

Myeloide Suppressorzellen an der humanen fetomaternalen
Grenzschicht und ihre Bedeutung für die immunologische
Toleranz zwischen Mutter und Fetus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hofstädter, Kathrin

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Ch. Gille

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Peschel

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Immunsystem während der Schwangerschaft	1
1.2. Myeloide Suppressorzellen	2
1.3. Ziel der Arbeit.....	3
2. Material und Methoden.....	5
2.1. Patientenkollektiv	5
2.2. Isolation von mononukleären Zellen und granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC)	7
2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut.....	7
2.2.2. Isolation von mononukleären Zellen aus Plazentagewebe	10
2.2.3. Isolation von GR-MDSC mithilfe Magnetic Activated Cell Sorting....	10
2.3. T-Zell-Proliferations-Assay.....	11
2.3.1. CFSE-Färbung und Stimulation der Zielzellen.....	11
2.3.2. Kulturansatz der T-Zell-Proliferationsversuche	12
2.3.3. T-Zell-Proliferationsversuch unter Hypoxie	12
2.4. Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies	13
2.4.1. Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch GR-MDSC aus humaner Plazenta, peripherem Blut gesunder Schwangerer und Nabelschnurblut unter Normoxie	13
2.4.2. Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch GR-MDSC aus humaner Plazenta unter Hypoxie	13
2.5. Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie	13
2.5.1. Immunphänotypisierung.....	14
2.5.2. Intrazelluläre Arginase 1- und induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthese-Färbung	15

2.5.3. T-Zell-Proliferationsnachweis.....	16
2.5.4. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies.....	16
2.6. Immunhistochemische Plazentafärbung	16
2.7. Statistik	17
3. Ergebnisse	18
3.1. Quantifizierung und Charakterisierung von GR-MDSC in der Plazenta (PL-MDSC) gesunder Schwangerer.....	18
3.1.1. GR-MDSC akkumulieren in der Plazenta.....	18
3.1.2. PL-MDSC exprimieren die Effektorenzyme Arginase 1 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und produzieren reaktive Sauerstoffspezies	20
3.1.3. PL-MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation.....	22
3.2. Vergleichende funktionelle Analyse von PL-MDSC gesunder Schwangerer mit GR-MDSC aus peripherem Blut gesunder Schwangerer (S-MDSC) und aus Nabelschnurblut (NSB-MDSC).....	27
3.2.1. Die Expression von Arginase 1 und induzierbarer Stickstoffmonoxid- Synthase ist in PL-MDSC im Vergleich zu S-MDSC und NSB-MDSC unverändert	27
3.2.2. PL-MDSC produzieren mehr reaktive Sauerstoffspezies als S-MDSC und NSB-MDSC	28
3.2.3. PL-MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation stärker als NSB-MDSC	32
3.3. GR-MDSC bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom.....	37
3.3.1. Die Expression von GR-MDSC im peripheren Blut ist bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom vermehrt.....	37
3.3.2. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch PL-MDSC ist unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck unverändert im Vergleich zu Standardkulturbedingungen.....	39
3.3.3. Die suppressive Wirkung von PL-MDSC auf die T-Zell-Proliferation ist unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck beeinträchtigt	41
3.4. GR-MDSC bei Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung	47
4. Diskussion.....	49
4.1. Akkumulation von GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht.....	50

4.2. Effektormechanismen von GR-MDSC.....	51
4.3. Fähigkeit zur Suppression von T-Zellen.....	53
4.4. Aktivierung von GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht.....	54
4.5. GR-MDSC im peripheren Blut von Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom	55
4.6. Die Funktion von GR-MDSC unter vermindertem Sauerstoffangebot....	57
4.7. GR-MDSC im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung	59
4.8. Methodenkritik und Limitationen des Systems	60
4.9. Schlussfolgerung.....	62
5. Zusammenfassung.....	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Erklärung zum Eigenanteil	
8. Veröffentlichungen	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

CBMC	Cord Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester, Carboxyfluoreszeindiacetat - Succinimidylester
DHR	Dihydrorhodamin 123
E-MDSC	MDSC aus peripherem Blut gesunder, nicht schwangerer Erwachsener
FACS	Fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
GR-MDSC	granulocytic myeloid derived suppressor cells, granulozytäre Suppressorzellen myeloischen Ursprungs
HLA	humanes Leukozytenantigen
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDSC	myeloid derived suppressor cells, Suppressorzellen myeloischen Ursprungs
MFI	mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzintensität
MO-MDSC	monocytic myeloid derived suppressor cells, monozytäre Suppressorzellen myeloischen Ursprungs
NSB-MDSC	MDSC aus Nabelschnurblut
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLMC	Placenta Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen der Plazenta
PL-MDSC	plazentare MDSC
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
S-PBMC	PBMC aus peripherem Blut gesunder Schwangerer
S-MDSC	MDSC aus peripherem Blut gesunder Schwangerer
Th	T-Helferzellen

Tregs

regulatorische T-Zellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ziel der Arbeit	4
Abbildung 2: Der Anteil an GR-MDSC ist abhängig von der Zeit bis zur Verarbeitung der Blutproben	9
Abbildung 3: Reinheit der über MACS isolierten GR-MDSC	11
Abbildung 4: Charakterisierung von GR-MDSC	15
Abbildung 5: GR-MDSC akkumulieren in der Plazenta	20
Abbildung 6: PL-MDSC exprimieren Arginase 1 und iNOS und produzieren ROS	21
Abbildung 7: PL-MDSC hemmen die CD4 ⁺ - und die CD8 ⁺ -T-Zell-Proliferation	26
Abbildung 8: Die Expression der Effektorenzyme Arginase 1 und iNOS ist in PL- MDSC im Vergleich zu S-MDSC und NSB-MDSC unverändert ..	27
Abbildung 9: PL-MDSC produzieren mehr ROS als S-MDSC und NSB-MDSC	31
Abbildung 10: PL-MDSC haben eine stärkere suppressive Wirkung als NSB- MDSC.....	36
Abbildung 11: GR-MDSC sind im peripheren Blut von Präeklampsie- bzw. HELLP-Syndrom-Patientinnen vermehrt	38
Abbildung 12: Die Produktion von ROS durch PL-MDSC ist unter verminderten Sauerstoffbedingungen unverändert im Vergleich zu Standardkulturbedingungen	41
Abbildung 13: PL-MDSC zeigen unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck eine reduzierte Hemmkapazität	46
Abbildung 14: GR-MDSC sind im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung vermehrt	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Angaben der Präeklampsie-Patientinnen und deren Kontrollen	37
--	----

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem während der Schwangerschaft

Die Präeklampsie ist definiert als arterielle Hypertension mit begleitender Proteinurie, welche erstmals nach der abgeschlossenen 20. Schwangerschaftswoche auftritt und sich nach der Geburt wieder normalisiert. Als Eklampsie werden im Rahmen einer Präeklampsie auftretende tonisch-klonische Krampfanfälle bezeichnet, die keiner anderen Ursache zugeordnet werden können (AWMF-Register-Nr. 015/018). Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen, darunter Präeklampsie und Eklampsie, treten in 6 – 8 % aller Schwangerschaften auf und tragen mit 20 – 25 % zur perinatalen Mortalität bei. Weiterhin sind sie für etwa 40 % der iatrogenen Frühgeburten verantwortlich, welche die Langzeitmorbidity der Neugeborenen entscheidend beeinflussen. Darüber hinaus ist die Präeklampsie für weltweit etwa 70.000 mütterliche Todesfälle pro Jahr verantwortlich (Andraweera et al. 2012; AWMF-Register-Nr. 015/018; Rath 2009). Die Ursachen, welche zum Auftreten einer Präeklampsie führen sind bisher nur unvollständig verstanden, jedoch scheint eine Fehlregulation des Immunsystems pathogenetisch eine wichtige Rolle zu spielen (Laresgoiti-Servitje 2013; Pennington et al. 2012; Saftlas et al. 2014), die mit einer Minderversorgung der Plazenta mit Sauerstoff einhergehen kann (Kanasaki und Kalluri 2009; Nevo et al. 2006; Royle et al. 2009; Soleymanlou et al. 2005).

Während einer Schwangerschaft muss das mütterliche Immunsystem einen semiallogenen Organismus tolerieren und es darf zu keiner Abstoßungsreaktion zwischen Mutter und Fetus kommen. Gleichzeitig muss es trotzdem in der Lage sein, adäquat Infektionen abzuwehren um sich und den Fetus zu schützen. Die immunologischen Mechanismen, welche die fetomaternalen Toleranz ermöglichen sind bisher noch nicht vollständig verstanden (Chaouat et al. 2010).

Die im Zusammenhang mit der fetomaternalen Toleranz bisher am besten untersuchten Immunzellen sind T-Zellen und dabei insbesondere die CD4⁺-T-

Helfer-Zellen (Th) (Raghupathy 2001; Saito et al. 2010). Als ein wesentlicher Mechanismus zur Gewährleistung der fetomaternalen Toleranz wurde vielfach eine Verschiebung des T-Zell-Zytokin-Profiles weg von einer Th1-getragenen und hin zu einer Th2-getragenen Immunantwort beschrieben (Liu et al. 2011; Piao et al. 2012; Raghupathy et al. 1999; Saito et al. 2010).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es während der Schwangerschaft zu einer Akkumulation von regulatorischen T-Zellen (Tregs) im peripheren Blut sowie in der Dezipua kommt und dass diese Zellen an der Induktion der fetomaternalen Toleranz beteiligt sind (Amsalem et al. 2008; Dimova et al. 2011; Ernerudh et al. 2011; Hsu et al. 2014; Toldi et al. 2012; Vacca et al. 2010). Wie diese Veränderungen in der T-Zell-Antwort zustande kommen ist bisher nur teilweise verstanden, es ist jedoch bekannt, dass eine gestörte Anpassung der T-Zell-Antwort im Sinne einer vermehrten Expression von Th1-Zytokinen und einer verminderten Expression von Th2-Zytokinen sowie eine gestörte Akkumulation von Tregs mit dem Auftreten von schweren Schwangerschaftskomplikationen wie rekurrierenden Aborten oder Präeklampsie assoziiert ist (Arruvito et al. 2010; Bansal 2010; Hennessy et al. 1999; Jin et al. 2011; Saito et al. 2010; Santner-Nanan et al. 2009; Strittmatter und Blecken 2007).

1.2. Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (myeloid derived suppressor cells, MDSC) sind eine heterogene Population myeloider Vorläuferzellen mit der gemeinsamen Eigenschaft andere Immunzellen in ihrer Funktion zu hemmen (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Es wurden bisher zwei Subtypen von MDSC beschrieben: granulozytäre MDSC (GR-MDSC) exprimieren die Granulozytenmarker CD66b, CD11b und CD15 und monozytäre MDSC (MO-MDSC) exprimieren den Monozytenmarker CD14. Beide Subpopulationen exprimieren kein oder nur sehr wenig des humanen Leukozytenantigens (HLA) HLA-DR (Brandau et al. 2011; Duffy et al. 2013; Greten et al. 2011; Rodriguez et al. 2009). Die Unterscheidung von GR-MDSC zu reifen Granulozyten ist nur anhand ihrer suppressiven Wirkung auf T-Zellen und ihrer unterschiedlichen Dichte möglich.

So sind GR-MDSC nach Dichtezentrifugation in der Fraktion der mononukleären Zellen und nicht in der Fraktion der Granulozyten zu finden (Brandau et al. 2011; Rieber, Gille et al. 2013).

Die Ausübung ihrer suppressiven Aktivität auf andere Immunzellen erfolgt über verschiedene Effektormechanismen, insbesondere über eine Depletion der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin durch die Enzyme Arginase 1 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowie über die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) (Bronte und Zanovello 2005; Corzo et al. 2009; Gabilovich und Nagaraj 2009; Kusmartsev et al. 2004; Nagaraj et al. 2007).

MDSC wurden bisher hauptsächlich bei Tumor-Erkrankungen beschrieben, im Rahmen derer sie die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort hemmen und dadurch ein Voranschreiten der Erkrankung begünstigen (Brandau et al. 2011; Gabitass et al. 2011; Lechner et al. 2011).

Im Gegensatz dazu scheint eine Akkumulation von MDSC nach Einbringen eines allogenen Transplantats mit einem verlängerten Überleben des Transplantats und einer verminderten Graft-versus-Host-Reaktion einherzugehen (Dugast et al. 2008; Highfill et al. 2010; Zhang et al. 2008). Unsere Arbeitsgruppe konnte vor Kurzem zeigen, dass GR-MDSC sowohl im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener als auch im peripheren Blut von gesunden Schwangeren vermehrt vorkommen und Funktionen von T-Zellen und natürlichen Killerzellen modulieren (Köstlin et al. 2014; Rieber, Gille et al. 2013). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sie neben ihrer Bedeutung bei pathologischen Prozessen auch eine Rolle für die physiologische Immunregulation während der Schwangerschaft und die Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz spielen.

1.3. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Rolle von GR-MDSC für die Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz und den komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft weiter zu untersuchen. Da die Plazenta als direkte Grenzschicht zwischen Mutter und Fetus den Ort darstellt, an dem der

Toleranzinduktion gegenüber dem Fetus die wahrscheinlich größte Bedeutung zukommt, sollte untersucht werden, ob es in der humanen Plazenta zu einer Akkumulation und zu einer funktionellen Aktivierung von GR-MDSC kommt (Abbildung 1).

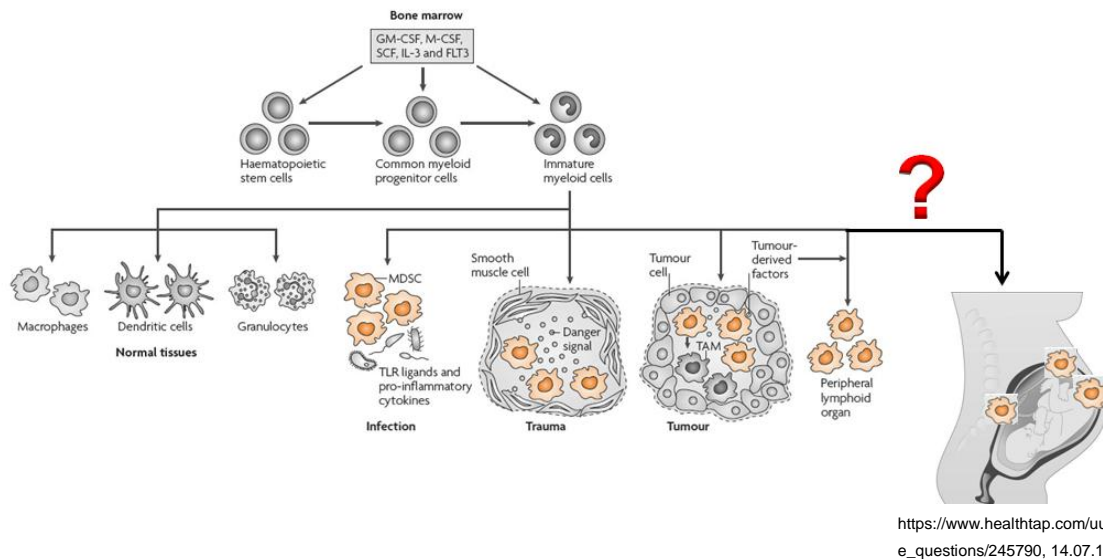


Abbildung 1: Ziel der Arbeit

MDSC sind myeloide Vorläuferzellen, welche im Rahmen von Tumorerkrankungen, Traumata und Infektionen akkumulieren. Ziel dieser Arbeit ist es, die Hypothese, dass MDSC für die fetomaternale Toleranz eine wichtige Rolle spielen zu untersuchen (in Anlehnung an Gabrilovich und Nagaraj 2009).

Außerdem sollte die Bedeutung von MDSC in zwei unterschiedlichen Situationen untersucht werden: zum einen wurde überprüft, ob es im Rahmen der Präeklampsie als einer der wichtigsten immunologischen Schwangerschaftskomplikationen zu Veränderungen der Anzahl oder der Funktion von GR-MDSC kommt. In einem Hypoxie-Modell der Präeklampsie wurden GR-MDSC weiter funktionell charakterisiert. Zum anderen wurden MDSC-Zahlen im Rahmen verschiedener assistierter Reproduktionsverfahren quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen genehmigt (Ethikvotum 178/2011BO1). Es wurden 8 Patientinnen mit Präeklampsie, 1 Patientin mit Eklampsie und 6 Patientinnen mit HELLP-Syndrom, 23 Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung sowie als Kontrollen 48 gesunde Schwangere mit normalem Schwangerschaftsverlauf und 27 nicht schwangere gesunde Erwachsene über den Zeitraum Mai 2012 bis Oktober 2014 eingeschlossen.

Die Rekrutierung der Präeklampsie- und HELLP-Syndrom-Patientinnen erfolgte über die Schwangerenstation, die Entbindungsstationen und den Kreißsaal der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Probandinnen nach assistierter Reproduktionsbehandlung wurden über die Kinderwunsch-Abteilung der Universitäts-Frauenklinik Tübingen rekrutiert. Die Rekrutierung der gesunden Schwangeren erfolgte über die Schwangerenambulanz der Universitäts-Frauenklinik Tübingen sowie über den in Tübingen niedergelassenen Gynäkologen Dr. Alexander Marmé. Von allen Probanden wurde eine schriftliche Einverständniserklärung nach erfolgter Aufklärung eingeholt.

Die Diagnosekriterien für die Krankheitsbilder Präeklampsie und HELLP-Syndrom wurden anhand der Leitlinie zu hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen der Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaftshochdruck/ Gestose der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. definiert, welche im Leitlinien-Register der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften zu finden ist (Register-Nr. 015/018). Die Präeklampsie wurde definiert als arterielle Hypertension $\geq 130/90$ mmHg mit begleitender Proteinurie ≥ 300 mg/24h bzw. $\geq +1$ auf einem Urinteststreifen, welche erstmals nach der abgeschlossenen 20. Schwangerschaftswoche aufgetreten war und sich nach der Geburt wieder normalisierte. Eine Präeklampsie wurde bei Fehlen einer Proteinurie auch dann diagnostiziert, wenn die arterielle Hypertension \geq

170/110 mmHg betrug oder alternativ neurologische Symptome, hämatologische Störungen, eine Leberbeteiligung, eine Nierenfunktionseinschränkung oder eine fetale Wachstumsrestriktion vorhanden waren. Das HELLP-Syndrom wurde definiert als gleichzeitiges Auftreten von Hämolyse mit Anstieg der Laktatdehydrogenase über den Normbereich, pathologisch erhöhten Leberwerten und erniedrigter Thrombozytenzahl $< 100.000/\mu\text{l}$.

Das Patientenkollektiv nach assistierter Reproduktionsbehandlung umfasste Frauen nach in-vitro Fertilisation und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion sowie nach künstlicher Insemination. Zur Reifung von mehreren Eizellen wurden bei der in-vitro Fertilisation und intrazytoplasmatischen Spermieninjektion unterschiedliche Stimulationsprotokolle angewandt. Folge war das Heranwachsen mehrerer Eizellen pro Zyklus. Durch Punktion der Follikel wurden Eizellen gewonnen und mit auf natürlichem Wege gewonnenen Spermien befruchtet. Dies geschah bei der in-vitro Fertilisation durch selbstständiges Eindringen des Spermiums in die Eizelle und bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion durch Injektion des Spermiums in die Eizelle. Es wurden außerdem befruchtete Eizellen kryokonserviert und gegebenenfalls später für einen sogenannten Kryo-Zyklus verwendet, bei welchem sich die aufgetauten befruchteten Eizellen zum Embryo entwickelten und diese transferiert wurden. Bei der künstlichen Insemination wurde eine sogenannte Low-Dose Stimulation angewandt um die Reifung einer Eizelle zu unterstützen und es wurden auf natürlichem Wege gewonnene Spermien in den weiblichen Genitaltrakt eingeführt. Eine Blutentnahme zur Bestimmung des humanen Choriongonadotropins erfolgte an Tag 14 nach Transfer der Embryonen bzw. nach Insemination. Zur selben Zeit erfolgte die Blutentnahme zur Quantifizierung der GR-MDSC. Ein Wert des humanen Choriongonadotropins von >5 IU/l galt als Zeichen für eine eingetretene Schwangerschaft.

2.2. Isolation von mononukleären Zellen und granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC)

Wie bereits beschrieben ist ein wesentliches Charakteristikum von GR-MDSC ihre im Vergleich zu reifen Granulozyten geringere Dichte. Dies führt dazu, dass GR-MDSC bei der Dichtegradientenzentrifugation in der Fraktion der mononukleären Zellen zusammen mit Lymphozyten und Monozyten sedimentieren und sich dadurch von reifen Granulozyten absondern lassen (Brandau et al. 2011; Rieber, Gille et al. 2013).

2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut

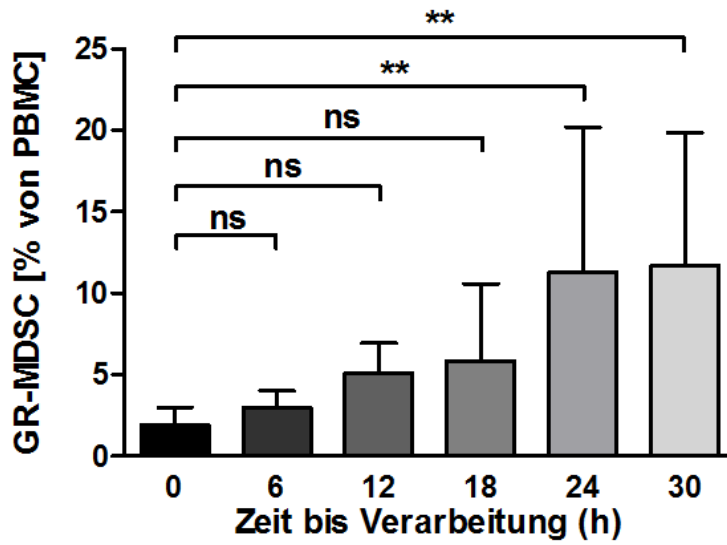
Zur Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) bzw. der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes (cord blood mononuclear cells, CBMC) wurde die von Böyum, A. 1968 vorgestellte Ficoll-Methode, basierend auf Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Hierzu wurde Vollblut bzw. Nabelschnurblut im Verhältnis 1:1 bis 1:9 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, PBS-Dulbecco, Fa. Biochrom, Berlin) gemischt, diese Suspension im Verhältnis 2:1 mithilfe einer serologischen Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml, Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) sowie der Pipettierhilfe accu-jet pro (Fa. Brand, Wertheim) in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml, Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) auf Biocoll (Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077 g/ml, Fa. Biochrom, Berlin) geschichtet und für 25 min bei 20 °C und 400 g ohne Bremse in der Zentrifuge Rotanta 46 RS bzw. Rotanta 460 RS (Fa. Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Die weniger dichten PBMC bzw. CBMC bildeten einen Ring oberhalb des Biocoll, wohingegen Granulozyten und Erythrozyten sedimentierten. Die PBMC bzw. CBMC wurden vorsichtig mit einer serologischen Pipette abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen durch Zentrifugation für 10 min bei 10 °C bzw. 4 °C und 500 g bzw. 400 g. Vor dem letzten Waschschrift wurden 100 µl Zellsuspension mithilfe einer Pipette (Fa. Abimed, Langenfeld) in ein Reaktionsgefäß (Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) überführt und die Zellkonzentration im Hämocytometer Sysmex

KX-21N (Fa. Sysmex GmbH, Norderstedt) ermittelt. Zuletzt wurden die PBMC bzw. CBMC in PBS auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

Für die T-Zell-Proliferationsversuche erfolgte die Isolation der Zellen unter sterilen Bedingungen mit Verwendung einer Sterilbank der Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart.

EDTA-Blutproben für die Quantifizierung von GR-MDSC wurden innerhalb von 24 Stunden, Natrium-Heparin-Blutproben für die funktionellen Versuche unmittelbar nach der Abnahme verarbeitet. Die mittlere Lagerungszeit der Blutproben unterschied sich nicht zwischen den zu vergleichenden Gruppen. Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit des Anteils von GR-MDSC an PBMC und die Abhängigkeit der absoluten Zahl von GR-MDSC in PBMC von der Lagerungszeit der Blutproben.

A



B

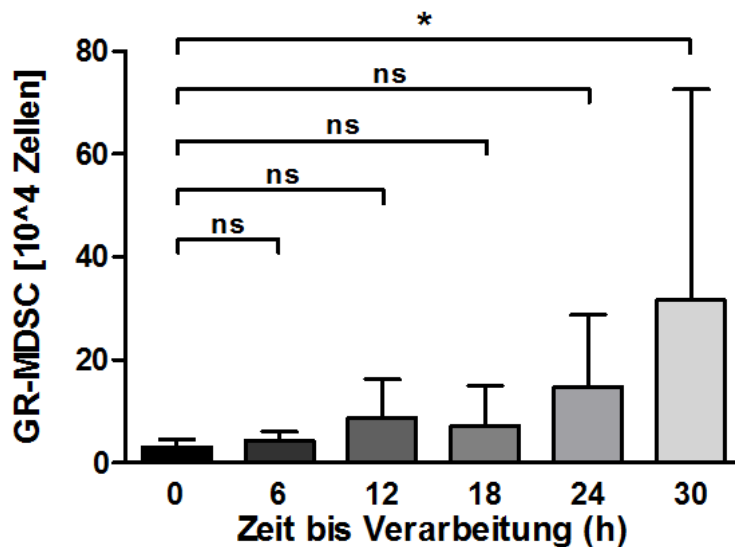


Abbildung 2: Der Anteil an GR-MDSC ist abhängig von der Zeit bis zur Verarbeitung der Blutproben

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 18, 24, 30 Stunden (h) nach Blutentnahme aus 1 ml peripherem Blut von gesunden, nicht schwangeren Erwachsenen isoliert und der Anteil an granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC) mittels CD66b/CD33/CD14/HLA-DR-Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Prozentualer Anteil von GR-MDSC an PBMC. (B) GR-MDSC in absoluten Zellzahlen. Mittelwert +/- Standardabweichung, **p<0,01, *p<0,05, ns nicht signifikant, Dunnett's Multiple Comparison Test

2.2.2. Isolation von mononukleären Zellen aus Plazentagewebe

Plazentaprobe wurden innerhalb einer Stunde nach Spontangeburt bzw. nach Entbindung per Sektio verarbeitet. Es wurden Proben mit einer Größe von ca. 5 cm² über die gesamte Dicke der Plazenten entnommen. In Anlehnung an Kropf et al. (2007) und Trundley et al. (2006) wurde das Plazentagewebe mechanisch mit Schere und Skalpell in einer Petrischale (Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) zerkleinert, in PBS gelöst und durch ein 40 µm Zellsieb (Fa. BD Falcon, heute: Corning Life Sciences, Tewksbury MA, USA) gefiltert. Die gefilterte Zellsuspension wurde im Verhältnis 2:1 auf Biocoll geschichtet. Die weitere Isolation der mononukleären Zellen aus der Plazenta (placenta mononuclear cells, PLMC) erfolgte entsprechend der Isolation von PBMC bzw. CBMC.

2.2.3. Isolation von GR-MDSC mithilfe Magnetic Activated Cell Sorting

Die Anreicherung von GR-MDSC erfolgte mithilfe Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) nach Anleitung der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach. Aufgereinigte PBMC bzw. CBMC bzw. PLMC wurden zunächst mit 4 °C kaltem Running Buffer (Universitätsapotheke Tübingen) gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und mit 4 °C kalten Reagenzien. Es wurden 2×10^7 – 1×10^8 Zellen in 100 µl Running Buffer gelöst und mit 5 µl anti-CD66b-FITC (G10F5, IgM, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg) pro 1×10^7 Zellen für 10 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Nach einem Waschschrift durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 310 g erfolgte die Aufnahme der Zellen in 90 µl Running Buffer und 10 µl anti-FITC-gekoppelten magnetischen Beads (anti-FITC MicroBeads, Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) pro 1×10^7 Zellen und anschließende Inkubation für 15 min bei 4 °C und Dunkelheit. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl Running Buffer aufgenommen und mit dem autoMACS Pro Separator (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) durch Positivselektion über zwei Säulen sortiert. Die Reinheitsbestimmung erfolgte im Durchflusszytometer FACSCalibur (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) nach Färbung mit Propidiumiodid (Fa. Sigma-Aldrich,

Taufkirchen bei München) und nach Selektion der vitalen Zellen. Es konnte eine Reinheit der GR-MDSC von über 90 % erzielt werden (Abbildung 3).

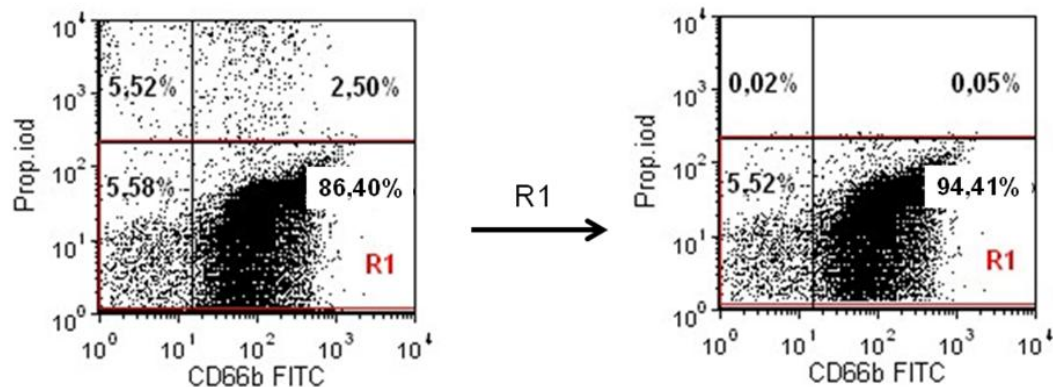


Abbildung 3: Reinheit der über MACS isolierten GR-MDSC

Zur Isolation von granulozytären myeloiden Suppressorzellen wurden diese mithilfe des Oberflächenmarkers CD66b sowie magnetischer Beads über den autoMACS Pro Separator angereichert. Nach Färbung der toten Zellen mit Propidiumiodid (Prop.iod) erfolgte die durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung nach Selektion der vitalen Zellen in R1.

2.3. T-Zell-Proliferations-Assay

Die suppressive Wirkung von GR-MDSC auf T-Zellen wurde anhand eines T-Zell-Proliferations-Assays mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) bestimmt (Lyons und Parish 1994).

2.3.1. CFSE-Färbung und Stimulation der Zielzellen

Als Zielzellen dienten beim T-Zell-Proliferationsversuch CFSE-markierte PBMC von gesunden erwachsenen Spendern. Die PBMC wurden wie oben beschrieben steril isoliert und 1×10^7 Zellen pro ml in PBS gelöst. Es folgte die Inkubation mit 25 μ l einer 1:50 verdünnten CFSE-Lösung (Fa. Invitrogen, Heidelberg) für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurde zunächst reines, zuvor 30 min im 56 °C warmen Wasserbad (Fa. GFL GmbH, Burgwedel) inaktiviertes fetales Kälberserum (Fa. Biochrom, Berlin) und nach 1 min RPMI-

Medium (RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l HCO₃, ohne L-Gutamin, Fa. Biochrom, Berlin) dazugegeben und die Zellen einmal gewaschen durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 310 g. Schließlich wurde die Zellkonzentration im Hämozytometer ermittelt und 5x10⁵ Zellen pro ml in Vollmedium (5 % Spender-Serum, 1 % L-Glutamin (Fa. Biochrom, Berlin) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin) in RPMI-Medium) aufgenommen. Ein Teil der CFSE-gefärbten PBMC wurde unmittelbar vor Ansetzen der Kultur mit 1,5 µg/ml OKT3 (LEAF purified anti-human CD3, OKT3, IgG_{2a}k, Fa. Biologend, San Diego CA, USA) sowie 150 U/ml Interleukin-2 (IL-2) (Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) stimuliert.

2.3.2. Kulturansatz der T-Zell-Proliferationsversuche

Nach Isolation der GR-MDSC im autoMACS Pro Separator wurde deren Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Fa. Hecht Assistent, Sondheim) bestimmt und 1x10⁶ Zellen pro ml in Vollmedium gelöst. Der Kulturansatz erfolgte in 96-well-Rundbodenkulturplatten (Fa. Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen). Die GR-MDSC wurden in den Verhältnissen PBMC:MDSC 6:1, 2:1 und 1:1 mit stimulierten, CFSE-gefärbten PBMC in Kultur gesetzt. Die Endkonzentration der stimulierenden Substanzen betrug 1 µg/ml OKT3 und 100 U/ml IL-2. Als Kontrollen dienten nicht stimulierte CFSE-gefärbte PBMC sowie stimulierte CFSE-gefärbte PBMC ohne Zugabe von GR-MDSC.

2.3.3. T-Zell-Proliferationsversuch unter Hypoxie

Die Isolation der PBMC und GR-MDSC, die CFSE-Färbung und der Kulturansatz erfolgten wie oben beschrieben. Die 96-stündige Kultur erfolgte in der Hypoxiebank Invivo₂ 1000 (Fa. Ruskinn Technology Ltd, Bridgend, UK) unter verminderten Sauerstoffbedingungen bei 2 % O₂, 5 % CO₂ und 93 % N₂. Um eine Austrocknung in der Hypoxiebank vorzubeugen wurden die beim Kulturansatz leer gebliebenen Löcher der Kulturplatte mit Ampuwa-Lösung (Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg) aufgefüllt.

2.4. Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Bestimmung der ROS-Produktion erfolgte durchflusszytometrisch anhand der Oxidation von Dihydrorhodamin 123 (DHR) zum grün fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin 123 (Crow 1997).

2.4.1. Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch GR-MDSC aus humaner Plazenta, peripherem Blut gesunder Schwangerer und Nabelschnurblut unter Normoxie

Zur Bestimmung der ROS-Produktion durch GR-MDSC aus humaner Plazenta (PL-MDSC), GR-MDSC aus dem peripheren Blut der Schwangeren (S-MDSC) und GR-MDSC aus Nabelschnurblut (NSB-MDSC) wurden PLMC, PBMC der zugehörigen Schwangeren (S-PBMC) und CBMC aus dazugehörigem Nabelschnurblut isoliert und 4×10^5 Zellen pro ml in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} (Fa. Biochrom, Berlin) gelöst. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten im Wasserbad bei 37 °C. 1 ml der Zellsuspension wurde mit 1 μ mol/ml DHR (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München) für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-, 20- bzw. 30-minütige Stimulation mit 100 nmol/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München). Als Kontrolle dienten nicht stimulierte, DHR-gefärbte Zellen.

2.4.2. Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch GR-MDSC aus humaner Plazenta unter Hypoxie

Zur Bestimmung des Einflusses von Hypoxie auf die ROS-Produktion durch PL-MDSC wurde der Versuch wie oben beschrieben, jedoch nur mit PL-MDSC, durchgeführt. Vor der DHR-Färbung und PMA-Stimulation erfolgte eine zweistündige Inkubation unter verminderten Sauerstoffbedingungen in der Hypoxiebank Invivo₂ 1000. Die DHR-Färbung und PMA-Stimulation wurden ebenfalls in der Hypoxiebank durchgeführt.

2.5. Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Diverse Analysen wurden mithilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) durchgeführt. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden FACS-Röhrchen (5ml

round-bottom polystyrene test tubes) der Firma BD Falcon, heute: Corning Life Sciences, Tewksbury MA, USA und das Durchflusszytometer FACSCalibur sowie die Software CellQuest Pro der Firma BD Biosciences, Heidelberg verwendet.

2.5.1. Immunphäotypisierung

Die immunphäotypische Charakterisierung von MDSC erfolgte wie in vorangegangenen Studien von Brandau et al. (2011), Duffy et al. (2013) und Rodriguez et al. (2009) über die Oberflächenmarker CD66b, CD33, CD14 und HLA-DR. GR-MDSC wurden definiert als CD66b⁺/ CD33⁺/ CD14⁻/ HLA-DR^{low/-} Zellen innerhalb der PBMC-Fraktion (Abbildung 4). Soweit nicht anders vermerkt wurden Antikörper der Firma BD Pharmingen, Heidelberg verwendet. Es wurden 2×10^5 PBMC mit 1 μ l anti-CD66b-FITC (G10F5, IgM), 2 μ l anti-CD33-PE (WM53, IgG₁ κ), 1 μ l anti-CD14-APC (M ϕ P9, IgG_{2b} κ , Fa. BD Biosciences, San Jose CA, USA) und 0,5 μ l anti-HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (G46-6, IgG_{2a} κ) für 15 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgten ein Waschschrift mit FACS-Puffer, bestehend aus 0,1 % Natriumazid (Fa. AppliChem, Darmstadt) in FACS-Flow Sheath Fluid (Fa. BD Biosciences, San Jose CA, USA) und die durchflusszytometrische Analyse.

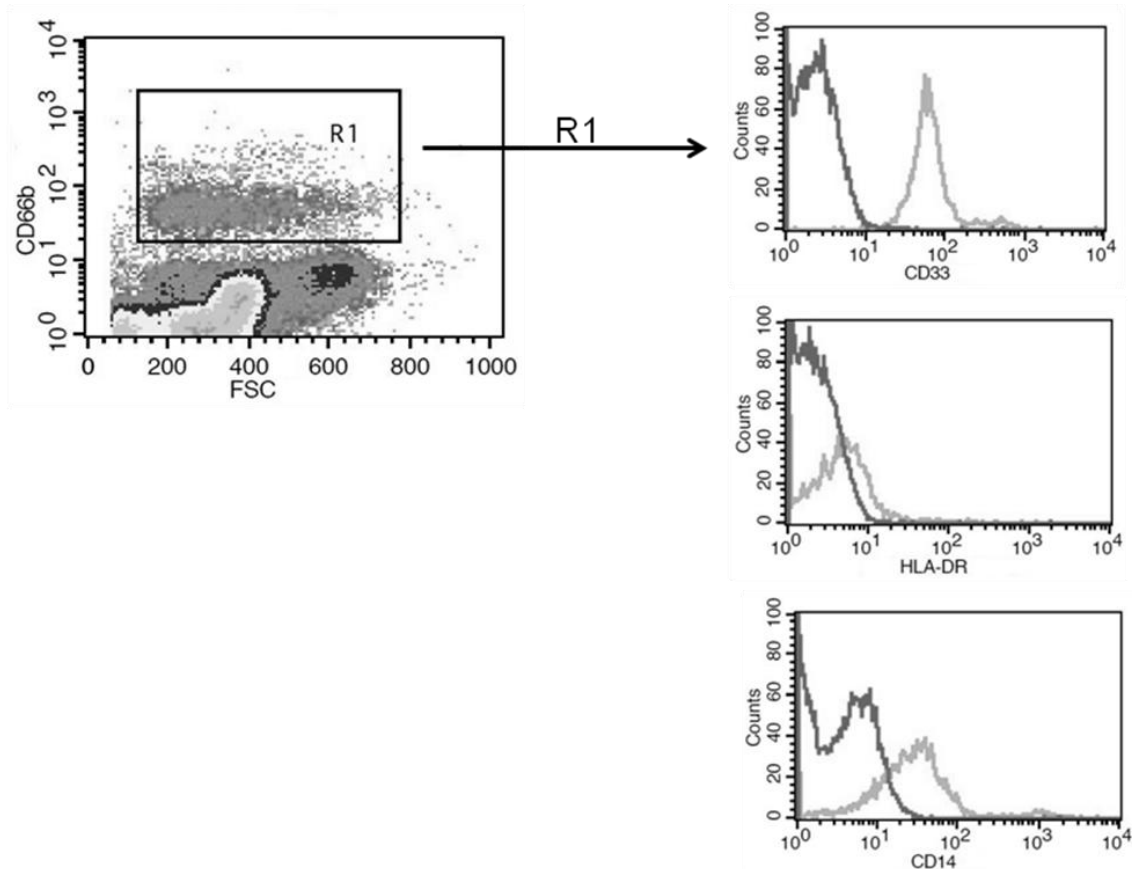


Abbildung 4: Charakterisierung von GR-MDSC

Nach Isolation der Fraktion der mononukleären Zellen erfolgte die Charakterisierung von granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC) anhand der Oberflächenmarker CD66b/ CD33/ CD14/ HLA-DR. Selektion der CD66b⁺ GR-MDSC in R1. Histogramm der Oberflächenmarker (hellgrau, Negativkontrolle dunkelgrau) nach Selektion der GR-MDSC in R1.

2.5.2. Intrazelluläre Arginase 1- und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase-Färbung

Für die Intrazellulärfärbung wurden 2×10^5 extrazellulär gefärbte PBMC, PLMC und CBMC mit Waschpuffer (0,1 % bovines Serumalbumin (Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) und 0,1 % Natriumazid in PBS) gewaschen und anschließend mit 100 μ l Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose CA, USA) für 10 min bei 37 °C im Brutschrank (Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart) inkubiert. Es folgte die Zugabe der intrazellulären Antikörper gegen Arginase 1 (anti-human Arginase 1 der Fa. Hycultec, Beutelsbach, markiert mit DY-485XL

der Fa. Dyomics, Jena) und iNOS (NOS2, C-11, IgG₁κ, Fa. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) sowie deren Isotyp-Kontrollen (Fa. BD Phosflow, Heidelberg) und erneute Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.3. T-Zell-Proliferationsnachweis

Nach 96-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen aus der Kultur genommen, mit 1 µl anti-CD4-PE (RPA-T4, IgG₁κ, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg) und 2 µl anti-CD8-APC (RPA-T8, IgG₁κ, Fa. BD Pharmingen, Heidelberg) für 15 min bei 4 °C und Dunkelheit gefärbt und einmal gewaschen. Zur Bestimmung der T-Zell-Proliferation wurde die Fluoreszenzintensität von CFSE durchflusszytometrisch analysiert und mit Hilfe des Programms CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet. CD4⁺- und CD8⁺-Zellen wurden gegatet. Der Anteil vermindert fluoreszierender Filialzellen wurde zu den am intensivsten fluoreszierenden Ursprungszellen ins Verhältnis gesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden Proben ohne Zugabe von GR-MDSC als 100 % gesetzt und die Proliferationsraten mit zugesetzten MDSC darauf bezogen.

2.5.4. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies

Nach Ende der Stimulation mit PMA erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis. Die DHR-gefärbten Zellen wurden nach der Stimulation mit PMA gewaschen, mit anti-CD66b-APC (G10F5, IgM, Fa. eBioscience, San Diego CA, USA) für 15 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert, erneut gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.6. Immunhistochemische Plazentafärbung

Für die immunhistochemischen Analysen wurden Plazentaprobe bis zur weiteren Verarbeitung durch Frau Dr. Susanne Haen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) in Formalin fixiert. Die Proben wurden anschließend in Paraffin gebettet, es wurden 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese wurden automatisch mithilfe der Ventana Benchmark XT (Fa.

Ventana medical systems, Tucson AZ, USA) gefärbt. Kurz erläutert wurden hierbei die Schnitte entparaffiniert durch Erhitzen auf 70 °C für 20 min und waschen und nach Hitze-induzierter Epitop-Wiederherstellung im Zellkulturmedium CC1 (pH 8,4, Fa. Ventana medical systems, Tucson AZ, USA) mit dem primären CD66b-Antikörper (G10F5, IgM, Fa. Biolegend, San Diego CA, USA, 1:50 Verdünnung) für 32 min bei 37 °C gefärbt. Gebundene Antikörper wurden mithilfe des OptiView DAB Detection Kits (Fa. Ventana medical systems, Tucson AZ, USA) sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin nach Gill gegengefärbt.

2.7. Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Statistik-Software GraphPad Prism 5.04 (Fa. Graph Pad Software, La Jolla CA, USA). Zur Analyse von Unterschieden zwischen zwei Gruppen unverbundener Stichproben wurden die Daten zunächst mittels des D'Agostino-Pearson-Tests auf Normalverteilung geprüft. Nicht normalverteilte Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests, normalverteilte Daten mithilfe des t-Tests bzw. bei Ungleichheit der Varianzen mithilfe des Welch-Tests analysiert. Bei Paarvergleichen verbundener Stichproben wurde der Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test angewandt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen verbundener Stichproben wurden die Gruppen ebenfalls zunächst auf Normalverteilung analysiert und bei Vorhandensein nicht normalverteilter Daten anhand des Dunnett's Multiple Comparison Tests verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Quantifizierung und Charakterisierung von GR-MDSC in der Plazenta (PL-MDSC) gesunder Schwangerer

3.1.1. GR-MDSC akkumulieren in der Plazenta

Zunächst wurde der Anteil von GR-MDSC an mononukleären Zellen aus Plazenta, Schwangerenblut und Nabelschnurblut verglichen. Abbildung 5a zeigt repräsentative Density Plots eines solchen Versuchs. Der Anteil an GR-MDSC war in PLMC signifikant erhöht im Vergleich zu S-PBMC und CBMC (Median (Quartilsabstand), 3,00 % (2,19 % – 4,96 %) vs. 1,71 % (1,20 % - 2,84 %) bzw. 1,79 % (1,39 % - 3,61 %), n = 13, p < 0,05, Abbildung 5b). Um herauszufinden ob GR-MDSC zu einem bestimmten Teil der Plazenta zugeordnet werden können wurden immunhistochemische Schnitte für CD66b von Plazentaprobe angefertigt. Abbildung 5c zeigt einige wenig CD66b-exprimierende Zellen im dezidualen Stroma (Abbildung 5c, oben) sowie viele stark CD66b-exprimierende Zellen im intervillösen Raum (Abbildung 5c, unten links), beides zur maternalen Seite der Plazenta gehörend. Einige CD66b-exprimierende Zellen konnten im fetalen Chorionzottergewebe der Plazenta (Abbildung 5d, unten rechts) gefunden werden.

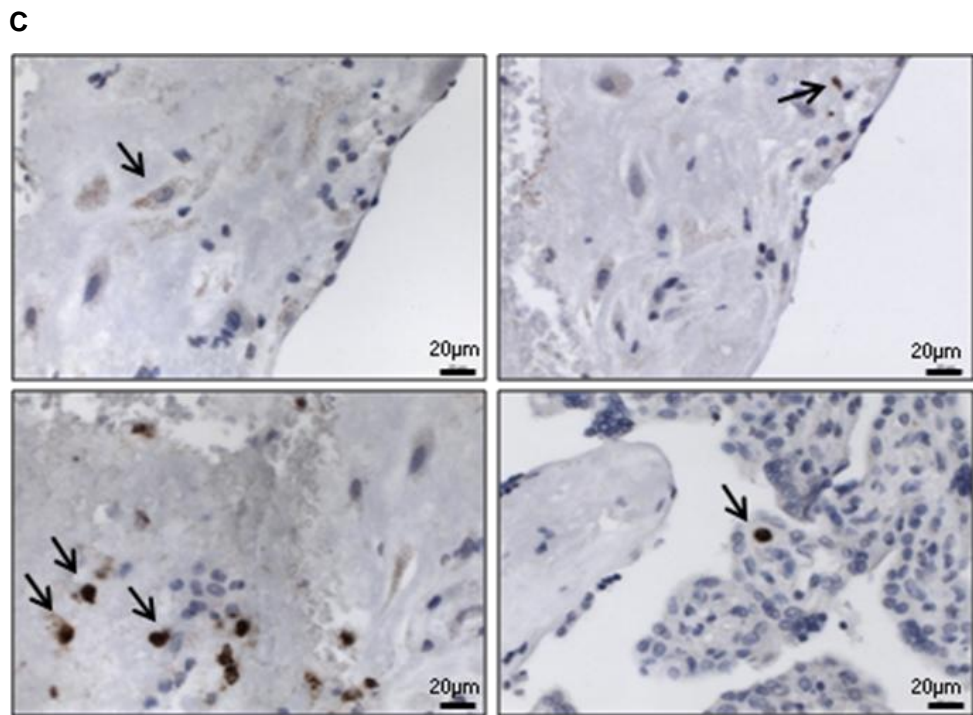
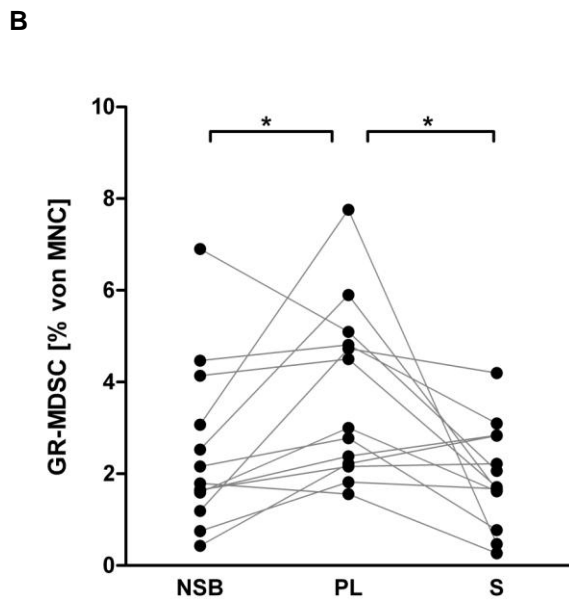
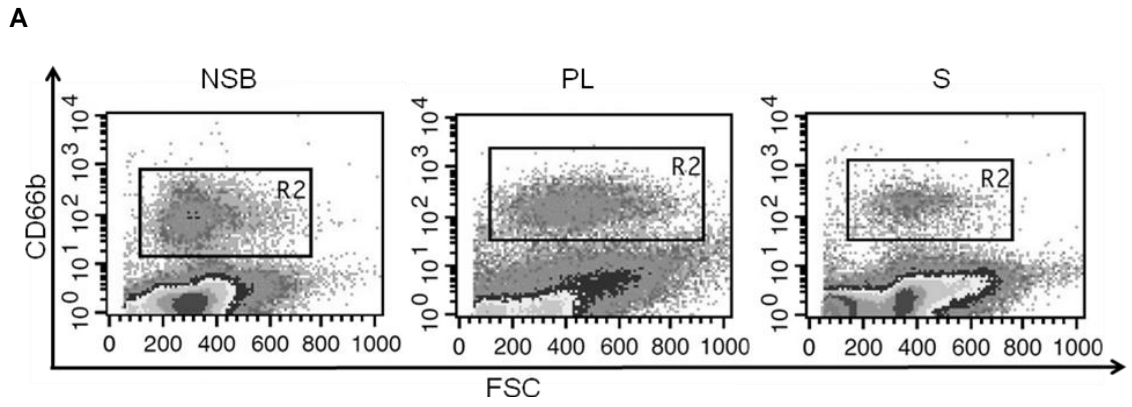


Abbildung 5: GR-MDSC akkumulieren in der Plazenta

Der Anteil von granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC) an mononukleären Zellen (MNC) wurde vergleichend in Nabelschnurblut (NSB), Plazentagewebe (PL) und peripherem Blut der zugehörigen Schwangeren (S) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (A) Repräsentative Density Plots zeigen die Population der CD66b⁺ GR-MDSC in der Fraktion der mononukleären Zellen aus PL, S und NSB. (B) Prozentualer Anteil von GR-MDSC an der Fraktion der mononukleären Zellen im Punktediagramm. Die Verbindungsstriche zeigen jeweils verbundene Proben an. n=13, *p<0,05, Dunnett's Multiple Comparison Test. (C) Immunhistochemische CD66b-Färbung (braun) von Schnitten von deziduaem Stroma (oben), intervillösem Raum (unten links) und Chorionzottingewebe (unten rechts). Aufnahmen wurden bei 50facher Vergrößerung gemacht.

3.1.2. PL-MDSC exprimieren die Effektorenzyme Arginase 1 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und produzieren reaktive Sauerstoffspezies

PL-MDSC exprimierten die Enzyme Arginase 1 und iNOS (Abbildung 6a, 6b) und produzierten ROS (ohne Stimulation sowie nach Stimulation mit PMA, Abbildung 6c).

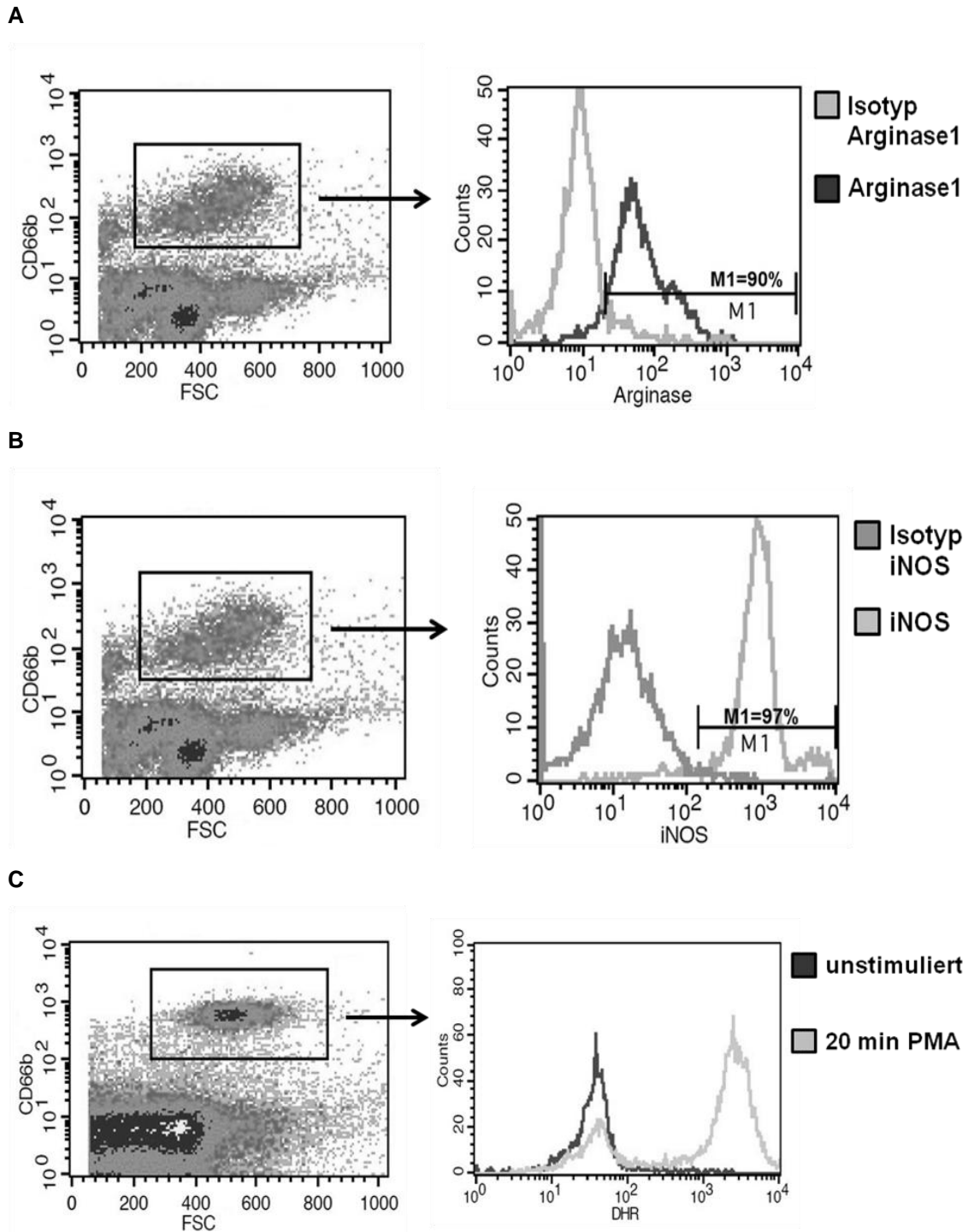


Abbildung 6: PL-MDSC exprimieren Arginase 1 und iNOS und produzieren ROS

Es wurden mononukleäre Zellen aus Plazentagewebe isoliert und die Expression von Arginase 1 und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in myeloiden Suppressorzellen der Plazenta (PL-MDSC) mittels Intrazellulärfärbung sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch PL-MDSC mittels Oxidation des Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 (DHR) durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Gating-Strategie der CD66b⁺ PL-MDSC im

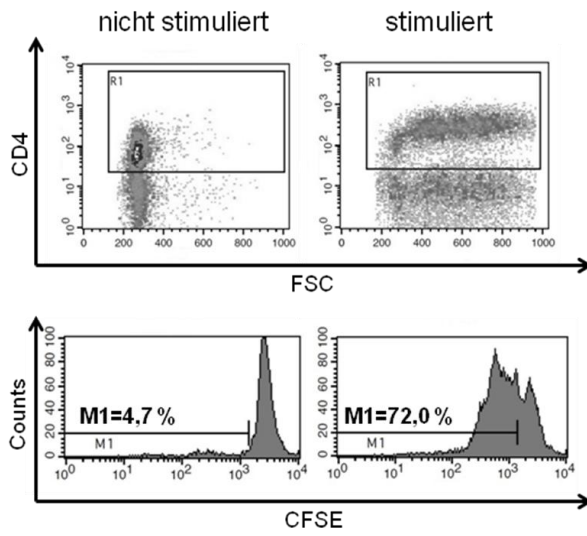
Density Plot und Histogramm der Arginase 1-Expression (dunkelgrau) durch PL-MDSC. (B) Gating-Strategie der CD66b⁺ PL-MDSC im Density Plot und Histogramm der iNOS-Expression (hellgrau) durch PL-MDSC. (C) Gating-Strategie der CD66b⁺ PL-MDSC im Density Plot und Histogramm der ROS-Produktion durch PL-MDSC im unstimulierten Zustand (dunkelgrau) und nach 20-minütiger Stimulation mit PMA (hellgrau).

3.1.3. PL-MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation

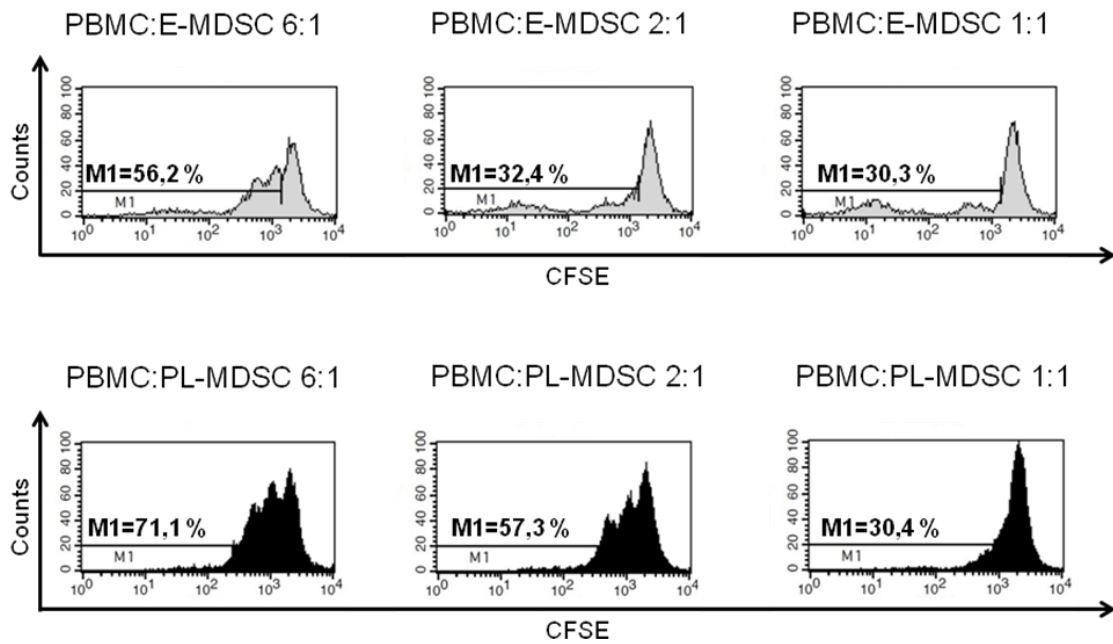
Abbildung 7a und 7c zeigen repräsentative Histogramme der CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne und mit Zugabe von PL-MDSC. Zugabe von PL-MDSC zu CFSE-markierten und mit OKT3- /IL-2-stimulierten PBMC reduzierte die CD4⁺-T-Zell-Proliferation konzentrationsabhängig auf 86,1 +/- 13,0 % (PBMC:GR-MDSC 6:1), 71,9 +/- 16,9 % (PBMC:GR-MDSC 2:1) und 52,9 +/- 18,3 % (PBMC:GR-MDSC 1:1) verglichen mit der CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von GR-MDSC, welche auf 100 % gesetzt wurde (n = 11-15, p<0,005, Abbildung 7b). GR-MDSC aus dem peripheren Blut eines nicht schwangeren Erwachsenen (E-MDSC) reduzierten die CD4⁺-T-Zell-Proliferation auf 87,8 +/- 7,6 % (PBMC:GR-MDSC 6:1), 67,0 +/- 22,6 % (PBMC:GR-MDSC 2:1) und 62,6 +/- 25,8 % (PBMC:GR-MDSC 1:1) (n = 13-14, p<0,005, Abbildung 7b). Die CD8⁺-T-Zell-Proliferation wurde durch PL-MDSC ebenfalls auf 85,0 +/- 18,6 % (PBMC:GR-MDSC 6:1), 73,0 +/- 17,5 % (PBMC:GR-MDSC 2:1) und 53,7 +/- 14,6 % (PBMC:GR-MDSC 1:1) gehemmt (n = 11-15, p<0,01, Abbildung 7d). E-MDSC hemmten die CD8⁺-T-Zell-Proliferation auf 91,3 +/- 9,5 % (PBMC:GR-MDSC 6:1), 70,6 +/- 29,9 % (PBMC:GR-MDSC 2:1) und 63,2 +/- 28,7 % (PBMC:GR-MDSC 1:1) (n = 13-14, p<0,01, Abbildung 7d).

A

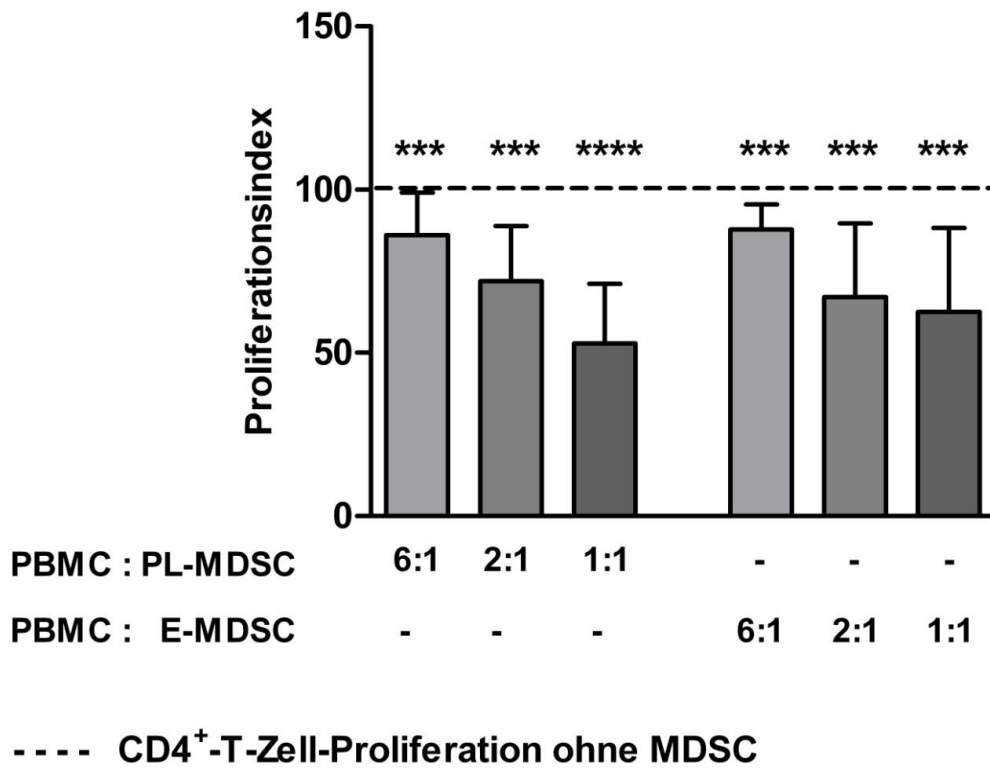
CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne MDSC



CD4⁺-T-Zell-Proliferation mit MDSC

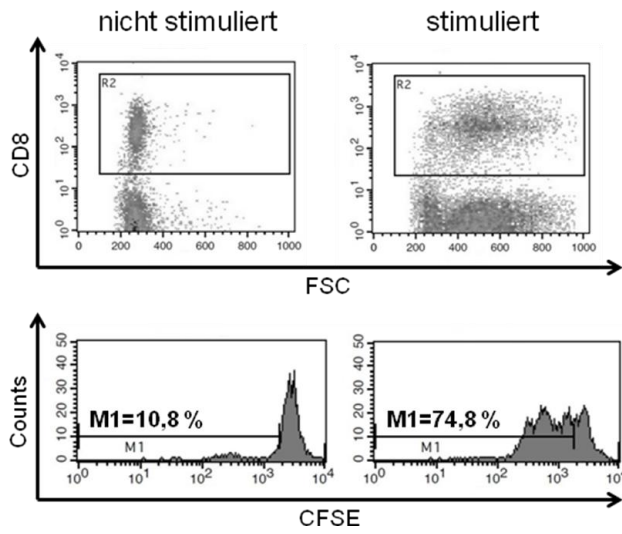


B

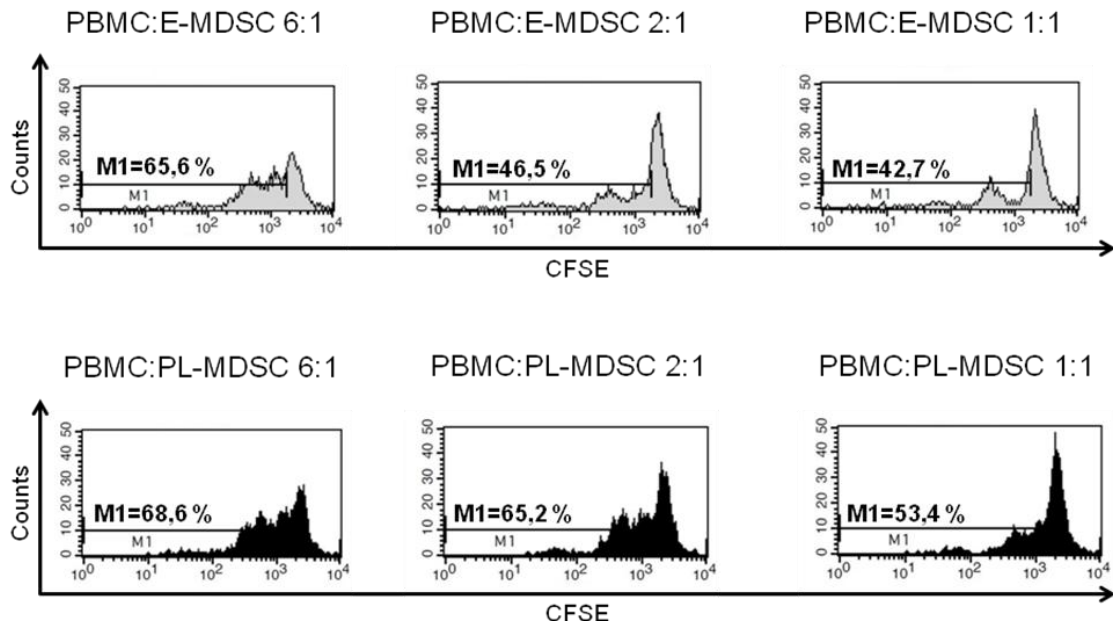


C

CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne MDSC



CD8⁺-T-Zell-Proliferation mit MDSC



D

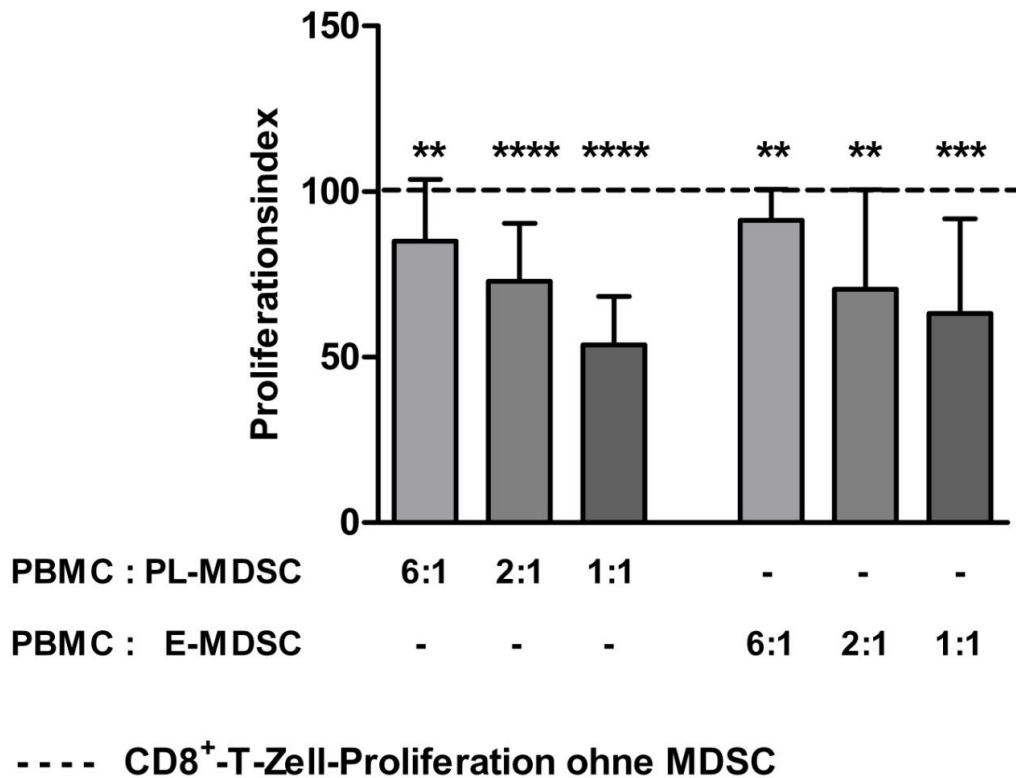


Abbildung 7: PL-MDSC hemmen die CD4⁺- und die CD8⁺-T-Zell-Proliferation

Über MACS isolierte granulozytäre myeloide Suppressorzellen aus der Plazenta (PL-MDSC, schwarz) bzw. aus peripherem Blut gesunder, nicht schwangerer Erwachsener (E-MDSC, hellgrau) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu CFSE-markierten und mit OKT3-/ IL-2-stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gesunder, nicht schwangerer Erwachsener gegeben und 96h unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Als Kontrollen dienten nicht stimulierte PBMC sowie mit OKT3-/ IL-2-stimulierte PBMC ohne Zugabe von MDSC. (A) Repräsentative Histogramme der CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne (dunkelgraue Histogramme) und mit Zugabe von PL-MDSC (schwarze Histogramme) bzw. E-MDSC (hellgraue Histogramme). (B) Proliferationsindex von CD4⁺-T-Zellen ohne und mit Zugabe von PL-MDSC bzw. E-MDSC. Die gestrichelte Linie gibt die Proliferationsindex der mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von MDSC an. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=11-15, ***p<0,005, ****p<0,001, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test (C) Repräsentative Histogramme der CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne (dunkelgraue Histogramme) und mit Zugabe von PL-MDSC (schwarze Histogramme) bzw. E-MDSC (hellgraue Histogramme). (D) Proliferationsindex von CD8⁺-T-Zellen ohne und mit Zugabe von PL-MDSC bzw. E-MDSC. Die gestrichelte Linie gibt die Proliferationsindex der mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von

MDSC an. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=11-15, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

3.2. Vergleichende funktionelle Analyse von PL-MDSC gesunder Schwangerer mit GR-MDSC aus peripherem Blut gesunder Schwangerer (S-MDSC) und aus Nabelschnurblut (NSB-MDSC)

3.2.1. Die Expression von Arginase 1 und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase ist in PL-MDSC im Vergleich zu S-MDSC und NSB-MDSC unverändert

Um Hinweise auf eine mögliche Aktivierung von GR-MDSC im Bereich der fetomaternalen Grenzschicht zu erlangen, wurde im nächsten Schritt die Expression von Arginase 1 und iNOS durch PL-MDSC im Vergleich zu S-MDSC und NSB-MDSC untersucht. Die Expression der Effektorenzyme Arginase 1 und iNOS, gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI), unterschied sich zwischen PL-MDSC und S-MDSC bzw. NSB-MDSC nicht (MFI Arginase 1 PL-MDSC 31,2 +/- 12,4 vs. S-MDSC 31,6 +/- 9,6 bzw. NSB-MDSC 26,2 +/- 10,9, MFI iNOS PL-MDSC 281 +/- 183 vs. S-MDSC 426 +/- 296 bzw. NSB-MDSC 390 +/- 213, n = 5, p > 0,05, Abbildung 8).

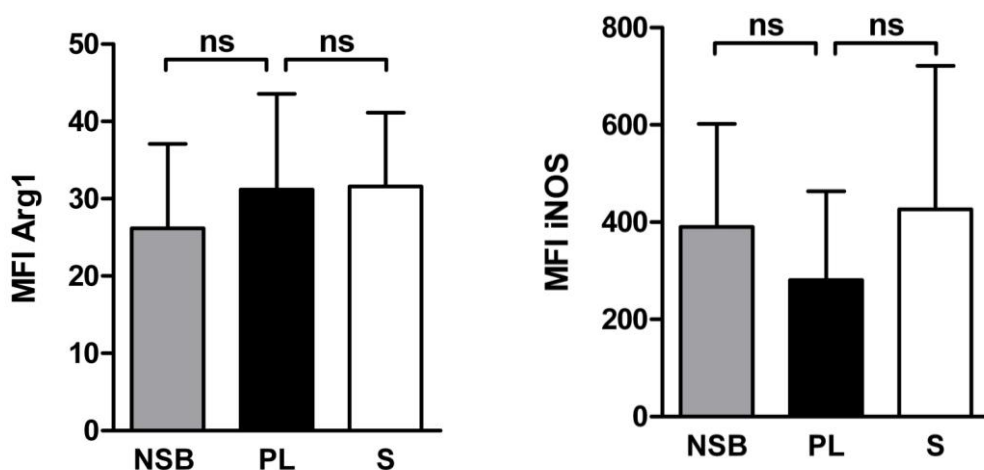


Abbildung 8: Die Expression der Effektorenzyme Arginase 1 und iNOS ist in PL-MDSC im Vergleich zu S-MDSC und NSB-MDSC unverändert

Die Expression der Effektorenzyme Arginase 1 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) wurde vergleichend in mononukleären Zellen aus Plazentagewebe (PL, schwarz), peripherem Blut der zugehörigen Schwangeren (S, weiß) und Nabelschnurblut (NSB, grau) mittels Intrazellulärfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Balkendiagramm zur Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Arginase 1 und iNOS. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=5, ns nicht signifikant, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

3.2.2. PL-MDSC produzieren mehr reaktive Sauerstoffspezies als S-MDSC und NSB-MDSC

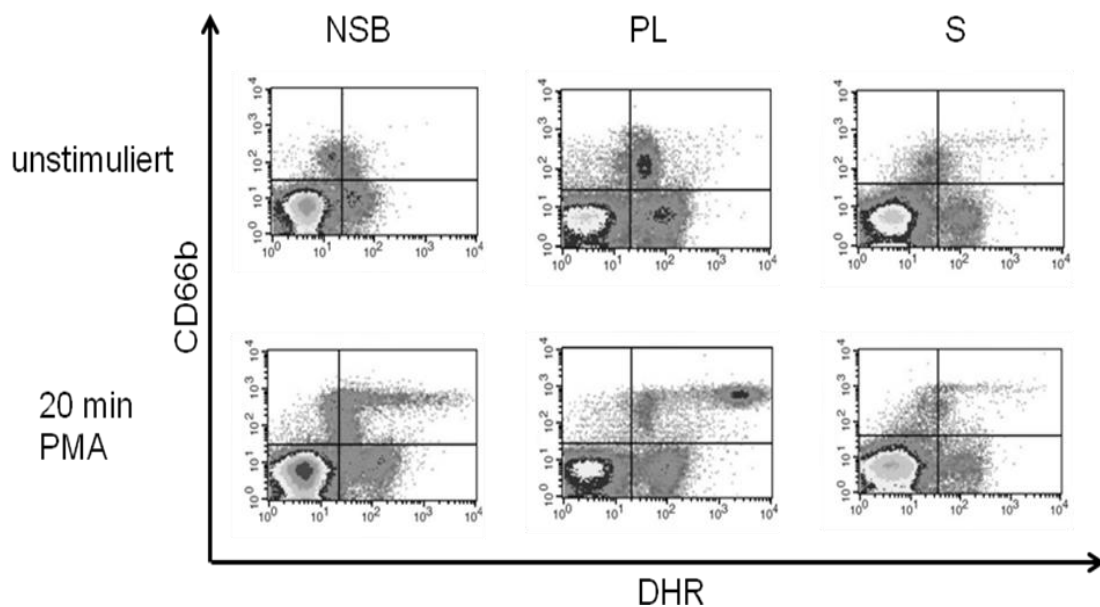
Weiterhin untersuchten wir die Produktion von ROS durch PL-MDSC im Vergleich zu jener durch S-MDSC und NSB-MDSC.

PL-MDSC produzierten sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach Stimulation mit PMA zu einem signifikant höheren Anteil ROS im Vergleich zu S-MDSC (unstimuliert PL-MDSC 40,3 +/- 26,0 % vs. S-MDSC 19,0 +/- 11,6 %, 10 min PMA PL-MDSC 76,7 +/- 12,5 % vs. S-MDSC 35,8 +/- 15,8 %, 20 min PMA PL-MDSC 80,4 +/- 8,9 % vs. S-MDSC 40,3 +/- 16,3 %, 30 min PMA PL-MDSC 84,0 +/- 7,6 % vs. S-MDSC 47,9 +/- 18,6 %, n = 8, p < 0,01, Abbildung 9b). Auch die ROS-Produktion pro Zelle, gemessen als MFI, war in PL-MDSC im Vergleich zu S-MDSC nach Stimulation mit PMA höher (10 min PMA MFI PL-MDSC 327 +/- 307 vs. MFI S-MDSC 86 +/- 44, 20 min PMA MFI PL-MDSC 785 +/- 535 vs. MFI S-MDSC 177 +/- 158, 30 min PMA MFI PL-MDSC 1140 +/- 650 vs. MFI S-MDSC 243 +/- 196, n = 8, p < 0,05, Abbildung 9c). Im unstimulierten Zustand unterschied sich die mittlere ROS-Produktion pro Zelle nicht zwischen PL-MDSC und S-MDSC (unstimuliert MFI PL-MDSC 76 +/- 34 vs. MFI S-MDSC 64 +/- 16, n = 8, p > 0,05, Abbildung 9c).

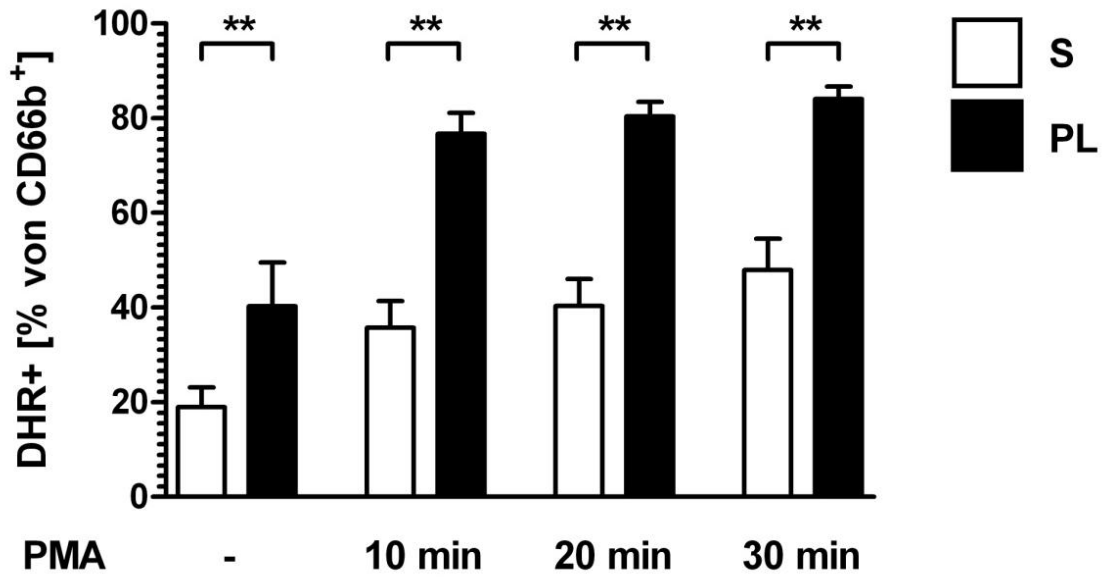
Ebenfalls zeigte sich eine stärkere ROS-Produktion durch PL-MDSC im Vergleich zu NSB-MDSC. Diese drückte sich aus in einem höheren Anteil ROS-produzierender Zellen bei PL-MDSC im Vergleich zu NSB-MDSC (unstimuliert PL-MDSC 57,0 +/- 20,9 % vs. NSB-MDSC 30,7 +/- 15,8 %, 10 min PMA PL-MDSC 61,7 +/- 20,9 % vs. NSB-MDSC 43,2 +/- 18,6 %, 20 min PMA PL-MDSC 69,0 +/- 23,1 % vs. NSB-MDSC 51,9 +/- 23,1 %, n = 5, p < 0,05, 30 min PMA PL-MDSC 72,8 +/- 21,0 % vs. NSB-MDSC 62,2 +/- 27,1 %, n = 5, p > 0,05,

Abbildung 9d). Hinsichtlich der ROS-Produktion pro Zelle, gemessen als MFI, war in PL-MDSC eine Tendenz zu erhöhter ROS-Produktion im Vergleich zu NSB-MDSC zu erkennen, es konnte jedoch nur im unstimulierten Zustand ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden (unstimuliert MFI PL-MDSC 51 +/- 8 vs. MFI NSB-MDSC 40 +/- 14 bzw. 10 min PMA MFI PL-MDSC 140 +/- 66 vs. MFI NSB-MDSC 68 +/- 24, 20 min PMA MFI PL-MDSC 332 +/- 235 vs. MFI NSB-MDSC 120 +/- 50, 30 min PMA MFI PL-MDSC 602 +/- 757 vs. MFI NSB-MDSC 183 +/- 79, n = 5, p < 0,05 bzw. p > 0,05, Abbildung 9e).

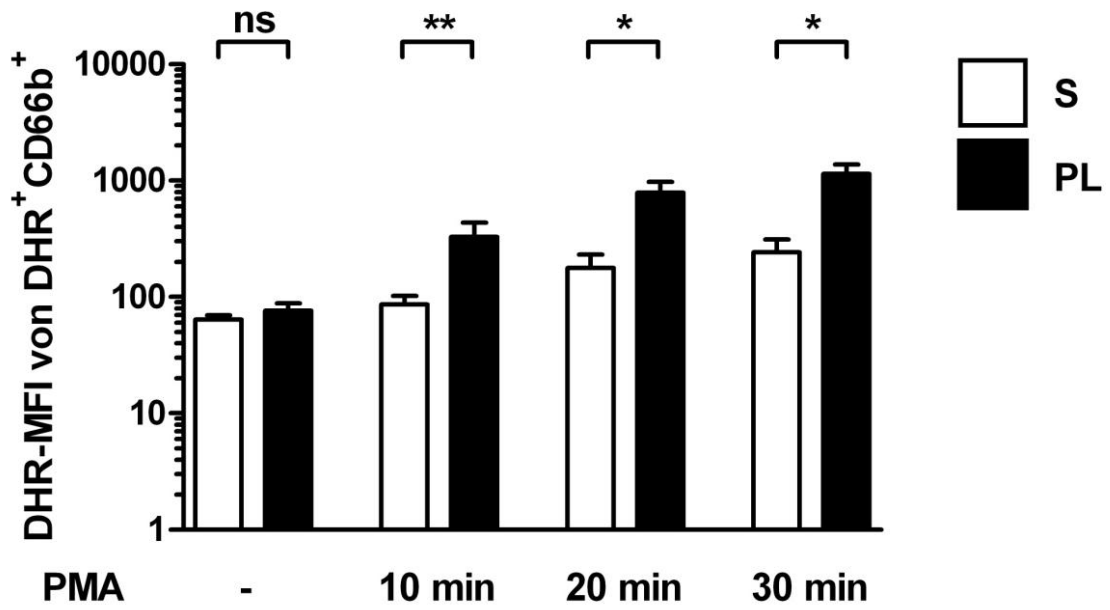
A



B



C



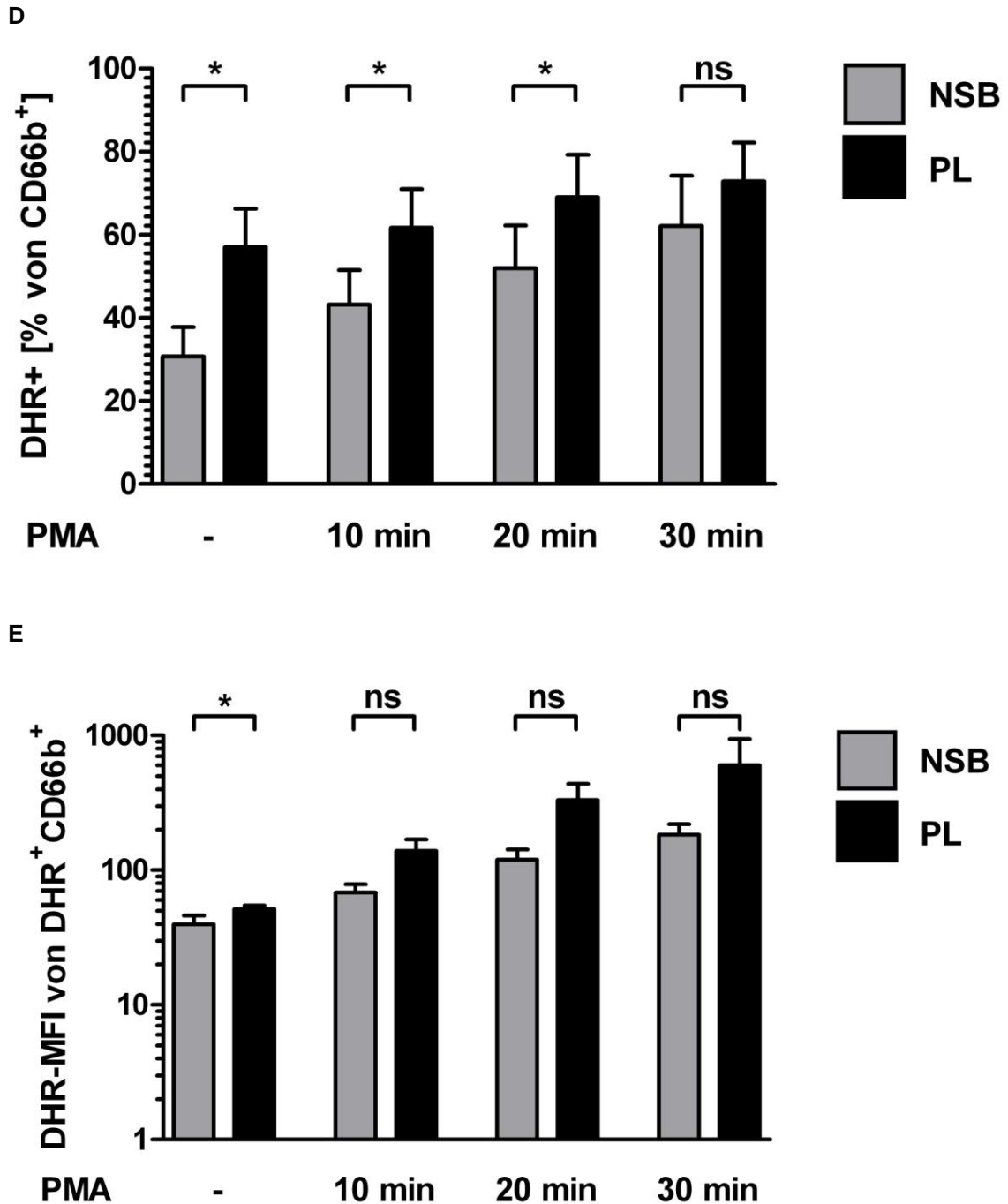


Abbildung 9: PL-MDSC produzieren mehr ROS als S-MDSC und NSB-MDSC

Die Fähigkeit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch granulozytäre myeloide Suppressorzellen (GR-MDSC) aus Plazentagewebe (PL, schwarz), peripherem Blut der zugehörigen Schwangeren (S, weiß) und zugehörigem Nabelschnurblut (NSB, grau) wurde vergleichend mittels Oxidation des Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 (DHR) vor und nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Repräsentative Density Plots zur Darstellung der ROS-Produktion durch PL-MDSC, S-MDSC und NSB-MDSC vor und nach Stimulation mit PMA. (B) Prozentualer Anteil der ROS-

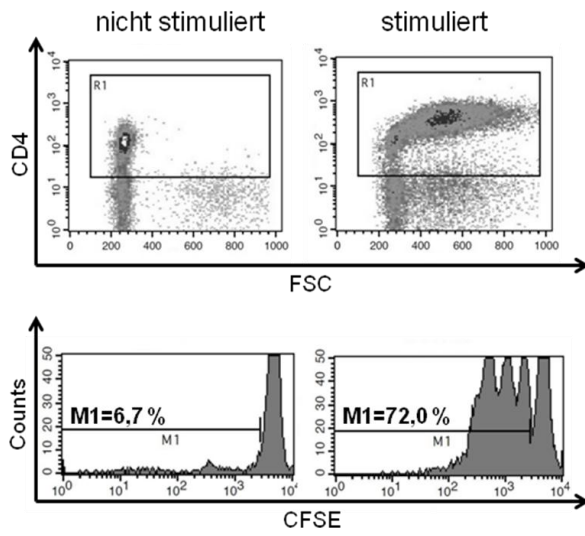
produzierenden PL-MDSC und S-MDSC im Balkendiagramm. (C) Mittlere ROS-Produktion pro Zelle in PL-MDSC und S-MDSC im Balkendiagramm. (D) Prozentualer Anteil der ROS-produzierenden PL-MDSC und NSB-MDSC im Balkendiagramm. (E) Mittlere ROS-Produktion pro Zelle in PL-MDSC und NSB-MDSC im Balkendiagramm. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=5-8, **p<0,01, *p<0,05, ns nicht signifikant, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

3.2.3. PL-MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation stärker als NSB-MDSC

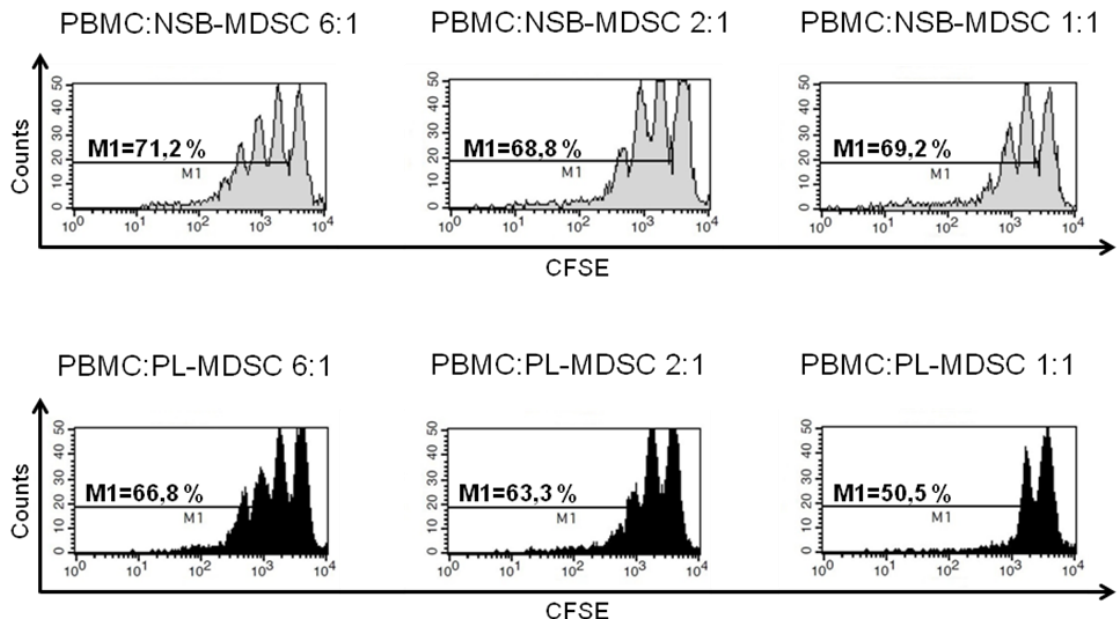
Um die Hypothese, dass es in der Plazenta zu einer Aktivierung von MDSC kommt, weiter zu überprüfen, wurde nun die Hemmkapazität von PL-MDSC mit der Hemmkapazität von NSB-MDSC vergleichend untersucht. Abbildungen 10a und 10c zeigen repräsentative Histogramme der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne und mit Zugabe von GR-MDSC aus Plazenta und Nabelschnurblut. Im Verhältnis PBMC:GR-MDSC von 1:1 hemmte die Zugabe von PL-MDSC zu CFSE-markierten und mit OKT3-/IL-2-stimulierten PBMC die CD4⁺-T-Zell-Proliferation signifikant besser als die Zugabe von NSB-MDSC (PL-MDSC 53,8 +/- 20,3 % vs. NSB-MDSC 73,3 +/- 32,6 %, n = 8, p < 0,05, Abbildung 10b). Bei Zugabe von GR-MDSC in den Verhältnissen 6:1 und 2:1 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (PL-MDSC 79,5 +/- 11,9 % und 67,3 +/- 18,7 % vs. NSB-MDSC 85,4 +/- 18,0 % und 81,5 +/- 31,7 %, n = 7-8, p > 0,05, Abbildung 10b). Die CD8⁺-T-Zell-Proliferation wurde durch PL-MDSC in den Verhältnissen PBMC:GR-MDSC 2:1 und 1:1 signifikant besser gehemmt als durch NSB-MDSC (PL-MDSC 66,3 +/- 20,1 % und 55,2 +/- 15,3 % vs. NSB-MDSC 87,6 +/- 25,1 % und 76,5 +/- 25,3 %, n = 7-8, p < 0,05, Abbildung 10d). Im Verhältnis PBMC:GR-MDSC 6:1 konnte auch hier kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (PL-MDSC 77,3 +/- 19,6 % vs. NSB-MDSC 90,4 +/- 11,2 %, n = 7, p > 0,05, Abbildung 10d).

A

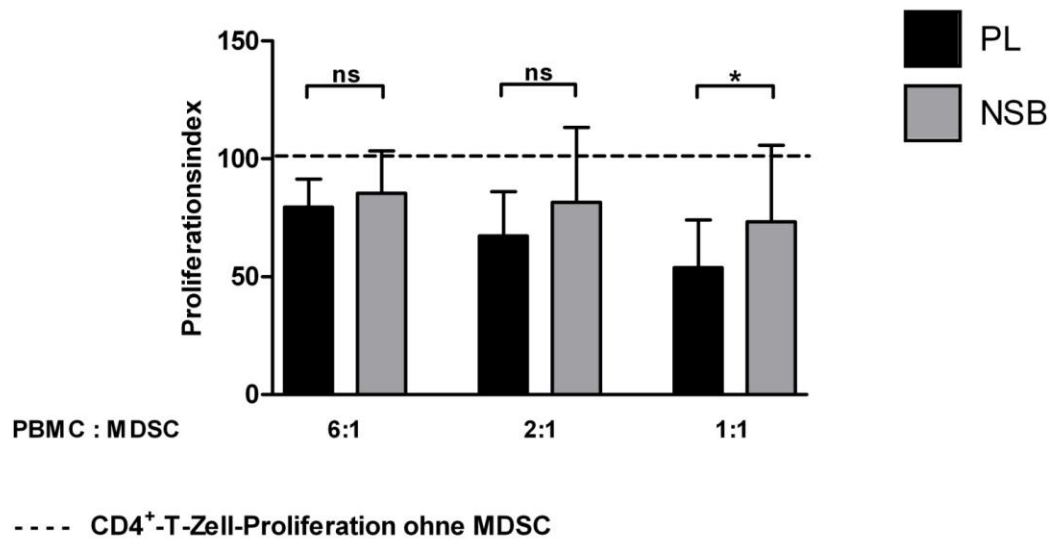
CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne MDSC



CD4⁺-T-Zell-Proliferation mit MDSC

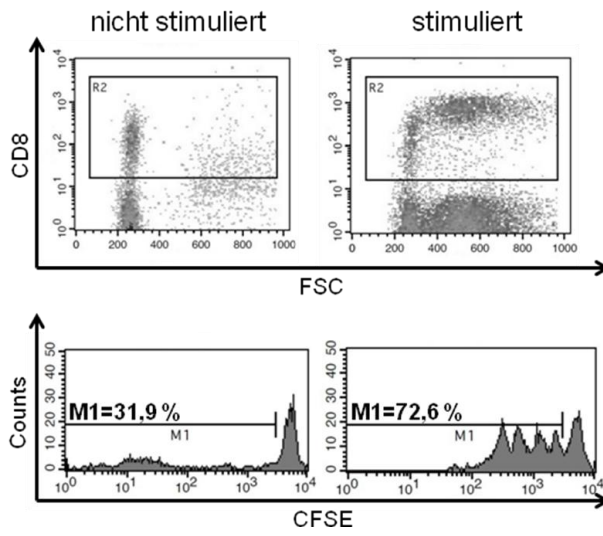


B

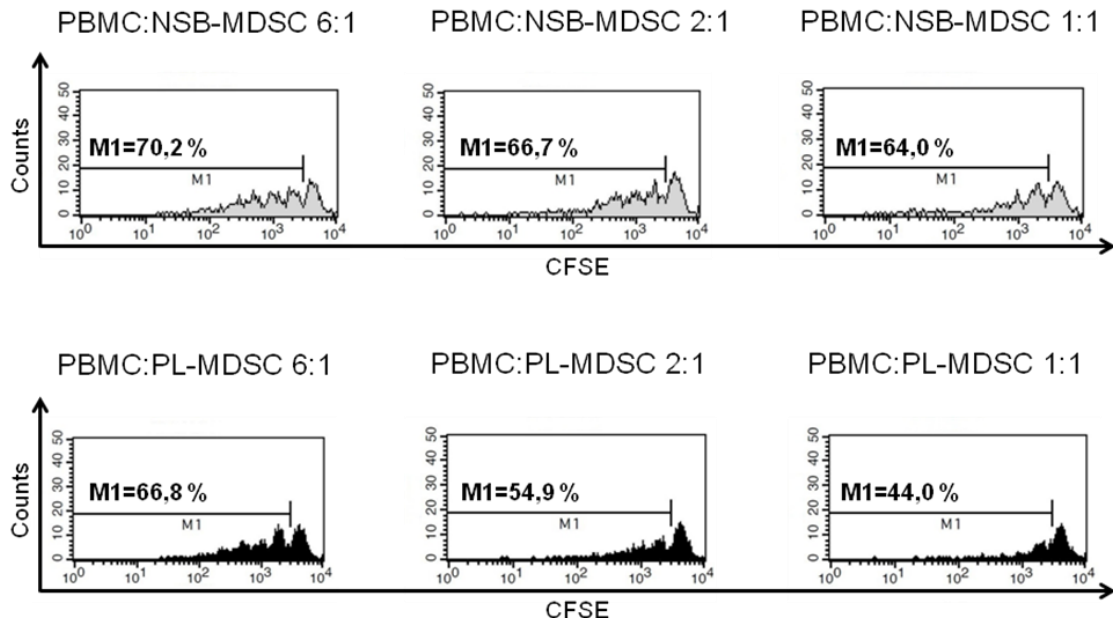


C

CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne MDSC



CD8⁺-T-Zell-Proliferation mit MDSC



D

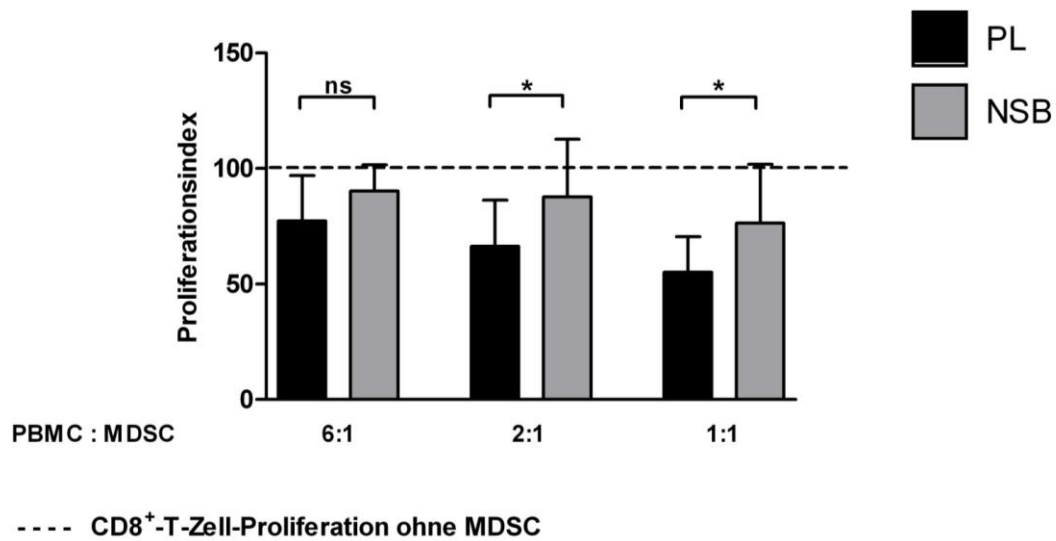


Abbildung 10: PL-MDSC haben eine stärkere suppressive Wirkung als NSB-MDSC

Über MACS isolierte granulozytäre myeloide Suppressorzellen aus der Plazenta (PL-MDSC, schwarz) bzw. aus Nabelschnurblut (NSB-MDSC, hellgrau) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu CFSE-markierten und mit OKT3-/ IL-2-stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gesunder, nicht schwangerer Erwachsener gegeben. Nach 96h unter Standardkulturbedingungen wurde die CD4⁺- und die CD8⁺-T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrollen (dunkelgrau) dienten nicht stimulierte PBMC sowie mit OKT3-/ IL-2-stimulierte PBMC ohne Zugabe von MDSC. (A) Repräsentative Histogramme der CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne und mit Zugabe von PL-MDSC bzw. NSB-MDSC. (B) Proliferationsindex von CD4⁺-T-Zellen ohne und mit Zugabe von PL-MDSC bzw. NSB-MDSC. Die gestrichelte Linie gibt die Proliferation der mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von MDSC an. (C) Repräsentative Histogramme der CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne und mit Zugabe von PL-MDSC bzw. NSB-MDSC. (D) Proliferationsindex von CD8⁺-T-Zellen ohne und mit Zugabe von PL-MDSC bzw. NSB-MDSC. Die gestrichelte Linie gibt die Proliferation der mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von MDSC an. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=7-8, *p<0,05, ns nicht signifikant, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

3.3. GR-MDSC bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom

3.3.1. Die Expression von GR-MDSC im peripheren Blut ist bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom vermehrt

Um zu überprüfen, ob bei immunologischen Schwangerschaftskomplikationen (Laresgoiti-Servitje 2013) eine Veränderung von MDSC in der Plazenta vorliegen, wurden GR-MDSC im peripheren Blut von Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom quantifiziert und mit denen gesunder Schwangerer verglichen. Tabelle 1 zeigt klinische Angaben der Patientinnen sowie der Kontrollen. Das Alter sowie die Anzahl der stattgehabten Schwangerschaften unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Das Gestationsalter bei Geburt, die Blutdruckwerte sowie das Geburtsgewicht des Fetus unterschieden sich statistisch signifikant zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,01$).

Tabelle 1: Klinische Angaben der Präeklampsie-Patientinnen und deren Kontrollen

keine PE/HELLP = gesunde Schwangere als Kontrollen

PE/HELLP = Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom

	keine PE/HELLP (n = 13)	PE/HELLP (n = 15)	p-Wert
Alter (Jahre)	30,5 +/- 3,6	30,7 +/- 4,0	0,4651
Entbindungsalter (Wochen)	38,7 +/- 1,8	33,7 +/- 3,3	** 0,0015
Anzahl Gravität	2 (1-3)	1 (1-2)	0,0806
systolischer Blutdruck (mmHg)	124 (120-130)	165 (155-173)	** 0,0088
diastolischer Blutdruck (mmHg)	72 (70-80)	97 (90-100)	** 0,0085
Geburtsgewicht Fetus (g)	3122 +/- 464	2029 +/- 967	** 0,0081

Anmerkung: Statistische Analysen wurden bei normalverteilten Daten mithilfe des t-Tests bzw. bei nicht normalverteilten Daten mithilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Gezeigt als Mittelwert +/- Standardabweichung bzw. Median (Quartilsabstand). ** $p < 0,01$.

Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom hatten im Vergleich zu gesunden Schwangeren einen erhöhten Anteil GR-MDSC im peripheren Blut (9,9 +/- 8,1 % vs. 5,7 +/- 3,8 %, n = 13-15, p < 0,05, Abbildung 11b).

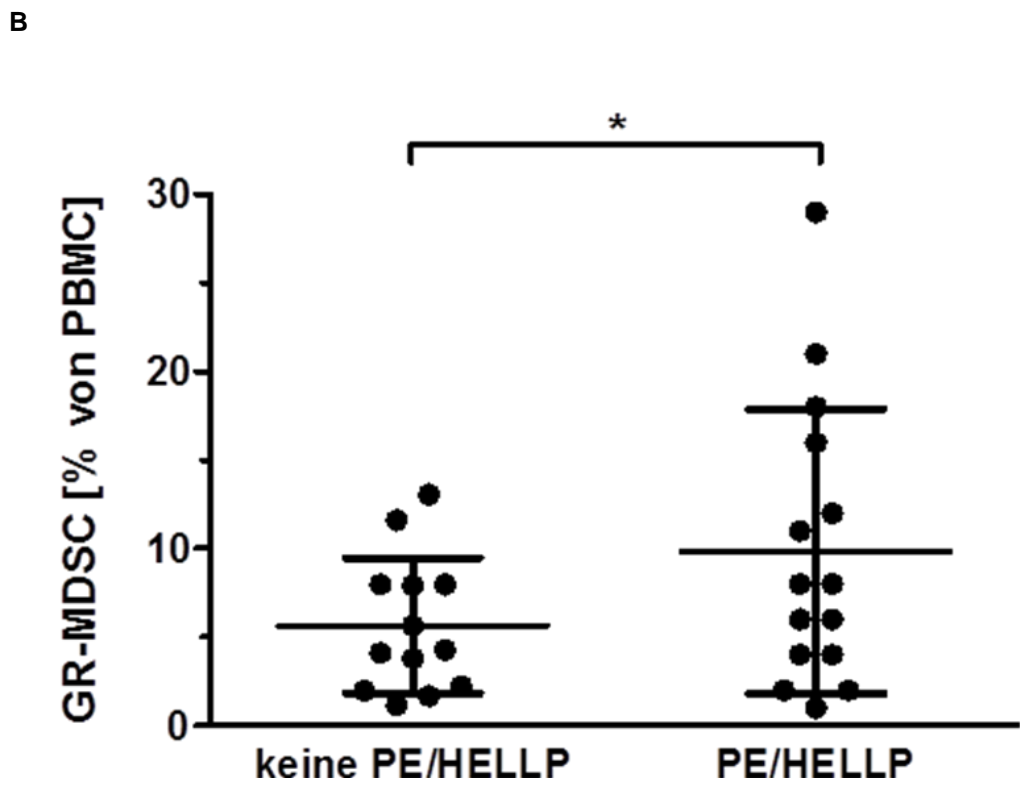
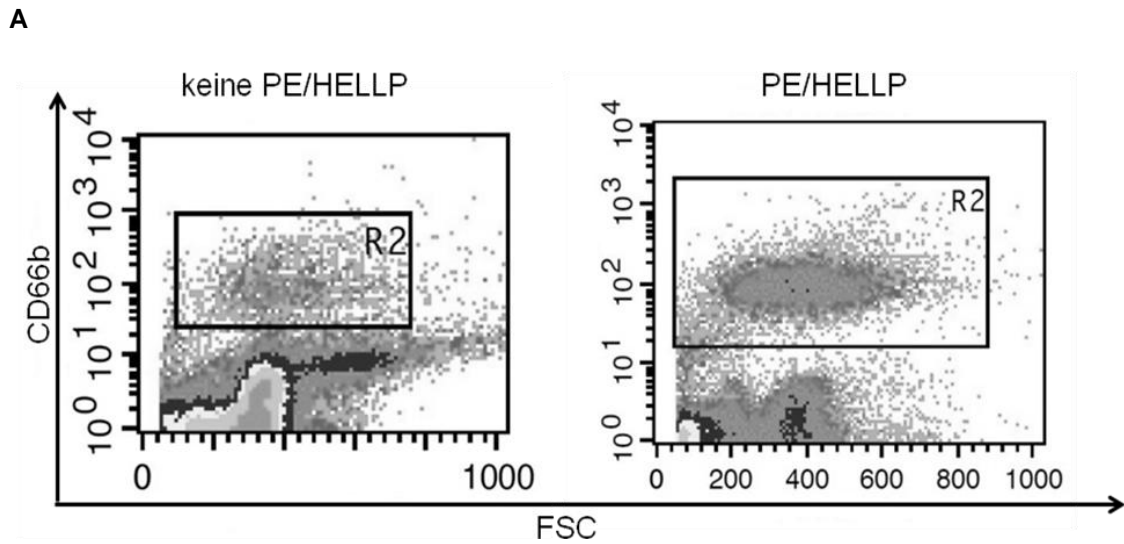


Abbildung 11: GR-MDSC sind im peripheren Blut von Präeklampsie- bzw. HELLP-Syndrom-Patientinnen vermehrt

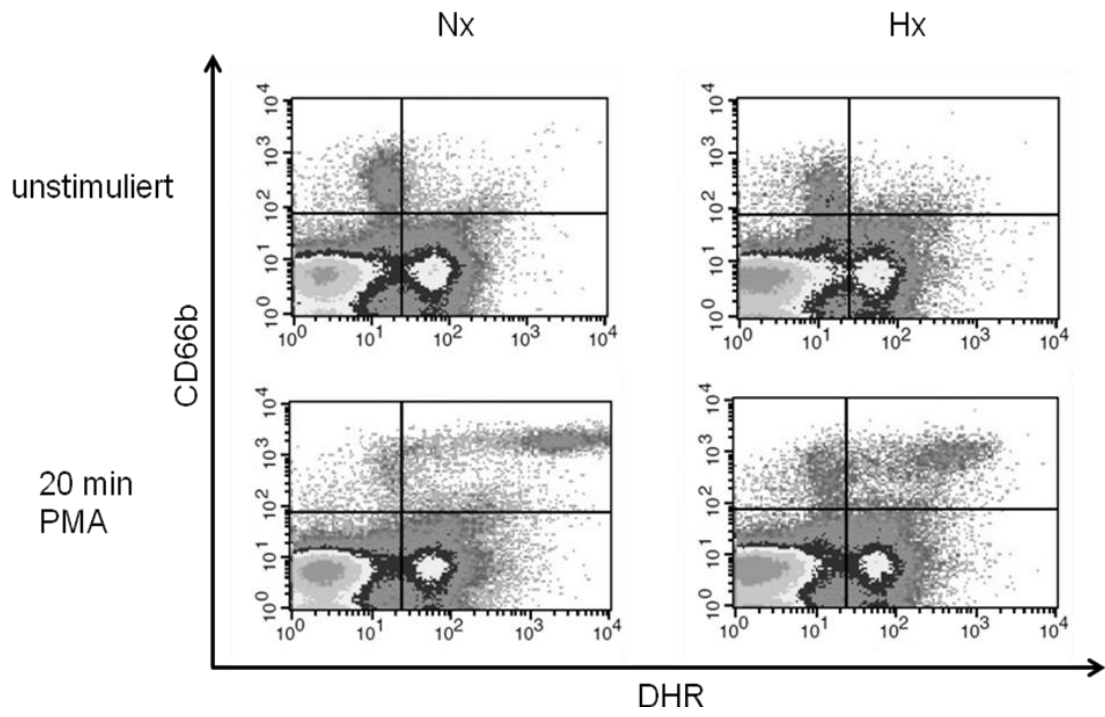
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden von gesunden Schwangeren (keine PE/HELLP) und von Präeklampsie- bzw. HELLP-Syndrom-Patientinnen (PE/HELLP) isoliert und der Anteil an granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC) durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Repräsentative Density Plots zeigen die Population der CD66b⁺ GR-MDSC bei gesunden Schwangeren und bei Patientinnen mit PE/HELLP. (B) Prozentualer Anteil der GR-MDSC an PBMC. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=13-15, *p<0,05, Welch-Test

3.3.2. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch PL-MDSC ist unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck unverändert im Vergleich zu Standardkulturbedingungen

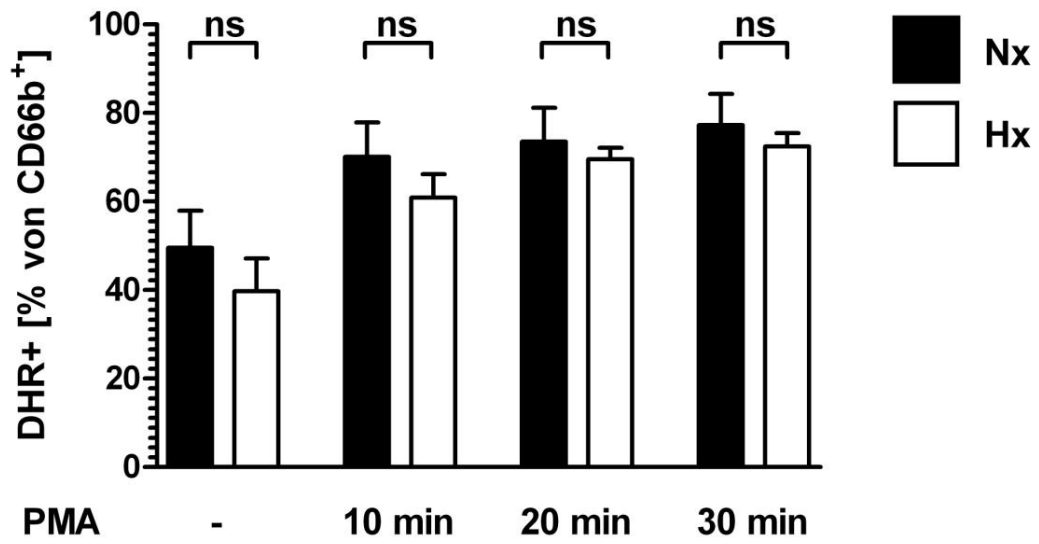
Um Hinweise auf die Funktionalität von PL-MDSC im Rahmen einer Präeklampsie zu bekommen wurde ein Hypoxie-Kulturverfahren als in-vitro-Modell für diese Schwangerschaftskomplikation angewandt, da die Minderversorgung der Plazenta mit Sauerstoff einen wichtigen pathogenetischen Aspekt darstellt (Kanasaki und Kalluri 2009; Nevo et al. 2006; Royle et al. 2009; Soleymanlou et al. 2005).

Sowohl der Anteil ROS-produzierender PL-MDSC (unstimuliert Hx 39,7 +/- 19,7 % vs. Nx 49,5 +/- 22,3 %, 10 min PMA Hx 60,8 +/- 14,2 % vs. Nx 70,1 +/- 20,6 %, 20 min PMA Hx 69,6 +/- 6,8 % vs. Nx 73,6 +/- 20,2 %, 30 min PMA Hx 72,5 +/- 7,8 % vs. Nx 77,3 +/- 18,5 %, n = 7, p > 0,05, Abbildung 12b) als auch die mittlere ROS-Produktion pro Zelle (unstimuliert MFI Hx 65 +/- 29 vs. MFI Nx 59 +/- 18, 10 min PMA MFI Hx 195 +/- 93 vs. MFI Nx 160 +/- 80, 20 min PMA MFI Hx 326 +/- 171 vs. MFI Nx 400 +/- 276, 30 min PMA MFI Hx 455 +/- 218 vs. MFI Nx 732 +/- 700, n = 7, p > 0,05, Abbildung 12c) waren unter Hypoxie im Vergleich zu Standardkulturbedingungen tendenziell vermindert, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

A



B



C

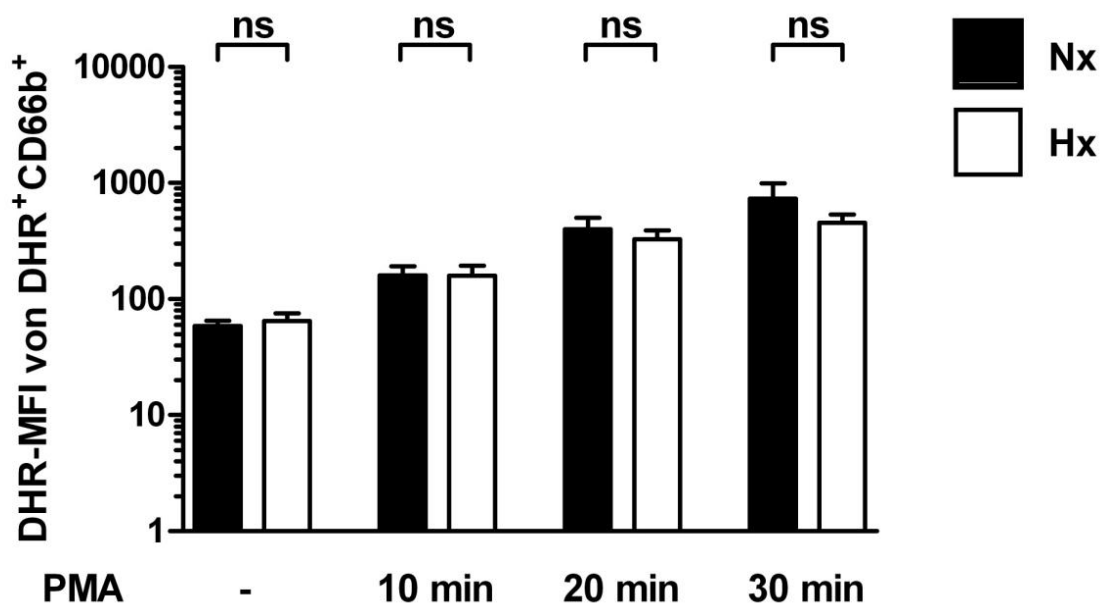


Abbildung 12: Die Produktion von ROS durch PL-MDSC ist unter verminderten Sauerstoffbedingungen unverändert im Vergleich zu Standardkulturbedingungen

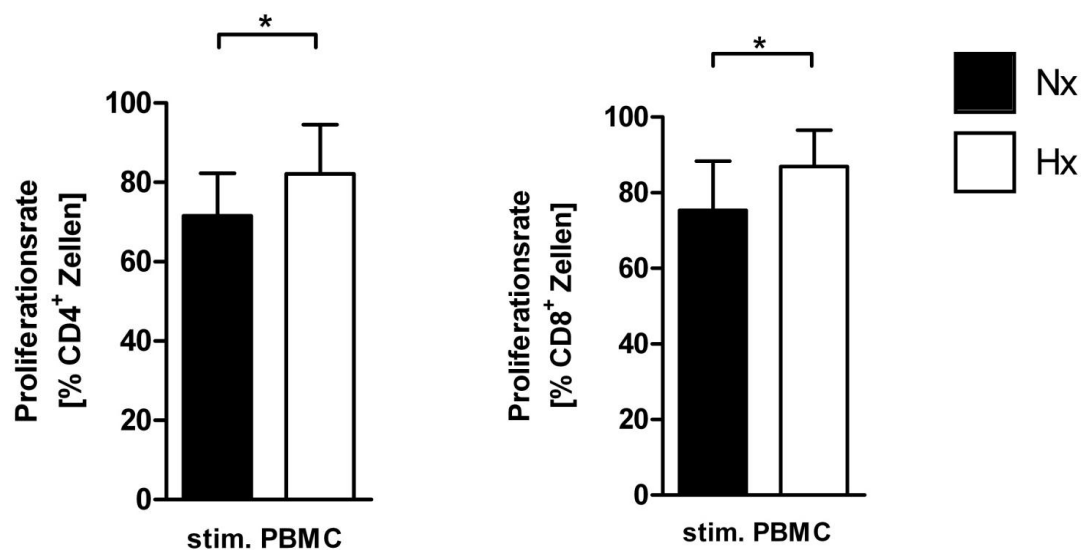
Mononukleäre Zellen aus Plazentagewebe wurden isoliert und 2 h unter Standardkulturbedingungen (Nx, schwarz) bzw. vermindertem Sauerstoffangebot bei 2 % O₂ (Hx, weiß) kultiviert. Anschließend wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mithilfe der Oxidation des Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 (DHR) vor und nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Repräsentative Density Plots zeigen die ROS-Produktion von PL-MDSC im unstimulierten Zustand und nach 20-minütiger Stimulation mit PMA. (B) Prozentualer Anteil der ROS-produzierenden Zellen an CD66b⁺ Zellen im Balkendiagramm. (C) Mittlere ROS-Produktion pro Zelle im Balkendiagramm. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=7, ns nicht signifikant, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

3.3.3. Die suppressive Wirkung von PL-MDSC auf die T-Zell-Proliferation ist unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck beeinträchtigt

Sowohl die CD4⁺- als auch die CD8⁺- T-Zellproliferation ohne Zugabe von MDSC war unter Hypoxie stärker ausgeprägt als unter Normoxie (Proliferation CD4⁺-T-Zellen: Hx 82,2 +/- 12,4 % vs. Nx 71,5 +/- 10,7 %, CD8⁺ Hx 87,0 +/- 9,5 % vs. Nx 75,3 +/- 13,1 %, n = 5, p < 0,05, Abbildung 13a). Zugabe von PL-MDSC führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der CD4⁺- und

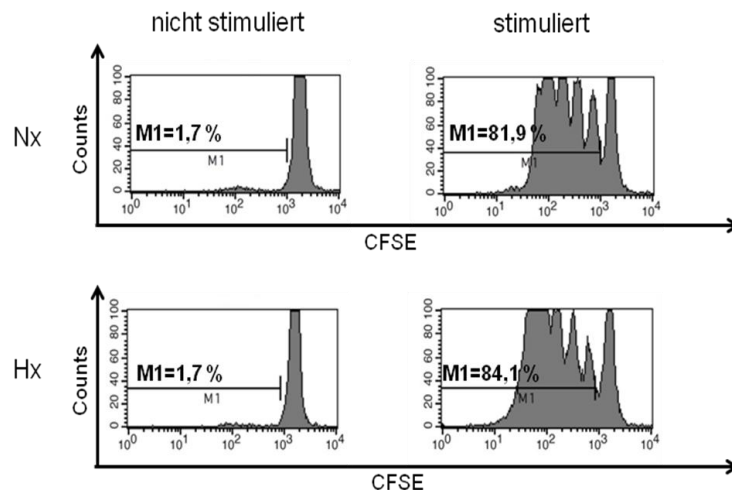
CD8⁺- T-Zell-Proliferation, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Kulturbedingungen. Die hemmende Wirkung von PL-MDSC war unter Hypoxie jedoch geringer ausgeprägt als unter Normoxie (Proliferationsindex für CD4⁺-T-Zellen: 6:1 Nx 79,5 +/- 11,9 % vs. Hx 93,7 +/- 4,9 %, 2:1 Nx 67,3 +/- 18,7 % vs. Hx 88,1 +/- 7,5 %, 1:1 Nx 53,8 +/- 20,3 % vs. Hx 70,2 +/- 19,7 %, n = 7-8, p < 0,05, Abbildung 13c; Proliferationsindex für CD8⁺-T-Zellen: 6:1 Nx 77,3 +/- 19,6 % vs. Hx 97,2 +/- 5,5 %, 2:1 Nx 66,3 +/- 20,1 % vs. Hx 87,8 +/- 9,4 %, 1:1 Nx 55,2 +/- 15,3 % vs. Hx 70,5 +/- 20,1 %, n = 7-8, p < 0,05, Abbildung 13e).

A

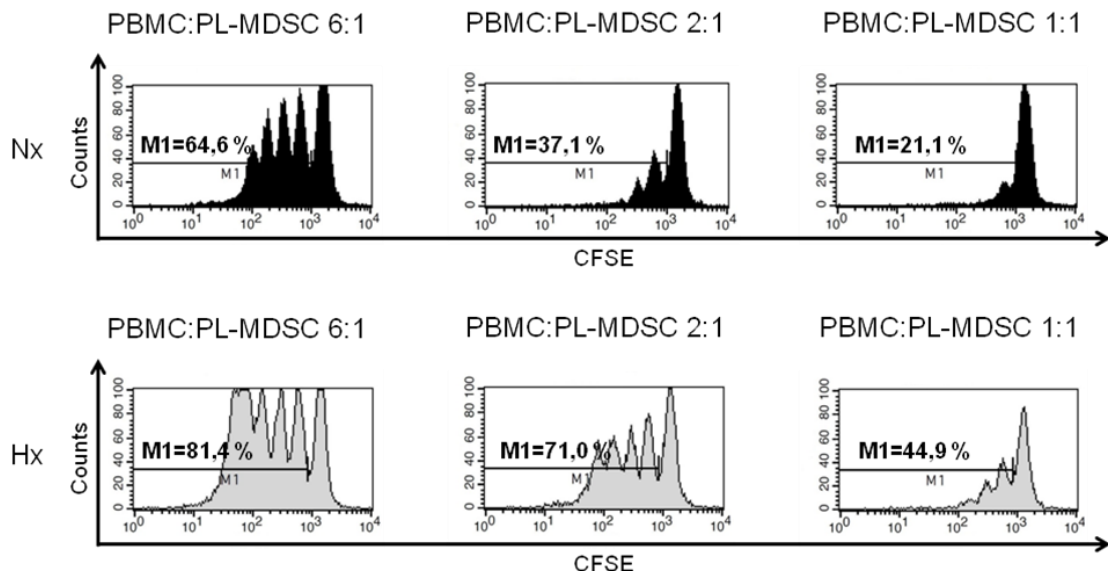


B

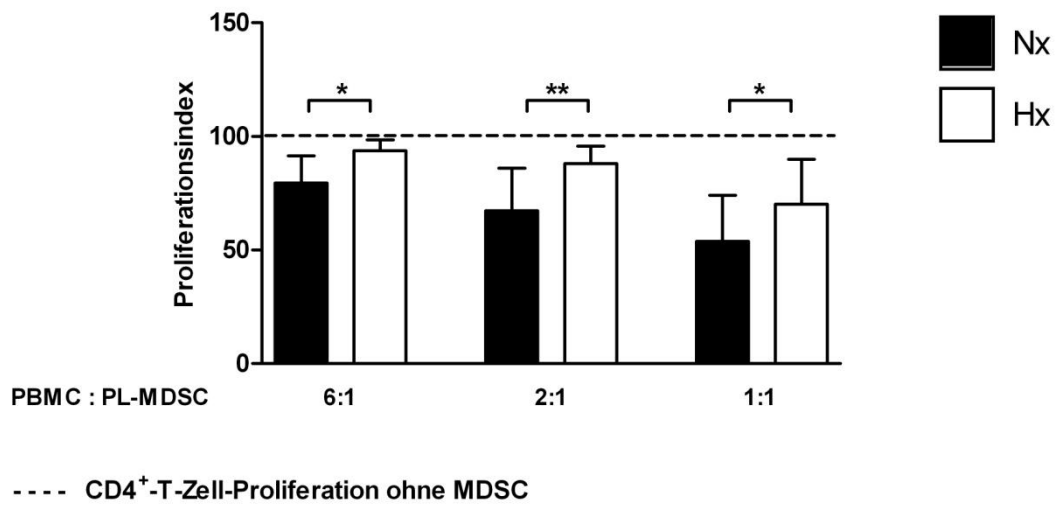
CD4⁺-T-Zell-Proliferation ohne MDSC



CD4⁺-T-Zell-Proliferation mit PL-MDSC

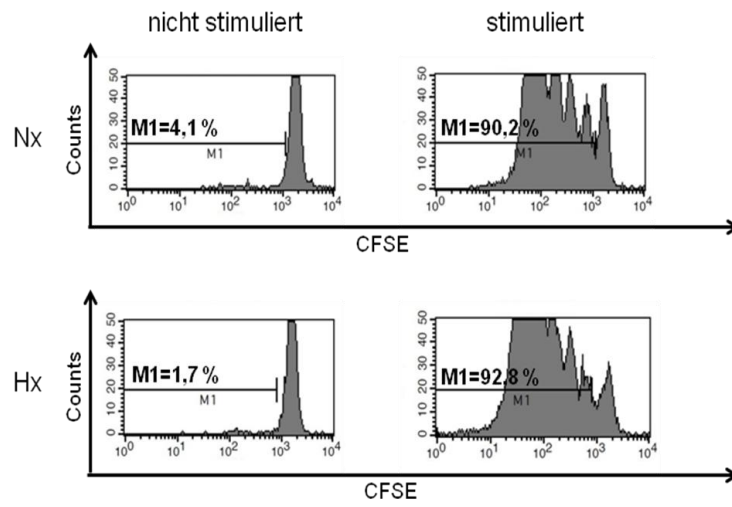


C

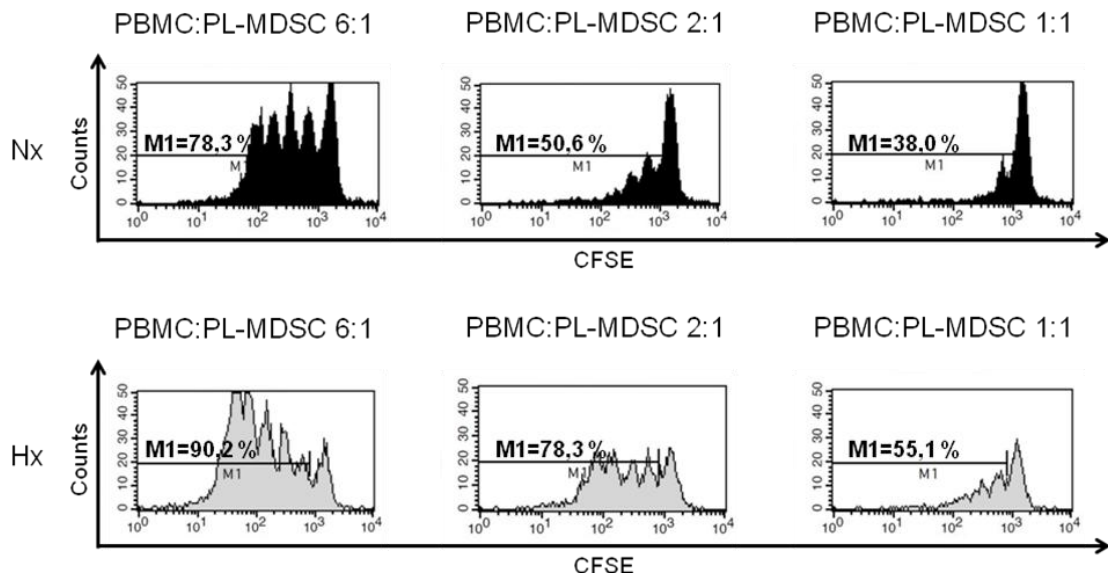


D

CD8⁺-T-Zell-Proliferation ohne MDSC



CD8⁺-T-Zell-Proliferation mit PL-MDSC



E

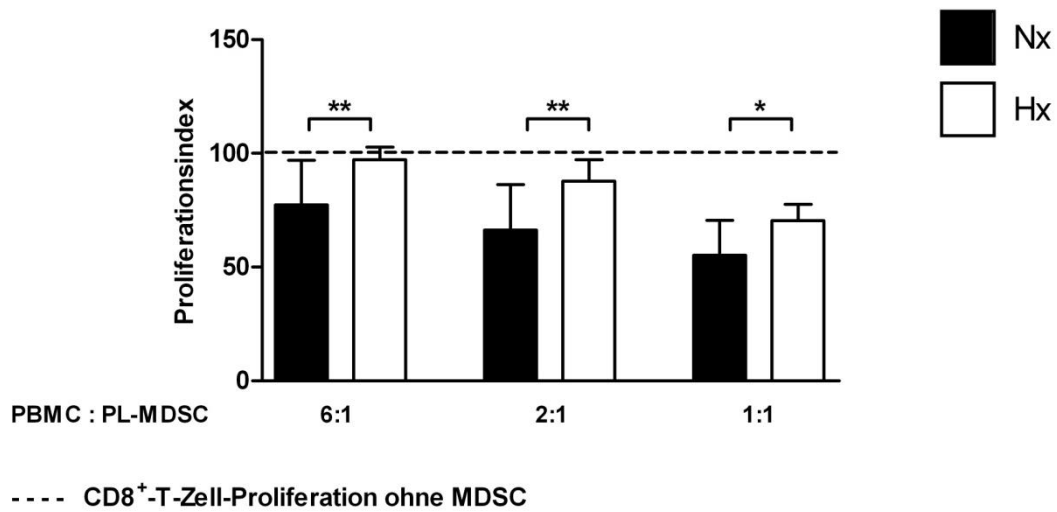


Abbildung 13: PL-MDSC zeigen unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck eine reduzierte Hemmkapazität

Über MACS isolierte granulozytäre myeloide Suppressorzellen aus der Plazenta (PL-MDSC) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu CFSE-markierten und mit OKT3-/ IL-2-stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gesunder, nicht schwangerer Erwachsener gegeben und 96h unter Standardkulturbedingungen (Nx, schwarz) bzw. bei 2 % O₂ (Hx, hellgrau/ weiß) kultiviert. Als Kontrollen (dunkelgrau) dienten nicht stimulierte PBMC sowie mit OKT3-/ IL-2-stimulierte PBMC ohne Zugabe von MDSC. (A) T-Zell-Proliferationsrate von mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von GR-MDSC (stim. PBMC) unter Nx und Hx. (B) Repräsentative Histogramme der CD4⁺-T-Zell-Proliferation unter Nx und Hx, ohne und mit Zugabe von PL-MDSC. (C) Proliferationsindex von CD4⁺-T-Zellen unter Nx und Hx, nach Zugabe von PL-MDSC. Die gestrichelte Linie gibt die Proliferation der mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von MDSC an. (D) Repräsentative Histogramme der CD8⁺-T-Zell-Proliferation unter Nx und Hx, ohne und mit Zugabe von PL-MDSC. (E) Proliferationsindex von CD8⁺-T-Zellen unter Nx und Hx, nach Zugabe von PL-MDSC. Die gestrichelte Linie gibt die Proliferation der mit OKT3-/ IL-2-stimulierten PBMC ohne Zugabe von MDSC an. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=7-8, **p<0,01, *p<0,05, Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

3.4. GR-MDSC bei Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung

Laut der deutschen IVF-Register e.V. führen etwa 29,1 % aller assistierten Reproduktionsbehandlungen zu einer Schwangerschaft. Um zu untersuchen, ob MDSC auch in der frühen Phase der Schwangerschaftsetablierung eine Rolle spielen könnten, wurden MDSC 14 Tage nach assistierter Reproduktionsbehandlung im peripheren Blut quantifiziert. Es wurde der Anteil GR-MDSC in PBMC von Frauen, die eine assistierte Reproduktionsbehandlung erhalten hatten und bei denen eine Schwangerschaft eingetreten war mit dem Anteil GR-MDSC in PBMC von Frauen verglichen, bei denen es nach assistierter Reproduktionsbehandlung nicht zum Eintritt einer Schwangerschaft gekommen war sowie mit dem Anteil GR-MDSC in PBMC gesunder, nicht schwangerer Erwachsener.

Nach assistierter Reproduktionsbehandlung war unabhängig vom Eintreten einer Schwangerschaft eine signifikant erhöhte Anzahl an GR-MDSC im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden, nicht schwangeren Erwachsenen ohne assistierte Reproduktionsbehandlung nachweisbar (IVF schwanger 1,35 % bzw. IVF nicht schwanger 1,00 % vs. E 0,21 %, Median, n = 8-15, $p < 0,005$, Abbildung 14). Frauen, die nach der Behandlung schwanger geworden waren und Frauen, bei welchen die assistierte Reproduktionsbehandlung erfolglos blieb zeigten einen vergleichbaren Anteil GR-MDSC (IVF schwanger 1,35 % vs. IVF nicht schwanger 1,00 %, Median, n = 8-15, $p > 0,05$, Abbildung 14).

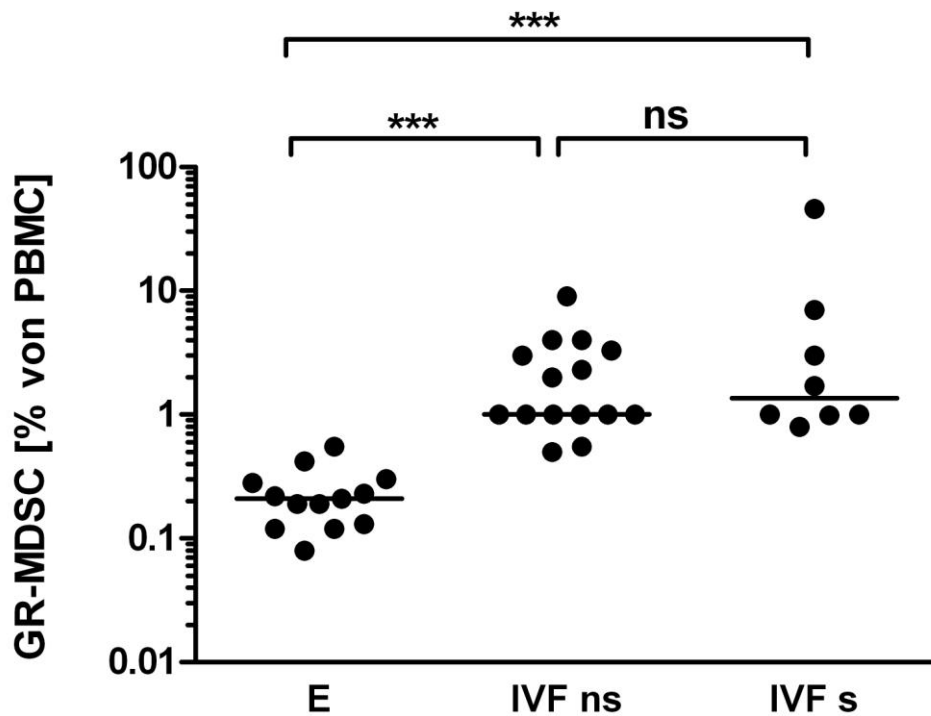


Abbildung 14: GR-MDSC sind im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung vermehrt

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus Frauen, welche eine erfolgreiche (IVF s) bzw. nicht erfolgreiche (IVF ns) assistierte Reproduktionsbehandlung (IVF) erhalten hatten isoliert und der prozentuale Anteil an granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC) bestimmt. Als Kontrolle dienten PBMC aus nicht schwangeren gesunden Erwachsenen (E). Median, n=8-15, ***p<0,005, ns nicht signifikant, Dunnett's Multiple Comparison Test

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Hypothese zu überprüfen, dass die immunsuppressiven Eigenschaften von GR-MDSC für die Aufrechterhaltung und den komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft von Bedeutung sind. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass GR-MDSC, jedoch nicht MO-MDSC, im peripheren Blut von gesunden Schwangeren über die gesamte Schwangerschaft hinweg erhöht sind und postpartal rasch wieder auf das Niveau nicht schwangerer Erwachsener abfallen (Köstlin et al. 2014). Es sollte nun untersucht werden, ob GR-MDSC an der Plazenta - dem Ort des direkten Kontaktes zwischen mütterlichen und fetalen Zellen - akkumulieren und/ oder dort funktionell aktiviert werden. Weiterhin sollte untersucht werden wie sich die Zahlen von GR-MDSC im peripheren Blut von Präeklampsie- bzw. HELLP-Syndrom-Patientinnen sowie von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung verhalten. Als gemeinsamer pathogenetischer Aspekt zahlreicher Schwangerschaftskomplikationen wurde zuletzt untersucht, wie sich ein vermindertes Sauerstoffangebot auf die Funktion von GR-MDSC auswirkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, (1) dass GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht akkumulieren, (2) dass diese PL-MDSC die Effektorenzyme Arginase 1 und iNOS exprimieren und große Mengen an ROS produzieren, (3) dass PL-MDSC die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Proliferation hemmen können und (4) dass PL-MDSC mehr ROS produzieren als GR-MDSC aus peripherem Blut der Schwangeren und aus Nabelschnurblut und stärker suppressiv aktiv sind als GR-MDSC aus Nabelschnurblut. Darüber hinaus konnten wir zeigen, (5) dass GR-MDSC im peripheren Blut von Schwangeren mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom vermehrt vorkommen als im Blut von gesunden Schwangeren und (6) dass ein vermindertes Sauerstoffangebot die T-Zell-suppressive Wirkung von PL-MDSC herabsetzt. Zuletzt konnte gezeigt werden, (7) dass GR-MDSC im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung unabhängig vom Eintreten einer Schwangerschaft

vermehrt vorkommen verglichen mit dem Blut von nicht schwangeren Erwachsenen.

4.1. Akkumulation von GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht

GR-MDSC akkumulierten in der Plazenta im Vergleich zu Nabelschnurblut und peripherem Blut der zugehörigen Schwangeren. Fainaru et al. (2013) konnten bereits zeigen, dass sich in der Plazenta von Mäusen unreife myeloide Zellen finden, welche ein sehr ähnliches genetisches Expressionsprofil aufweisen wie unreife myeloide Zellen aus Tumoren. Exprimiert wurden dabei vorwiegend Gene, welche die Angiogenese, aber auch die Immunantwort und Entzündungsreaktionen regulieren. Andere Daten zeigen, dass MDSC nach Organtransplantation akkumulieren, eine Graft-versus-Host-Reaktion verhindern und das Langzeitüberleben des Transplantats fördern können (Dugast et al. 2008; Highfill et al. 2010; Zhang et al. 2008). Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass GR-MDSC neben ihrer Bedeutung bei pathologischen Prozessen wie der Immunsuppression bei Tumorerkrankungen (Brandau et al. 2011; Gabitass et al. 2011; Lechner et al. 2011; Rieber, Brand et al. 2013) auch eine Rolle für die physiologische Immunregulation und die Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz in der Schwangerschaft spielen könnten.

MDSC zeigen quantitativ ein ähnliches Verhalten wie regulatorische T-Zellen (Tregs). Tregs akkumulieren im Rahmen von Tumorerkrankungen (Lindau et al. 2013) aber auch im Bereich der fetomaternalen Grenzschicht und scheinen den Fetus vor einer Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem zu schützen (Arruvito et al. 2010; Dimova et al. 2011; Mjösberg et al. 2010). MDSC könnten somit als weiterer potentieller Mechanismus der fetomaternalen Toleranzinduktion in Frage kommen.

Immunhistochemische Färbungen von Plazentaprobe zeigten, dass der Großteil der CD66b⁺ Zellen auf der mütterlichen Seite, hauptsächlich im intervillösen Raum und der Dezidua lokalisiert waren. Diese Ergebnisse passen zu immunhistochemischen Analysen von Tregs an der fetomaternalen Grenzschicht, welche eine ähnliche Verteilung dieser Zellen im dezidualen

Stroma zeigten (Dimova et al. 2011). Da anhand der Oberflächenmarker nicht zwischen unreifen GR-MDSC mit suppressiven Eigenschaften und reifen Granulozyten ohne suppressive Eigenschaften unterschieden werden kann, müssen diese Ergebnisse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden.

Eine entscheidende, bisher aber noch nicht untersuchte Frage ist wie es zur GR-MDSC-Akkumulation in der Plazenta kommt. Eine Reihe an Faktoren wurden beschrieben, welche die Akkumulation und funktionelle Aktivierung von MDSC bei pathologischen Prozessen induzieren, u.a. HLA-G (Agaugué et al. 2011; Zhang et al. 2008), Vascular Endothelial Growth Factor (Lechner et al. 2011; Nakamura et al. 2013) und IL-6 (Lechner et al. 2011). Viele dieser Faktoren werden ebenfalls im Rahmen einer Schwangerschaft und dabei ganz besonders in der Plazenta vermehrt exprimiert (Andraweera et al. 2012; Darmochwal-Kolarz et al. 2012; Dimitriadis et al. 2005; Hsu et al. 2014; Raghupathy et al. 1999) und könnten hier eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von GR-MDSC spielen.

4.2. Effektormechanismen von GR-MDSC

PL-MDSC zeigten sowohl eine Expression der Enzyme Arginase 1 und iNOS als auch ein hohes Potential zur ROS-Produktion in den von uns untersuchten Zellen. Alle drei dieser Mechanismen wurden im Rahmen pathologischer Situationen bereits vielfach beschrieben (Bronte und Zanovello 2005; Corzo et al. 2009; Gabrilovich und Nagaraj 2009; Kusmartsev et al. 2004; Nagaraj et al. 2007).

Das Vorkommen von Arginase in der humanen Plazenta wurde erstmals bereits 1976 von Porta et al. beschrieben. In dieser Arbeit wurde vermutet, dass durch die Expression von Arginase Ornithin für die Produktion von Spermidin bereitgestellt wird. Kropf et al. zeigten dann 2007, dass durch Arginase-exprimierende Zellen in der Plazenta eine Herunterregulation der CD3 ζ -Kette und eine Proliferationshemmung von T-Zellen hervorgerufen werden konnte. Als Zelltyp, welcher für die erhöhte Arginase-Expression in der Plazenta verantwortlich war, beschrieben Kropf et al. CD15⁺CD14^{low/-} neutrophile Zellen. Dies stimmt gut mit den Vordaten unserer Arbeitsgruppe überein, in denen die

Arginase-Expression im peripheren Blut Schwangerer auf eine verstärkte Expression von GR-MDSC zurückzuführen war (Köstlin et al. 2014) und zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass Arginase-exprimierende Zellen mit Oberflächeneigenschaften neutrophiler Zellen in der Plazenta akkumulieren.

Stickstoffmonoxid spielt während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung und der Regulation vaskulärer Funktionen (Molnár et al. 1994; Valdes et al. 2009). Über die Bedeutung von Stickstoffmonoxid als Immunmodulator während der Schwangerschaft ist bisher jedoch sehr wenig bekannt.

Baylis et al. konnten 1999 zeigen, dass iNOS in der humanen Plazenta in Synzytiotrophoblasten und glatten Gefäßmuskulaturzellen exprimiert wird und wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Plazenta spielt. Haddad et al. (1997) zeigten in einem Mausmodell, dass die Expression von iNOS im Bereich der Implantationsregion mit der Abortrate der Tiere korrelierte. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass eine erhöhte Arginase-Expression durch Reduktion der Verfügbarkeit von Arginin die Stickstoffmonoxid-Produktion über die NOS hemmt und die Funktion von NOS in Richtung ROS-Produktion lenkt, was dann zu verstärktem oxidativen Stress bei Patienten mit Präeklampsie führt (Johal et al. 2014; Noris et al. 2004; Sankaralingam et al. 2010). Da beide Enzyme, sowohl Arginase 1 als auch iNOS, von PL-MDSC exprimiert werden, könnte eine Fehlregulation dieser Enzyme in PL-MDSC ebenfalls zur Pathogenese bei Präeklampsie oder Aborten beitragen.

Die Rolle von ROS in der Schwangerschaft wurde bereits vielfach untersucht und von Agarwal et al. (2006) ausführlich diskutiert: physiologische, geringe ROS-Level scheinen für eine Schwangerschaft notwendig zu sein, wohingegen erhöhte ROS-Level und oxidativer Stress zur Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen wie Infertilität, Abortneigung und Präeklampsie beitragen können. In Zusammenhang mit MDSC wurde beschrieben, dass ROS an der Hemmung einer Weiterdifferenzierung von MDSC zu reifen myeloiden Zellen beteiligt sind (Kusmartsev und Gabrilovich 2003) und dass sie insbesondere eine Suppression der Antigen-spezifischen T-

Zell-Antwort vermitteln (Kusmartsev et al. 2004; Nagaraj et al. 2007). Dieser Mechanismus könnte gerade in der Schwangerschaft, wo eine Unterdrückung der Immunantwort gegen den Fetus, nicht jedoch eine systemische Immunsuppression erforderlich ist eine Rolle spielen und durch die hohe Kapazität zur ROS-Produktion von PL-MDSC vermittelt werden.

4.3. Fähigkeit zur Suppression von T-Zellen

Neben der Expression wichtiger Effektormechanismen konnten wir zeigen, dass aus der Plazenta isolierte GR-MDSC sehr potent sowohl die CD4⁺- als auch die CD8⁺-T-Zell-Proliferation hemmen können. Dies stärkt die Hypothese, dass GR-MDSC eine Rolle für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft spielen, indem sie möglicherweise gegen fetale Antigene gerichtete T-Zellen in ihrer Funktion hemmen und damit eine Abstoßung verhindern. Wie bereits erwähnt wird eine wichtige Frage für weiterführende Studien zu MDSC in der Schwangerschaft sein, ob neben der Hemmung der T-Zell-Funktion auf unspezifische Stimuli hin auch die T-Zell-Antwort auf spezifische, vor allem paternale Antigene durch GR-MDSC beeinflusst wird. Damit zeigen MDSC auch funktionell Ähnlichkeiten mit Tregs (Lindau et al. 2013). Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass Tregs eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft spielen (Arruvito et al. 2010; Ernerudh et al. 2011; Hsu et al. 2012; Schlossberger et al. 2013). Jedoch kam es auch bei vollständiger Depletion aller Tregs im Tiermodell zu keiner vollständigen Resorption der Embryonen (Samstein et al. 2012), was darauf hindeutet, dass diese Zellen nicht allein für die Toleranzentwicklung gegenüber dem Fetus verantwortlich sein können, sondern vielmehr sich ergänzende Mechanismen existieren müssen, zu denen wahrscheinlich sowohl Zellen des erworbenen Immunsystems wie die T-Zellen als auch solche der angeborenen Immunität wie die MDSC gehören.

Nachfolgende Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass PL-MDSC neben der T-Zell-Proliferation auch die Polarisierung von T-Zellen in Richtung einer Th2-getragenen Immunantwort beeinflussen. Wie bereits erwähnt, wird eine Verschiebung des T-Zell-Zytokin-Profiles in Richtung einer Th2-getragenen Immunantwort als wesentlicher Mechanismus zur Gewährleistung der

fetomaternalen Toleranz beschrieben (Liu et al. 2011; Piao et al. 2012; Raghupathy et al. 1999; Saito et al. 2010) und Störungen dieser Polarisierung scheinen mit dem Auftreten diverser schwerer Schwangerschaftskomplikationen wie rekurrierenden Aborten oder Präeklampsie assoziiert zu sein (Arruvito et al. 2010; Bansal 2010; Hennessy et al. 1999; Jin et al. 2011; Saito et al. 2010; Santner-Nanan et al. 2009; Strittmatter und Blecken 2007).

4.4. Aktivierung von GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht

Anhand vergleichender Untersuchungen zur Enzymexpression und ROS-Produktion durch GR-MDSC aus dem peripheren Blut Schwangerer, aus Nabelschnurblut und aus der Plazenta sowie der Analyse der suppressiven Kapazität von PL-MDSC verglichen mit NSB-MDSC zeigte sich ein unterschiedlicher Aktivierungsgrad der Zellen aus den verschiedenen Kompartimenten. Während die Expression der Effektorenzyme Arginase 1 und iNOS in PL-MDSC im Vergleich zu GR-MDSC aus dem peripheren Blut von Schwangeren und aus Nabelschnurblut unverändert war, zeigte sich ein deutlich höheres Potential zur ROS-Produktion. Diese Ergebnisse entsprechen Daten von Corzo et al. (2009), die eine verstärkte ROS-Produktion in MDSC aus Tumorpatienten im Vergleich zu MDSC aus gesunden Kontrollen als Zeichen einer funktionellen Aktivierung fanden.

Daneben hatten Kusmartsev et al. (2004) in einem Tumormodell beschrieben, dass die Interaktion von unreifen myeloiden Zellen mit Antigen-spezifischen T-Zellen in Anwesenheit von spezifischen Antigenen die ROS-Produktion durch die myeloiden Zellen steigert. Eine Ursache für die vermehrte ROS-Produktion durch PL-MDSC könnte die Tatsache sein, dass in der Plazenta im Vergleich zum peripheren Blut vermehrt fetale und damit „Fremd“-Antigene exprimiert werden, welche die GR-MDSC aktivieren könnten.

Neben der verstärkten ROS-Produktion durch PL-MDSC war die Fähigkeit zur T-Zell-Proliferationshemmung bei PL-MDSC ausgeprägter als bei NSB-MDSC. Auch dieser Befund spricht für eine Aktivierung von MDSC in der Plazenta. Unklar bleibt, welche Effektormechanismen zur stärkeren inhibitorischen Potenz

von PL-MDSC führen, da die Expression der beiden bekanntesten Effektorenzyme, Arginase 1 und iNOS, nicht erhöht war. Außerdem soll untersucht werden, über welche Faktoren es in der Plazenta zu einer Aktivierung der MDSC kommt. Mögliche Mechanismen könnten dabei die Aktivierung durch fetale Antigene oder durch die Expression von Zytokinen oder HLA-G durch Trophoblast- und Deziduazellen sein.

Bei allen Ergebnissen zur Untersuchung von PL-MDSC muss vor allem die Tatsache erwähnt werden, dass bei der mechanischen Verarbeitung von Plazentabiopsien die Kontamination mit Nabelschnurblut, welches das gesamte Organ durchfließt, nicht zu vermeiden war. Es stellte sich also die Frage, ob die aus der Plazenta isolierten GR-MDSC nicht eigentlich zum größten Teil NSB-MDSC waren. Sowohl die deutlich verstärkte ROS-Produktion als auch die verstärkte suppressive Aktivität auf die T-Zell-Proliferation sprechen jedoch dagegen. Eine wichtige Frage für weitere Studien war, ob die aus der Plazenta isolierten GR-MDSC fetalen oder mütterlichen Ursprungs sind. Dies konnte nach Abschluss der Arbeit anhand einer genetischen Analyse von Schwangerschaften mit männlichen Feten erfolgen. Es wurden GR-MDSC aus Plazenten von männlichen Feten isoliert und deren Ursprung analysiert. 80 % der PL-MDSC wiesen einen weiblichen Karyotyp auf und waren somit mütterlichen Ursprungs.

4.5. GR-MDSC im peripheren Blut von Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom

Im nächsten Schritt untersuchten wir Blut von Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom, zwei wichtigen immunologischen Schwangerschaftskomplikationen (Abildgaard und Heimdal 2013; Laresgoiti-Servitje 2013; Pennington et al. 2012; Saftlas et al. 2014), auf die Expression von GR-MDSC.

Dabei zeigte sich, dass GR-MDSC im peripheren Blut von Schwangeren mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom im Vergleich zu gesunden Schwangeren überraschenderweise vermehrt vorkamen. Dieses Ergebnis steht in

Widerspruch zu unserer Hypothese, dass eine verminderte Bildung von MDSC zu einer gestörten Immuntoleranz gegenüber dem Fetus und damit zum Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen führt.

In unserer Studie wurden GR-MDSC im Rahmen der Präeklampsie bzw. des HELLP-Syndroms bisher nur quantifiziert, nicht jedoch funktionell analysiert. Eine mögliche Erklärung für die unerwartete Erhöhung des Anteils an GR-MDSC bei Präeklampsie- bzw. HELLP-Syndrom-Patientinnen könnte sein, dass diese Zellen im Vergleich zu MDSC von gesunden Schwangeren eine verminderte funktionelle Aktivität besitzen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Rekrutierung von MDSC in die Plazenta bei Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom gestört ist und damit zwar systemisch der Anteil dieser Zellen erhöht ist, sie jedoch am Ort der eigentlichen Toleranzinduktion fehlen. Hierauf könnten Untersuchungen von Hsu et al. (2012, 2014) hinweisen, die zeigen, dass die Fähigkeit zur Treg-Induktion durch spezielle, HLA-G-exprimierende Antigen-präsentierende Zellen in der Plazenta bei Präeklampsie vermindert ist. Ebenso wie für die Tregs wäre es möglich, dass Zellen, welche normalerweise für die Induktion und Aktivierung von MDSC an der fetomaternalen Grenze wichtig sind, bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

Ergänzend zu den bisher genannten möglichen Gründen für die vermehrte Expression von GR-MDSC bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom ist aus einer Reihe von Studien zu Krankheitsbildern, die mit einer Inflammationsreaktion einhergehen, wie z.B. Sepsis, Trauma oder autoimmunologischen Erkrankungen weiterhin bekannt, dass es im Rahmen dieser ebenfalls zu einer Expansion von MDSC kommt. Diese Expansion soll nicht, wie es bei Tumor-induzierten MDSC der Fall zu sein scheint, durch spezifische Antigene hervorgerufen werden, sondern sei im Sinne einer „Notfall-Myelopoese“ als Mobilisation unreifer Populationen aus dem Knochenmark zu betrachten (Cuenca et al. 2011). Bezogen auf die Schwangerschaft könnte dies bedeuten, dass es im Rahmen einer Präeklampsie zwar zu einer unspezifischen Expansion unreifer myeloider Zellen kommt, die spezifische Toleranz gegenüber den fetalen Antigenen aber dennoch gestört ist.

Um diesen Fragen weiter nachzugehen, müsste zunächst eine vergleichende Quantifizierung und funktionelle Analyse von GR-MDSC in Plazenten von gesunden Schwangeren und Patientinnen mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom erfolgen. Dies war im Rahmen der vorliegenden Studie aufgrund einer erschwerten Rekrutierung von Probandinnen leider nicht möglich. Wir wählten daher ein Hypoxie-Kulturmodell um zumindest einen pathogenetischen Aspekt der Präeklampsie genauer zu untersuchen.

4.6. Die Funktion von GR-MDSC unter vermindertem Sauerstoffangebot

Ein wesentlicher pathogenetischer Mechanismus bei der Entstehung der Präeklampsie scheint ein niedriger Sauerstoffpartialdruck der Plazenta zu sein. Zahlreiche Studien, so z.B. Untersuchungen zum Vorkommen von Präeklampsie bei Frauen, welche in Höhenlagen Boliviens, Saudi-Arabiens bzw. Colorados leben, geben Hinweis darauf, dass ein verminderter Sauerstoffpartialdruck die Prävalenz der Präeklampsie erhöht (Keyes et al. 2003; Mahfouz et al. 1994; Palmer et al. 1999). Nevo et al. (2006) konnten in vitro zeigen, dass die Expression des antiangiogenen Faktors sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1) sowohl in Plazenten von Frauen, welche in Höhenlagen lebten als auch in Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen und in Plazentagewebe, welches unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurde vermehrt exprimiert war. Weiterhin konnten Soleymanlou et al. (2005) zeigen, dass die Genexpressions-Profile in Plazenten von Frauen aus Höhenlagen, in Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen sowie in hypoxisch kultiviertem Plazentagewebe bemerkenswerte Ähnlichkeiten aufwiesen. Trollmann et al. (2003) zeigten in einem Mausmodell, dass die Überexpression des Hypoxie-abhängigen Transkriptionsfaktors HIF-1 α in tragenden Mäusen zu klinischen und pathologischen Veränderungen führte, welche denen einer Präeklampsie entsprachen, wie z.B. Hypertonie, Proteinurie und glomeruläre Endotheliose. Zur weiteren funktionellen Untersuchung von MDSC im Rahmen der Präeklampsie wählten wir daher ein Hypoxie-Modell.

Anhand dieses Modells konnten wir zeigen, dass nach zweistündiger Kultur bei 2 % O₂ die ROS-Produktion von MDSC nicht verändert war im Vergleich zur

Kultur bei 21 % O₂. In der Literatur finden sich bezüglich der ROS-Produktion unter Hypoxie kontroverse Daten. So beschrieben Corzo et al. (2010) eine verminderte ROS-Produktion durch murine MDSC aus der Milz nach 48-stündiger Kultur bei 1 % O₂. McGovern et al. (2011) beschrieben außerdem eine verminderte ROS-Produktion durch Neutrophile nach ein- bzw. vierstündiger Kultur unter hypoxischen Bedingungen. Kim et al. (2014) konnten hingegen an aus Fettgewebe isolierten Stammzellen zeigen, dass deren ROS-Produktion nach 20-minütiger Kultur bei 2 % O₂ erhöht war. Grund für diese zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen ROS-Nachweisverfahren und Kulturbedingungen bzw. Kulturzeiten sein.

Hinsichtlich der T-Zell-Suppressivität von PL-MDSC konnten wir zeigen, dass diese unter hypoxischen Bedingungen herabgesetzt war im Vergleich zu Kultur unter Normoxie. Die Wirkung von Hypoxie auf Immunzellen wurde bereits vielfach untersucht. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Studien sagen, dass Hypoxie auf Zellen der angeborenen Immunität eher aktivierend (Anand et al. 2007; Cramer et al. 2003; Peyssonnaud et al. 2005) und auf Zellen der adaptiven Immunität eher hemmend zu wirken scheint (Georgiev et al. 2013; Goda et al. 2003; Neumann et al. 2005; Thiel et al. 2007). Unseres Wissens nach existiert bisher erst eine Studie, die die Wirkung von Hypoxie auf die Funktion von MDSC untersuchte: Corzo et al. (2010) konnten an murinen MDSC aus der Milz zeigen, dass Hypoxie über HIF-1 α die Kapazität von MDSC zur Hemmung der T-Zell-Proliferation sowie zur Hemmung der Interferon γ -Produktion steigerte. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu unseren Daten, die zeigen, dass die proliferative Aktivität von T-Zellen unter Hypoxie zunimmt, die suppressive Aktivität der MDSC dagegen aber abnimmt. Eine mögliche Erklärung für diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass es sich um Zellen unterschiedlicher Herkunft handelte. Die meisten der oben genannten Studien, so auch Corzo et al. (2010) arbeiten mit murinen Zellen während in der vorliegenden Arbeit Zellen aus peripherem Blut bzw. Plazenten von Menschen verwendet wurden. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass bereits physiologisch der Sauerstoffpartialdruck in Plazentagewebe mit 25 mmHg im ersten Trimenon bis 65 mmHg im letzten

Trimenon (Sullivan et al. 2006), entsprechend 3 % O₂ und 8 % O₂, deutlich unter dem Sauerstoffpartialdruck in peripherem Blut liegt und damit die von uns gewählten Standardkulturbedingungen für die PL-MDSC hyperoxische Bedingungen darstellen.

Unter Vorbehalt dieser methodischen Kritikpunkte könnten unsere Ergebnisse darauf hindeuten, dass durch die u.a. bei Präeklampsie- und HELLP-Syndrom-Patientinnen vorliegende Gewebhypoxie eine Beeinträchtigung der MDSC-Funktion in der Plazenta hervorgerufen wird, welche letztlich dazu führen könnte, dass die Toleranz gegenüber dem semiallogenen Organismus im Rahmen diverser Schwangerschaftskomplikationen nicht mehr aufrecht erhalten werden kann.

4.7. GR-MDSC im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung

Um einen möglichen Einfluss von MDSC auf die Induktion bzw. Aufrechterhaltung einer frühen Schwangerschaft zu untersuchen wurde als klinischer Ansatz die Anzahl an GR-MDSC im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung quantifiziert. GR-MDSC waren im peripheren Blut von Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung vermehrt vorhanden im Vergleich zu nicht schwangeren gesunden Kontrollen. Dieses Ergebnis bestätigte unsere Hypothese, dass GR-MDSC bereits in der sehr frühen Schwangerschaft eine Rolle spielen könnten. Interessanterweise wiesen jedoch sowohl Frauen, bei welcher die Reproduktionsbehandlung zu einem Schwangerschaftseintritt führte genau wie jene, bei denen es nicht zum Eintritt einer Schwangerschaft kam erhöhte Zahlen an GR-MDSC auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Schlossberger et al. (2013), dass sich die Gesamtzahl von Tregs bei Frauen, welche nach einer assistierten Reproduktionsbehandlung schwanger geworden waren nicht von der Gesamtzahl an Tregs bei Frauen mit erfolgloser Behandlung unterschied, jedoch Unterschiede in der Zusammensetzung der Tregs vorlagen, im Sinne von vermehrt naiven Tregs und prozentual verminderten Gedächtnis-Tregs bei

den Frauen mit erfolgreicher Behandlung. Ebenso könnten in der Funktionalität von MDSC Unterschiede zwischen erfolgreich und erfolglos behandelten Patientinnen vorliegen.

Anders betrachtet kann unser Ergebnis Hinweise auf die Akkumulation von GR-MDSC im Rahmen einer Schwangerschaft geben: vor dem Einbringen der Spermien oder Embryonen erhalten die Patientinnen eine Stimulationstherapie mit Geschlechtshormonen. Der Anstieg der GR-MDSC-Zahlen könnte also beispielsweise durch hormonelle Einflüsse zustande kommen. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie, die zeigte, dass Medroxyprogesteron die Akkumulation und Funktion von MDSC fördert (Spallanzani et al. 2013). Weiterhin konnte für Tregs gezeigt werden, dass deren suppressive Aktivität durch Östrogen gesteigert werden kann (Luo et al. 2011). Aufbauend auf unsere Ergebnisse zur MDSC-Zahl bei Patientinnen nach assistierter Reproduktionsbehandlung sollte der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Zahl und Funktion von MDSC in der Schwangerschaft genauer untersucht werden.

4.8. Methodenkritik und Limitationen des Systems

Zunächst muss betont werden, dass bei den durchgeführten Versuchen mit biologischem Material gearbeitet wurde und dass es hierbei immer interindividuelle Unterschiede gibt, welche bei der Auswertung der Ergebnisse nie vollkommen ausgeglichen werden können. Jedoch wurde bei der Auswahl von Probanden und Kontrollen darauf geachtet, dass es sich um ein möglichst homogenes Kollektiv hinsichtlich Alter, Gestationsalter und bisherigem Schwangerschaftsverlauf handelt. Außerdem wurden Probandinnen ausgeschlossen, bei denen der klinische Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom vorlag, welches seinerseits zu Veränderungen der MDSC-Anzahl und Funktion führen könnte. Ein laborchemischer oder serologischer Nachweis einer subklinischen Infektion sowie die Beobachtung des postpartalen Verlaufs erfolgten jedoch nicht.

Eine weitere Problematik bei der Analyse biologischen Materials aus Routineentnahmen, wie es bei der Quantifizierung von GR-MDSC im Blut von

Präeklampsie- und HELLP-Syndrom-Patientinnen der Fall war, ist, dass nicht alle Proben sofort nach Rekrutierung verarbeitet werden konnten. Längere Lagerungszeiten könnten die prozentualen Anteile der verschiedenen Subpopulationen der PBMC-Fraktion verändern. Daher wurde eine Kinetik erstellt und Blutproben nur mit einem Alter von weniger als 24 Stunden nach Abnahme verarbeitet. Außerdem wurden die Kontrollproben nicht nur hinsichtlich Gestationsalter und Alter der Schwangeren, sondern auch hinsichtlich der Lagerungszeit vor Verarbeitung aufeinander abgestimmt.

Die Durchführung der Experimente war angelehnt an aus der Literatur bekannte Methoden, sodass eine vergleichende Aussage zur bereits vorhandenen Literatur möglich ist. Bei der Verarbeitung der Plazentaprobe wurde auf einen enzymatischen Verdau verzichtet, da sich in Vorversuchen zeigte, dass eine Behandlung mit DNase und Kollagenase möglicherweise zu einer Aktivierung von Granulozyten führte, was bewirkte, dass diese teilweise in der PBMC-Fraktion zu finden waren und so nicht mehr sicher von MDSC zu unterscheiden waren. Diese Beobachtung machten bereits Rodriguez et al. (2009), die beschrieben, dass die Behandlung von Granulozyten mit PMA dazu führte, dass diese vermehrt CD66b exprimierten und nach Dichtezentrifugation in der PBMC-Fraktion zu finden waren. Durch die Behandlung des Plazentagewebes mit Enzymen könnte die Quantifizierung der GR-MDSC folglich verfälscht werden, daher wurde in dieser Arbeit eine ausschließlich mechanische Aufarbeitung des Gewebes durchgeführt.

Die Kultivierung der Ansätze der CFSE-Proliferations-Assays erfolgte unter Standardkulturbedingungen bzw. verminderten Sauerstoffbedingungen in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Kulturverfahren um mögliche pathophysiologische Faktoren der Präeklampsie zu untersuchen (Nevo et al. 2006; Royle et al. 2009; Soleymanlou et al. 2005). Es ist jedoch bekannt, dass die physiologischen Sauerstoffbedingungen in humanem Gewebe, u.a. in der Plazenta im Vergleich zu den Standardkulturbedingungen vermindert sind und damit derzeit die meisten in-vitro Kulturen unter hyperoxischen Bedingungen stattfinden (Sullivan et al. 2006).

Bei den Probandinnen nach assistierter Reproduktionsbehandlung wurden aufgrund erschwerter Rekrutierung Frauen mit unterschiedlichen Behandlungsverfahren (in-vitro Fertilisation, intrazytoplasmatischer Spermieninjektion, künstlicher Insemination) eingeschlossen. Um genauere Hinweise auf die Ursache für die vermehrte Expression von GR-MDSC bei Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung zu bekommen, sollte in weiterführenden Untersuchungen auf ein einheitlicheres Probandenkollektiv hinsichtlich der Behandlungsmethode geachtet werden.

4.9. Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass GR-MDSC für die Aufrechterhaltung und den komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft eine wichtige Rolle spielen könnten, indem sie durch ihre immunmodulatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften einen Angriff des semiallogenen Fetus durch mütterliche T-Zellen verhindern und so zur fetomaternalen Toleranz beitragen. Wir konnten zeigen, dass GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht akkumulieren, wichtige Effektormechanismen exprimieren, im Vergleich zu Zellen aus dem peripheren Blut stärker aktiviert sind und in der Lage sind unspezifische T-Zell-Antworten zu hemmen. Darüber hinaus konnten wir Hinweise darauf finden, dass PL-MDSC unter vermindertem Sauerstoffangebot, welcher ein gemeinsamer pathophysiologischer Aspekt zahlreicher Schwangerschaftskomplikationen ist, eine verminderte suppressive Aktivität aufweisen. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass sowohl die Präeklampsie bzw. das HELLP-Syndrom als wichtige immunologische Schwangerschaftskomplikationen sowie eine assistierte Reproduktionsbehandlung zu Veränderungen in der Zahl von GR-MDSC führt.

Unsere Ergebnisse tragen damit zu einem besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge während einer Schwangerschaft und der Entstehung der fetomaternalen Toleranz bei und könnten in Zukunft eine Möglichkeit bieten Schwangerschaftskomplikationen therapeutisch besser

beeinflussen zu können. Darüber hinaus können genauere Kenntnisse der regulatorischen Funktionen von MDSC während der Schwangerschaft helfen, generelle Prinzipien der Toleranzinduktion besser zu verstehen und eventuell in Zukunft therapeutische Möglichkeiten auch zur Behandlung von Tumorerkrankungen, Transplantationsreaktionen und Autoimmunkrankheiten abzuleiten.

5. Zusammenfassung

Während der Schwangerschaft muss das mütterliche Immunsystem in der Lage sein Infektionen adäquat abzuwehren, gleichzeitig aber einen semiallogenen Organismus tolerieren. Das Zustandekommen dieser fetomaternalen Toleranz ist bisher nur unvollständig verstanden.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Bedeutung von granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC) für den komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft untersucht. GR-MDSC wurden in der Plazenta durchflusszytometrisch quantifiziert, die Expression wichtiger Effektormechanismen analysiert und ihre Kapazität zur Hemmung der T-Zell-Proliferation untersucht. Um den Effekt eines verringerten Sauerstoffangebotes auf die Funktion von GR-MDSC und damit einen pathogenetischen Aspekt verschiedener Schwangerschaftskomplikationen genauer zu beleuchten, wurden GR-MDSC unter hypoxischen Kulturbedingungen funktionell analysiert. Außerdem erfolgte eine Quantifizierung von GR-MDSC im Blut von Präeklampsie-/ HELLP-Syndrom-Patientinnen und Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung.

Es konnte gezeigt werden, dass GR-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht akkumulieren, die Effektorenzyme Arginase 1 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase exprimieren, reaktive Sauerstoffspezies produzieren und suffizient in der Lage sind, die T-Zellproliferation zu unterdrücken. Außerdem scheinen PL-MDSC stärker aktiviert zu sein als GR-MDSC aus der Peripherie. Nach Kultur unter hypoxischen Bedingungen war die T-Zell-suppressive Kapazität von PL-MDSC vermindert. Die Quantifizierung von GR-MDSC im Blut von Präeklampsie-/ HELLP-Syndrom-Patientinnen zeigte ein vermehrtes Vorkommen dieser Zellen verglichen mit gesunden Schwangeren. Bei Frauen nach assistierter Reproduktionsbehandlung waren unabhängig vom Erfolg der Behandlung ebenfalls erhöhte Zahlen von GR-MDSC zu finden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass GR-MDSC eine Bedeutung für die immunologische Toleranz zwischen Mutter und

Fetus haben. Aufbauend auf unseren Ergebnissen könnten in Zukunft Strategien entwickelt werden, immunologische Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie oder Aborte besser behandeln zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Abildgaard U, Heimdal K: Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;166(2):117-23.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S: The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18(3):325-32.
- Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N: Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood* 2011;117(26):7021-31.
- Amsalem H, Gaiger A, Mizrahi S, Yagel S, Rachmilewitz J: Charakterization of a lymphocyte subset displaying a unique regulatory activity in human decidua. *Int Immunol* 2008;20(9):1147-54.
- Anand RJ, Gribar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, Dubowski T, Sodhi CP, Hackam DJ: Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. *J Leukoc Biol* 2007;82(5):1257-65.
- Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT: The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update* 2012;18(4):436-57.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlich Medizinischen Fachgesellschaften. Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaftshochdruck/Gestose der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG): Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen. 2008;Register Nr 015/018.
- Arruvito L, Sotelo AI, Billordo A, Fainboim L: A physiological role for inducible FOXP3+ TREG cells Lessons from women with reproductive failure. *Clin Immunol* 2010;136(3):432-41.
- Bansal AS: Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2010;64(5):307-15.
- Baylis SA, Strijbos PJ, Sandra A, Russell RJ, Rijhsinghani A, Charles IG, Weiner CP: Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999;5(3):277-86.
- Böyum A: Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:31-50.
- Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, Suttman H, Schenck M, Welling J, Zabel P, Lang S: Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol* 2011;89(2):311-7.
- Bronte V, Zanovello P: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005;5(8):641-54.
- Chaouat G, Petitbarat M, Dubanchet S, Rahmati M, Ledée N: Tolerance to the foetal allograft? *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):624-36.
- Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gibrilovich DI:

- HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2010;207(11):2439-53.
- Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, MyCaffrey JC, Gabilovich DI: Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2009;182(9):5693-701.
- Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS: HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112(5):645-57.
- Crow JP: Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1997;1(2):145-57.
- Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL: A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med* 2011;17(3-4):281-92.
- Darmochwal-Kolarz D, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J: The concentrations of soluble HLA-G protein are elevated during mid-gestation and decreased in pre-eclampsia. *Folia Histochem Cytobiol* 2012;50(2):286-91.
- Deutsches IVF-Register Jahrbuch 2012. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2013;10 (Sonderheft 2).
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA: Cytokines, Chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005;11(6):613-30.
- Dimova T, Nagaeva O, Stengvist AC, Hedlund M, Kjellberg L, Strand M, Dehlin E, Mincheva-Nilsson L: Maternal Foxp3 expressing CD4⁺ CD25⁺ and CD4⁺ CD25⁻ regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy deciduas: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples. *Am J Reprod Immunol* 2011;66 Suppl 1:44-56.
- Duffy A, Zhao F, Haile L, Gamrekashvili J, Fioravanti S, Ma C, Kapanadze T, Compton K, Figg WD, Greten TF: Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62(2):299-307.
- Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B: Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008;180(12):7898-906.
- Ernerudh J, Berg G, Mjösberg J: Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *Am J Reprod Immunol* 2011;66 Suppl 1:31-43.
- Fainaru O, Pencovich N, Hantisteanu S, Yona G, Hallak M: Immature myeloid cells derived from mouse placentas and malignant tumors demonstrate

- similar proangiogenic transcriptional signatures. *Fertil Steril* 2013;99(3):910-917.
- Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW: Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(10):1419-30.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9(3):162-74.
- Georgiev P, Belikoff BG, Hatfield S, Ohta A, Sitkovsky MV, Lukashev D: Genetic deletion of the HIF-1 α isoform I.1 in T cells enhances antibacterial immunity and improves survival in a murine peritonitis model. *Eur J Immunol* 2013;43(3):655-66.
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;23(1):359-69.
- Greten TF, Manns MP, Korangy F: Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol* 2011;11(7):802-7.
- Haddad EK, Duclos AJ, Anteckka E, Lapp WS, Baines MG: Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cell Immunol* 1997;181(1):68-75.
- Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM: A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol* 1999;163(6):3491-5.
- Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Serody JS, Munn DH, Tolar J, Ochoa AC, Blazar BR: Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 2010;116(25):5738-47.
- Hsu P, Santner-Nanan B, Dahlstrom JE, Fadia M, Chandra A, Peek M, Nanan R: Altered decidual DC-SIGN⁺ antigen-presenting cells and impaired regulatory T-cell induction in preeclampsia. *Am J Pathol* 2012;181(6):2149-60.
- Hsu P, Santner-Nanan B, Joung S, Peek MJ, Nanan R: Expansion of CD4(+) HLA-G(+) T Cell in human pregnancy is impaired in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2014;71(3):217-28.
- Jin LP, Fan DX, Zhang T, Guo PF, Li DJ: The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2011;66(4):270-8.
- Johal T, Lees CC, Everett TR, Wilkinson IB: The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *Br J Clin Pharmacol* 2014;78(2):244-57.
- Kanasaki K, Kalluri R: The biology of preeclampsia. *Kidney Int* 2009;76(8):831-7.
- Keyes LE, Armaza JF, Niermeyer S, vargas E, Young DA, Moore LG: Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr Res* 2003;54(1):20-5.

- Kim JH, Kim SH, Song SY, Kim WS, Song SU, Yi T, Jeon MS, Chung HM, Xia Y, Sung JH: Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation. *Cell Biol Int* 2014;38(1):32-40.
- Köstlin N, Kugel H, Spring B, Leiber A, Marmé A, Henes M, Rieber N, Hartl D, Poets CF, Gille C: Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur J Immunol* 2014.
- Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, Bangham CR, Taylor GP, Herath S, Choi BS, Soler G, Teoh T, Modolell M, Müller I: Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* 2007;37(4):935-45.
- Kusmartsev S, Gabrilovich DI: Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* 2003;74(2):186-96.
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI: Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 2004;172(2):989-99.
- Laresgoiti-Servitje E: A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol* 2013;94(2):247-57.
- Lechner MG, Megiel C, Russell SM, Bingham B, Arger N, Woo T, Epstein AL: Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med* 2011;9:90.
- Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ: The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 2013;138(2):105-15.
- Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H, Dong M: Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS* 2011;119(9):597-604.
- Luo CY, Wang L, Sun C, Li DJ: Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol* 2011;8(1):50-8.
- Lyons AB, Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171(1):131-7.
- Mahfouz AA, el-Said MM, Alakija W, al-Erian RA: Altitude and socio-biological determinants of pregnancy-associated hypertension. *Int J Gynaecol Obstet* 1994;44(2):135-8.
- McGovern NN, Cowburn AS, Porter L, Walmsley SR, Summers C, Thompson AA, Anwar S, Willcocks LC, Whyte MK, Condliffe AM, Chilvers ER: Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *J Immunol* 2011;186(1):453-63.
- Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J: FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol Reprod* 2010;82(4):698-705.

- Molnár M, Sütö T, Tóth T, Hertelendy F: Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(5 Pt 1):1458-66.
- Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI: Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13(7):828-35.
- Nakamura I, Shibata M, Gonda K, Yazawa T, Shimura T, Anazawa T, Suzuki S, Sakurai K, Koyama Y, Ohto H, Tomita R, Gotoh M, Takenoshita S: Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncol Lett.* 2013;5(5):1682-1686.
- Neumann AK, Yang J, Biju MP, Joseph SK, Johnson RS, Haase VH, Freedman BD, Turka LA: Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):17071-6.
- Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I: Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291(4):R1085-93.
- Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porra F, Benigni A, Picciolo C, Remuzzi G: L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension* 2004;43(3):614-22.
- Palmer SK, Moore LG, Young D, Cregger B, Berman JC, Zamudio S: Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(5):1161-8.
- Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ: Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 2012;5(1):9-18.
- Peyssonaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS: HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 2005;115(7):1806-15.
- Piao HL, Tao Y, Zhu R, Wang SC, Tang CL, Fu Q, Du MR, Li DJ: The CXCL12/CXCR4 axis is involved in the maintenance of Th2 bias at the maternal/fetal interface in early human pregnancy. *Cell Mol Immunol* 2012;9(5):423-30.
- Porta R, Esposito C, Martin A, Pietra GD: Arginase from human full-term placenta. *Biochem J* 1976;159(3):579-83.
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E: Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999;196(2):122-30.
- Raghupathy R: Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001;13(4):219-27.

- Rath W: Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen (HES). In: Rath W, Friese K (Hrg.). *Erkrankungen in der Schwangerschaft*. Georg Thieme Verlag, 2009, S. 73-97.
- Rieber N, Brand A, Hector A, Graepler-Mainka U, Ost M, Schäfer I, Wecker I, Neri D, Wirth A, Mays L, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Stern M, Hogardt M, Döring G, Riethmüller J, Kormann M, Hartl D: Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 2013;190(3):1276-84.
- Rieber N, Gille C, Köstlin N, Schäfer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heininger V, Alkhaled M, Hector A, Mays L, Kormann M, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Poets CF, Hartl D: Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin Exp Immunol* 2013;174(1):45-52.
- Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC: Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 2009;69(4):1553-60.
- Royle C, Lim S, Xu B, Tocher J, Ogle R, Hennessy A: Effect of hypoxia and exogenous IL-10 on the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha and the anti-angiogenic molecule soluble Flt-1 in placental villous explants. *Cytokine* 2009;47(1):56-60.
- Saftlas AF, Rubenstein L, Prater K, Harland KK, Field E, Triche EW: Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2014;101-102:104-10.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M: Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):601-10.
- Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY: Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 2012;150(1):29-38.
- Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST: Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res* 2010;85(1):194-203.
- Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R: Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009;183(11):7023-30.
- Schlossberger V, Schober L, Rehnitz J, Schaiyer M, Zeier M, Meuer S, Schmitt E, Toth B, Strowitzki T, Steinborn A: The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets. *Hum Reprod* 2013;28(11):3062-73.
- Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I: Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):4299-308.
- Spallanzani RG, Dalotto-Moreno T, Raffo Iraolagoitia XL, Ziblat A, Domaica CI, Avila DE, Rossi LE, Fuertes MB, Battistone MA, Rabinovich GA, Salatino M, Zwirner NW: Expansion of CD11b(+)Ly6G (+)Ly6C (int) cells driven

- by medroxyprogesterone acetate in mice bearing breast tumors restrains NK cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62(12):1781-95.
- Strittmatter HJ, Blecken SR: [Secretion and regulation of cytokines during pregnancy and gestosis]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2007;211(2):69-75.
- Sullivan M, Galea P, Latif S: What is the appropriate oxygen tension for in vitro culture? *Mol Hum Reprod* 2006;12(11):653.
- Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, Smith P, Ohta A, Lentsch AB, Lukashev D, Sitkovsky MV: Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS One* 2007; 2(9):e853.
- Toldi G, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Molvarec A: The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2012;68(2):175-80.
- Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, Dötsch J: Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(2):517-23.
- Trundley A, Gardner L, Northfield J, Chang C, Moffett A: Methods for isolation of cells from the human fetal-maternal interface. *Methods Mol Med* 2006;122:109-22.
- Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, Fenoglio D, Ragni N, Moretta L, Mingari MC: Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(26):11918-23.
- Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J: Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:79.
- Zhang W, Liang S, Wu J, Horuzsko A: Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation* 2008;86(8):1125-34.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätskinderklinik Tübingen, Abteilung IV Neonatologie unter Betreuung von Herrn PD Dr. Gille durchgeführt.

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

Die Versuche, die in den Abbildungen 2 bis 14 dargestellt sind wurden von mir durchgeführt.

Frau Hellen Kugel hat die Daten der gesunden Schwangeren bzw. gesunden nicht schwangeren Erwachsenen Kontrollen in den Abbildungen 8, 11 und 14 zur Verfügung gestellt.

Frau Helen Spieles war an der Durchführung der Versuche, die in den Abbildungen 10 und 13 dargestellt sind beteiligt.

Frau Dr. Haen hat die immunhistochemischen Färbungen für die Abbildung 5c zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung durch Herrn PD Dr. Gille und Frau Dr. Köstlin, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Kathrin Hofstädter

Neckartenzlingen, den 6. August 2015

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Köstlin N, Hofstädter K, Ostermeir AL, Spring B, Leiber A, Haen S, Abele H, Bauer P, Pollheimer J, Hartl D, Poets CF, Gille C: Granulocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in human placenta and polarize toward a th2 phenotype. *J Immunol* 2016;196(3):1132-45.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zuerst gilt mein Dank Herr Prof. Dr. Poets für die Annahme als Doktorandin in der Neonatologie, und ganz besonders meinem Betreuer und Doktorvater Herr PD Dr. Gille sowie meiner Betreuerin Frau Dr. Köstlin für die tolle Betreuung und die Zeit, die sie sich immer für mich genommen haben.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. Spring für die Einarbeitung in die Laborarbeit, die Beantwortung aller meiner Fragen und die Aufmunterungen zwischendurch sowie dem gesamten Team des Neolabors und den Doktoranden Frau Kugel und Frau Spieles für die Bereitstellung von Kontrolldaten bzw. der Mithilfe bei der Durchführung der Hypoxie-Versuche.

Einen weiteren Dank möchte ich Frau Dr. Haen aussprechen für die Bereitstellung der immunhistochemischen Färbungen, Herr Dr. Marmé sowie dem Team der IVF-Sprechstunde unter Leitung von Frau Dr. Henes, und dem Team des Kreißsaals, insbesondere Fr. Hahn sowie den Entbindungsstationen an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen für die Bereitstellung der Probanden und Materialien.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei dem Team des Immunzytologie-Labors für die Nutzung des FACS sowie dem Team des Kinderklinikum-Labors für die Nutzung des MACS.

Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank meiner Familie und engsten Freunden, die mich immer unterstützt und ermutigt haben – ohne euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

