

4. Bedeutung der immunkompetenten Zellen in der Dezidua (zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, CD56⁺ NK Zellen) und deren Th1-Zytokinen Produktion in Fehlgeburten und Präeklampsie

Eine Zunahme von zytotoxischen CD8⁺-Zellen konnte im Blut sowie in der Dezidua von im ersten Trimenon abortierenden Patientinnen nachgewiesen werden. Diese Zellen waren auch für die Sekretion von Th1-Zytokinen verantwortlich und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Fehlgeburtspathologie (Zenclussen *et al.* 2001). Im Mausabortmodell CBA/J x DBA/2J war, ebenfalls eine Zunahme dieser Th1-CD8⁺-Population im Blut sowie in Dezidua nach Stressapplikation oder Substanz-P-Injektion (beide Behandlungen führten zur höheren Abortraten) zu beobachten (Fest *et al.* 2002). In Präeklampsiemäusen konnten auch höhere Zahlen an CD8⁺-Zellen in der Dezidua festgestellt werden. Diese Zellpopulation stellte jedoch nicht den überwiegenden Anteil an Th1 Zytokine sekretierenden Zellen. Deziduale CD4⁺-Zellen scheinen, bei der Präeklampsie eine wichtigere Rolle zu spielen (Zenclussen *et al.* 2004). Höhere Anzahlen an CD56⁺ NK Zellen waren im Blut und in der Dezidua von Patientinnen mit Fehlgeburten zu finden. CD56⁺-NK-Zellen sind aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität von mehreren Autoren für die Pathologie verantwortlich gemacht worden. (Zenclussen *et al.* 2001a).

5. Regulatorische T - Zellen und Toleranzerzeugung

5.1 Definition regulatorischer T - Zellen

Es ist bekannt, dass der Großteil regulatorischer T-Zellen der CD4⁺-Population zuzurechnen ist, auch wenn andere Subpopulationen wie CD8⁺, CD8⁺CD28⁻ und TCR⁺CD4⁻CD8⁻ regulatorische Fähigkeiten besitzen (Waldmann *et al.* 2004). Die so genannten T regulatorischen Zellen (Treg) exprimieren sowohl CD4 als auch CD25. Die ersten Hinweise für die regulatorische Funktion dieser Population gelangen Hall *et al.* (Hall *et al.* 1990). Diese Autoren haben CD4⁺CD25⁺ T Zellen von langfristig überlebten herztransplantierten Mäusen

in transplantierte Mäuse, die normalerweise die Transplantate abstoßen, transferiert und Toleranz induziert. 1995 haben Sakaguchi *et al.* zum ersten Mal gezeigt, dass die Treg Zellen eine entscheidende Rolle bei der peripheren Toleranz gegen „selbst“ spielen. Darüber hinaus konnte der Transfer von *ex vivo* expandierten Treg Zellen die Abstoßung der Transplantate (GVHD) hemmen (Taylor *et al.* 2002). Weiterhin konnte in verschiedenen allogenen Organtransplantationsmodellen gezeigt werden, dass nicht-depletierende anti-CD4 mAb oder kostimulatorische Inhibitoren wie CTLA4-Ig periphere Toleranz induzieren, deren Stabilität von der Entwicklung von Treg abhängt (Hara *et al.* 2001). Treg Zellen können *in vitro* nach Stimulation nicht proliferieren (Takahashi *et al.* 2000). *In vivo* zeigen sie hingegen durchaus eine Proliferationskapazität (Klein *et al.* 2003). Ihre regulatorische Wirkung kann je nach Modell sowohl durch Zell-Zell-Kontakt als auch durch lösliche Mediatoren vermittelt werden. Interessanterweise sind Treg Zellen in der Lage via Zell-Zell-Kontakt die Proliferation von Th1 aber nicht Th2-Zellen zu inhibieren (Cosmi *et al.* 2003). Die Moleküle, die in der Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Suppression von Th1-Zellen eine Rolle spielen, sind noch nicht bekannt (Cosmi *et al.* 2003). T regulatorische Zellen produzieren zumeist auch IL-10 und TGF- β , welches sowohl direkt die Effektorzellen als auch die APCs hemmen kann (Hara *et al.* 2001, Kingsley *et al.* 2002, Cosmi *et al.* 2003). Es wurde vorgeschlagen, dass T regulatorische Zellen nicht nur CD4⁺- sondern auch CD8⁺-Effektorzellen hemmen können (Wood and Sakaguchi 2003). Der Kontakt von T regulatorischen Zellen mit anderen T Zellen (z.B. Th- und Tc-Zellen) resultiert in der Inhibition von deren Zytokinproduktion, Herabregulation von co-stimulatorischen Molekülen, in deren Proliferationshemmung und der Erzeugung von Anergie.

CD4⁺CD25⁺ Treg aus dem Thymus und dem peripheren Blut von normalen Mäusen und Menschen exprimieren den spezifischen molekularen Marker foxp3 (engl.: forkhead box P3), der den Transkriptionsfaktor Scurfin kodiert. Dieser ist für die Entwicklung im Thymus, die

Funktion dieser Zellen und die normale Immunhomöostase essentiell (Brunkow *et al.* 2001, Fontenot *et al.* 2003). Der retrovirale Transfer von foxp3 bewirkt die Umwandlung naiver T - Zellen in den regulatorischen Phäno- und Funktionstyp (Hori *et al.* 2003). Die foxp3 Expression korreliert mit der biologischen Aktivität regulatorischer T Zellen. Bei mutationsbedingtem Funktionsverlust von foxp3 entwickeln sich fatale Autoimmunerkrankungen (Khattari *et al.* 2003).

5.2 Wirkungen regulatorischer T -Zellen

Treg kontrollieren *in vivo* Immunantworten und können gefährliche immunpathologische Antworten sowohl gegenüber Selbst- als auch Fremddantigene supprimieren (Maloy und Powrie 2001, Wood und Sakaguchi 2003). Die immunregulatorische Wirkung dieser CD4⁺CD25⁺ T-Zellen beinhaltet jedoch nicht nur positive Effekte, wie beispielsweise die Erzeugung von Toleranz nach Transplantation, sondern auch negative, wie die Herabsetzung von Tumor- und Infektionsimmunität (*Tabelle 2*).

Wünschenswerte Effekte	Schädliche Effekte
<ul style="list-style-type: none"> - T – Zell - Homöostase - Toleranz nach Transplantation - Verhinderung: - GVHD <ul style="list-style-type: none"> - Autoimmunkrankheiten - Allergie - Hypersensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Herabsetzung: - Tumorimmunität <li style="padding-left: 100px;">- Infektionsimmunität

Tabelle 2: *In vivo* Wirkungen regulatorischer T -Zellen (nach Wood und Sakaguchi 2003)

Sowohl die Induktion als auch die Aufrechterhaltung der spezifischen immunologischen Toleranz gegenüber Alloantigenen in Maus und Mensch sind aktive Regulationsprozesse, wie durch viele Arbeitsgruppen bestätigt wurde (Jonuleit *et al.* 2001, Hoffmann *et al.* 2002, Wood und Sakaguchi 2003).

Treg können vielfältige Einzelprozesse im Rahmen der Toleranzentwicklung auslösen. Die Inhibition der Zytokinproduktion und –sekretion, die Herabregulierung der Expression von Adhäsions- und co-stimulatorischen Molekülen, die Proliferationsinhibition, die Induktion von Anergie, die Förderung von Apoptose der Effektorzellen oder deren Konversion in einen regulatorischen Phänotyp stellen wesentliche immunregulatorische Prozesse dar (Maloy und Powrie 2001, Wood und Sakaguchi 2003). Der letztgenannte wird auch als Infekttoleranz bezeichnet, bei dem Treg die Differenzierung naiver CD4⁺ T -Zellen in den regulatorischen Phäno- und Funktionstyp induzieren. Die erzeugte Toleranz hält mehr als eine Generation auch in Abwesenheit der ursprünglichen Toleranz-erzeugenden Population an (Cobbold und Waldmann 1998, Onodera *et al.* 1998, Jonuleit *et al.* 2002).

CD4⁺CD25⁺ hemmen sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T Effektorzellen (T eff) (Wood und Sakaguchi 2003). *In vitro* Versuche ergaben eine wesentlich stärkere Suppressionsaktivität humaner CD4⁺CD25⁺ und CD8⁺CD25⁺ T - Zellklone gegenüber der Th1- als der Th2 -Proliferation (Cosmi *et al.* 2003).

5.3 Die Rolle regulatorischer T - Zellen in der Schwangerschaft

Wenige neue Untersuchungen weisen auf eine entscheidende aktive Rolle von Treg bei der Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz während der Normalschwangerschaft. Somerset und Mitarbeiter (2004) vertreten die Auffassung, dass die normale Humanschwangerschaft mit einem Ansteigen der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T

Zellsubpopulation im Blut einhergeht. Im 2. Schwangerschaftstertial, zum Zeitpunkt der maximalen Trophoblasteninvasion in die mütterliche Dezidua (Pijnenborg *et al.* 1983), wurde der höchste Anteil an zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ T -Zellen im Blut erreicht. Post partum sinkt die Treg -Population wiederum anteilig ab (Somerset *et al.* 2004). Sasaki und Mitarbeiter (2004) fanden im peripheren Blut von Frauen in der normalen Frühschwangerschaft anteilig mehr CD4⁺CD25⁺ T -Zellen, verglichen mit Frauen mit Spontanabort oder Nichtschwangerschaft. Dabei wurden wiederum anteilig mehr CD4⁺CD25^{bright} Treg an Gesamt CD4⁺ in der Dezidua als im peripheren Blut gemessen. Dass es sich bei CD4⁺CD25⁺ -Zellen nicht nur um aktivierte T -Zellen handelt, konnte mittels einer erhöhten foxp3- bzw. CTLA-4 (CD152) Expression dieser Zellen nachgewiesen werden (Sasaki *et al.* 2004, Somerset *et al.* 2004).

Vor kurzer Zeit konnte die wichtige Funktion natürlicher Treg in der Vermittlung maternaler Toleranz gegenüber dem Fetus an Mäusen gezeigt werden (Aluvihare *et al.* 2004). Wie bereits beim Menschen konnte auch hier ein Ansteigen der Treg in fast allen Geweben trächtiger C57BL/6 Mäuse verglichen mit nichtträchtigen Weibchen nachgewiesen werden, unabhängig von der Syn- oder Allogenetität des Feten. Nach dem Transfer von gepoolten Lymphozyten aus der Milz und den Lymphknoten normalträchtiger BALB/c bzw. solcher Mäuse, bei denen eine Depletion CD25⁺-Zellen erfolgt war, in BALB/c nu/nu –Weibchen wurden diese mit C57BL/6 –Männchen verpaart. Bei Präparation der trächtigen Tiere wiesen jene, die CD25⁺-Zell-depletierte Zellpräparationen erhalten hatten, keine normalen Schwangerschaften, sondern zahlreiche Resorptionen auf (Aluvihare *et al.* 2004).

5.4 Das Fehlen regulatorischer T- Zellen in der Schwangerschaft verursacht Fehlgeburt im Mausmodell

Wir haben kürzlich zum ersten Mal im Mausmodell gezeigt, dass ein Mangel an Treg in einer Fehlgeburt enden kann. Das Fehlen der Treg Zellen im Thymus, in der Milz und in der Dezidua führte zur Akkumulation von Th1 Zellen in der Dezidua, die gegen väterliche Antigene gerichtet sind (Zenclussen *et al.* 2005). Aufgrund unserer Daten, haben wir hypothetisiert, dass plazentare bzw. embryofetale Antigene, aus der Kombination CBA/J x BALB/c stammend, regulatorische T Zellen generieren und eine suppressive Zytokinproduktion insbesondere von IL-10 induzieren können. In der Kombination CBA/J x DBA/2J können die erzeugten plazentaren Antigene nicht ausreichend Treg im Thymus generieren und /oder deren regulatorische Funktion ist eingeschränkt.

In weiteren *in vitro* Co-Kultur Experimenten konnten wir die Dosisabhängigkeit der regulatorischen Wirkung CD4⁺CD25⁺er T Zellen auf die Proliferation sowie auf die Produktion von Th1- bzw. Th2-Zytokinen allostimulierter Effektorzellen analysieren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben zuvor bereits die suppressive Wirkung regulatorischer T -Zellen *in vitro* auf die Proliferation naiver T Zellen und deren Dosisabhängigkeit beschrieben (Levings *et al.* 2001, Sakaguchi *et al.* 2001, Stephens *et al.* 2001). In Übereinstimmung mit *in vitro* –Analysen von Aluvihare und Mitarbeitern (2004) konnten wir die suppressive Wirkung regulatorischer T Zellen auf die maternale Alloantwort bei väterlicher Alloantigen Stimulation nachweisen. Mit zunehmendem Anteil an Treg wurden sowohl die Proliferation als auch die IFN- γ -Produktion von Milz- und Deziduaeffektorzellen gehemmt. Die nahezu lineare Dosisabhängigkeit dezidualer Effektorzellen von der Treg Konzentration lässt auf eine besondere Sensitivität der Dezidua gegenüber regulatorischen T Zellen schließen (Zenclussen *et al.* 2005).

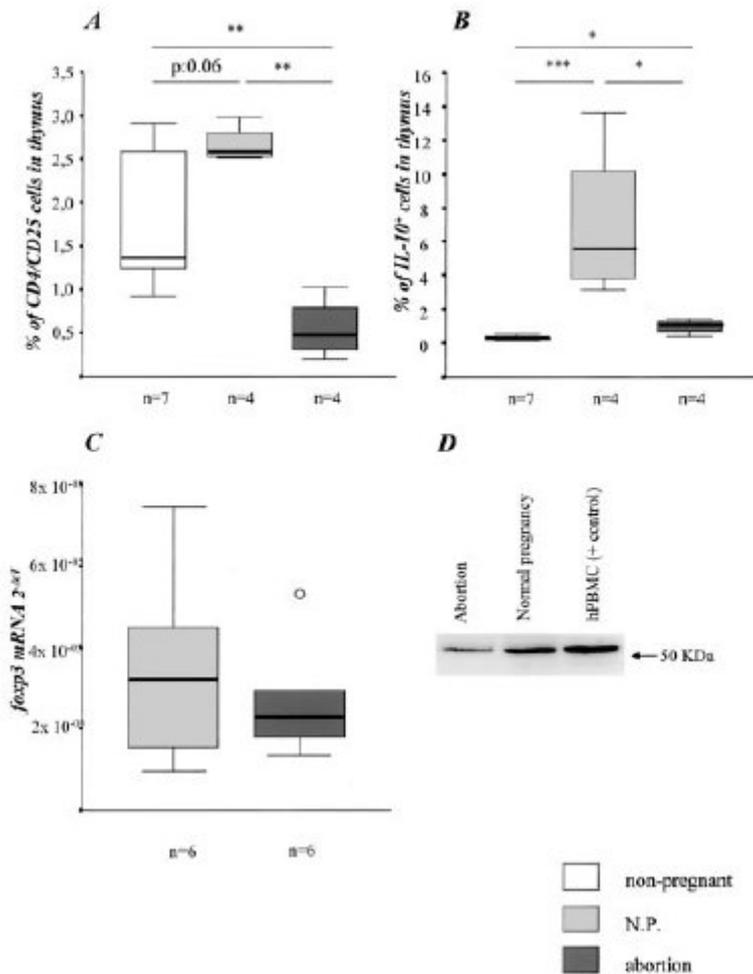


Abbildung 14: Abortmäuse zeigten weniger Treg (CD4⁺CD25⁺IL-10⁺) im Thymus im Vergleich zu Kontrollmäusen. Eine erniedrigte foxp3 Expression konnte in der Dezidua der Abortmäusen festgestellt werden (aus Zenclussen *et al.* 2005)

5.5 Der Transfer von Treg am Tag 0-2 der Schwangerschaft verhindert Abort im Mausmodell

Der adoptive Transfer CD4⁺CD25⁺-T-Zellen ausschließlich normalschwangerer, nicht aber nichtträchtiger CBA/J-Weibchen konnte die Abortrate in den Abortverpaarten Mäusen auf Normalschwangerschaftsniveau senken. Die erzeugte Toleranz konnte die fetale Abstoßung in den Mäusen der Abortkombination verhindern (Zenclussen *et al.* 2005). Die Vermittlung von Toleranz mittels Transfer von CD4⁺CD25⁺-T-Zellen ist auch in Allotransplantationsmodellen beschrieben worden (Hall *et al.* 1990). Eine wesentliche Bedingung für die Induktion dieser

Toleranz ist der Zeitpunkt des Transfers regulatorischer T Zellen, so ließ sich der abortsenkende Effekt nicht mit Treg-Injektionen (aus normalträchtigen CBA/J stammend) am Tag 4-5 der murinen Schwangerschaft erzielen, was auf eine bedeutsame immunregulatorische Funktion der Treg in der Frühschwangerschaft, vor dem Implantationszeitpunkt, schließen lässt (Zenclussen *et al.* 2005).

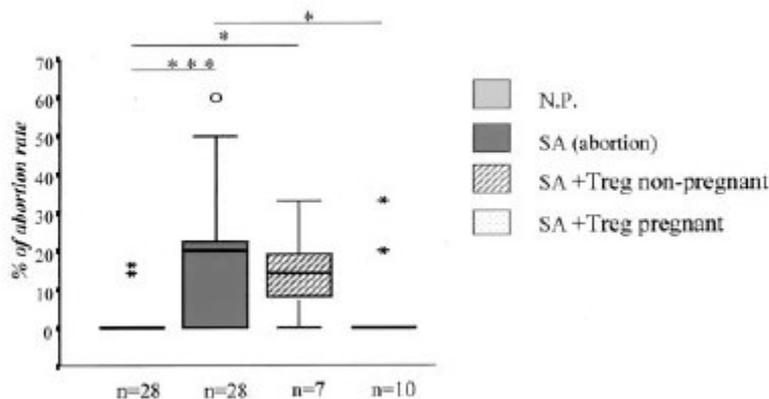


Abbildung 15: Der Transfer von Treg aus normal trächtigen Mäusen (CBA/J x BALB/c) konnte die fetale Abstoßung der Abortkombination CBA/J x DBA/2J verhindern (aus Zenclussen *et al.* 2005)

In Diskrepanz zu unseren *in vivo* erhobenen Daten waren *in vitro* CD4⁺CD25⁺-T-Zellen aus nichtträchtigen Weibchen vergleichbar in der Lage, die maternale Alloimmunantwort zu hemmen. Sie supprimierten die Proliferation und Zytokinproduktion der splenalen bzw. dezidualen aus Abortweibchen stammenden Effektorzellen in gleichem Maße wie die Treg normalträchtiger CBA/J. Waldmann und Mitarbeiter machten ähnlich diskrepante Beobachtungen in Allotransplantationsversuchen, in denen Treg, *in vitro*, Alloimmunantworten naiver T Zellen inhibieren konnten, *in vivo* jedoch nicht dazu in der Lage waren, entsprechend ihrer Funktion das Allotransplantatüberleben zu verlängern (Waldmann *et al.* 2004). Die lokale Akkumulation CD4⁺CD25⁺-T-Zellen an der fetomaternalen Kontaktzone, ablesbar an der gesteigerten foxp3 Expression innerhalb des

dezidualen und plazentaren Gewebes, war in beiden Treg-behandelten Gruppen vergleichbar gewesen (Zenclussen *et al.* 2005). Wenn also *in vivo* nur Treg normalträchtiger Mäuse ihre regulatorische Funktion der Toleranzinduktion erzeugen konnten, muss die vorherige alloantigene Stimulation durch embryofetale Alloantigene CD4⁺CD25⁺-Treg erforderlich sein. Dieses „Ag-priming“ vermittelt die regulatorische Funktion der Treg dem Fötus gegenüber. So können beim adoptiven Transfer CD4⁺CD25⁺-T-Zellen von normalträchtigen Mäusen in trüchtige Abortmäuse diese ihre regulatorische Funktion ausüben und vor fetaler Abstoßung schützen. Treg nichtträchtiger CBA/J -Weibchen dagegen haben keine Primäraktivierung (Priming) durch plazentare bzw. embryofetale Antigene erfahren und sind daher *in vivo* nicht in der Lage, eine entsprechende fetomaternale Toleranz zu erzeugen (Zenclussen *et al.* 2005).

Um die Ag-Spezifität näher zu erforschen, haben wir ein etabliertes „Anti-Abort“ Protokoll verwendet, in dem wir CBA/J (H2^k) weibliche Mäuse vor der Abort-Verpaarung mit DBA/2J (H2^d) Männchen mit BALB/c (H2^d) Splenozyten behandeln. Diese Vorbehandlung wurde schon vor Jahren beschrieben (Chao *et al.* 1983) und verhindert die hohe Abortrate der CBA/J x DBA/2J-Abortkombination. Wir haben beobachtet, dass die Vorbehandlung mit BALB/c-Zellen den Anteil an Treg Zellen erhöht (Sollwedel *et al.* eingereicht), was für die Verhinderung des Abortgeschehens verantwortlich sein kann. Wir denken, dass die Vorbehandlung mit H2^d Zellen Treg erzeugen kann, die in der Lage sind, DBA/2J Antigene zu erkennen und eine protektive Immunreaktion zu vermitteln, die den Fötus schützt und nicht abstößt. Interessanterweise ist dieser Schutz nur kurzfristig, denn wenn die Verpaarung der Weibchen 2 Wochen nach Behandlung erfolgt, ist der protektive Effekt nicht nachweisbar. Wir haben Treg aus diesen vorbehandelten Weibchen in andere DBA/2J-verpaarte-CBA/J Weibchen transferiert und beobachtet, dass auch diese Treg die Abortrate reduzierten (Sollwedel *et al.* eingereicht).

Weitere Untersuchungen über die Antigenspezifität der Treg während der Schwangerschaft beinhalteten den Transfer von Treg Zellen aus folgenden Verpaarungskombinationen: a) CBA/J x CBA/J und b) CBA/J x C57/BL6. Unsere vorläufigen Ergebnisse der noch zu vervollständigenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass Treg auf einer Ag-spezifischen Weise wirken (unpublizierte Daten von Anne Schumacher und Ana Zenclussen).

5.7 Wirkungsmechanismen der Treg während der Schwangerschaft

Kürzlich haben Waldmann *et al.* (Waldmann *et al.* 2004) in einem Übersichtsartikel vorgeschlagen, dass Treg Zellen in bestimmte Gewebe einwandern, z.B. nach einem inflammatorischen Signal, und dort eine protektive Immunantwort anregen. Andere Moleküle würden durch diese protektive Antwort hochreguliert. In der Schwangerschaft könnte das inflammatorische Signal, welches die Einwanderung der Treg Zellen in das Plazentagewebe anregt, die transiente Hochregulation von inflammatorischen Molekülen kurz nach der Implantation sein (Chen *et al.* 1994; Ashkar *et al.* 2000; Ashkar und Croy 2001). Interessanterweise haben wir feststellen können, dass in normal trächtigen Mäusen tatsächlich eine lokale Hochregulation von IL-10, HO-1 und protektiven Genen, wie Bcl-2 und Bag-1, stattfindet (Zenclussen AC *et al.* 2005, Zenclussen ML *et al.* in finaler Begutachtung, Zambon Bertoja *et al.* im Druck). Die Abortmäuse zeigten wiederum eine Herabregulation der oben genannten Moleküle und ebenso unzureichende Niveaus an Treg Zellen. Der Transfer von Treg Zellen führte zur Toleranz und Hochregulation der IL-10 Expression (Zenclussen *et al.* eingereicht). Wir haben weiterhin feststellen können, dass der Transfer von Treg die Expression von anderen Toleranz-assoziierten Molekülen erhöht, wie beispielsweise HO-1, LIF und TGF- β (Zenclussen *et al.* eingereicht). Wir haben aus diesem Grund vorgeschlagen, dass Treg in der Lage sind, ein tolerantes „Microenvironment“ zu erzeugen (Zenclussen *et al.* eingereicht).

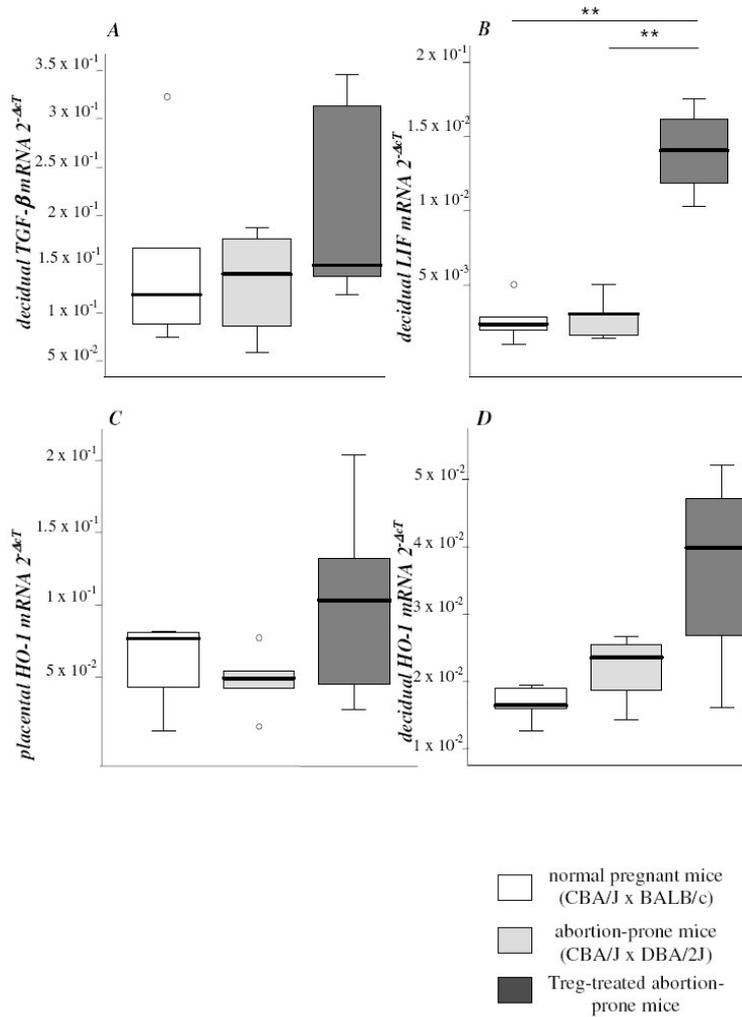


Abbildung 16: Der Transfer von Treg aus normalträchtigen Mäusen (CBA/J x BALB/c) regulierte die Expression von TGF- β , LIF und HO-1 hoch (aus Zenclussen *et al.* eingereicht).

Ausgewählte Publikation zum Thema „Regulatorische T - Zellen und Toleranzerzeugung“

Seite 87-98

1. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Bertoja A, Sollwedel A, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD. Abormal T cell reactivity against paternal antigens: The adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model *Am J Pathol* 2005; 163 (3): 811-822.

Link: [American Society for Investigative Pathology](#)