

## ***1. Das Th1/Th2 Paradigma in der Reproduktionsimmunologie***

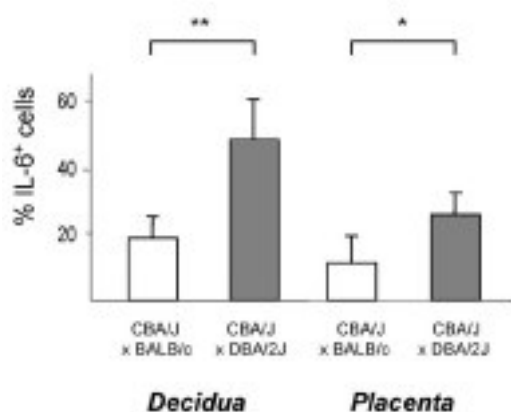
Das Milieu, in dem die Toleranz- bzw. Abstoßungsreaktionen stattfinden, scheint eine entscheidende Rolle zu spielen. Mit der Balance von Th1- und Th2-Zytokinen während der Schwangerschaft haben sich viele Reproduktionsimmunologen in den letzten zehn Jahren intensiv beschäftigt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass anti-inflammatorische Th2-Zytokine (insbesondere Interleukin- (IL)-4 und IL-10) schwangerschaftsprotective Eigenschaften besitzen und bei normalverlaufender Schwangerschaft dominieren (Lin *et al.* 1993, Wegmann *et al.* 1993, Chaouat *et al.* 1995, Joachim *et al.* 2003). Th1-Zytokine dagegen sind die dominierende Population bei Abortfällen und können zur plazentaren Nekrose sowie zur Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen und somit zu einer Abstoßungsreaktion führen. Zu diesen Th1-Zytokinen werden Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1, IL-2, IL-6 und Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gerechnet (Chaouat *et al.* 1990, Lin *et al.* 1993, Arck *et al.* 1995, Raghupathy *et al.* 1997 und 1999, Joachim *et al.* 2001, Zenclussen *et al.* 2000, 2001a, 2002a, Fest *et al.* 2002, Zenclussen *et al.* 2003).

### ***1.1 Th1/Th2 im Abortmausmodell***

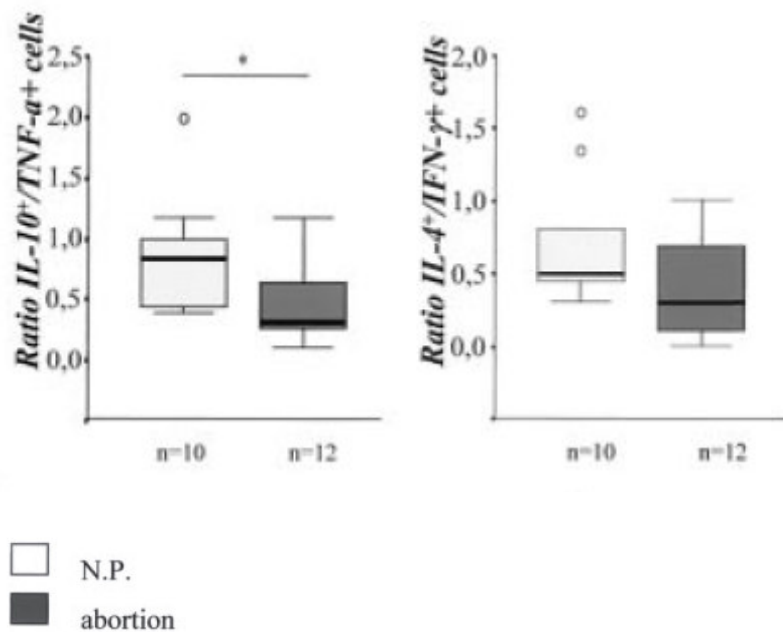
Lin und Mitarbeiter (1993) haben erstmalig die charakteristischen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10, die an der feto-maternalen Grenze dominieren, im Zeitraum der murinen Früh- bis Spätschwangerschaft nachgewiesen. Chaouat und Mitarbeiter haben später die essentielle Rolle der Th2-Zytokine am CBA/J x DBA/2J Mausmodell verdeutlicht, indem sie eine defiziente plazentare Produktion von IL-4 und IL-10 bei Tieren der Abortkombination verglichen mit normalschwangeren Tieren nachwiesen. Durch Gabe von rekombinantem IL-10 oder anti -IFN- $\gamma$  konnte die Abortrate reduziert und mittels Applikation von anti -IL-10 wiederum gesteigert werden (Chaouat *et al.* 1995). Die Arbeitsgruppe um Chaouat (1990) demonstrierte auch den schwangerschaftsschädigenden Einfluss von Th1-Zytokinen in Form intravenöser Applikationen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2, welche zu gestationsalters- und

dosisabhängigen Steigerungen der Abortrate sowohl bei Tieren der Abort- (CBA/J x DBA/2) als auch der Normalschwangerschaftskombination CBA/J x BALB/c führten.

Wir konnten hohe Th1- und niedrige Th2-Niveaus im Mausabortmodell beobachten (Fest *et al.* 2002, Knackstedt *et al.* 2003, Zenclussen *et al.* 2003). Unsere Arbeiten mit der Abortkombination CBA/J x DBA/2J und mit der normalen Kombination CBA/J x BALB/c haben gezeigt, dass Th1 Zytokine (u.a. IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) mit Fehlgeburten assoziiert sind (Fest *et al.* 2002, Knackstedt *et al.* 2003, Zenclussen *et al.* 2003), und dass Th2-Zytokine schwangerschaftsschützende Effekte haben (Joachim *et al.* im 2003). Wir haben erstmalig gezeigt, dass deziduale Immunzellen von Abortmäusen signifikant mehr inflammatorische Zytokine produzieren als die Immunzellen von Kontrollmäusen nach PMA/Iono Stimulation, was die Gedächtniszellen stimuliert (Zenclussen *et al.* 2005). *In vivo* Studien bestätigen, dass IL-12 negative Wirkungen auf die Trächtigkeit von Mäusen hat, da eine höhere Abortrate nach IL-12 Injektionen zu beobachten gewesen war (Zenclussen *et al.* 2002).



**Abbildung 1:** Erhöhte IL-6 Produktion der Abortkombination CBA/J x DBA/2J im Vergleich zu der Normalkombination CBA/J x BALB/c (aus Zenclussen *et al.* 2003)

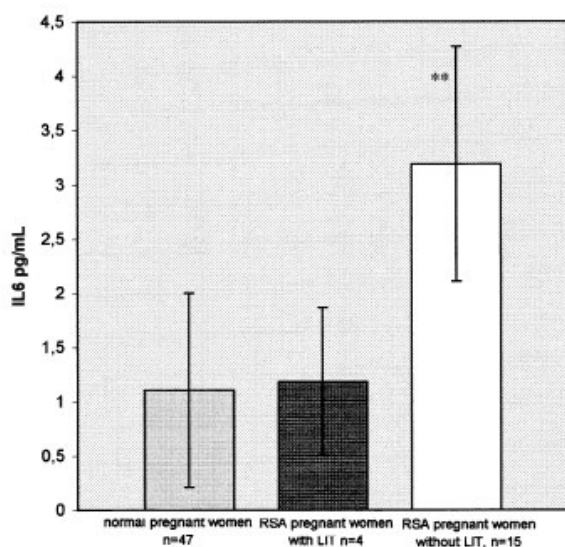


**Abbildung 2:** Niedrige IL-10/TNF- $\alpha$  und IL-4/IFN $\gamma$  Ratios der Abortkombination CBA/J x DBA/2J im Vergleich zu der Normalkombination CBA/J x BALB/c (aus Zenclussen *et al.* 2005)

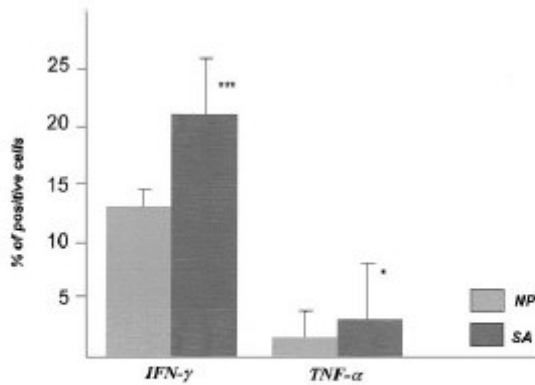
Neben der Th2-Zytokindominanz scheint auch das Th3-Zytokin TGF- $\beta$  mit seinen 3 Isoformen eine schwangerschaftsprotective Rolle zu spielen (Cheng *et al.* 1993, Gorivodsky *et al.* 1999, Dünker und Kriegelstein 2002). Laut Untersuchungen von Gorivodsky und Mitarbeitern (1999) ließen sich im uteroplazentaren Gewebe von Mäusen der Abortkombination CBA/J x DBA/2J um 50% geringere TGF- $\beta$ 2-mRNA-Levels verglichen mit normalschwangeren Kontrollweibchen nachweisen. Wir selber haben diese Daten bestätigt und darüber hinaus zeigen können, dass TGF- $\beta$  von T regulatorischen Zellen (Treg) produziert wird (Sollwedel und Zenclussen, unpublizierte Daten). Die Abwesenheit von TGF- $\beta$ 2 und -3 in Knock Out (KO) Mäusen resultiert in früher embryonaler Letalität und unterstreicht die essentielle Rolle der Typ-3 -Zytokine im embryonalen Entwicklungsprozess (Dünker und Kriegelstein 2002).

## 1.2 Th1/Th2 in Patientinnen mit Fehlgeburt

Humanstudien, wie beispielsweise von Piccinni und Mitarbeitern (1998), zeigten, dass deziduale CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der normalen Humanschwangerschaft signifikant mehr IL-4, IL-10 und LIF produzierten im Vergleich zu Frauen, die unter ungeklärten Mehrfachabort (englisch: RSA –recurrent spontaneous abortion) litten. Humanstudien ergaben eine eindeutige Korrelation zwischen Th1-Übergewicht und wiederholtem Spontanabort (zusammengefasst in Raghupathy *et al.* 2001). Wir konnten erhöhte IL-6 Spiegel bei RSA Patientinnen im Vergleich zu normalschwangeren Frauen nachweisen (Zenclussen *et al.* 2000). Später haben wir auch zeigen können, dass bereits während der ersten immunologischen Fehlgeburt, ein Anstieg an Th1-Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) festzustellen ist (Zenclussen *et al.* 2001a, Sehmsdorf *et al.* 2004). Beim Vergleich der maternalen Reaktivität gegenüber Plazentaantigenen mittels Co-Kultivierung von PBMCs (englisch: peripheral blood mononuclear cells) wiesen Frauen mit RSA im Gegensatz zu Frauen mit erfolgreicher Schwangerschaft ein signifikant höheres Level an Th1-Zytokinreaktivität auf (Raghupathy *et al.* 1999). Haimovici und Mitarbeiter (1991) konnten eine Wachstumsinhibition von humanen Trophoblastenzellen in Anwesenheit von den Th1-Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  in MLCs (engl.: mixed lymphocyte cultures) nachweisen.



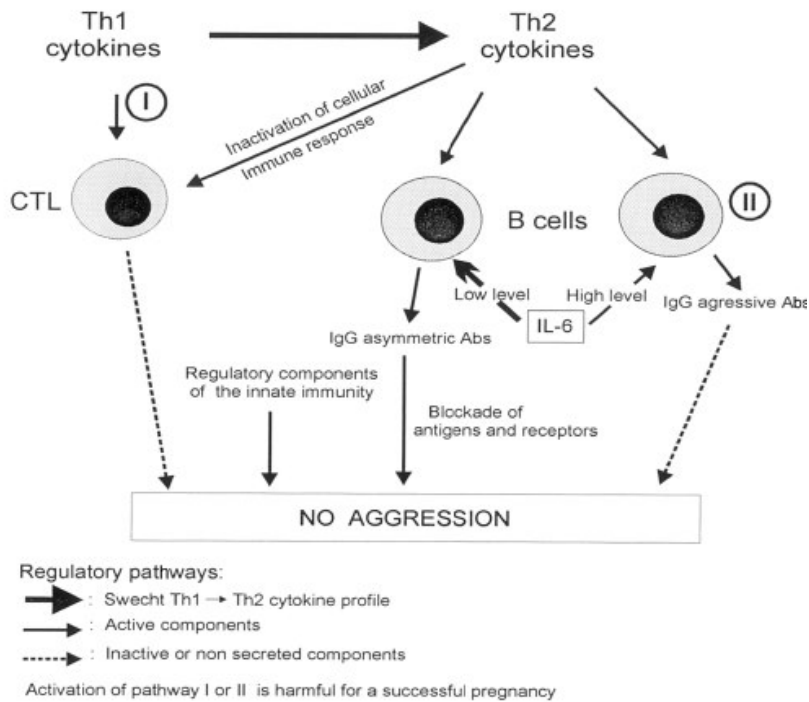
**Abbildung 3:** Erhöhte IL-6 Serumspiegel bei Frauen mit wiederholten Fehlgeburten (englisch: RSA: recurrent spontaneous abortion) im Vergleich zu normal schwangeren Frauen (aus Zenclussen *et al.* 2000)



**Abbildung 4:** Erhöhte TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Produktion in Blutzellen von Patientinnen mit Fehlgeburt im Vergleich zu normal schwangeren Frauen (aus Zenclussen *et al.* 2001)

### **1.3 Th1/Th2 und die asymmetrischen Antikörper**

Da eine Th2-Zytokindominanz in der Schwangerschaft eigentlich mit vermehrter Antikörperproduktion von B-Zellen mit folgender Degradation paternaler Antigene verbunden sein müsste, bietet sich die Anwesenheit asymmetrischer Antikörper, die unfähig zur Auslösung von Effektormechanismen einer Immunantwort sind, als Erklärungsmodell an (Margni und Malan Borel 1998, Margni und Zenclussen 2001). Diese These stützend konnten wir bei Patientinnen mit Fehlgeburt ein nicht ausreichendes Niveau an asymmetrischen Antikörper im Serum feststellen (Zenclussen *et al.* 2001b).

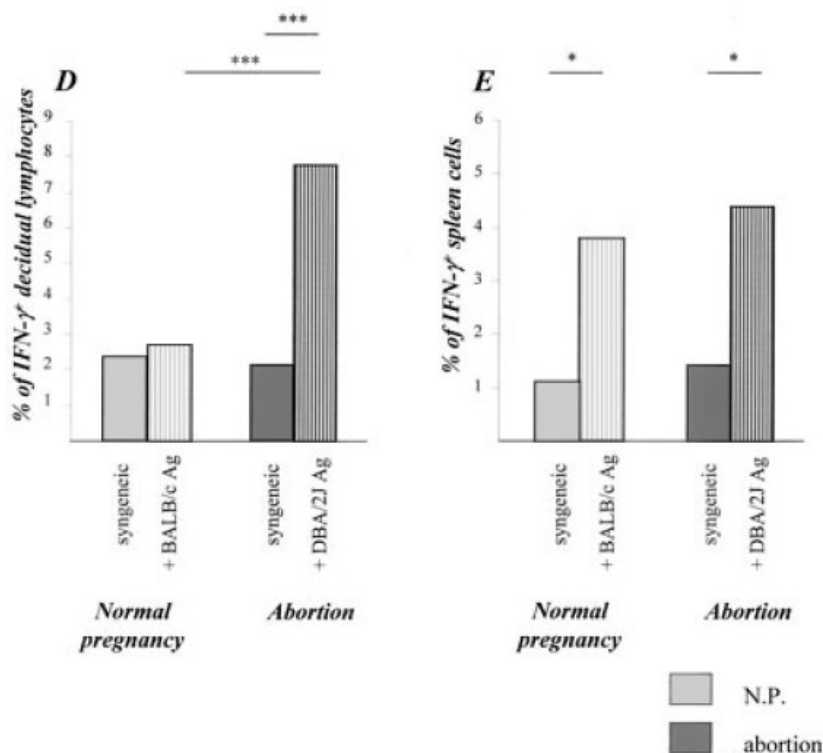


**Abbildung 5:** Modellvorstellung über den Effekt asymmetrischer Antikörper während der Schwangerschaft (aus Margni und Zenclussen 2001)

#### **1.4 Ist die mit dem Abort assoziierte Th1-Antwort spezifisch gegen väterliche Antigene?**

1994 haben Tangri und Mitarbeiter vorgeschlagen, dass unangemessene mütterliche Immunantworten gegenüber plazentaren Antigenen Schwangerschaftsfehler auslösen können. In MLPR-Überständen (engl.: mixed lymphocyte-placenta reaction) von Tieren der Abortkombination CBA/J x DBA/2 fanden sich signifikant höhere Anteile an Th1 Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) verglichen mit jenen der Normalkombination CBA/J x BALB/c, was auf die Existenz einer Antigen-spezifischen Th1 Antwort schließen lässt (Tangri *et al.* 1994). Bisher wurden kaum Studien bezüglich der *ex vivo*-Fähigkeit von splenalen und dezidualen Immunzellen hinsichtlich der Th1/Th2-Zytokinproduktion nach unspezifischer (PMA / Ionomycin) und spezifischer (väterlich) Stimulation durchgeführt. Wir beobachteten in Co-Kulturversuchen, dass Dezidualymphozyten von Mäusen der Abortkombination bei Stimulation mit väterlich bestrahlten Splenozyten (APC) signifikant mehr IFN- $\gamma$  sekretierten

verglichen mit Tieren der Normalschwangerschaftsgruppe (Zenclussen *et al.* 2005). Daraus lässt sich bei einer vergleichbaren CD3<sup>+</sup>-Zellen Infiltration schließen, dass in Abortmäusen verglichen mit normalschwangeren Weibchen mehr väterlich-spezifische Th1-Lymphozyten im Deziduagewebe anzutreffen sind. Milzzellen dagegen zeigten jeweils vergleichbare Häufigkeiten von polyklonalen und väterlich (alloantigen) spezifischen Th1-Zellen in beiden Paarungskombinationen. Diese Daten zeigen, dass die Generierung von polyklonalen Th1-Zellen und ihr Homing ins Gewebe durch die Art der Schwangerschaft nicht beeinflusst werden. Unsere Daten zeigen keinerlei Supprimierung der Generierung väterlich-alloantigener Th1-Zellen während der Schwangerschaft, was auf die Existenz regulatorischer Prozesse schließen lässt, die die Aktivität spezifischer Th1 -Zellen, insbesondere an der fetomaternalen Grenzfläche, steuern (Zenclussen *et al.* 2005).



**Abbildung 6:** Erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion ausschließlich in Deziduazellen von Abortmäusen nach Stimulation mit väterlichen Antigenen. (aus Zenclussen *et al.* 2005)

### 1.5 Th1/Th2 in der Präeklampsie

Als Auslösemechanismus der Schwangerschaftskomplikation „Präeklampsie“ (PE) wurden ebenfalls immunologische Abnormalitäten vorgeschlagen (Faas *et al.* 1994, Sacks *et al.* 1997, Redman *et al.* 1999, Saito *et al.* 1999, Faas *et al.* 2000). Diese immunologischen Abnormalitäten könnten durch eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems erklärt werden (Sacks *et al.* 1997, Crocker *et al.* 1999), welche zu einem Anstieg von pro-inflammatorischen Zytokinen im Blut und in der Plazenta führen (Visser *et al.* 1994, Kupferminc *et al.* 1999). Diese erhöhten Th1-Zytokinwerte aktivieren Endothelzellen und führen dadurch zur generalisierten vaskulären Dysfunktion (Redman *et al.* 1999). Erhöhte TNF- $\alpha$  Werte wurden in Plazentaprobe von Patientinnen mit Präeklampsie nachgewiesen (Visser *et al.* 1994). Im Mausmodell für Präeklampsie konnten wir erhöhte Th1-Werte bei Mäusen mit PE-ähnlichen Symptomen feststellen (Zenclussen *et al.* 2004).

### ***1.6 Etablierung eines neuen Modells für Präeklampsie basierend auf dem Transfer von aktivierten Th1 Lymphozyten***

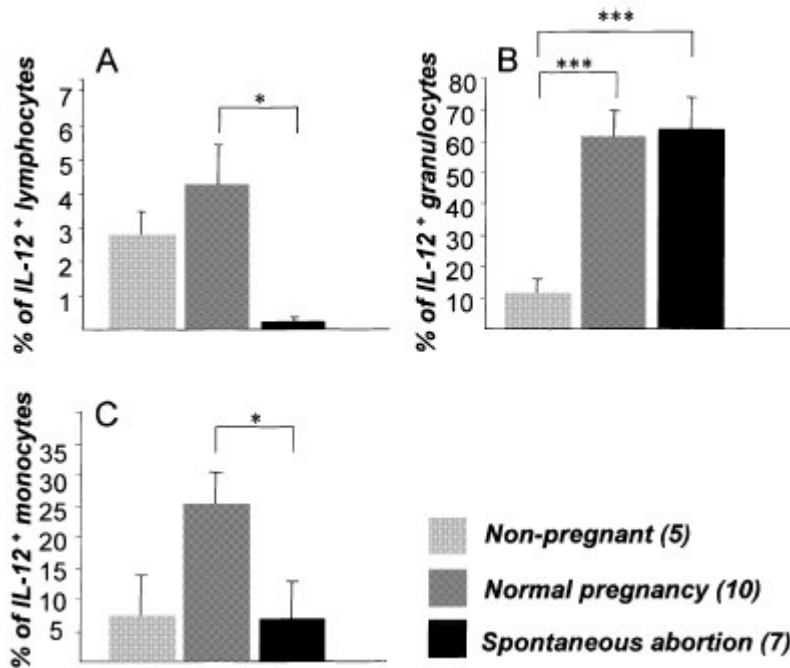
Vor kurzem wurde ein neues Präeklampsie Mausmodell von mir beschrieben. In diesem Modell wurden BALB/c Weibchen mit C57/BL6 Männchen verpaart. Die daraus resultierende Normalträchtigkeit konnte nach der intravenösen Injektion aktivierter Th1-Zellen beeinträchtigt werden, und hat zu PE-ähnlichen Symptomen (Bluthochdruck, Proteinurie und Nierenabnormalität) geführt. Eine Zunahme inflammatorischer und nicht inflammatorischer Zytokine konnte festgestellt werden (Zenclussen *et al.* 2004). Die präeklampsischen Symptome konnten ausschließlich bei trächtigen Empfängermäusen beobachtet werden. Dieses Modell bietet somit erstmalig die Möglichkeit zur Erforschung immunologischer Mechanismen, die zur PE führen (Zenclussen *et al.* 2004). Für die Etablierung dieses Modells wurde ich bei dem Meeting der «American Society for Reproductive Immunology» mit dem «New Investigator Award» in 2002 ausgezeichnet.





immunsuppressive Zytokine, z.B. TGF- $\beta$ , übertragen wird. Obwohl IL-10 nicht essentiell für die maternale Immuntoleranz oder erfolgreiche Schwangerschaft zu sein scheint, ist das Th2-Zytokin jedoch bedeutsam für das Wachstum der Nachkommenschaft sowohl im Uterus als auch postpartal (White *et al.* 2004).

Die Th1/Th2-Balance unterliegt Veränderungen. So ist zum Zeitpunkt der Implantation eher von einem Th1 Übergewicht auszugehen, im weiteren Verlauf jedoch scheinen Th2-Zytokine zu dominieren (Chaouat *et al.* 2002). Das starre Th1/Th2-Paradigma erscheint heute als unzureichend und sollte deshalb Gegenstand weiterer Diskussionen sein.



**Abbildung 8:** Erniedrigte IL-12 Produktion in Blutzellen (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) von Patientinnen mit Fehlgeburt im Vergleich zu normal schwangeren Frauen (aus Zenclussen *et al.* 2002b)

*Ausgewählte Publikationen zum Thema „Das Th1/Th2 Paradigma in der Reproduktionsimmunologie“*

**Seite 19-29**

1. **Zenclussen AC**, Blois S, Stumpo R, Olmos S, Arias K, Malan Borel I, Roux ME, Margni RA. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the fetomaternal interface. *Cytokine*. 2003 24 (4): 150-160.

Link: [doi:10.1016/j.cyto.2003.08.002](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.08.002)

**Seite 30-40**

2. **Zenclussen AC**, Fest S, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. Introducing a mouse model for pre-eclampsia: adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur J Immunol*. 2004 34 (2): 377-387.

Link : [DOI 10.1002/eji.200324469](https://doi.org/10.1002/eji.200324469)

**Seite 41-47**

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

Link: [doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01136.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.01136.x)