht-Fähigkeit resultiert. Die Reifung von uterinen NK-Zellen wird an DZ-depletierten Implantationsstellen unterbunden. Das spiegelte sich in einer reduzierten

Perforin-Expression sowie einer verminderten Anzahl von PAS positiven Zellen wieder. Die Depletion von DZ in der Implantationsphase verursachte Anomalien in der Entwicklung der Plazenta (Hypozellularität von Spongiotrophoblast-Zellen und Labyrinth-Zellen, reduzierte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen). Zudem werden zwei charakteristische Marker der Trophoblast-Differenzierung (plazentare Laktogen-1 sowie Proliferin) herabreguliert.

Zusammenfassend spielen die Funktionen der DZ und ihre Interaktionen mit dem dezidualen Mikromilieu eine wichtige Rolle um das Gelingen einer Schwangerschaft zu unterstützen.

## VII. Abstract

Successful mammalian pregnancy relies on the development of maternal immune tolerance towards the fetal semiallograft, which has been referred to as immunity's pregnant pause. Fetal tolerance results from a complex interplay involving steroid hormones, cytokines and other soluble factors that modulate leukocyte functions at the maternal fetal interface. For instance, low levels of progesterone and predominance of Th1 type cytokines have often been associated with increased abortion rates, which can also be boosted by psychoemotional stress. In mice, the abortogenic effects of stress can be counteracted by treatment with dydrogesterone (a progesterone derivative highly selective for the progesterone receptor), decreasing the frequency of abortogenic cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-12 and IFN- $\gamma$ . Experiments *in vivo* have also shown that stress-triggered fetal rejection can be prevented by interfering with the molecular cross talk between ICAM-1, expressed on antigen presenting cells and its ligand, LFA-1, restoring immune acceptance mechanisms in challenged pregnancies. Intercellular adhesion events involving the ICAM-1/LFA-1 pathway mediate the recruitment of proinflammatory cells to the implantation site, promote dendritic cell (DC) maturation in the decidua, and subsequently induce additional local Th1 polarization via mature DCs. More recently, progesterone has been shown to act in synergy with Galectin (Gal)-1 (an immunoregulatory glycan-binding protein) to promote fetal tolerance. Consistently with a marked decrease in Gal-1 expression during failing pregnancies, treatment with recombinant Gal-1 restored fetal immune acceptance through multiple mechanisms, including the induction of tolerogenic DC, which in turn promoted the expansion of interleukin-10 (IL-10)-secreting regulatory T cells *in vivo*.

Antigen presenting cells, mediating the first encounter with non-self antigens, are likely to be the core of immunoregulatory mechanisms acting on mucosal surfaces. Particularly in the decidua, DC have emerged as an important regulatory population given their ability to interact with other cellular components of the uterine milieu (i.e., natural killer cells) and modulate the nature of immune responses in stimulatory or tolerogenic fashion. Studies *in vitro* have shown that such DC-NK cell cross talk can result in the promotion of a tolerogenic microenvironment characterized by downregulation of the expression of activation markers on uterine NK cells and DC and dominance of pregnancy-protective Th2 cytokines. NK and DC interactions were also shown to influence uterine cell proliferation, providing the first clues into a role played by these cells during the process of endometrial decidualization. The important role played by DC during early pregnancy was further highlighted by studies *in vivo* showing that transient depletion of CD11c+ cells (i.e., through administration of diphtheria toxin) impairs the implantation process in mice, resulting in a reduced breeding efficiency. The analysis of DC-depleted implantation sites further revealed impairments in the maturation of uterine NK cell precursors, as demonstrated by decreased perforin expression and reduced numbers of periodic-acid-Schiff (PAS)-positive cells. Depletion of DC during the implantation process resulted in substantial anomalies in decidual and placental development, including defective vascular development as well as hypocellularity of the spongiotrophoblast and labyrinthine layers and impaired differentiation of trophoblast giant cells. In view of these findings, DC functions and their interactions within the decidualizing microenvironment are of critical importance to support a successful pregnancy outcome.



## VIII. Literatur

Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J. 2007. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol.* 58(3):268-279.

Arck PC, Merali FS, Manuel J, Chaouat G, Clark DA. 1995. Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release as a mechanism triggering resorptions in mice. *Am J Reprod Immunol.* 33(1):74-80.

Arck PC, Merali FS, Stanisz AM, Stead RH, Chaouat G, Manuel J, Clark DA. 1995. Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua. *Biol Reprod.* 53(4):814-819.

Ashkar AA, Croy BA. 1999. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod.* 61(2): 493-502.

Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. 2000. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 192(2): 259-270.

Askelund K, Liddell HS, Zanderigo AM, Fernando NS, Khong TY, Stone PR, Chamley LW. 2004. CD83(+) dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy. *Placenta.* 2-3:140-145.

Athanassakis I, Bleackley RC, Paetkau V, Guilbert L, Barr PJ, Wegmann TG. 1987. The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol.* 138(1):37-44.

Athanassakis I, Vassiliadis S. 2002. Interplay between T helper type 1 and type 2 cytokines and soluble major histocompatibility complex molecules: a paradigm in pregnancy. *Immunology.* 107(3):281-287.

Baum LG, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, Hoffmann D, Emmanouilides CE, Territo MC, Baldwin GC. 2003. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol.* 109(3): 295-307.

Blois S, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. 2005. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the fetomaternal interface in murine pregnancies. *J Immunol.* 174(4): 1820-1829.

Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. 2004. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod.* 70(4): 1018-1023.

Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thomson AW, Klapp BF, Fernández N, Arck PC. 2007. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod.* 77(4): 590-598.

Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 11:137-157.

Chaouat G, Menu E, Bustany P, Rebut-Bonneton C, Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. 1988. Role of the placenta in maintaining the fetal allograft. *Reprod Nutr Dev*. 28(6B):1587-1598.

Chaouat G. 2003. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 131(3):393-395.

Choudhury SR, Knapp LA. 2001. Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum Reprod Update*. 2:113-34.

Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. 1998. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med*. 129(3): 229-240.

Clark DA, Banwatt D, Chaouat G. 1993. Stress-triggered abortion in mice prevented by alloimmunization. *Am J Reprod Immunol*. 3:141-147.

Clark DA, Arck PC, Chaouat G. 1999. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol*. 41(1):5-22.

Cooper DN, Barondes SH. 1999. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. 10: 979-984.

Coulam CB. 1991. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 1: 23-27.

Cozen W, Diaz-Sanchez D, James Gauderman W, Zadnick J, Cockburn MG, Gill PS, Masood R, Hamilton AS, Jyrala M, Mack TM. 2004. Th1 and Th2 cytokines and IgE levels in identical twins with varying levels of cigarette consumption. *J Clin Immunol*. 6: 617-622.

Dosiou C, Giudice LC. 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev*. 26(1):44-62.

Erlebacher A. 2001. Why isn't the fetus rejected? *Curr Opin Immunol*. 5:590-593.

Gardner L, Moffett A. 2003. Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod*. 69(4):1438-1446.

Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 4:502-519.

Haimovici F, Anderson D. 1993. Cytokines and growth factors in implantation. *Microsc Res Tech* 25(3):201-207

Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA. 2002. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2-and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol.* 176(10): 6323-6332.

Huizinga TW, van der Linden MW, Deneys-Laporte V, Breedveld FC. 1999. Interleukin-10 as an explanation for pregnancy-induced flare in systemic lupus erythematosus and remission in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38(6):496-498.

Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, Klapp BF, Arck PC. 2003. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids.* 68(10-13):931-940.

Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kämpgen E. 2003. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol.* 162(3):887-896.

Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kämpgen E, Dietl J. 2000. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol.* 157(1):159-169.

Keeling SO, Oswald AE. 2009. Pregnancy and rheumatic disease: "by the book" or "by the doc". *Clin Rheumatol.* 1:1-9.

Klock SC, Chang G, Hiley A, Hill J. 1997. Psychological distress among women with recurrent spontaneous abortion. *Psychosomatics.* 38(5): 503-507.

Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* 198(8): 1201-1212.

Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. 2004. Introduction to galectins. *Glycoconj J.* 19(7-9):433-440.

Maquoi E, van den Brûle FA, Castronovo V, Foidart JM. 1997. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta.* 5-6:433-439.

Medawar PB. 1953. Biological problems of skin surgery. *J Int Chir.* 4:385-391.

Mishan-Eisenberg G, Borovsky Z, Weber MC, Gazit R, Tykocinski ML, Rachmilewitz J. 2004. Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. *J Immunol.* 173(9): 5524-5530.

Miyaura H, Iwata M. 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol.* 168(3): 1087-1094.

Moffett-King A. 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 9:656-663.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 345(19): 1400-1408.

Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. 1995. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.* 155(1): 128-133.

Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, Shufesky WJ, Piganelli JD, Baum LG, Trucco M, Morelli AE. 2006. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J Immunol.* 177(8): 5278-5289.

Phillips B, Knisley K, Weitlauf KD, Dorsett J, Lee V, Weitlauf H. 1996. Differential expression of two beta-galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. *Biol Reprod.* 55(3):548-558.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Polanczyk MJ, Hopke C, Vandenbark AA, Offner H. 2006. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res.* 84(2): 370-378.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?. *Trends Immunol.* 6:313-320.

Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y. 1999. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med.* 190(3):385-398.

Rabinovich GA, Morelli A. 2003. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology.* 124(5):1381-1394.

Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A. 2000. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2:399-406.

Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Scott JR. 2003. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev.* CD000112.

Seppälä M, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. 2002. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev.* 4:401-430.

Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT. 1999. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol.* 21(3): 339-359.

Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. 1984. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 148(2):140-146.

Svensson L, Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R, Mattsson R. 2001. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol.* 51(1): 3-7.

Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. 2001. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol.* 6:1037-1048.

Tong S, Marjono B, Brown DA, Mulvey S, Breit SN, Manuelpillai U, Wallace EM. 2004. Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet.* 363(9403): 129-130.

Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, van der Leij J, van den Berg A, Harms G, Eschbach H, Vos H, Zwiers P, van Weeghel R, Groen H, Poppema S, Visser L. 2007. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol Immunol.* 44(4):506-513.

Wang MW, Heap RB, Taussig MJ. 1992. Abnormal maternal behaviour in mice previously immunized against progesterone. *J Endocrinol.* 134(2):257-267

Weetman AP. 1999. The immunology of pregnancy. *Thyroid.* 7:643-646.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* 7:353-356.

Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, Molina H. 2000. A critical role for murine complement regulator *crry* in fetomaternal tolerance. *Science.* 287(5452):498-501.

Zenclussen AC, Fest S, Busse P, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. 2002. Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. *Am J Reprod Immunol.* 48(4): 245-251.

Zhu XY, Zhou YH, Wang MY, Jin LP, Yuan MM, Li DJ. 2005 Blockade of CD86 signaling facilitates a Th2 bias at the maternal-fetal interface and expands peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells to rescue abortion-prone fetuses. *Biol Reprod.* 72(2):338-345.

## **IX. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Klinikdirektor Prof. Dr. B.F. Klapp, der durch seine Psychosomatik-Kompetenz und seinen Enthusiasmus mein Interesse an der Stress-Reproduktionsimmunologie weckte. Ohne seine unermüdliche Schaffenskraft wären die vorliegenden Forschungsarbeiten nicht realisierbar gewesen. Auch bin ich ihnen für die Verstärkung meiner Arbeitsgruppe mit einer MTA (Petra Moschansky) dankbar.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Prof. Dr. P. C. Arck, die mich bei meiner Arbeit an der Charité großzügig unterstützte und mir stets mit gutem Rat zur Seite gestanden hat. Sehr wichtig war für mich die Freiheit, die sie mir für die Entwicklung meiner Ideen und Projekte eingeräumt hat. Sie unterstützte mich beim Aufbau des Reproduktionsimmunologie-Labors. Für ihre Unterstützung, Präsenz und Betreuung meines Habilitationsvorhabens bedanke ich mich ganz herzlich an dieser Stelle.

Frau Dr. M.G Garcia, Frau Dr. Tirado González, Frau Dr. M. Tometten, Frau Dr. Judith Kandil, Herrn Dr. A. Örsal und Frau Petra Moschansky danke ich für ihre Mitarbeit und Verlässlichkeit. Ohne ihre Hilfe wäre die systematische Immunologieanalyse nicht in meinem Sinne realisierbar gewesen. Ebenfalls möchte ich den von mir betreuten Doktoranden, Frau G. Krey, Herrn P. Frank, Frau G. Barrientos, Frau R. Cordo Russo meinen Dank aussprechen.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen unseres Institutes, insbesondere Herrn Dr. Peter Kobelt, Frau PD. Dr. Eva Peters, Frau Dr. Nadja Tariverdian, Frau Hagen, Frau Pliet, Frau Buße und Frau Meißner für stimulierende Diskussionen und Hilfe in vielfältiger Weise.

Die Zusammenarbeit mit den zahlreichen, multidisziplinären Kooperationspartnern hat mich stets inspiriert. Bedanken möchte ich mich namentlich bei Herrn Prof. Dr. I. Sargent (Oxford Universität, England), Frau PD Dr. U. Kämmerer (Würzburg Universität), Herrn Prof. Dr. P. Terness (Heidelberg Universität), Frau Prof. Dr. Lucia Mincheva-Nilsson (Umeå Universität, Schweden), Herrn Dr. S. Löb (Tübingen Universität), Herrn Dr. G.

Rabinovich (Buenos Aires Universität, Argentinien), Frau Prof. Dr. S. Hajos (IDEHU Institute, Buenos Aires Universität, Argentinien), Herrn Dr. E. Chuluyan (Buenos Aires Universität, Argentinien), Frau Dr. L. Alaniz (Austral Universität, Argentinien), Frau PD Dr. B. Toth (Ludwig-Maximilians Universität), Frau Dr. F. Ringel (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin), Frau Dr. M. Pincus (Pädiatrie Klinik, Charité-Universitätsmedizin Berlin) und Frau Dr. A. Friebe (Psychosomatik Abteilung, Charité-Universitätsmedizin Berlin).

Mein Dank gilt auch der Deutsche Forschungsgemeinschaft, der Charité-Universitätsmedizin Berlin sowie der Stiftung Fritz Thyssen. Diese haben meine Forschungsarbeiten durch Sachbeihilfen und Stipendien unterstützt.

Für ihre stetige moralische Unterstützung und tatkräftige Hilfe danke ich von ganzen Herzen meinen Eltern Dina M. Calamante und Oscar A. Blois, Schwester Cecilia M. Blois und Ehemann Gastón Kirby.

## **X. Eidesstattliche Erklärung**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift