

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kinetik regulatorischer T-Zellen in der murinen Schwangerschaft

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Catharina Thüre

aus Berlin

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. rer. nat. A. C. Zenclussen

2. Prof. Dr. med. D. Kabelitz

3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend

Datum der Promotion:

22.03.2013

## **Abstract**

### **Einleitung und Zielsetzung**

Das Überleben des semi-allogenetischen Feten in der Mutter ist zum Teil der immunmodulatorischen Kompetenz der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-regulatorischen Zellen (Treg) zuzuschreiben. Zunächst stellte sich die Frage, in welchem zeitlichen Ablauf nach der Insemination die Expansion der Treg in unterschiedlichen Geweben vonstatten geht. Weiterhin wurde untersucht, ob diese Treg spezifisch für die paternalen Antigene gebildet wurden, oder die Expansion einen hormonellen Hintergrund aufweist. Darüber hinaus wurden potentielle Treg-vermittelte protektive Mechanismen begutachtet. Zusätzlich wurde aufgezeigt, an welcher Stelle paternale Antigene auf maternale Immunzellen treffen, um die Treg Expansion zu triggern.

### **Methodik**

Es wurden sowohl Abort- als auch normal-schwangere Kombinationen gebildet. Die Tiere wurden zu verschiedenen Schwangerschaftszeitpunkten getötet und Gewebe für dieIDO- und Hormonbestimmung sowie Treg-Messung entnommen. Die Untersuchung der Antigen-spezifität erfolgte durch Impfung der Mäuse mit paternalen Antigenen oder Treg aus verschiedenen Schwangerschaftskombinationen. Scheinschwangere (durch vasktomierte Männchen oder mechanische Stimulation) wurden auf die Fähigkeit zur Treg Expansion untersucht. Die Blockade mit anti-IL-10- oder anti-TGF- $\beta$ -Antikörpern beleuchtet die protektiven Treg Mechanismen näher. Zusätzlich wurden BALB/c mit transgenen, GFP<sup>+</sup> Männchen verpaart.

### **Ergebnisse / Zusammenfassung**

Bereits direkt nach der Insemination kam es zu einem Anstieg der Treg zunächst im Mukus, gefolgt von den Lymphknoten und anderen Geweben der Tiere. In Korrelation dazu gab es schon früh den Nachweis paternaler GFP<sup>+</sup> Antigene in den mütterlichen Geweben. Bereits vor der Implantation zeigten sich Unterschiede zwischen den Tieren der Abort- und der normal-schwangeren Gruppe. Zwischen den Gruppen gab es weder signifikante Unterschiede derIDO- noch Hormonlevel. Der protektive Effekt des Treg Transfers zeigte sich v.a.beim gleichen MHC; Nebengruppen wurden mit geschützt. Anti-IL-10-Antikörper konnten den positiven Effekt im Gegensatz zu den TGF- $\beta$  Antikörpern aufheben. Bei mit vasktomierten Männchen verpaarten Mäusen kam es zu einer Expansion der Treg; bei den mechanisch stimulierten Weibchen nicht. Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass es bei einer erfolgreichen Schwangerschaft direkt nach der Insemination zu einem nicht durch Hormone gesteuerten Anstieg antigenspezifischer Treg kommt. Durch eine konstante Abgabe zuerst paternaler, dann fetaler Antigene in das mütterliche System kann die Treg Population aufrecht erhalten werden, um so bis zum Schwangerschaftsende eine Toleranz gegenüber dem Feten zu vermitteln.

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1. Zusammenfassung**

1.1 Einleitung und Zielsetzung

1.2 Materialien und Methoden

1.2.1 Tierversuche

1.2.2 Probenaufbereitung und Analyse der Daten

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Publikation 1

1.3.2 Publikation 2

1.3.3 Publikation 3

1.4 Diskussion

1.5 Literaturverzeichnis

## **2. Anteilserklärung**

## **3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

3.1 Kinetics of Regulatory T Cells during Murine Pregnancy  
(Publikation 1)

3.2 Mechanisms of Action of Regulatory T Cells Specific for Paternal  
Antigens during Pregnancy (Publikation 2)

3.3 The Persistence of Paternal Antigens in the Maternal Body is  
Involved in Regulatory T-Cell Expansion and Fetal-Maternal  
Tolerance in Murine Pregnancy (Publikation 3)

## **4. Curriculum Vitae**

## **5. Publikationsliste**

## **6. Selbständigkeitserklärung**

## **Danksagung**

## 1.1 Einleitung und Zielsetzung

Die erfolgreiche Schwangerschaft bei Säugetieren stellt ein noch immer nicht vollständig verstandenes Phänomen dar. Obwohl der Fetus Antigene väterlichen Ursprungs trägt, wird er in der Regel nicht durch das mütterliche Immunsystem abgewehrt, sondern gezielt geschützt.

Dieser scheinbare Widerspruch wurde bereits im Jahr 1953 durch Medawar et al. thematisiert<sup>1</sup>. Er führte als mögliche Gründe für den Erhalt der Frucht die natürliche Barriere zwischen Mutter und Kind in Form der Plazenta, die Unreife der Antigenität des Feten, sowie eine gewisse Inaktivierung des mütterlichen Immunsystems an. In den vergangenen Jahren ließen sich die Thesen in dieser Form nicht mehr aufrecht erhalten; so ist z.B. der bidirektionale Transfer von Zellen in mehreren Studien nachgewiesen<sup>2,3,4</sup>. Daraus leitet sich ab, dass eine transiente Toleranz gegenüber dem Feten ohne Kompromittierung des mütterlichen Immunsystems der Schlüssel für eine erfolgreiche Schwangerschaft zu sein scheint.

Dieses Modell der Toleranz gegenüber den fremden Antigenen wurde schon früh durch Untersuchungen gestützt. Sie belegten, dass schwangere Mäuse bzw. Multipara-Mäuse eine bessere Akzeptanz gegenüber Hauttransplantaten hatten, sofern diese Transplantate von Männchen desselben Stammes kamen wie jene, die sie schwängerten<sup>5</sup>. Entnahm man diesen schwangeren Weibchen wiederum Lymphozyten um sie in jungfräuliche Weibchen zu injizieren, akzeptierten diese ebenso verlängert die vorab beschriebenen Transplantate im Sinne einer spezifischen Toleranzvermittlung<sup>6</sup>.

Dieser Mechanismus ließ sich nicht nur auf Transplantate, sondern auch auf ein murines Abortmodell übertragen. Verpaart man CBA/J-Weibchen mit BALB/c-Männchen wird in der Regel eine normale Schwangerschaft ohne Aborte erreicht. Werden die gleichen Weibchen jedoch mit DBA/2J-Männchen verpaart, ergibt sich eine durchschnittliche Spontanabortrate von 20%. Bei der zuletzt genannten Kombination konnte jedoch ein Abort verhindert werden, wenn man die Weibchen zuvor mit BALB/c-Antigenen in Form von Lymphozyten impfte<sup>7</sup>.

Eine Schlüsselrolle dieser Toleranzvermittlung in der humanen Schwangerschaft schrieben u.a. Somerset et al.<sup>8</sup> den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Treg) zu. Es wurde beobachtet, dass Frauen in einer normalen Frühschwangerschaft ein erhöhtes Level dieser spezifischen Zellen im Vergleich zu Nicht-Schwangeren bzw. Frauen mit Spontanaborten aufwiesen. Durch das Vorhandensein von CTLA-4 und Foxp3 erfolgte der Nachweis, dass es sich nicht nur um aktivierte T-Zellen, sondern in der Tat um Zellen mit regulatorischer Funktion handelt<sup>8,9</sup>. Aluvihare et al. zeigten, dass durch eine Unterdrückung von CD25<sup>+</sup> Zellen die murine Schwangerschaft kompromittiert wurde<sup>10</sup>.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es nachzuweisen, dass in dem zuvor beschriebenen Abortmodell der CBA/J x DBA/2J-Kombination die Anzahl regulatorischer T-Zellen erniedrigt war. Die Weibchen konnten jedoch vom fetalen Abort bewahrt werden, wenn Treg normal-schwangerer Mäuse (CBA/J x BALB/c) injiziert wurden<sup>11</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein Treg Transfer aus nicht-verpaarten Mäusen wiederum die Abortrate nicht senken konnte. Daraus wurde durch unsere Arbeitsgruppe die These abgeleitet, dass die Treg zunächst durch Alloantigene stimuliert werden müssen, um diese protektiven Eigenschaften den Feten gegenüber zu besitzen. Weiterhin wird im Rahmen dieser Publikation gezeigt, dass die protektive Eigenschaft nur dann vermittelt werden konnte, wenn die Zellen zu Beginn der Schwangerschaft injiziert wurden (d0-2). Eine Injektion zum Zeitpunkt der Implantation (d5) konnte den positiven Effekt auf die Abortrate nicht mehr erreichen.

Dieser zeitliche Zusammenhang führte direkt zur Zielsetzung der ersten Publikation (Kinetics of Regulatory T Cells during murine Pregnancy; nachfolgend Publikation 1; P1); der Untersuchung der Treg Expansion während der murinen Schwangerschaft zum einen im zeitlichen Bezug zur Insemination, zum anderen auch der örtlichen Expansion durch die Untersuchung verschiedener Gewebe. Weitergehend wurde die Rolle von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in diesem Rahmen genauer betrachtet, da durch Mellor postuliert wurde, dass die protektive Funktion der Treg u.a. durch die Hochregulierung dieses Enzyms begründet wird<sup>12</sup>. Untersucht wurden auch eventuelle hormonelle Einflüsse auf die Treg Expansion durch die Bestimmung von Progesteron, Östradiol und Estron.

Die zweite Arbeit (Mechanisms of Action of Regulatory T Cells Specific for Paternal Antigens During Pregnancy, Publikation 2, P2) befasste sich hauptsächlich mit der Frage, ob die schwangerschaftsinduzierten Treg spezifisch für die paternalen Antigene gebildet wurden oder durch die hormonellen Veränderungen zur Expansion gebracht werden. Darüber hinaus wurden die Treg-vermittelten Schutzmechanismen genauer betrachtet; insbesondere die Rolle von IL-10 und TGF- $\beta$ . Die letzte im Rahmen dieser Dissertation vorgestellte Arbeit (The Persistence of Paternal Antigens in the Maternal Body is Involved in Regulatory T-Cell Expansion and Fetal-Maternal Tolerance in Murine Pregnancy, Publikation 3, P3) zeichnet mithilfe transgener GFP<sup>+</sup> (green fluorescent protein) Mäuse den Weg nach, an welchem Ort paternale Antigene auf maternale Immunzellen treffen, um so zu einer Expansion der Treg zu führen.

## 1.2 Materialien und Methoden

### 1.2.1 Tierversuche

Alle Tierversuche sind nach Zustimmung der zuständigen Behörden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt worden (Authorisierungsnummer LaGeSo 0070/03).

Für die Untersuchung der Expansion der Treg im Verlauf der Schwangerschaft (P1) wurde das bekannte Abortmodell der CBA/J (H2<sup>k</sup>) x DBA/2J (H2<sup>d</sup>) angewandt. Als Kontrolle dienten CBA/J-Weibchen, welche mit BALB/c (H2<sup>d</sup>) – Männchen verpaart wurden. Als weitere Kontrollen für normale Schwangerschaften wurden folgende Kombinationen mit eingeschlossen: CBA/J x C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) sowie BALB/c x C57BL/6 (n = 5-9 / Verpaarungsgruppe / Tag der Tötung).

Zweimal täglich erfolgte die Kontrolle der Weibchen auf Vaginalpfropfen (Plugs) als Zeichen der Insemination. Das Vorhandensein der Plugs definierte den d0 der Schwangerschaft. Die Sektion der Weibchen erfolgte am d0, 2, 5, 8, 10 oder 12 der Schwangerschaft. Die Abortrate definierte sich durch die Anzahl der gesund erscheinenden Feten im Vergleich zu den kleinen, nekrotischen, resorbierten Feten. Die Abortratenberechnung erfolgte für jedes Tier einzeln.

Blut wurde den anästhesierten Tieren vorab durch retrobulbäre Punktion entnommen; nach der Tötung erfolgte die Entnahme von Milz, Thymus, Lymphknoten, Uterus (bis d5 oder postpartal) oder Dezidua und Plazenta (d8-12). Die Gewebeproben wurden entweder in flüssigem Stickstoff gelagert oder für die Durchflusszytometrie bzw. Paraffineinbettung vorbereitet<sup>11</sup>. Darüber hinaus wurde eine vaginale Spülung zum Zwecke der Mukusgewinnung durchgeführt<sup>12</sup>.

Zur Bestimmung der Antigenspezifität der Treg (P2) wurden zusätzlich CBA/J (H2<sup>k</sup>)- Weibchen mit BALB/c (H2<sup>d</sup>) (n=15, normale Schwangerschaft), DBA/2J (H2<sup>d</sup>) (n=15, Abortmodell) oder C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) (n=5, normale Schwangerschaft) – Männchen verpaart. Die Weibchen der drei Gruppen wurden am d14 ihrer Schwangerschaft getötet, Treg aus gepoolten Thymus- und Milzzellen mit Hilfe von MACS (magnetic activated cell sorting) isoliert und am d0 der Schwangerschaft DBA/2J-verpaarten CBA/J-Weibchen intravenös (i.v.) verabreicht (n=6-9 pro vorab beschriebener Gruppe).

Zusätzlich wurden jungfräuliche CBA/J-Weibchen mit Splenozyten von BALB/c-Männchen intraperitoneal (i.p.) geimpft<sup>7</sup> und im Anschluss mit DBA/2J-Männchen verpaart (n=10). Die Mäuse wurden wiederum am d14 ihrer Schwangerschaft getötet, und die Treg wie oben beschrieben isoliert und erneut in CBA/J-Weibchen am d0 ihrer Schwangerschaft nach der Verpaarung mit DBA/2J-Mäusen i.v. appliziert (n=8). Als Kontrollen fungierten mit BALB/c – oder DBA/2J-verpaarte CBA/J-Weibchen, welchen ab d0 ihrer Schwangerschaft *phosphate*

*buffered saline* (PBS) i.v. injiziert wurde (n=10-11).

In einer dritten Versuchsreihe im Rahmen dieser Publikation wurden am d0 der Schwangerschaft DBA/2J-verpaarte CBA/J-Weibchen im Rahmen des Abortmodells Treg aus einer normalen Schwangerschaftskombination (CBA/J x DBA/2J) i.v. appliziert; zusätzlich jedoch noch mit 1mg anti-IL-10 monoklonalen Antikörpers (mAb, n=6) oder 1mg anti-TGF- $\beta$ -mAb (n=6) sowohl am Tag 0 als auch am d7 ihrer Schwangerschaft i.p. behandelt. Als Kontrolle wurde anstelle der Antikörper 1mg Immunglobulin (Ig G) aus Rattenserum wie vorab beschrieben appliziert (n=6). Alle Weibchen wurden am d14 ihrer Schwangerschaft getötet, die Abortraten dokumentiert und die Proben entsprechend wie in P1 beschrieben verarbeitet.

Zusätzlich wurden CBA/J – Weibchen zum Erreichen einer Scheinschwangerschaft entweder mit vasktomierten BALB/c-Männchen verpaart oder mechanisch stimuliert. Die Tötung zur oben beschriebenen Probengewinnung erfolgte am d0, 2 oder 5 (n=5 / Gruppe / d).

Um die Präsenz paternaler / fetaler Antigene im Gewebe der Mutter besser darstellen zu können (P3), wurden neben der bekannten CBA/J x BALB/c-Kombination zusätzlich BALB/c-Weibchen mit homozygoten, transgenen GFP (*green fluorescent protein*) – Männchen mit einem C57BL/6 - Hintergrund verpaart. Diese Weibchen wurden am d0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 oder 14 der Schwangerschaft getötet (n=5/Zeitpunkt), die Abortraten dokumentiert und die Proben wie oben beschrieben prozessiert. Zusätzlich wurde noch Lungen- und Lebergewebe entnommen bzw. Teile aller entnommenen Organe über Nacht in Paraformaldehyd gelagert, um sie am nächsten Tag einer mikroskopischen Analyse zu unterziehen.

### 1.2.2. Probenaufbereitung und Analyse der Daten (P1-P3)

Für die Durchflusszytometrie wurden die Gewebeproben wie bei Zenclussen et al. beschrieben prozessiert und mit CD4-, CD8-, CD25-(Milz) und Foxp3-Antikörpern gefärbt (P1-3)<sup>11</sup>. In P2 wurden die Proben zusätzlich mit anti-IL-10- und CD3-Antikörpern gefärbt. Ungefärbte Zellen und Zellen, die mit Isotypenkontrollen gefärbt wurden, fungierten als Kontrolle zum Gating und Einstellen der Quadranten. GFP<sup>+</sup>-Zellen wurden unter Zuhilfenahme von Zellen schwangerer BALB/c-Mäuse als Negativ- und schwangerer GFP<sup>+</sup> transgener C57BL/6 verpaarter Mäuse als Positivkontrollen identifiziert. Diese Zellen wurden durch die Färbung mit CD11c- und anti-MHC II-Antikörpern weiter differenziert (P2). Die Analyse erfolgte an einem FACScan-Durchflusszytometer der Firma BD.

Für die Foxp3-mRNA - Bestimmung wurden je 100 mg Uterus- (bis d5 der Schwangerschaft) oder Plazenta- und Deziduagewebe (ab d8) bzw.  $5 \times 10^5$  gefrorene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> - Zellen entnommen und gemäß Protokoll verarbeitet<sup>11</sup>. Der Nachweis erfolgte im ABI Prism 7700



Sequence Detection System (P1 und P2). Für P2 wurde auf diese Art zusätzlich TGF- $\beta$  bestimmt. Ebenso wurde mit dem Gewebe zurIDO-Bestimmung verfahren (P1). *SYBR-green-technology* wurde zur Amplifizierung und der i-Cycler von Bio-Rad zur Durchführung genutzt. Mit diesem Verfahren erfolgte auch die Bestimmung des neuropilin-1 (P2).  $\beta$ -Actin wurde jeweils als *housekeeping gene* genutzt; nur im Fall der GFP-DNA-Expressions-Bestimmung (P3) erfolgte die Nutzung von Apolipoprotein.

Der Nachweis GFP<sup>+</sup>-Zellen erfolgte zusätzlich über die Fluoreszenzmikroskopie; dazu wurden die zuvor in PFA eingelegten Gewebeproben zunächst am Vibratom geschnitten und dann entsprechend analysiert (P3).

Die Hormonbestimmung von Progesteron, Estradiol und Estron (P1 und P2) erfolgte im Plasma der Tiere via ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*); die dazu benutzten Kits stellte freundlicherweise kostenfrei die Firma DLC-Laboratories, Kanada, zur Verfügung.

Aufgrund der Tatsache, dass die Werte nicht normal verteilt waren, erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als Median, entweder als Boxplot oder als Darstellung einzelner Werte für jedes individuelle Tier<sup>14</sup>. Die Analyse erfolgte zur Berechnung der Signifikanz zwischen allen Gruppen mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test oder mittels Mann-Whitney-U-Test, bei dem die Gruppen paarweise miteinander verglichen wurden. Als statistisch signifikant wurde  $p \leq 0,05$  angesehen, wobei \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  darstellt (P1-P3).

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Kinetics of Regulatory T Cells during Murine Pregnancy (Publikation 1)

Eine Übereinstimmung mit früheren Studien konnte für die am d10 und 12 der Schwangerschaft analysierten Abortraten gezeigt werden<sup>11</sup>. Es ergab sich hierbei ein Median von 0% bei der CBA/J x BALB/c Verpaarung sowie eine Abortrate von etwa 19% bei den DBA/2J-verpaarten CBA/J-Mäusen (d12). Bei den Kontrollen zeigte sich ebenfalls eine Abortrate von 0% bei den CBA/J x C57BL/6-Mäusen. Interessanterweise zeigten die C57BL/6-verpaarten BALB/c-Mäuse im Rahmen dieses Experiments mit 18% am d12 der Schwangerschaft eine vergleichbare Rate wie im Abortmodell.

In Korrelation zu diesen Daten konnte die Expansion regulatorischer T-Zellen gesetzt werden.

Bei den normal-schwangeren Mäusen im Vergleich zu jungfräulichen Tieren wurde diese bereits ab dem d2 der Schwangerschaft (also noch vor der Implantation um den d5) nachgewiesen und zwar in allen untersuchten Geweben via Durchflusszytometrie. Zusätzlich konnte ein ähnlicher Trend im Uterusgewebe mit dem Nachweis der Foxp3-mRNA zu definierten Zeitpunkten festgestellt werden. Diese Expansion konnte bei Mäusen der Abortgruppe nicht nachgewiesen werden. Die ebenfalls durch hohe Abortraten aufgefallene BALB/c x C57BL/6 – Gruppe zeigte ebenfalls keinen Anstieg der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellen. Im Gegenzug dazu wurde eben diese Expansion vom frühen Beginn der Schwangerschaft auch bei den CBA/J x C57BL/6 - Mäusen mit einer 0%-Abortrate gesehen.

Zusammenfassend gehen auch in verschiedenen Paarungskombinationen hohe Treg-Level mit niedrigen Abortraten und umgekehrt einher, wobei die Expansion schon vor der Implantation zu beobachten ist. Die darüber hinaus untersuchten Level der Schwangerschaftshormone Progesteron, Östradiol und Estron konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den normal-schwangeren und den Mäusen der Abortgruppe zeigen. Teilweise wiesen die Tiere der Gruppen mit erhöhten Aborten sogar höhere Progesteronlevel auf.

Zusätzlich wurde die IDO mRNA untersucht, da vermutet wird, dass Treg durch die IDO - Induktion protektiv im Rahmen der Schwangerschaft wirken können<sup>12,15</sup>. In den untersuchten Geweben des Uterus bzw der Dezidua und der Plazenta konnte IDO mRNA nur in der Plazenta (d8, d10, d12) nachgewiesen werden, also weit nach dem Nachweis der unterschiedlichen Treg Level der Gruppen. Es konnte trotz unterschiedlichen Schwangerschaftsausgangs kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden.

### 1.3.2 Mechanisms of Action of Regulatory T Cells Specific for Paternal Antigens during Pregnancy (Publikation 2)

In der ersten Versuchsreihe konnte in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen<sup>11</sup> gezeigt werden, dass Mäuse der Abortgruppe durch die Impfung mit Treg aus der CBA/J x BALB/c Verpaarung auf eine Abortrate von ebenfalls 0% im Median gebracht werden konnten. Die Zellen aus der CBA/J x DBA/2J – Verpaarung führten dagegen nicht zu einem Erhalt der Feten; die Abortrate betrug hier 15%. Ebenso wenig konnten die Treg aus der CBA/J x C57BL/6 Kombination die Abortrate entscheidend beeinflussen, sie lag hier bei 10%. Dies ist insofern beachtlich, als dass die Kombination an sich ebenso wie die CBA/J x BALB/c - Verpaarung eine Abortrate von 0% aufweisen. Nur konnte die protektive Wirkung der Tregs nicht in das Abortmodell übertragen werden.

Die Gruppe von CBA/J-Weibchen, die mit DBA/2J-Männchen verpaart und vorab mit Splenozyten aus BALB/c-Männchen geimpft wurden, wies in Übereinstimmung mit älteren Studien<sup>7</sup> am d14 eine Abortrate von 0% auf. Es zeigten sich gestiegene Level funktionaler Treg, belegt u.a. durch eine gestiegene IL-10-Produktion in der Milz, gesteigerte TGF- $\beta$ -Level der Plazenta sowie gesteigerte deziduale neuropilin-1-Level. Impfte man diese Treg wiederum in eine Abortgruppe, so konnte man auch diese Feten vor der Resorption bewahren.

Um die Bedeutung der Exposition gegenüber paternalen Antigenen weiterhin zu ermitteln, wurden CBA/J-Weibchen mit vasktomierten Männchen verpaart, welche zwar Samenflüssigkeit, jedoch kein Spermium abgeben. Im Mukus sowie den Lymphknoten dieser Weibchen kam es ebenso wie bei den normal verpaarten Tieren zu einem Anstieg der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Treg. Dieser Effekt ließ sich nicht nachahmen, wenn eine Scheinschwangerschaft durch mechanische Stimulation vorgenommen wurde. Zwar ließ sich hier durch einen vergrößerten, stark perfundierten Uterus die Scheinschwangerschaft zeigen, jedoch hatte dies keinen Einfluss auf die Treg-Level der untersuchten Gewebe.

Um die protektive Wirkung der Treg in diesem Kontext besser zu beleuchten, wurden nach vorher beschriebener Art erneut Treg aus normal-schwangeren Mäusen am d0 in Weibchen der Abort-Verpaarung mit DBA/2J-Männchen injiziert. Zusätzlich wurden zum einen neutralisierende anti-IL-10-Antikörper und zum anderen anti-TGF- $\beta$  injiziert. In der ersten Gruppe wurde der zuvor protektive Effekt der Treg aufgehoben; die Blockade des TGF- $\beta$  konnte diesen Effekt nicht in Gänze blockieren; die Abortraten entsprachen hier dem Niveau der Kontrollgruppe.

### 1.3.3 The Persistence of Paternal Antigens in the Maternal Body is Involved in Regulatory T-Cell Expansion and Fetal-Maternal Tolerance in Murine Pregnancy (Publikation 3)

Es konnte zunächst nochmals bestätigt werden, dass es in der normal-schwangeren-Gruppe im Vergleich zu der Abort-Gruppe bereits vor der Implantation am d5 zu einem Anstieg der Treg in den untersuchten Geweben kommt; der Stimulus also direkt in den paternalen Antigenen und nicht allein durch die paternalen Anteile der Feten kommt. Um diesen Weg zu visualisieren, wurden transgene GFP<sup>+</sup> Männchen zur Paarung eingesetzt. Bereits kurz nach der Insemination konnten GFP<sup>+</sup> - Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop zunächst in Lymphknoten, später auch in den anderen untersuchten Geweben der Mutter nachgewiesen werden, sowohl vor als auch nach der Implantation bis hin zum d14. Einige der im vaginalen Mukus gewonnenen GFP<sup>+</sup>- Zellen erwiesen sich in der Durchflusszytometrie als MHC II<sup>+</sup> sowie teilweise als zusätzlich CD11c<sup>+</sup>. Zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft konnten GFP<sup>+</sup>- Zellen direkt in der äußeren Plazenta nachgewiesen werden, dies kann in Übereinstimmung mit der fortwährenden Expansion von Treg im Verlauf einer erfolgreichen Schwangerschaft als möglicher Hinweis auf die fortwährende Abgabe von Alloantigenen gesehen werden<sup>3</sup>.

## 1.4 Diskussion

Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen sowohl in der humanen als auch der murinen Schwangerschaft konnte bereits durch mehrere Studien belegt werden<sup>8,9,10</sup>. Es zeigte sich in den entsprechenden Mausmodellen eine Korrelation zwischen einer erfolgreichen Schwangerschaft und dem erhöhten Level der Treg. Die protektive Wirkung für die Feten ließ sich durch Transfer von spezifischen Treg in der Schwangerschaft auch bei Tieren des Abortmodells erzielen<sup>11</sup>. Diese Wirkung ergab sich jedoch nur, wenn der Transfer noch vor der Implantation in der frühen Schwangerschaft stattfand. Im Rahmen der Publikation 1 konnte zum ersten Mal nachvollzogen werden, dass es bei Mäusen bereits kurz nach der Insemination zu einer Änderung der Treg Anzahl in verschiedenen, immunologisch aktiven Geweben kommt. Noch vor der Implantation gab es bereits signifikante Unterschiede zwischen den Mäusen der Gruppe, die eine Abortrate von 0% aufweist (CBA/J x BALB/c), sowie jener, bei denen eine Abortrate von 19% zu verzeichnen war (CBA/J x DBA2J). Diese Abortgruppe wurde gekennzeichnet durch eine fehlende Expansion der Treg bereits in diesem frühen Stadium der Schwangerschaft. Untermauert wurde dies noch dadurch, dass die mitgeführte BALB/c x C57BL/6-Gruppe in unseren Händen auch eine erhöhte Abortrate von etwa 18% aufwies. In den Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass es bei diesen Tieren ebenfalls nicht zu einer Expansion der Treg kam. Es besteht also eine Korrelation zwischen der frühen Expansion und dem späteren Ausgang der Schwangerschaft. Diese Tatsache könnte von klinischer Bedeutung für einen möglichen prädiktiven Test sein, da man bei humanen Spontanaborten ebenfalls keine erhöhten Treg-Level im Vergleich zu Normalschwangeren fand<sup>9</sup>. Der frühe Zeitpunkt der Expansion ist hier interessant. Bisher gut dokumentiert ist in der murinen und humanen Schwangerschaft das Auftreten fetaler Antigene im Organismus der Mutter und umgekehrt im Sinne eines Mikrochimärismus<sup>2,16</sup>. Die konstante Präsentation fetaler Antigene im mütterlichen Kreislauf könnte so zu einer fortwährenden Stimulation der Expansion einer spezifischen Treg Population führen. Im Rahmen der Publikation 3 versuchten wir, diesen Weg mit Hilfe transgener GFP<sup>+</sup>-Männchen zu visualisieren. Es ist bekannt, dass nach der Implantation die Plazenta kontinuierlich Alloantigene abgibt<sup>3</sup>. Auch wir konnten zeigen, dass eher die äußeren Zellen der Plazenta, also jene, die eine erhöhte Chance zur Migration aufweisen, grün waren. Passend dazu sanken sieben Tage *post partum* die erhöhten Treg-Level wieder auf das Niveau der nicht-verpaarten Tiere; dies kann als Reaktion auf das Fehlen einer konstanten Antigenpräsentation nach der Geburt verstanden werden. Vor der Implantation wäre dieser Effekt nur durch die Reaktion auf die paternalen Antigene möglich. Interessanterweise fanden wir hier ebenfalls

schon kurz nach der Insemination paternale GFP<sup>+</sup>- Antigene sowohl im Mukus als auch den Lymphknoten der Weibchen. Ein Teil dieser gefundenen „grünen“ Zellen war MHC II<sup>+</sup>, davon wiederum ein Teil CD11c<sup>+</sup>. Dies belegt das Vorhandensein sowohl paternaler, als auch maternaler APC`s. Die Antigenpräsentation erscheint so auf dem direkten als auch dem indirekten Weg schon kurz nach der Insemination möglich<sup>17</sup>. Schon 1967 konnten Reid und Blackwell nachweisen, dass Teile markierten Spermias phagozytiert und in die regionären Lymphknoten transportiert wurden<sup>18</sup>. Andere Studien konnten neben Mäusen auch bei Schweinen bereits belegen, dass Sperma oder die Samenflüssigkeit allein eine direkte Immunantwort der Mutter auslösen kann<sup>19,20</sup>.

Robertson et al. Demonstrieren darüber hinaus, dass diese Form der Immunantwort mit konsekutiv verlängerter Toleranz gegenüber männlichen Antigenen (in Rahmen der Studie in Form von Tumorzellen) auch dann funktioniert, wenn den Weibchen die Eileiter legiert wurden; es also weder zu einer Befruchtung geschweige denn Einnistung kommen konnte<sup>20</sup>.

Durch Treg induziertes IDO wurde im Rahmen humaner Schwangerschaften mit dafür verantwortlich gemacht, die F1 vor einem Angriff des mütterlichen Immunsystems zu schützen und so entscheidend für den Schwangerschaftsausgang zu sein<sup>12</sup>. In der P1 können wir in Übereinstimmung mit anderen Studien<sup>21</sup> demonstrieren, dass IDO erst ab d8 in der Plazenta nachweisbar ist; nicht jedoch schon im Uterus vor der Implantation. Treg werden jedoch schon früh in der Schwangerschaft für die Schaffung eines toleranten Mikromilieus gebraucht, um die Implantation zu ermöglichen<sup>22</sup>. Außerdem zeigen IDO - defiziente Mäuse normale Schwangerschaften<sup>23</sup>, währenddessen Tiere mit niedrigen Treg-Leveln erhöhte Abortraten aufweisen<sup>10,11</sup>. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der protektive Effekt der Treg in Mäusen auf einer IDO - Hochregulierung beruht.

Hormonelle Einflüsse auf die Abortrate durch eine insuffiziente Hormonproduktion (v.a. des Progesterons), wie es in einigen Arbeiten vorgeschlagen wurde<sup>24</sup>, konnten wir in unseren Messungen nicht bestätigen. Die Mäuse der Abortgruppe zeigten teilweise sogar leicht erhöhte Werte des Progesterons. Daher erscheint es auch nicht als wahrscheinlich, dass die Treg-Population vorab existiert und nur durch Hormonänderungen im Rahmen der Schwangerschaft zur Expansion gebracht wird. Die Idee liegt nahe, dass es sich um spezifisch für paternale oder fetale Antigene gebildete Zellen handelt. Im Rahmen der P2 konnte erneut belegt werden, dass Treg von normal-schwangeren Mäusen die F1 der Abortgruppe vor der Abstoßung bewahren können<sup>11</sup>. Jedoch konnten wir belegen, dass dies nur funktioniert, wenn es sich wie bei den DBA/2J – sowie den BALB/c – Männchen um Mäuse handelt, die den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) H2<sup>d</sup> besitzen. Es besteht also Übereinstimmung

(Match) im MHC und ein Mismatch in den Untereinheiten (*minor antigens*). Die Treg, die der CBA/J x C57BL/6 - Verpaarung entstammen, also einer Kombination, die eine Abortrate von ebenfalls 0%, jedoch den MHC H2<sup>b</sup> bei den Männchen aufweist, konnten die Feten der Abortgruppe nicht vor der Abstoßung bewahren. Da alle eingebrachten Treg eine ähnliche Fähigkeit zur Expansion zeigten, jedoch nur die der kreuzprotektiven, allogenen Kombination die H2<sup>k</sup> H2<sup>d</sup> - F1 retteten, ist dies ein Hinweis darauf, dass Treg spezifisch durch väterliche Antigene direkt (in diesem Fall H2<sup>d</sup> und die entsprechenden Untergruppen) oder an der feto-maternalen Grenzfläche aktiviert werden müssen, um die beschriebene protektive Wirkung zu entfalten. Es würde sich hierbei um eine sogenannte vermittelte Immunsuppression (*linked immunosuppression*) handeln, da die im Kontakt zu den BALB/c-Männchen gebildeten Treg die spezifische anti-DBA/2J-Antwort der CBA/J-Weibchen unterbinden können. Impfte man Weibchen vor der Verpaarung direkt mit BALB/c-Antigenen in Form von Splenozyten, so erhielt man auch hier funktionale Treg, u.a. charakterisiert durch entsprechend gesteigerte Level an IL-10, TGF- $\beta$  und neuropilin-1. Die Wirkung zeigte sich ebenso *in vivo*; nicht nur konnte die CBA/J x DBA/2J - F1 vor dem Untergang bewahrt sondern auch diese Protektion durch den Transfer von Treg dieser Gruppe in eine weitere Abortgruppe übertragen werden. Zusammenfassend lässt sich also belegen, dass die Auseinandersetzung mit BALB/c - Antigenen zu funktional aktiven Treg führt, die wiederum die Feten vor der mütterlichen spezifischen anti - DBA/2J - Antwort schützen können.

Untermauert wurde die Wichtigkeit der spezifischen Stimulation der Treg dadurch, dass es bei mechanischer Induktion der Scheinschwangerschaft im Gegensatz zu den mit vasktomierten Männchen verpaarten Weibchen nicht zu einer Expansion der Treg kam.

Wie beschrieben, konnten nach Impfung der Abortgruppe mit Treg gesteigerte IL-10-Level beobachtet werden. Es wurde bereits vorab vermutet, dass Treg dieses Zytokin sezernieren und so teilweise zur Schaffung eines toleranten Mikromilieus beitragen<sup>22</sup>. Das deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass bei zeitgleicher Injektion der Treg zusammen mit anti-IL-10-Antikörpern die Abortrate nicht gesenkt werden konnte. IL-10 spielt nicht nur bei der Akzeptanz gegenüber fetalen Allogenen eine wichtige Rolle, sondern u.a. auch beim Treg vermitteltem Schutz gegenüber Autoimmunerkrankungen und Allergien<sup>25,26,27</sup>. Dieses Zytokin vermittelt außerdem eine Art positiver Feedbackschleife zwischen Treg und dendritischen Zellen, die durch die Treg im unreifen Stadium gehalten werden, was wiederum zu einer vermehrten Bildung von Treg führt. Dies sorgt dafür, dass die dendritischen Zellen die Alloantigene zwar aufnehmen und prozessieren können, nicht jedoch eine Immunreaktion gegen diese Alloantigene vermitteln<sup>28,29,30,31</sup>. Durch die gezeigte dauerhafte Stimulation der Treg durch eine konstante

Alloantigen-Abgabe an der feto-maternalen Grenzfläche könnte über diesen Weg zusätzlich eine protektive Treg-Population bis zur Geburt aufrecht erhalten werden.

Da die zeitgleiche Injektion von anti-TGF- $\beta$ -Antikörpern mit Treg-Zellen in Abortmäuse die protektive Wirkung im Gegensatz zum anti-IL-10 nicht in Gänze aufheben konnte, scheint es sich hier ähnlich wie bei der Unterdrückung intestinaler Entzündungen durch Treg<sup>32</sup> nicht um ein absolut notwendiges Zytokin zu handeln.

Zusammenfassend konnten wir erstmalig die bereits frühzeitige Expansion der Treg direkt nach der Insemination in verschiedenen mütterlichen Geweben zeigen und einen fehlenden Anstieg der Treg-Level noch vor der Implantation in Zusammenhang mit einer erhöhten Abortrate setzen. So konnte in diesem zeitlichen Kontext belegt werden, dass die paternalen Antigene für die Expansion verantwortlich zu machen sind. Unter Zuhilfenahme transgener GFP<sup>+</sup>-Mäuse demonstrierten wir, dass paternale Antigene sowohl auf dem direkten, als auch indirekten Weg vom mütterlichen Immunsystem prozessiert werden können, um so die Bildung einer protektiven Treg-Population zu initiieren. Wir konnten aufzeigen, dass diese Protektion antigenspezifisch ist, und für unser Abortmodell nicht der hormonellen Beeinflussung unterliegt. Im Rahmen dieses Modells konnten wir belegen, dassIDO im Gegensatz zu IL-10 keine entscheidende Rolle bei der Schaffung eines transienten toleranten Mikromilieus spielt.

So betonen diese Studien die Bedeutung der frühen Auseinandersetzung des mütterlichen Immunsystems mit den paternalen Antigenen, um später die fetalen Antigene zwar als fremd, aber nicht gefährlich zu erkennen, um so zu einer erfolgreichen Schwangerschaft zu führen.



## 1.5 Literaturverzeichnis

- 1 Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953; 7:320-338.
- 2 Khosrotehrani K, Johnson KL, Guégan S, Stroh H, Bianchi DW. Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2005; 66(1):1-12.
- 3 Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online.* 2006 Nov;13(5):680-6.
- 4 Billington WD. The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 1992;6:417-438.
- 5 Breyere EJ, Barrett MK. *J Natl Cancer Inst.* "Tolerance" in postpartum female mice induced by strain-specific matings. 1960 Mar;24:699-705.
- 6 Smith RN, Powell AE. *J Exp Med.* The adoptive transfer of pregnancy-induced unresponsiveness to male skin grafts with thymus-dependent cells. 1977 Sep 1;146(3):899-904.
- 7 Chaouat G, Kiger N, Wegmann TG. Vaccination against spontaneous abortion in mice. *J Reprod Immunol.* 1983 Nov;5(6):389-92.
- 8 Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004 May;112(1):38-43.
- 9 Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 2004 May;10(5):347-53.
- 10 Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004 Mar;5(3):266-71. Epub 2004 Feb 1.
- 11 Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 2005 Mar;166(3):811-22.
- 12 Mellor AL, Munn D. Policing pregnancy: Tregs help keep the peace. *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):563-5.
- 13 Blois S, Zenclussen AC, Roux ME, et al. Asymmetric antibodies (AAb) in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol.* 2004 Dec;64(1-2):31-43.

- 14 Lange S, Bender R. Median oder Mittelwert? *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132 Suppl 1:e1-2.
- 15 Miwa N, Hayakawa S, Miyazaki S, et al. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod.* 2005 Dec;11(12):865-70.
- 16 Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood.* 1999 Mar 15;93(6):2033-7.
- 17 Root-Bernstein RS, DeWitt SH. Semen alloantigens and lymphocytotoxic antibodies in AIDS and ICL. *Genetica.* 1995;95(1-3):133-56.
- 18 Reid BL, Blackwell PM. Evidence for the possibility of nuclear uptake of polymerised deoxyribonucleic acid of sperm phagocytosed by macrophages. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1967 Jun;45(3):323-6.
- 19 Bischof RJ, Lee CS, Brandon MR, Meeusen E. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *J Reprod Immunol.* 1994 Mar;26(2):131-46.
- 20 Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlström AC, Care AS. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod.* 2009 May;80(5):1036-45.
- 21 Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998 Aug 21;281(5380):1191-3.
- 22 Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol.* 2006 Jan;36(1):82-94.
- 23 Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol.* 2004 Apr;61(2):67-77.
- 24 Erlebacher A, Zhang D, Parlow AF, Glimcher LH. Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(1):39-48.
- 25 Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003 Apr 15;170(8):3939-43.
- 26 Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J*

- Exp Med. 1999 Oct 4;190(7):995-1004.
- 27 Ostroukhova M, Ray A. CD25<sup>+</sup> T cells and regulation of allergen-induced responses. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Jan;5(1):35-41.
- 28 Sato K, Yamashita N, Matsuyama T. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol.* 2002 Feb;215(2):186-94.
- 29 Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1634-42.
- 30 Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003 May;18(5):605-17.
- 31 Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004 Apr 15;172(8):4676-80.
- 32 Kullberg MC, Hay V, Cheever AW, et al. TGF-beta1 production by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur J Immunol.* 2005 Oct;35(10):2886-95.

## **2. Anteilserklärung**

**Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy.** Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A, Langwisch S, Schulte-Wrede U, Teles A, Paeschke S, Volk HD, Zenclussen AC. Am J Reprod Immunol. 2007 Dec; 58(6):514-23.

**Impact Factor: 2,130 (2007)**

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der Tierversuche, Probengewinnung, Planung und Durchführung der Methoden (außer Real Time – PCR für IDO und foxp3), statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Hauptarbeit am Manuskript. **Anteil: 80%**

**Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy.** Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, Thuere C, Wollenberg I, Yagita H, Volk HD, Zenclussen AC. Obstet Gynecol. 2007 Nov; 110(5):1137-45.

**Impact Factor: 4,282 (2007)**

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der Tierversuche für die mechanisch induzierte sowie durch Verpaarung mit vasektomierten Männchen herbei geführte Scheinschwangerschaft incl. Probengewinnung, Verarbeitung und Auswertung der Ergebnisse. Messung der Hormonspiegel, Unterstützung bei den Tierversuchen (insbesondere bei den mitgeführten Kontrollen) sowie Mitarbeit am Manuskript. **Anteil: 25 %**

**The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy.** Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, Wafula PO, Fest S, Teles A, Leber A, Casalis PA, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC. Am J Reprod Immunol. 2010 Mar 1;63(3):200-8. **(geteilte Erstautorenschaft)**

**Impact Factor: 2,451 (2010)**

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der Tierversuche (exclusive der GFP<sup>+</sup>-Mäuse) incl. Probengewinnung, Verarbeitung und Auswertung der Ergebnisse. Messung von MHC II und CD11c mit Hilfe der Durchflusszytometrie, Unterstützung bei den weiteren Tierversuchen sowie Mitarbeit am Manuskript. **Anteil: 45%**

Prof. Dr. Ana Claudia Zenclussen  
(Doktormutter)

Catharina Thüre  
(Doktorandin)

#### **4. Curriculum vitae**

**Catharina Thüre**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 5. Publikationsliste

### Publikationen

- 07/2007 **Murine Pre-Eclampsia Induced by Unspecific Activation of the Immune System Correlates with Alterations in the eNOS and AT1 Receptor Expression in the Kidneys and Placenta.** Schmid M, Sollwedel A, **Thuere C**, Wafula PO, Zenclussen ML, Mueller DN, Gratze P, Woiciechowsky C, Volk HD, Zenclussen AC. Placenta. 2007 Jul; 28(7):688-700. **(geteilte Erstautorenschaft)**
- 11/2007 **Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy.** Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, Sollwedel A, **Thuere C**, Wollenberg I, Yagita H, Volk HD, Zenclussen AC. Obstet Gynecol. 2007 Nov; 110(5):1137-45.
- 12/2007 **Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy.** **Thuere C**, Zenclussen ML, Schumacher A, Langwisch S, Schulte-Wrede U, Teles A, Paeschke S, Volk HD, Zenclussen AC. Am J Reprod Immunol. 2007 Dec; 58(6):514-23.
- 03/2010 **The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy.** Zenclussen ML, **Thuere C**, Ahmad N, Wafula PO, Fest S, Teles A, Leber A, Casalis PA, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC. Am J Reprod Immunol. 2010 Mar 1;63(3):200-8. **(geteilte Erstautorenschaft)**

### Kongressbeiträge

- 09/2005 **Pregnancy-protective Treg are antigen-specific.** Schumacher A, Wollenberg I, Bertoja AZ, **Thuere C**, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Leber J, Wafula P, Volk HD, Zenclussen AC. 3<sup>rd</sup> ESRADI Reproductive Immunology Congress, Colchester, England (11.-15.9.05) **Poster**
- 02/2006 **Increased levels of foxp3+ cells in vaginal mucus from normal pregnant mice suggest early tolerance mechanisms during pregnancy.** **Thuere C**, Leber J, Schumacher A, Zenclussen ML, Volk HD, Zenclussen AC. 7<sup>th</sup> International Conference on New trends in immunosuppression and immunotherapy, Berlin (16.-19.02.06) **Poster**

- 06/2006 **Increased numbers of foxp3<sup>+</sup> cells in vaginal mucus from normal pregnant mice suggest early antigen-specific tolerance mechanism during pregnancy.** **Thuere C**, Leber J, Schumacher A, Zenclussen ML, Volk HD, Zenclussen AC. 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology, Nashville, USA (15.-17.06.06) **Vortrag**
- 07/2006 **Pregnancy-protective regulatory T cells (Treg) act in an antigen-specific manner.** Schumacher A, Wollenberg I, Bertoja AZ, **Thuere C**, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Leber J, Wafula PO, Volk HD, Zenclussen AC. 4<sup>th</sup> ESRADI Reproductive Immunology Congress, Graz, Österreich (5.-9.06.06) **Vortrag**
- 07/2006 **Paternal Alloantigens are recognized by the direct pathway in maternal tissue throughout the whole murine pregnancy beginning on day 0.** Zenclussen ML, Wafula PO, **Thuere C**, Casalis P, Fest S, Bechmann I, Priller J, Volk HD, Zenclussen AC. 4<sup>th</sup> ESRADI Reproductive Immunology congress, Graz, Österreich (5.-9.06.06) **Poster**
- 09/2006 **Existence of early antigen-specific tolerance mechanisms are suggested by increased levels of foxp3<sup>+</sup> cells in vaginal mucus from normal pregnant mice.** **Thuere C**, Leber J, Schumacher A, Zenclussen ML, Volk HD, Zenclussen AC. 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Paris, Frankreich (6.-9.09.06) **Vortrag**
- 09/2006 **Mice with pre-eclampsia like symptoms present increased levels of Enos in kidneys and at the fetal-maternal interface.** Sollwedel A, Schmid M, **Thuere C**, Zenclussen ML, Wafula PO, Volk HD, Zenclussen AC. 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Paris, Frankreich (6.-9.09.06) **Vortrag**
- 09/2006 **Presence of paternal / fetal antigens in pregnant mice.** Zenclussen ML, Wafula PO, Casalis P, Fest S, **Thuere C**, Bechmann I, Volk HD, Priller J, Zenclussen AC. 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Paris, Frankreich (6.- 9.09.06) **Poster**
- 04/2007 **Regulatory T-Cells in Pregnancy.** Zenclussen AC, Rau J, **Thuere C**, Schumacher A, Zimmermann G, Volk HD. European Congress of Endocrinology, Budapest, Ungarn (28.04.-02.05.07) **Poster**
- 04/2007 **Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during murine pregnancy is not driven by pregnancy-associated hormones.** Schumacher A, **Thuere C**, Rau J, Volk HD, Zenclussen AC. European Congress of Endocrinology, Budapest, Ungarn (28.04.-02.05.07) **Poster**

## **6. Selbständigkeitserklärung**

„Ich, Catharina Thüre, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kinetik regulatorischer T-Zellen in der murinen Schwangerschaft“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

**Datum**

**Unterschrift**



## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Ana Zenclussen, welche für mich für ein absolutes Vorbild und Mentorin im wissenschaftlichen Bereich wurde. Sie stand nicht nur jederzeit (incl. Wochenenden, Urlaub, etc) bei allen möglichen Arten von Problemen zur Verfügung, sondern schaffte darüber hinaus, aus ihrem aus vielen verschiedenen Ländern und Fachrichtungen stammendem Team eine richtige Einheit zusammen zu schweißen. So wurde ihre Leidenschaft für ihre Arbeit ansteckend. Gemeinsam mit so vielen tollen Menschen, wie Maria Laura Zenclussen, André Sollwedel, Anne Leber, Ana Teles, Anna Zambon-Bertoja, Pablo Casalis, Paul Wafula, Steffen Paeschke und vielen anderen entstand eine positive, produktive und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die einen immer wieder auffing, wenn man einen Dämpfer bekam, sei es, weil sich die Mäuse nicht paaren wollten, Ergebnisse nicht wie erhofft ausfielen oder Paper zunächst nicht akzeptiert werden wollten. Alle arbeiteten zusammen an einem Ziel: dem nächsten Vortrag, der nächsten Veröffentlichung, der Deadline für eine Diplom- oder Doktorarbeit, auch wenn es ungezählte abendliche oder wochenendliche Überstunden bedeutete. Ich bin sehr dankbar, dass sie mir die Möglichkeit einräumte, Ergebnisse meiner Arbeit nicht nur in der Fachpresse zu publizieren, sondern auch auf internationalen Kongressen u.a. in den USA und Frankreich vorzustellen. So wurde dieses ganze Unterfangen der Doktorarbeit eine wahnsinnig interessante Zeit, die ich nicht missen möchte, wobei das eigentlich Anliegen immer weiter aufgrund meines Einstiegs in das Berufsleben in den Hintergrund gedrängt wurde. Aber auch hier zeigte sich Prof. Zenclussens Stärke, einen nicht im Stich zu lassen, sondern immer wieder erneut zu motivieren, die Arbeit doch noch zu einem Ende zu führen.

A. Leber möchte ich nochmals gesondert für das Korrekturlesen danken. Dank hierfür auch Barbara Klepka, einer weiteren, mich auf meinem Lebensweg inspirierenden Frau, die mich lehrte, immer an sich und seine Träume zu glauben getreu dem Motto „Vorwärts bis zum Sieg“. Dank gilt auch meiner Familie für ihre vorbehaltlose Liebe und Unterstützung sowie meinem Bruder Markus Thüre für seine finanzielle Hilfe während des Studiums, ohne die ich nicht die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gehabt hätte.

Schlussendlich möchte ich mich bei all meinen Freunden und insbesondere meinem geliebten Partner für ihr Verständnis bedanken, dass meine freie Zeit vor allen vom Paarungswillen meiner Mäuse abhing; viele Verabredungen kurzfristig abgesagt werden mussten oder gar nicht erst zustande kamen. Marie, Judith, Jacqueline, beide Julianes; Ihr wart immer für mich da, wenn ich mal wieder aufgebaut, motiviert oder abgelenkt werden musste und habt ein gutes Gespür dafür bewiesen, wann was angebracht war.