

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
(Direktor Univ. - Prof. Dr. Marek Zygmunt)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Die Rolle der Tfh/IL-21/B-Zell Achse innerhalb normaler Schwangerschaften
und ihr Einfluss auf die Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von

Carolin Fröhlich

geb. am 08.01.1994

in Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Marek Zygmunt

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Stubert

Disputation als Online-Zoom-Meeting

Tag der Disputation: 07.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	- 1 -
1.1. Der Aufbau des humanen Immunsystems.....	- 1 -
1.1.1. Primäre lymphatische Organe	- 2 -
1.1.1.1. Knochenmark	- 2 -
1.1.1.2. Thymus.....	- 3 -
1.1.2. Sekundäre lymphatische Organe	- 3 -
1.1.2.1. Milz	- 3 -
1.1.2.2. Lymphknoten	- 4 -
1.2. Entwicklung und Reifung der T-Zell-Population.....	- 5 -
1.2.1. CD4 ⁺ T-Lymphozyten	- 6 -
1.2.1.1. Regulatorische T-Lymphozyten (Treg).....	- 8 -
1.2.1.2. Follikuläre T-Helfer-Zellen	- 9 -
1.3. Entwicklung und Reifung der B-Zell-Population	- 11 -
1.3.1. B-Zell-Einteilung	- 14 -
1.4. Zelltod und Zellzyklus innerhalb des Immunsystems	- 16 -
1.4.1. Programmierter Zelltod	- 16 -
1.4.1.1. Apoptose	- 16 -
1.5. Der Einfluss von Zytokinen und Chemokinen auf die Immunzellen.....	- 17 -
1.5.1 Zytokine	- 17 -
1.5.1.1. Zytokine in der Schwangerschaft	- 18 -
1.5.1.2. IL-21	- 21 -
2. Zielsetzung der Arbeit.....	- 23 -
3. Methoden.....	- 24 -
3.1. Tiermodell.....	- 24 -
3.2. Zellbiologische Methoden	- 25 -

3.2.1.	Isolation von murinen Splenozyten	25 -
3.2.2.	Isolation von PBMCs aus humanem EDTA-Vollblut	25 -
3.2.3.	Bestimmung der Zellzahl	26 -
3.2.4.	Prinzip der Durchflusszytometrie	26 -
3.2.5.	Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie-Analyse	27 -
3.2.5.1.	Extrazelluläre Färbung	27 -
3.2.5.2.	Intrazelluläre Färbung.....	28 -
3.2.5.3.	Durchflusszytometrie Apoptose-Detektion nach Nicoletti.....	28 -
3.2.5.4.	Durchflusszytometrie Färbung der humanen Proben.....	29 -
3.2.6.	Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS).....	29 -
3.2.6.1.	CD19 ⁺ Isolation aus murinen Splenozyten	29 -
3.2.6.2.	Positive CD3 ⁺ Selektion aus humanen peripheren Blutzellen	30 -
3.2.7.	Kultivierung und Konservierung der Zellen	30 -
3.2.7.1.	CD19 ⁺ : Apoptose und Proliferation.....	30 -
3.2.8.	Histologische Techniken – Immunhistochemie und Immunzytochemie -	32 -
3.2.8.1.	Einbettung	32 -
3.2.8.2.	Anfertigung von Gefrierschnitten	33 -
3.2.8.3.	Färben	33 -
3.2.8.4.	Mikroskopieren	34 -
3.3.	Immunologische Methoden.....	34 -
3.3.1.	ELISA IL-10	34 -
3.3.2.	Immunoassay	36 -
3.3.3.	Das Prinzip der Reversen Transkription quantitative PCR (RT-qPCR) .-	37 -
3.3.3.1.	Isolierung der RNA	38 -
3.3.3.2.	Reverse Transkription	39 -
3.3.3.3.	Primer	40 -

3.3.3.4. Quantitative PCR.....	- 40 -
3.4. Statistische Auswertung	- 41 -
4. Materialien	- 42 -
4.1. Geräte.....	- 42 -
4.2. Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel	- 44 -
4.3. Chemikalien, Reagenzien, Stimulanzen	- 47 -
4.4. Medien, Puffer und Lösungen.....	- 49 -
4.5. Antikörper	- 50 -
4.6. Kits.....	- 52 -
4.7. Software.....	- 52 -
5. Ergebnisse	- 53 -
5.1. Der Einfluss von IL-21 auf die Viabilität der B-Lymphozyten.....	- 53 -
5.1.1. Lebenszyklus der B-Zellen	- 53 -
5.1.2. Proliferation der B-Zellen	- 55 -
5.1.3. Zelltod	- 57 -
5.1.4. Apoptose.....	- 59 -
5.4. Der Einfluss von IL-21 auf die Immunglobulin-Produktion der B-Lymphozyten ..	- 61 -
5.5. Der Einfluss von rekombinantem IL-21 auf die IL-10 Produktion der B-Lymphozyten auf mRNA- und Proteinebene	- 63 -
5.6. IL-21 Rezeptor Expression variiert auf B-Zellen	- 65 -
5.7. Der Einfluss von IL-21 auf die Expression der Aktivierungsmarker der B-Lymphozyten	- 68 -
5.8. Tfh-Zellen in Schwangerschaft	- 74 -
5.8.1. Durchflusszytometrie-Färbung von Tfh-Zellen in Mäusen	- 74 -
6. Diskussion	- 80 -
6.1. Die Expression von IL-21R auf B-Zellen.....	- 81 -

6.1.1.	Eintritt in Apoptose oder Proliferation in Abhängigkeit von der IL-21R Expression	- 83 -
6.1.2.	Produktion von Ig und IL-10 in Abhängigkeit von der IL-21R Expression	- 86 -
6.1.3.	Expression von Oberflächenmarkern CD69, MHCII, CD80 und CD86 in Abhängigkeit von der IL-21R Expression.....	- 88 -
6.2.	Anzahl von Tfh-Zellen.....	- 89 -
6.3.	Die Bedeutung des IL-21/IL-21R-Systems für die Schwangerschaft.....	- 91 -
6.4.	Die Methoden und ihre Limitationen	- 92 -
6.5.	Das Mausmodell, seine Limitationen und dessen Translation auf den Menschen	- 93 -
7.	Zusammenfassung	- 97 -
8.	Abbildungsverzeichnis	- 99 -
9.	Tabellenverzeichnis	- 100 -
10.	Literaturverzeichnis	- 101 -
11.	Anhang.....	- 117 -
11.1.	Publikationsliste (Stand 05/2021).....	- 117 -
11.1.1.	Originalarbeiten	- 117 -
11.1.2.	Texte.....	- 117 -
11.2.	Danksagung	- 118 -
11.3.	Eidesstattliche Erklärung.....	- 119 -

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	deutsche Bezeichnung/Erklärung
AF647		Fluorochrom
APC		Fluorochrom
Bcl-6	<i>B cell lymphoma 6</i>	B-Zell-Lymphom-6
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>	
BSA	<i>bovine serum albumine</i>	Bovines Serumalbumin
B220		Antikörper gegen CD45R
Bzw.		beziehungsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	Unterscheidungsgruppen aufgrund diverser Oberflächenmerkmale
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>	Zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4
CXCR		Chemokin Rezeptor der CXC-Chemokine
°C		Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i>	komplementär DNA
DAPI		Diaminidino-phenyl-indol- dihydrochlorid
DC	<i>dendritic cell</i>	dendritische Zelle
dd H ₂ O		bi-distilliertes Wasser
DIF		direkte Immunfluoreszenz
DNA		Desoxyribonukleinsäure
EDTA		Ethylendiamintetracetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	
f	<i>Follow</i>	folgend
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	Fluorescence markierte Zellen Sortierer
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	fetales Rinderserum
FDC	<i>follicular dendritic cell</i>	follikuläre dendritische Zelle
ff		fortfolgend
FITC		Fluorochrom
FO	<i>follicular zone B-cell</i>	follikulär Zonen B-Zelle
Fox	<i>Forkhead-Box-Proteine</i>	Transkriptionsfaktor
g		mittlere Erdbeschleunigung
GPOM	<i>Good pregnancy outcome mice</i>	Mäuse mit gutem Ausgang der Schwangerschaft
h	<i>hour</i>	Stunde
HEV		hochendothelialen Venolen
ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>	induzierbarer Kostimulator
Ig		Immunglobulin

IL		Interleukin
kD		Kilodalton
kg		Kilogramm
LAG3	<i>lymphocyte activation gene 3</i>	
LPS		Lipopolysaccharid
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>	Mukosa- assoziierte- lymphatisches Gewebe
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min		Minute
MLKL	<i>Mixed lineare kinase like pseudokinase</i>	
mRNA	<i>messenger</i>	Ribonukleinsäure Boten-RNA
MZ	<i>marginal zone B-cell</i>	marginal Zonen B-Zelle
µl		Mikroliter
nm		Nanometer
NPM	<i>Non pregnant mice</i>	Nicht schwangere Mäuse
NTC	<i>no template control</i>	
PALS		periarterielle Lymphozytenscheide
PD-1	<i>programmed death-1</i>	programmierter Tod-1
PE		Flurochrom
PE-Cy7		Flurochrom
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Polymerase Ketten Reaktion
PerCP-Cy5.5		Fluorochrom
PBMC's	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>	phosphatgepufferte Salzlösung
PPOM	<i>Poor pregnancy outcome mice</i>	Mäuse mit schlechtem Ausgang der Schwangerschaft
RIP	<i>Receptor interacting protein kinase</i>	
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ribonukleinsäure
RNAse		Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>	Runde pro Minute
RT		Reverse Transkriptase
s	<i>second</i>	Sekunde
SAP	<i>signaling lymphocytic activation molecule associated protein</i>	
S-HRP	<i>Streptavidin-horseradish Peroxidase</i>	
T-bet	T-box expressed in T-cells	
Tfh		Follikuläre T-Helfer-Zellen
TGF	<i>Transforming growth factor</i>	Transformierender Wachstumsfaktor
TLR	<i>Toll like Receptor</i>	

1. Einleitung

“Man kann nicht hoffen, die Welt zum Besseren zu wenden, wenn sich der Einzelne nicht zum Besseren wendet. Dazu sollte jeder von uns an seiner eigenen Vervollkommnung arbeiten und sich dessen bewußt werden, daß er die persönliche Verantwortung für alles trägt, was in dieser Welt geschieht, und daß es die direkte Pflicht eines jeden ist, sich dort nützlich zu machen, wo er sich am nützlichsten machen kann.”

Marie Curie (1867-1943)

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Körper vor ihm fremden Strukturen zu schützen, indem es diese erkennt und bekämpft. Auch körpereigene Zellen, die das Potential zur Entartung besitzen, werden von bestimmten Immunzellen erkannt und eliminiert. Für die Erfüllung dieser zentralen Aufgaben ist es wichtig, dass die verschiedenen Immunzellen miteinander kommunizieren und kooperieren. Die Kommunikation erfolgt dabei über lösliche Botenstoffe, sogenannte Zytokine, die von den Immunzellen sezerniert werden und die an Rezeptoren anderer Zellen binden können. Weiterhin ist es dem Immunsystem möglich eine Art Gedächtnis zu erzeugen, wodurch die Gesundheit nach überstandener Infektion auch dann aufrechterhalten werden kann, wenn der Organismus ein weiteres Mal mit dem Pathogen in Berührung kommt. Richtet sich das Immunsystem fälschlicherweise gegen körpereigene Strukturen, so kommt es zu einer Autoimmunkrankheit. Diese Erkrankung macht deutlich welche wichtige Rolle den Regulationsmechanismen innerhalb des Immunsystems zugesprochen werden kann. Auch der Ausgang einer Schwangerschaft hängt maßgeblich von den Akteuren des Immunsystems und deren Zusammenwirken ab. Innerhalb einer Schwangerschaft kommt es zu einer Adaptation bezüglich einer adäquaten Balance zwischen mütterlichem und fetalem Schutz vor Infektionen und einer Toleranz gegenüber dem semi-allogenen Fötus. Ist dieses Verhältnis gestört, so kann es zu einer Fehlgeburt oder anderen schwangerschaftsassozierten Erkrankungen kommen.

1.1. Der Aufbau des humanen Immunsystems

Das Immunsystem kann zu den größten Organen des menschlichen Körpers gezählt werden. Als eine etablierte Einteilung gilt die Unterscheidung in das angeborene und

adaptive Immunsystem. Beiden ist die Erkennung von fremden Strukturen, wie beispielsweise Oberflächenmolekülen, gemeinsam. Die Erkennung erfolgt mit Hilfe der auf den Immunzellen vorkommenden Oberflächenrezeptoren (Schütt and Bröker, 2011, 2).

Dem angeborenen Immunsystem kommt dabei die Aufgabe zu, im Falle einer Infektion eine erste schnelle Reaktion hierauf einzuleiten. Die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems kommen erst nach gewisser Zeit zum Tragen, da sie die wechselseitige Kommunikation und Kooperation von T- und B-Zellen benötigen (Deller et al., 2018, 261–264). Diese Interaktion zwischen T- und B-Zellen ist für eine erfolgreiche Aktivierung des adaptiven Systems und damit für das Funktionieren des Immunsystems als Ganzes unabdingbar.

1.1.1. Primäre lymphatische Organe

In den primären lymphatischen Organen, zu denen das Knochenmark und der Thymus gehören, findet die Bildung und Reifung der T- und B-Lymphozyten statt.

1.1.1.1. Knochenmark

Das Knochenmark ist das Gewebe, in dem die Bildung aller zellulären Bestandteile des Blutes stattfindet. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich T-, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die B-Zellen durchlaufen im Knochenmark bereits einen großen Teil ihrer Differenzierung (Deller et al., 2018, 224–231).

Nach Bildung der Blutzellen wandern diese in das Blutgefäßsystem und die verschiedenen Gewebe, wobei diese Wanderung bei Mäusen auf einem niedrigeren Niveau stattfindet. Dementsprechend verbleiben mehr Blutzellen im Knochenmark. Ein weiterer Unterschied zwischen humanem und murinem Knochenmark besteht darin, dass bei Mäusen nahezu der ganze Raum des Knochenmarks mit rotem Mark ausgefüllt ist. Die daraus resultierende fehlende Fähigkeit einer Steigerung der Hämatopoese wird mit einer extramedullären Hämatopoese kompensiert (Hedrich, 2012).

1.1.1.2. Thymus

Nachdem die T-Zellen das Knochenmark verlassen haben, erreichen sie über den Blutkreislauf den Thymus. Hier findet ihre weitere Entwicklung statt. Die T-Zellen wandern vom Rand (Rinde) des Thymus zu dessen Inneren (Mark). Dabei treten sie mit den Epithelzellen in Kontakt und differenzieren hierbei fortschreitend aus (Schütt and Bröker, 2011, 100 f.).

Sowohl die anatomische Lage als auch der histologische Aufbau ist bei Mäusen ähnlich dem Menschen. So kommt es auch bei Mäusen im jungen Erwachsenenalter zu einer Atrophie des Organs, wohingegen bei den so genannten Nackt-Mäusen dieser vollständig fehlt (Hedrich, 2012).

1.1.2. Sekundäre lymphatische Organe

Nach der Bildung und Ausdifferenzierung wandern die Immunzellen in die sekundären lymphatischen Organe. Hier treffen die T- und B-Zellen auf mögliche körperfremde Antigene, die ihnen von anderen Immunzellen prozessiert dargestellt werden und sorgen für eine zelluläre und humorale Abwehr (Deller et al., 2018, 264–268).

Zu den sekundären lymphatischen Organen gehören die Milz, die Lymphknoten und das mit der Schleimhaut assoziierte Gewebe (MALT).

1.1.2.1. Milz

Das Immunsystem innerhalb der Milz wird durch die weiße Pulpa gebildet. Diese kann in drei Bereiche aufgeteilt werden: periarterielle Lymphozytenscheide PALS, Lymphfollikel und Marginalzone MZ. Die weiße Pulpa wird von der roten Pulpa umschlossen (Waldeyer et al., 2012, 979 ff.), wobei letztere bei den Mäusen der extramedullären Hämatopoese dient (Hedrich, 2012).

Die PALS wird durch T-Lymphozyten und dendritischen Zellen gebildet. Am Rand der PALS finden sich meist Häufungen naiver B-Lymphozyten in Form von Lymphfollikeln (Milzknötchen,=Malpighi-Körperchen), die bei einer Infektion von T-Lymphozyten aktiviert werden und proliferieren. In diesem Fall bildet sich innerhalb des Follikels ein Keimzentrum, das von einer Mantelzone (Corona) umgeben wird. Ein Follikel, der in

seinem Inneren ein Keimzentrum ausgebildet hat, wird als Sekundärfollikel bezeichnet (Deller et al., 2018, 277–282).

Die Corona wird von der Marginalzone umgeben, die vor allem B-Gedächtniszellen und sogenannte marginal Zonen (MZ) B-Zellen enthält (Deller et al., 2018, 280 f.). Bezüglich ihrer Fähigkeit zur Rezirkulation durch das lymphatische System unterscheiden sich die MZ B-Zellen von Menschen und Mäusen. Obwohl die MZ B-Zellen bei Mäusen von rezirkulierenden Vorläuferzellen abstammen, entwickeln diese, nach Erreichen der Milz, eine Sesshaftigkeit (Kumararatne and MacLennan, 1981). Beim Menschen hingegen sind die MZ B-Zellen für ihre Rezirkulation bekannt (Pillai et al., 2005).

In Bezug auf eine Schwangerschaft bei Mäusen legte man das Augenmerk auf die MZ B-Zellen, da eine Vermehrung ihrer Zellzahl gesehen wurde (Muzzio et al., 2014a). Die Architektur der Milz und deren Veränderungen während der Schwangerschaft wurde bei Mäusen bereits in früheren Arbeiten in unserem Labor untersucht (Muzzio et al., 2014a). So konnte bis zum mittleren Stadium der Schwangerschaft eine deutliche Splenomegalie beobachtet werden. Auch histologische Veränderungen bezüglich der weißen Pulpa wurden beschrieben. Gab es bis zum Tag 14 der Schwangerschaft eine Abnahme des Verhältnisses der weißen Pulpa am gesamten Parenchym, so zeigte dasselbe Gewebe am Tag 18 bereits wieder einen größeren Anteil gegenüber der roten Pulpa. Vor allem sind bislang die zellulären Veränderungen innerhalb der Milz während der Schwangerschaft noch nicht ausreichend aufgeklärt, was Gegenstand dieser Arbeit sein sollte.

1.1.2.2. Lymphknoten

Innerhalb eines Lymphknotens verteilen sich die Immunzellen in unterschiedliche Bereiche zwischen Rinde und Mark. Erzeugt wird die Verteilung durch Chemokine (Lockstoffe). Chemokine bilden eine eigene Gruppe innerhalb der Zytokine. Ihre besondere Rolle, der sie auch ihren Namen verdanken, ist die Steuerung der Zellwanderung von verschiedenen Immunzellen (Chemotaxis-chemotaktische Zytokine). Die Wanderungsbewegung erfolgt dabei entlang eines Konzentrationsgradienten, nachdem Chemokine und Zielzelle mit ihren spezifischen Rezeptoren eine Bindung eingegangen sind (Schütt and Bröker, 2011, 58, 79 ff.).

Die B-Lymphozyten gelangen auf diese Weise in die Rinde, wo sie sich zu sogenannten Lymphfollikeln formatieren. Hiervon nicht weit entfernt sammeln sich die T-Lymphozyten (Deller et al., 2018, 280 f.). Diese räumliche Nähe ermöglicht in der Folge eine Keimzentrumsreaktion.

Es konnte beobachtet werden, dass während der Schwangerschaft bei Mäusen im Vergleich zu nicht-schwangeren Mäusen in den Lymphknoten, die den Uterus drainieren, vermehrt B-Zellen vorkommen. In Folge einer Schwangerschaft zeigte sich, dass sich die zelluläre Zusammensetzung einzelner Lymphknoten ändern kann. So konnte in den Lymphknoten, die von der Lymphe des Uterus drainiert werden, ein vermehrtes Vorkommen an regulatorischen T-Zellen (Treg) beobachtet werden. Dabei handelt es sich um eine Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen, deren anti-inflammatorische Effektorfunktionen mit einem positiven Einfluss auf die Schwangerschaft assoziiert sind (Krey et al., 2008).

1.2. Entwicklung und Reifung der T-Zell-Population

Voraussetzung für eine weitere Differenzierung der T-Zellen ist eine Interaktion mit den Thymusepithelzellen. Durch die von den Epithelzellen produzierten Signalpeptide und Wachstumsfaktoren kommt es zu einer starken Proliferation der T-Zellen. Die T-Zellen produzieren daraufhin verschiedene Enzyme, die für die Herstellung ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle (CD8 und CD4) und dem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) notwendig sind (Schütt and Bröker, 2011, 100).

Nachfolgend durchlaufen die Thymozyten zwei Prozesse, die als positive und negative Selektion bezeichnet werden. Je nachdem, ob die Zellen überhaupt oder zu stark an die ihnen präsentierten Strukturen binden, gehen sie durch Apoptose zugrunde. Nach dem Durchlaufen beider Selektionsprozesse sind 95% der ursprünglichen unreifen Thymozyten von Apoptose betroffen. Die verbleibenden 5% der nun funktionsfähigen T-Lymphozyten lassen sich hinsichtlich ihrer Funktion in drei Haupttypen unterscheiden: CD4⁺, CD8⁺ und regulatorische T-Lymphozyten (Schütt and Bröker, 2011, 100 ff.).

Abschließend verlassen die Lymphozyten den Thymus und gehen in das Blut, oder in sekundäre lymphatische Organe über. Dort kommen sie ständig mit Antigenen in Kontakt, wodurch sie sich wiederholt zu Effektor- oder Gedächtniszellen entwickeln. (Deller et al., 2018, 266 ff.).

1.2.1. CD4⁺ T-Lymphozyten

Im Verlauf ihrer Aktivierung entwickeln sich CD4⁺CD8⁻ Zellen zu sogenannten T-Helferzellen. Diese sind in der Lage, andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren, nachdem sie ihrerseits aktiviert wurden. Die Aktivierung der naiven CD4⁺ Zellen erfolgt dabei durch dendritische Zellen in lymphatischen Geweben nach dem "Zwei-Signal"-Modell (Bretscher und Cohn 1970). Das erste Signal initiiert die Bindung des TCR an das MHCII Molekül der APC. Das zweite Signal, welches vielmehr eine Reihe von aktivierenden und inhibierenden Einflüssen auslöst, wird als kostimulatorisches Signal bezeichnet und bewirkt die Interaktion zwischen Vertretern der B7-Familie (CD80 und CD86 auf APC) und Vertretern der CD28-Familie (T-Zelle) dar. Diese Interaktion (B7:CD28) dient der Regulation einer angemessenen T-Zell-Aktivierung und schützt beispielsweise vor einer Überreaktion dieser Zellen (Neumann, 2008, 92 f.; Schütt and Bröker, 2011, 64 ff.).

Das kostimulatorische Signal führt bei der T-Zelle im Folgenden zu einer Expression von Interleukin-2 (IL-2) und des IL2-Rezeptors (IL-2R). IL-2 ist ein starker autokriner Wachstumsfaktor für die T-Zelle, die nach erfolgter IL-2 Bindung an den IL-2R in die klonale Expansion eintritt und nachfolgend nun auch einen CD40-Liganden (CD40L) exprimiert (Schütt and Bröker, 2011, 66–67).

Unter klonaler Expansion versteht man die zunehmende Teilung der Ausgangszelle und deren Nachkommen. Mit Hilfe des CD40L ist es einer aktivierten T-Zelle nun möglich, dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten zu aktivieren, die CD40 als den entsprechenden Rezeptor exprimieren. T-Zellen, die einen CD40L exprimieren, werden deshalb als T-Helfer-Zellen bezeichnet und liegen nach erfolgter Antigeneliminierung als langlebige Gedächtnis-T-Zellen vor. Derartige Gedächtniszellen benötigen bei erneutem Antigenkontakt keine zweisignalige Aktivierung mehr, sondern stehen direkt für die Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen zur Verfügung (Schütt and Bröker, 2011, 97 ff.).

Durch die Bindung CD40L:CD40 werden weiterhin dendritische Zellen aktiviert. Durch die daraufhin von ihnen sezernierten Zytokine wird die T-Zelle in ihrer Differenzierung beeinflusst. So entstehen entweder Th1- oder Th2-Zellen, die jeweils unterschiedliche Zytokine sezernieren und unterschiedliche Immunantworten induzieren können (Neumann, 2008, 95 f.; Schütt and Bröker, 2011, 74 ff.)

Während einer Schwangerschaft erfahren diese komplexen Vorgänge eine umfassende Adaptation an die jeweiligen Phasen einer Schwangerschaft. Vor diesem Hintergrund gelangt jeder einzelne Akteur erneut in den Fokus der Forschung.

Eine erst kürzlich definierte vierte Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen ist die Th17-Zelle, die das bisherige Th1:Th2 Paradigma erweitert und damit einen weiterentwickelten Ansatz zum Verständnis liefert, weshalb ein Fötus in manchen Fällen von der Mutter abgestoßen wird. Die Th17-Zellpopulation ist durch die Expression von IL-17 gekennzeichnet (Neumann, 2008, 110–113). IL-17 gehört zu den Zytokinen, die eine Entzündungsreaktion im Körper aufrechterhalten können. Während einer Schwangerschaft ist ein Ungleichgewicht zugunsten der Th2-Zellen mit einem erfolgreichen Ausgang einer Schwangerschaft assoziiert (Sykes et al., 2012). Finden sich hingegen überwiegend Th1- und Th17-Zellen kommt es häufig zu einer Fehlgeburt. Für diese Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Th1- und Th17-Zellen scheint IL-21 einen entscheidenden Einfluss zu nehmen. So konnte gezeigt werden, dass IL-21 die Antwort der Th2-Zellen, entgegen ihrer eigentlichen Funktion, in Richtung einer Entzündungsaufrechterhaltung verändert. Die Th2-Zellen standen folglich nicht mehr als Gegenpart zu den Th1- und Th17-Zellen bereit, was die Balance innerhalb der genannten Zellgruppen ungünstig beeinflusste (Pesce et al., 2006). Weitere Forschungen werden zeigen, welchen Einfluss IL-21 während einer Schwangerschaft und auf die B-Zellen hat.

Für einen besseren Überblick sind abschließend die Untergruppen der CD4⁺ T-Zellen in einer Tabelle zusammengetragen. Hierbei ist eine weitere Differenzierung anhand der Expression der Chemokinrezeptoren (CCR oder CXCR) und Transkriptionsfaktoren berücksichtigt.

CD4⁺ T-Zelle	stimulierendes Zytokin	sezernierte Zytokine	Chemokinrezeptor	Transkriptionsfaktor
Th1-Zelle	IL-12	IFN γ , IL-2, TNF β	CXCR3, CCR5	T-bet
Th2-Zelle	IL-4	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13	CCR3, CCR4	STAT6, GATA3
Treg	IL-10, TGF β	TGF β		FoxP3
Th17-Zelle	TGF β , IL-6, IL-23	IL-22, IL-17A	CCR4, CCR6	STAT3, ROR γ t, ROR α
Tfh-Zellen	IL-21	IL-21, IL-6	CXCR5	STAT3, Bcl-6

Tabelle 1: CD4⁺ T-Zell Untergruppen (Eigene Darstellung)

1.2.1.1. Regulatorische T-Lymphozyten (Treg)

Die auch als T-Suppressorzellen bezeichnete T-Zellgruppe konnte bislang nicht eindeutig phänotypisiert werden, weil kein ausschließlich auf den Treg vorkommendes Oberflächenmolekül bekannt ist und für eine Charakterisierung verwendet werden kann (Schütt and Bröker, 2011, 75; Shevryev and Tereshchenko, 2020). Vielmehr sind es eine Reihe von Gemeinsamkeiten, die innerhalb dieser Zellgruppe aufgefallen sind und mit den bereits bestehenden T-Zellgruppen nicht vereinbar waren.

So hat diese Zellgruppe eine CD4-Positivität, eine Expression von Neuropilin und entwickelt sich unter dem Einfluss von IL-10 und TGF β (Kisielow et al., 1988). Unterschiede gibt es bezüglich der Expression von CD25 (CD25⁺ oder CD25⁻) und des Transkriptionsfaktors FoxP3 (FoxP3⁺ oder FoxP3⁻) (Schütt and Bröker, 2011, 75; Hori et al., 2017). Weiterhin exprimieren Treg einige Toll-like-Rezeptoren (TLR2, TLR8), welche die immunsuppressive Wirkung der Treg verhindern können, wenn sie durch Bindung stimuliert werden. Ihre Funktion der Immunsuppression gewährleisten die Treg mit Hilfe von CTLA4 (zellgebundenes Molekül), oder über LAG3 (*lymphocyte activation gene 3*), welche mit CD4 assoziiert sind und an MHCII binden (Zheng et al., 2009; Delacher et al., 2019).

Die Bedeutung der Treg ist deshalb so groß, da sie in der Lage sind die ständig bestehende geringe Affinität der T-Zellen gegenüber eigenen Strukturen mit Hilfe von IL-10 zu unterdrücken. Auch für den positiven Outcome einer Schwangerschaft sind sie bedeutend, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine fehlerhafte Regulation dieser Population, in Kombination mit einer gegen väterliche Antigene gerichtete Immunantwort, zur fetalen Resorption führen kann (Clark et al., 1986, 2002). Weiterhin zeigten Aluvihare et al. (2014), dass die Zahl an Treg während einer Schwangerschaft ansteigt und dass sie dann vermehrt in den Lymphknoten vorkommen, die den Uterus drainieren (Krey et al., 2008; Zeng et al., 2020).

Eine Untergruppe von CD4⁺ Zellen, die von den Treg abgeleitet ist, sind die folliculären Treg (TFR). Diese Zellen sind, wie auch die Tfh-Zellen, durch die Expression von CXCR5, PD-1, ICOS und Bcl-6 gekennzeichnet, unterscheiden sich jedoch von jenen durch das Fehlen von CD40L und IL-21. Als Gegenspieler von Tfh-Zellen unterdrücken TFR-Zellen über die Produktion von IL-10 die Keimzentrumsformation (Yu et al., 2015). Damit rückt diese Zellpopulation in den Vordergrund, sofern man die Rolle von Tfh-Zellen in Bezug auf eine Schwangerschaft untersuchen möchte.

1.2.1.2. Follikuläre T-Helfer-Zellen

Eine Subpopulation der CD4⁺ Zellen sind die follikulären T-Helfer-Zellen (Tfh-Zellen). Beim Menschen wurden sie erstmalig im Jahr 2000 in den Tonsillen entdeckt (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000).

Ein Charakteristikum der Tfh-Zellen ist die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 und die Bereitstellung einer B-Zell-Hilfe. Bei CXCR5 handelt es sich derzeit um den einzig bekannten Rezeptor für CXCL13, der für die Wanderung der Tfh-Zellen in die B-Zell-Follikel verantwortlich ist (Mackay, 2000). Es wurde bereits beobachtet, dass die Organisation der lymphatischen Gewebe in CXCR5-*knockout* Mäusen gestört und die absolute Zahl an Lymphknoten vermindert ist (Ansel et al., 2000; Mackay, 2000). Außerdem stellten Nhan-Chang et al. fest, dass der Level von CXCL13 im Serum schwangerer Frauen erhöht ist (Nhan-Chang et al., 2008). Auch in den Seren mit immunologisch normalen Schwangerschaften von Mäusen wurde eine Erhöhung von CXCL13 beobachtet (Zeng et al., 2016).

Charakteristisch für die Tfh-Zellen ist weiterhin die Expression der kostimulatorischen Moleküle ICOS (induzierbarer Kostimulator), PD-1 (*programmed death-1*=programmierter Tod-1) und SAP (*signaling lymphocytic activation molecule associated protein*), wohingegen die für andere CD4⁺ T-Zell-Linien typischen Expressionslevel anderer Zytokine und Transkriptionsfaktoren sehr niedrig sind (Ma et al., 2012). B-Zell-Lymphom-6 (B cell lymphoma 6=Bcl-6) ist der für Tfh-Zellen typische Transkriptionsfaktor. Bei dem Zytokin, welches auf die Tfh-Zellen Einfluss nimmt, handelt es sich um IL-21. IL-21 wird von den Tfh-Zellen selbst sezerniert und dient der Interaktion mit B-Zellen, die den IL-21R exprimieren. Auch die Sekretion von IL-4 ist typisch für diese Zellgruppe.

Nachdem ein Ungleichgewicht innerhalb ihrer Zellpopulation für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten postuliert wurde, gelangten die Tfh-Zellen in den Fokus (Fan et al., 2015). Obwohl es auch bei Fehlgeburten, die durch eine Fehlregulation des Immunsystems verursacht werden, zu einem Ungleichgewicht innerhalb dieser Zellpopulation kommt, ist ihre Rolle und Charakteristik innerhalb der Schwangerschaft noch weitestgehend ungeklärt.

Erst kürzlich wiesen Zeng et al. unter den in Uterus und Plazenta von Mäusen angesiedelten CD4⁺ T-Zellen ein Phänotyp nach, der dem der Tfh-Zellen entspricht (CD4⁺CXCR5^{hi}PD-1^{hi} und CD4⁺CXCR5^{hi}ICOS^{hi}). Die Arbeit zeigte weiterhin, dass

diese Zellen im Uterus in der Mitte der Schwangerschaft gehäuft vorkommen und in der letzten Phase der Schwangerschaft einen großen Anstieg ihrer Zellzahl in der Plazenta aufweisen. Im Kontrast dazu konnten extrem hohe Level dieser Zellen und eine Hochregulation von ICOS und PD-1 mit einem erhöhten Risiko von Fehlgeburten assoziiert werden. Damit wurde erstmalig postuliert, dass eine adäquate Tfh-Zellzahl mit einem erfolgreichen Ausgang der Schwangerschaft in Verbindung gebracht werden kann (Zeng et al., 2016).

Neben den anderen CD4⁺ T-Zell-Untergruppen erfüllen auch die Tfh-Zellen eine für sie spezifische Funktion. Dabei handelt es sich insbesondere um die Bereitstellung einer B-Zell-Hilfe innerhalb eines Keimzentrums, wodurch den B-Zellen eine Affinitätsreifung und ein Klassenwechsel ermöglicht wird. Für eine Formation eines Keimzentrums sind Tfh-Zellen entscheidend (Crotty, 2011). Innerhalb dieses Zentrums differenzieren die B-Zellen zu Plasma- und Gedächtniszellen. Das Keimzentrum ist weiterhin auch die spezifische anatomische Lokalisation der Tfh-Zellen und dient damit der weiteren Unterscheidung zu anderen T-Zell-Untergruppen. Tfh-Zellen entstehen aus einer aktivierten T-Zelle unter dem Einfluss von IL-21 und in der Abwesenheit von TGFβ (Crotty, 2011).

Die Differenzierung zu Tfh-Zellen ereignet sich in der T-Zell-Region von sekundär lymphatischen Organen. Eine naive CD4⁺ Zelle interagiert mit einer DC über ICOS (ICOSL der DC) und dem TCR (MHCII der DC). Nachfolgend kommt es zu einer Hochregulation von Bcl-6 und CXCR5 und einer Runterregulation von CCR7. Diese Veränderung innerhalb des Rezeptorprofils ermöglicht es Tfh-Zellen von der T-Zell-Region in Richtung des B-Zell-Follikels, entsprechend der dort vorherrschenden Ligandenproduktion, zu wandern (Vinuesa et al., 2016).

Gleichzeitig beeinflusst die DC über die Sekretion von IL-6 und IL-27 die Differenzierung der naiven Tfh-Zelle zur prä-Tfh-Zelle (Bcl-6⁺CXCR5⁺). Der nächste Differenzierungsschritt ereignet sich an der Grenze zum B-Zell-Follikel. Hier kommt es zur Interaktion zwischen prä-Tfh-Zelle und B-Zelle (ICOS:ICOSL), durch welche letztere sich entweder zur kurzlebigen extrafollikulären Plasmablaste entwickelt, oder zurück in die Tiefe des Follikels einwandert (Ma and Phan, 2017).

Erreicht die Tfh-Zelle das Keimzentrum, differenziert sie sich hier zur ausgereiften Tfh-Zelle aus, die sich nur in Bezug auf einen erhöhten Expressionslevel (Bcl-6, ICOS, CXCR5) gegenüber der prä-Tfh-Zelle unterscheidet. Für diese weitere

Ausdifferenzierung ist eine erneute T-Zell-B-Zell-Interaktion notwendig, die über eine stabile Bindung erfolgt (CD40:CD40L, ICOS:ICOSL, CD28:B7). Ebenfalls ist eine erneute Autostimulation mit IL-21 seitens der Tfh-Zelle zum Erreichen der erfolgreichen Differenzierung und zum anschließenden Überleben der Zelle erforderlich (Fan et al., 2015). Dieser Fakt verdeutlicht die entscheidende Rolle des Zytokins IL-21 für die Entwicklung der Tfh-Zelle.

B-Zellen durchlaufen durch die beschriebene Interaktion eine Affinitätsreifung, einen Klassenwechsel und differenzieren nun ihrerseits weiter zu Gedächtnis- oder langlebigen Plasmazellen (Fan et al., 2015).

Innerhalb der CXCR5⁺ Th-Zellen werden die Tfh-Zellen, die im Keimzentrum vorkommen, oftmals als Keimzentrums Th-Zelle bezeichnet. Im Keimzentrum nehmen die Tfh-Zellen eine Schlüsselposition bezüglich der Beeinflussung der B-Zellen ein (Donnadieu et al., 2020), weshalb es wichtig erscheint, die Rolle von Tfh-Zellen im Zusammenhang einer Schwangerschaft genauer zu untersuchen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass auch im peripheren Blut des Menschen CD4⁺CXCR5⁺ Zellen vorkommen, die funktionelle Ähnlichkeiten zu den Tfh-Zellen in den Keimzentren aufweisen, sich jedoch im Expressionsprofil unterscheiden (Yu et al., 2015). So exprimieren die zirkulierenden Tfh-Zellen niedrigere Level von Bcl-6, aber höhere Level des Transkriptionsfaktors Maf, der im Verdacht steht die Fähigkeit zur Zirkulation aufrechtzuerhalten.

1.3. Entwicklung und Reifung der B-Zell-Population

Die Bildung und auch ein Großteil der Differenzierung der B-Zellen findet im Knochenmark statt. Im Rahmen der somatischen Rekombination exprimieren die B-Zellen IgM auf ihren Oberflächen, was den B-Zellen als B-Zell-Rezeptor (BZR) dient. Nachdem die B-Zellen bezüglich ihrer Affinität auf körpereigene Strukturen selektiert wurden, verlassen sie das Knochenmark und exprimieren neben IgM nun auch IgD. Anschließend treten die B-Zellen in das Blut über, wo sie über ihren BZR Antigene aufnehmen und im Folgenden als APC die jeweiligen Peptide mithilfe ihrer MHCII Moleküle präsentieren können (Neumann, 2008, 115 ff.; Schütt and Bröker, 2011, 68 f.).

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich während der Schwangerschaft bei Mäusen ein verminderter Anteil an unreifen B-Zellen im Knochenmark befindet, die die

erwähnte Differenzierung durchlaufen, wobei gleichzeitig ein erhöhter Anteil an reifen B-Zellen nachweisbar ist (Muzzio et al., 2014a). Zwar ist die absolute Anzahl der B-Zellen vermindert, jedoch kommt es zu einer an sich gesteigerten B-Zell-Reifung. Die geringere Anzahl an Splenozyten steht dabei im Kontrast zum sich vergrößernden Milzgewicht, worauf bereits verwiesen wurde.

Innerhalb des sekundären lymphatischen Organs folgen die B-Zellen einem Gradienten aus chemotaktischen Substanzen. Ein solcher Gradient entsteht zum einen durch die Sekretion von Chemokinen und Integrinen und ihrer jeweiligen Liganden. So exprimieren naive B-Zellen beispielsweise die Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR5 und den Liganden für das Chemokin 13 (CXCL13). Letzteres wird von den Stromazellen der B-Zell-Follikel sezerniert, mit dessen Hilfe die B-Zellen den für sie vorgesehenen Platz finden (Schütt and Bröker, 2011, 115 f.).

Dort angekommen treten sie mit den follikulären DC (FDC) in Kontakt, von denen sie verschiedene Antigene präsentiert bekommen. Erkennt ein BZR das für ihn passende Antigen, so wird es über diesen aufgenommen, prozessiert und für die Präsentation gegenüber der CD4⁺ T-Helfer-Zelle vorbereitet. Ebenfalls exprimiert die B-Zelle im Folgenden verstärkt CCR7, der als Rezeptor für die Liganden CCL19 und CCL21 dient. Diese Liganden finden sich wiederum in hoher Anzahl in der T-Zell-Region eines Lymphknotens wieder, was die Migration der B-Zellen erneut beeinflusst (Schütt and Bröker, 2011, 115 f.).

T-Zellen besitzen im naiven Zustand keinen CXCR5. Erst nachdem ihnen von den DC ein Antigen präsentiert wurde, beginnen sie mit der Expression dieses Rezeptors. Anschließend können auch sie die Chemokine aus dem B-Zell-Follikel erkennen und wandern an dessen Rand, sodass sie sich in der notwendigen Distanz zu den B-Zellen befinden, um mit diesen zu interagieren (Neumann, 2008, 119; Schütt and Bröker, 2011, 115 f.).

Am Follikelrand beginnt die Th2-Zelle die B-Zellen nach den von ihnen über MHCII präsentierten Antigenen abzusuchen. Sobald sie das zu ihrem jeweiligen TCR passende Antigen gefunden hat, wird die B-Zelle aktiviert. Die auf diese Weise stattfindende Aktivierung wird als T-Zell-abhängig bezeichnet. Wie auch bei der T-Zelle bedarf es dafür zwei Signal-Schritte. Das erste Signal betrifft die Bindung des TCR an das MHCII Molekül und das zweite Signal erhält die B-Zelle über die Bindung von CD40 an den CD40L der T-Zelle (Neumann, 2008, 119; Schütt and Bröker, 2011, 69).

In vitro lässt sich eine T-Zell-abhängige Aktivierung mithilfe von anti-CD40 Antikörpern imitieren.

Die somit vollständig aktivierte B-Zelle wandert zurück in die Tiefe des B-Zell-Follikels und bildet mit diesem ein Keimzentrum aus (Keimzentrumsreaktion). In diesem Keimzentrum unterliegt die B-Zelle einer Affinitätsreifung und wechselt dabei die Klasse ihres Isotypen. Nach diesem Klassenwechsel tritt die B-Zelle in die klonale Expansion ein. Weiterhin kommt es zu einer vermehrten Expression von B7 und IL-R4. B7 dient wiederum der T-Zellen als kostimulatorisches Signal, welche IL-4 sezernieren und damit einen Wachstumsfaktor für die B-Zelle bereitstellen. IL-4 ist außerdem für einen Klassenwechsel in Richtung IgE verantwortlich (Neumann, 2008, 119; Schütt and Bröker, 2011, 69).

Nachfolgend entwickelt sich eine Plasmazelle, die ihre Produktion von membranständigen Antikörpern auf lösliche Antikörper (IgE) umgestellt hat. Auch kommt es zur Entstehung von B-Gedächtnis-Zellen, die im Rahmen der Immunreaktion einen Klassenwechsel von IgM hin zu einer anderen Ig-Klasse durchlaufen (Neumann, 2008, 119).

Neben den B-Zellen finden sich einige wenige aktivierte Th2-Zellen, die die Proliferation der B-Zellen aufrechterhalten, und viele FDC. Die FDC tragen zu der bereits angesprochenen Affinitätsreifung von B-Zellen bei (Neumann, 2008, 120).

Nach dieser Reifung hat sich die Rezeptoraffinität der B-Zellen gegenüber seinem jeweiligen Antigen erhöht oder vermindert, was eine erneute Selektion von B-Zellen notwendig werden lässt. Dadurch können mögliche autoreaktive B-Zellen eliminiert werden (Schütt and Bröker, 2011, 69).

Bei den Th2-Zellen, die in die Keimzentren eingewandert sind und dort für die Interaktion mit den B-Zellen bereitstehen, handelt es sich um folliculäre B-Helfer T-Zellen (Tfh-Zellen). Sie exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR5, dessen Ligand in den B-Zell-Follikeln produziert und sezerniert wird (Schütt and Bröker, 2011, 116). Auf diese eigenständige Population aus CD4⁺ Zellen wurde bereits eingegangen.

B-Zellen, die beim Durchlaufen der sekundären lymphatischen Organe nicht ihr passendes Antigen gefunden haben, treten in den Blutkreislauf über und zirkulieren durch den Körper. Die Produktion von Antikörpern kann, wie bereits kurz erwähnt, einerseits T-Zell-abhängig oder andererseits T-Zell-unabhängig sein. Erstere Art der Aktivierung wurde bereits weiter oben beschrieben. Sie kommt durch die CD40-CD40L-Bindung

zu Stande und hat durch einen Antikörperklassenwechsel, eine Affinitätsreifung und im Ergebnis schließlich eine Differenzierung zur Gedächtniszellen zur Folge (Schütt and Bröker, 2011, 64–69).

Für eine Aktivierung von B-Zellen ohne die Hilfe von T-Zellen kommen Antigene mit sich wiederholenden (repetierenden) Epitopen in Frage, wobei es zu einer Kreuzvernetzung der B-Zell-Rezeptoren kommt und damit eine Aktivierung der Zelle ausgelöst wird. In diesem Fall binden die Antigene direkt an das zellgebundene IgM, welches den reifen B-Zellen vor einem stattgefundenen Antigenkontakt als BZR dient (Schütt and Bröker, 2011, 69).

Des Weiteren besitzen B-Zellen einen sogenannten Toll-like-Rezeptor, der zu den Muster-Erkennungs-Rezeptoren (PRR=*Pattern-recognition-Receptor*) gehört. Mit Hilfe dieses Rezeptors können die B-Zellen Pathogene über sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) erkennen und binden. Bei PAMPs handelt es sich um hoch konservierte Strukturen, die beim Menschen nicht vorkommen und somit spezifisch für Pathogene sind (z.B. Lipide, Polysaccharide und Nukleinsäuren) (Neumann, 2008, 29 ff.; Schütt and Bröker, 2011, 22 f.). An dieser Stelle ist anzumerken, dass *in vitro* die Möglichkeit besteht, den Weg der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Aktivierung nachzustellen. Dafür können B-Lymphozyten mit anti-IgM und LPS stimuliert werden, was zum letztlich beschriebenen Weg der Aktivierung führt.

Antikörper, die nach einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen gebildet werden, sind weniger affin und gehören mit wenigen Ausnahmen zur Klasse der IgM Antikörper. Auch kommt es nur selten zur Differenzierung von Gedächtnis B-Zellen (Neumann, 2008, 126 f.). Trotz allem scheint diesem Aktivierungsweg in Bezug auf die Schwangerschaft eine besondere Rolle zuzukommen. Es konnte gezeigt werden, dass MZ B-Zellen bei normal trächtigen Mäusen verglichen mit Mäusen, die eine komplizierte Trächtigkeit aufwiesen, verstärkt T-Zell unabhängig aktiviert werden (Jensen et al., 2013; Muzzio et al., 2014b, 2016).

1.3.1. B-Zell-Einteilung

Wie auch bei den T-Zellen sind innerhalb von B-Zell-Populationen Subpopulationen bekannt, die sich durch unterschiedliche Merkmale, Lebenszyklen und Funktionen auszeichnen. Vor allem in Bezug auf den Ausgang einer Schwangerschaft spielen die

einzelnen Populationen in unterschiedlichem Maße eine Rolle. Die Einteilung erfolgt in B1 und B2 B-Zellen, wobei B2 B-Zellen sich in folliculäre (FO) und Marginalzonen (MZ) B-Zellen unterscheiden lassen (Lebien and Tedder, 2008).

Bei den B2 B-Zellen erfolgt die Entwicklung nach dem oben beschriebenen Weg. In der frühesten Entwicklungsstufe der unreifen B2 B-Zellen bezeichnet man sie als Transitionalzonen T1 B-Zellen ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$). Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die Zellen bereits schwach den IL-21R. Nachfolgend kommt es zur Veränderung des Expressionsprofils (T2 B-Zellen: $\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{high}}$) und zur weiteren Ausreifung zu MZ B-Zellen und FO B-Zellen. Definiert werden die B-Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle (FO B-Zellen: $\text{B220}^+\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD21/35}^{\text{int}}$; MZ B-Zellen: $\text{B220}^+\text{CD23}^{\text{lo}}\text{CD21}^{\text{hi}}$) (Allman and Pillai, 2008).

Jede dieser so entstandenen B-Zell Gruppe übernimmt anschließend eine besondere Aufgabe innerhalb des Immunsystems und ist an unterschiedlichen Bereichen lokalisiert. So leiten die MZ B-Zellen, die im Marginalsinus der Milz platziert sind, eine schnelle, aber nur gering spezifische Abwehr ein. Die im Follikel von Milz und Lymphknoten angesiedelten FO B-Zellen sind hingegen in der Lage durch einen T-Zell abhängigen Mechanismus hoch affine Antikörper (somatische Hypermutation) zu bilden und ermöglichen damit eine starke Abwehr (Allman and Pillai, 2008).

Da dieser Prozess jedoch etwa fünf Tage dauert, wäre in dieser Zeit keine Abwehr für schnell teilungsfähige Pathogene vorhanden und einer Infektion könnte nichts entgegengesetzt werden. Diese Nische wird von den MZ B-Zellen besetzt, indem sie mit ihren natürlichen, niedrig affinen Antikörpern (IgM, IgA) eine schnelle erste Antikörperantwort bereitstellen (Cerutti et al., 2013a).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es während der Schwangerschaft von Mäusen zu einer Unterdrückung der B-Zell Lymphopoese kommt. Jedoch stellt sich gleichzeitig ein vergleichsweise übergroßer Anteil an MZ B-Zellen zu den FO B-Zellen in der Milz ein (Muzzio et al., 2014a). Diese Zunahme an MZ B-Zellen war nicht bei den Mäusen zu beobachten, bei denen es im Verlauf zu einer fetalen Resorption kam. Die MZ B-Zellen stehen unter dem Einfluss von IL-21 und den Tfh-Zellen, was die Bedeutung dieser Tfh/IL-21/MZ B-Zell Interaktion bezüglich des Ausgangs einer Schwangerschaft erahnen lässt, jedoch bislang nicht näher untersucht wurde.

1.4. Zelltod und Zellzyklus innerhalb des Immunsystems

Nachdem die Lymphozyten ausdifferenziert und in ihre Zielorgane gelangt sind, haben sie drei Optionen: sie können in den Zellzyklus eintreten und proliferieren, sie können ruhen oder sterben. In den meisten Fällen treten die Zellen in einen Ruhezustand ein, in dem sie ihre Funktionen erfüllen, sich aber nicht mehr teilen. Durch bestimmte Wachstumsfaktoren kann dieser Zustand hin zur Proliferation überwunden werden. Hierbei durchläuft die Zelle die Phasen des Zellzyklus (G1/S/G2/M), an dessen Ende zwei identische Tochterzellen stehen (Rosamond, 1995).

1.4.1. Programmierter Zelltod

Der programmierte Zelltod stellt einen physiologischen Prozess dar und wird dem traumatischen Zelltod gegenübergestellt. Ersterer kann durch unterschiedliche Ursachen eingeleitet werden und läuft immer nach einer festgeschriebenen Signalkaskade ab. Im ersten Schritt kommt es zur reversiblen Phase, in welcher der Zelltod durch bestimmte zellschützende Maßnahmen noch verhindert werden kann. Diese Maßnahmen führen in der anschließenden irreversiblen Phase schon zu keinem Erfolg mehr. Der dritte Schritt wird als vermeidbare Phase bezeichnet und ist durch eine Entzündungsreaktion gekennzeichnet, die die Todessignale auf die Nachbarzellen ausweitet (Raff, 1998). Je nachdem durch welche Initiatoren die Signalkaskade in Gang gesetzt wird, unterscheidet man Apoptose, Nekroptose, Pyroptose und Netose (Galluzzi et al., 2012).

Vor allem innerhalb des Immunsystems hat der programmierte Zelltod einen großen Stellenwert. Zu nennen ist beispielweise die Eliminierung autoreaktiver Zellen während der Reifung von B- und T-Zellen (positive und negative Selektion), die durch einen programmierten Zelltod erreicht wird. Auch die Bekämpfung von virusinfizierten oder entarteten Zellen gelingt durch die Induktion des Zelltods mittels zytotoxischer CD8⁺ T-Lymphozyten (Schütt and Bröker, 2011, 46 f.).

1.4.1.1. Apoptose

Die Einleitung der Apoptose kann entweder durch intra- oder durch extrazelluläre Stressoren geschehen. Beide Wege münden in der Bildung eines Apoptosoms, in der Aktivierung von Caspasen und anderen proteolytischen Enzymen, die die Zelle in ihre

Bestandteile zerlegen. Das extrazelluläre Signal wird durch das Binden von Botenstoffen an spezifische Todesrezeptoren übermittelt (Elmore, 2007). Als Botenstoffe fungieren z.B. Zytokine wie IL-21. Als teilweise proinflammatorisches Interleukin steuert es z.B. den Eintritt einer Zelle in die Apoptose durch Bindung an den Todesrezeptor. Die Bindung durch IL-21 an den Todesrezeptor aktiviert im Folgenden eine Signalkaskade, wobei das proapoptotische Protein Bim gebildet wird. Bim leitet seinerseits die nächsten Schritte eines Eintritts einer anti-CD40-stimulierten B-Zelle in die Apoptose ein (Jin et al., 2004; Gogada et al., 2013).

Auch durch das Fehlen von Signalen, die der Zelle zur Lebenserhaltung dienen, kann die Apoptose ausgelöst werden (Fadeel and Orrenius, 2005). Genau dieser Mechanismus ist für die vorliegende Arbeit von Bedeutung: durch spezielle Stimulantien (anti-CD40, anti-IgM und LPS) wurden die B-Lymphozyten T-Zell-unabhängig und T-Zell-abhängig aktiviert. Ist die Aktivierung, die über die jeweilige Bindung ausgelöst wird und zur Proliferation der B-Zelle benötigt wird, nicht ausreichend, so treten die Zelle in die Apoptose ein.

Stress auf intrazellulärer Ebene kann beispielsweise durch das vermehrte Auftreten fehlgefalteter Proteine und durch Schäden an der DNA ausgelöst werden (Fadeel and Orrenius, 2005).

1.5. Der Einfluss von Zytokinen und Chemokinen auf die Immunzellen

1.5.1 Zytokine

Zytokine sind kleine (5-20 kDa) Polypeptide, die als lösliche Form von verschiedenen kernhaltigen Zellen sezerniert werden. Diese regulatorischen Proteine dienen der Signalübertragung zwischen den einzelnen Immunzellen und ermöglichen eine Art Kommunikation innerhalb des komplexen Immunsystems (Schütt and Bröker, 2011, 71–74).

Die Zytokine entfalten ihre Wirkung durch Bindung an einen oder mehrere Rezeptoren. Dem Rezeptor ist jeweils eine spezifische Signalkaskade nachgeschaltet, die nach Bindung in Gang gesetzt wird und die für den jeweiligen Effekt eines Zytokins verantwortlich ist (Schütt and Bröker, 2011, 72). Im Falle von IL-21 kann es dabei, je

nachdem an welchen Rezeptor es bindet, zu teilweise gegensätzliche Effekten kommen (pro- oder antiinflammatorische Wirkung) (Jin et al., 2004).

Nicht selten ist es der Fall, dass mehrere Zytokine gleichzeitig einen Einfluss auf Zellen nehmen. Durch dieses Zusammenspiel kann es auf zellulärer Ebene zu verschiedenen Wirkmechanismen kommen (pleiotrop, redundant, synergistisch, antagonistisch) (Schütt and Bröker, 2011, 73 f.).

Zytokine können in verschiedene Gruppen unterteilt werden: Interleukine (IL), koloniestimulierende Faktoren (z.B. G-CSF), Interferone (IFN), Chemokine und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF α). Zytokine lassen sich anhand ihrer Hauptwirkung in zwei Gruppen einteilen: entzündungshemmend oder -fördernd. Eine weitere Einteilung der Zytokine erhält man in Abhängigkeit von den Zellen, die das jeweilige Zytokin produziert (Neumann, 2008, 150–154; Schütt and Bröker, 2011, 72).

Über eine gewisse Rezeptorverfügbarkeit ist es den jeweiligen Zielzellen möglich den Einfluss eines Zytokins auf sich zu regulieren. Wie bereits vorher beschrieben kommt es bei der aktivierten T-Zelle zu einer klonalen Proliferation. Diese Proliferation wird durch das sezernierte IL-2 ermöglicht, welches an den IL-2R der T-Zellen bindet. Der IL-2R kann nun wiederum von den aktivierten T-Zellen vermehrt exprimiert werden, wodurch sichergestellt ist, dass aktivierte T-Zellen sensibler gegenüber IL-2 sind. (Neumann, 2008, 94).

1.5.1.1. Zytokine in der Schwangerschaft

Die Veränderungen innerhalb einer Schwangerschaft umfassen vor allem die Anteilsverhältnisse der verschiedenen Zelltypen des Immunsystems, sowie ihre jeweilige Rezeptorexpression, was nachfolgend auch zu Unterschieden bezüglich ihrer Zytokinproduktion führt. So konnten zum Beispiel niedrigere Serumlevel der B-Zell-Aktivierungsmarker der TNF Familie bei schwangeren Mäusen beobachtet werden (Clark et al., 2002). Zytokine der TNF Familie gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Schwangerschaft hinsichtlich ihres Effekts differenziert betrachtet werden muss. Ein Entzündungsprozess am Beginn und am Ende einer erfolgreichen Schwangerschaft (Implantation und Geburt) ist durchaus sinnvoll und notwendig. Nur so kann beispielsweise die Beschädigung am Uterus, die durch die Blastozysteninvasion

entstanden ist, repariert werden. Sobald es jedoch zu einer Persistenz der Entzündung kommt, weil eine Kontrolle durch antiinflammatorische Zytokine fehlt, kann eine Aufrechterhaltung der Schwangerschaft gestört sein und es kann infolgedessen zu verschiedenen Schwangerschaftskomplikationen kommen. IL-4 und IL-10 sind als anti-entzündliche Zytokine, die diese Kontrolle übernehmen können, bisher am detailliertesten beschrieben (Chatterjee et al., 2014).

Das zentrale Ereignis am Beginn der Schwangerschaft ist die Einnistung des Keims in die Uterusschleimhaut. Nach einer aktuellen Theorie ist für das Gelingen dieses Prozesses die Sekretion eines immunsupprimierenden Faktors (*early pregnancy factor EPF*) notwendig. EPF soll das mütterliche Immunsystem daran hindern den Keim abzustößen. Dabei werden von mütterlicher Seite immunsupprimierende Zytokine sezerniert. Diese sind von den Deziduazellen (umgewandelte Bindegewebszellen des endometrialen Stromas des Uterus´) abgeleitet und haben neben der Immunsuppression auch noch andere Funktionen, die die frühzeitige Etablierung der Schwangerschaft ermöglichen sollen. Dazu zählen u.a. die Regulation der Throphoblasteninvasion und das Remodeling der Spiralarterien (Lash and Ernerudh, 2015). Für das Remodeling ist $IFN\gamma$ von entscheidender Bedeutung (Ashkar et al., 2000; Croy et al., 2003; Robson et al., 2012) und wird von Th1-Zellen produziert. Th1-Zellen sind für die Bereitstellung einer proinflammatorischen Antwort bekannt, womit die Theorie einer am Schwangerschaftsbeginn durchaus sinnvollen Entzündung untermauert werden kann (Wegmann et al., 1993).

Wie bereits weiter vorne erwähnt, geht man bezüglich der Th1:Th2 Dichotomie davon aus, dass Th2-Zellen und die von ihnen produzierten Zytokine während einer Schwangerschaft von erhöhtem relativen Anteil sind und dieses Übergewicht mit dem erfolgreichen Ausgang einer Schwangerschaft assoziiert ist. Das wohl am besten untersuchte Zytokin mit einem großen Einfluss auf einen erfolgreichen Schwangerschaftsausgang ist IL-10 (Chatterjee et al., 2014; Cheng and Sharma, 2015).

Eine Tendenz zugunsten der Th1-Zellen wird im Allgemeinen mit frühen Fehlgeburten, Präeklampsie und einer vorzeitigen Wehentätigkeit in Zusammenhang gebracht (Sykes et al., 2012). Dass diese Hypothese jedoch noch nicht differenziert genug untersucht ist, kann folgendermaßen begründet werden: Einerseits produzieren auch Th1-Zellen während einer Schwangerschaft für diese förderliche Zytokine ($IFN\gamma$) (Ashkar et al., 2000) und andererseits sind im Falle einer stark ausgeprägten Th2 Dominanz

Fehlgeburten beobachtet worden (Chaouat et al., 2003). Es scheint demnach eine für eine erfolgreiche Schwangerschaft adäquate Th1:Th2 Balance mit leichter Dominanz zugunsten der Th2-Zellen notwendig zu sein, die wiederum von anderen Zellen getriggert wird.

Aus diesem Grund wurde die Th1:Th2 Dichotomie zu einem Th1/Th2/Th17/Treg Paradigma weiterentwickelt, was der Komplexität der Wechselwirkungen der beteiligten Komponenten Rechnung tragen soll (Saito et al., 2010). Dennoch scheint das Augenmerk auf Th2-Zellen zu liegen, da mütterliche Hormone wie beispielsweise Progesteron, Östradiol und Prostaglandin D2, die in der Schwangerschaft vermehrt gebildet werden und nicht dem Paradigma zugeordnet sind, die Entstehung eines Ungleichgewichts zugunsten der Th2-Zellen fördern (Xue et al., 2005).

Postuliert wurde weiterhin, dass Zytokine, die an der Schnittfläche von Mutter und Fötus gebildet werden (z.B. IL-15, IL-18, IL-4, IL-10, m-CSF), einen stärkeren Einfluss für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft haben als Zytokine aus der Peripherie, weshalb ein verstärktes Augenmerk auf IL-15 und IL-18 gelegt wurde (Chaouat et al., 2002). Die Komplexität des Zusammenspiels verschiedenster Zellen stellt sich durch die Entdeckung weiterer an einer Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft beteiligter Zellen dar. So sind neben Th17 und Treg auch die Throphoblasten-, Stroma-, Epithelzellen, Makrophagen und NK Zellen an der Zytokinproduktion beteiligt, die für die Entwicklung der fetalen Plazenta und die Entwicklung von Th2-Zellen unabdingbar sind (Vince and Johnson, 2000).

Durch frühere Untersuchungen bezüglich der Entstehung von Fehlgeburten konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von IL-6 und CXCL8/IL-8 und ein Anstieg von TNF α einen negativen Einfluss auf die Vorgänge bei der Einnistung des Embryos haben (Lash and Ernerudh, 2015).

Die dargestellten Erkenntnisse machen deutlich, dass Zellen des Immunsystems und Zytokinen einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf einer Schwangerschaft haben. Längst sind noch nicht alle Zusammenhänge und Abhängigkeiten untersucht und bedürfen weiterer Forschung.

1.5.1.2. IL-21

IL-21 gehört zur Familie der Typ 1 Zytokine mit gemeinsamer gamma-c-Kette (Asao et al., 2001). Dem IL-21R ist der gut untersuchte JAK/STAT Signaltransduktionsweg nachgeschaltet, der nach Bindung von IL-21 an den Rezeptor eine Aktivierung der nachgeschalteten Gene bewirkt (z.B. Bim, Bcl6, IL-10, Maf). Produziert wird IL-21 von aktivierten T-Helfer-Zellen und NK-Zellen, die auch den entsprechenden Rezeptor exprimieren (Foster et al., 2000; Ozaki et al., 2000; Asao et al., 2001).

Die höchste Dichte an IL-21R exprimieren aktivierte B-Zellen. Schon für die Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark ist IL-21 ein wichtiger Helfer bei deren Entwicklung (Simard et al., 2011). In früheren Arbeiten konnte weiterhin gezeigt werden, dass unterschiedliche B-Zell-Subpopulationen den IL-21R in unterschiedlicher Dichte exprimieren, aber jeweils vergleichbar sensibel auf eine IL-21 Stimulation reagieren (Jin and Malek, 2006)

Obwohl IL-21 zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt wird und bisher mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht wurde (Bubier et al., 2009), kann es über seinen Rezeptor zum Teil gegenteilige Effekte auf die Zielzellen ausüben. Im Falle von B-Zellen konnte sogar eine antiinflammatorische Wirkung hinzu Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen beobachtet werden (Spolski and Leonard, 2014). Auch die Antikörperantwort von B-Zellen wird durch IL-21 beeinflusst. An dieser Stelle sei erwähnt, dass IL-21 aber keineswegs für eine B-Zell Entwicklung erforderlich ist, da sich auch in IL-21R defizienten Mäuse B-Zellen entwickeln (Kasaian et al., 2002; Ozaki et al., 2002).

Die Induktion von Th17-Zellen, eine Entwicklungshemmung von Treg-Zellen, sowie weitere regulatorische Funktionen bei der Tfh-Zell-Entwicklung finden unter dem Einfluss von IL-21 statt. In Bezug auf dessen Einfluss auf die Keimzentrumsbildung konnten überlappende Funktionen mit anderen Zytokinen beschrieben werden (IL-6, IL-4) (Fan et al., 2015). Weiterhin zeigte sich, dass IL-21 die IL-10 Produktion von B- und T-Zellen beeinflusst (Bubier et al., 2009; Yoshizaki et al., 2012). IL-10 ist wiederum ein Zytokin, das bereits mit einem erfolgreichen Ausgang einer Schwangerschaft assoziiert wurde (Chatterjee et al., 2014; Cheng and Sharma, 2015).

Jedoch konnte bezüglich eines Polymorphismus im *il21* Gen eine Assoziation zu spontanen Fehlgeburten und Autoimmunkrankheiten (SLE, juvenile idiopathische Arthritis)

hergestellt werden (Messaoudi et al., 2011). Der genaue Mechanismus ist bislang nicht ausreichend untersucht. In Mäusen, die einen defizienten IL-21R exprimierten, zeigte sich eine fehlende Entwicklung der CD8-positiven T-Zellen und eine abweichende Produktion von IgG1 (erniedrigt) und IgE (erhöht) (Ozaki et al., 2002). Die Mäuse waren außerdem anfälliger für Autoimmunkrankheiten (Diabetes mellitus Typ 1) und Myokarditis.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit folgenden Fragestellungen:

Zunächst sollte im Mausmodell geprüft werden, inwieweit IL-21 B-Zellen während der Schwangerschaft beeinflusst. Hierzu sollen Gruppen aus nicht schwangeren Mäusen mit Gruppen aus Mäusen verglichen werden, die sowohl problematische, als auch normale Schwangerschaften aufwiesen.

Insbesondere wird auf den Einfluss von IL-21 auf B-Zellen anhand des Zellzyklus und der Immunglobulin- und Zytokin-Produktion (IL-10) fokussiert.

Nebenher wird der Phänotyp hinsichtlich der IL-21R Expression und anderer Aktivitätsmarker untersucht werden.

Nachfolgend wird versucht, die Tfh-Zellen als IL-21 Produzenten auf die folgende Weise näher zu charakterisieren: Ihre Interaktion mit den B-Zellen soll dem T-Zell-unabhängigen Aktivierungsweg gegenübergestellt werden.

Abschließend wird versucht, eine Analogie der Ergebnisse zum Menschen herzustellen. Hierfür werden die Tfh-Zellen im Blut von schwangeren und nicht schwangeren Patientinnen untersucht.

In der Zusammenschau aller Experimente wird die Bedeutung der Tfh/IL-21/B-Zell Achse für eine Schwangerschaft und für die Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen näher erläutert und diskutiert.

3. Methoden

3.1. Tiermodell

Als Grundlage für die tierexperimentellen Versuche wurden CBA/2J (H2^k) weibliche und DBA/c (H2^d) männliche Mäuse verwendet, die aus den Laboren von Charles River (Sulzfeld, Bayern, Deutschland) und Janvier (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen wurden. Verwendete männliche BALB/c (H2^d) Mäuse wurden in der zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere (ZSFV, Greifswald, Deutschland) gezüchtet. Die in einem Alter von sechs bis acht Wochen gelieferten Tiere, wurden in standardisierten Käfigen zu je fünf Tieren für zwei Wochen akklimatisiert. Ihnen stand Wasser (angesäuert), welches einmal die Woche komplett ausgetauscht wurde, und jederzeit extrodiertes Standard Diätfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) zur Verfügung. Die Einstreu der Käfige wurde zweimal wöchentlich erneuert.

Nachdem die Eingewöhnungszeit eingehalten worden war, wurde je ein Weibchen zu einem Männchen in dessen Käfig hinzugesetzt. Die Anpaarung der Tiere beruhte auf einem Mausmodell, das in zahlreichen Publikationen seit 1998 als geeignet für immuninduzierte Fehlgeburten beschrieben wurde und in unserem Labor erstmalig verwendet wurde (Ahmed et al., 2010; Bonney and Brown, 2014). Bei der Anpaarung von CBA/2J (H2^k) Weibchen mit DBA/c (H2^d) Männchen werden Fehlgeburten erwartet (PPOM=*poor pregnancy outcome mice*), während bei Anpaarungen aus CBA/2J (H2^k) Weibchen mit BALB/c (H2^d) Männchen ein normaler Schwangerschaftsverlauf erwartet wird (GPOM=*good pregnancy outcome mice*). Als Kontrollgruppe wurden nicht schwangere CBA/2J (H2^k) Mäuse verwendet (NPM=*non pregnant mice*).

Allmorgendlich wurden die Mäuse aus den Anpaarungen auf vaginale Plugs untersucht, was bei positivem Befund als Tag 0 der Schwangerschaft festgelegt wurde. Im Falle des Vorhandenseins eines Plugs wurde das Weibchen vom Männchen getrennt und für weitere zwei Wochen in einem Käfig zusammen mit anderen schwangeren Mäusen gehalten. An Tag 14 der Schwangerschaft wurde die Maus durch CO₂-Begasung und zusätzlicher zervikaler Dislokation der Halswirbelsäule getötet und ihre Organe für die spätere Zellisolation entnommen. Genehmigt wurde der Versuch vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherung und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern im Versuchsvorhaben mit der Nummer 7221.3-1-068/13. Die Entnahme der

Organe erfolgte durch Eröffnung des Bauchraumes mit der Schere und stumpfer Präparation der Milz. Der Transport erfolgte in einem auf Eis gelegten und mit Kulturmedium gefüllten Reaktionsgefäß.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Isolation von murinen Splenozyten

Mithilfe einer Kolbenstange einer Insulinspritze wurde die Milz vorsichtig durch ein 40 µm Nylon Zellsieb zermahlen, welches in Vorbereitung mit 3 ml PBS angefeuchtet worden war. Durch das Nachwaschen mit PBS wurden die Zellen aus dem Bindegewebe der Milz und dem Sieb gelöst und in einem 50 ml Probenröhrchen aufgefangen. Es folgte die Zentrifugation bei $300 \times g$ für 5 min. Im Anschluss wurden die Erythrozyten aus der Gewebesuspension mit 1 ml $1\times$ Lysis- Puffer lysiert. Gestoppt wurde die Lyse nach 4-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 3 ml FBS. Nachdem die Zellsuspension ein weiteres Mal durch ein 40 µm Nylon Zellsieb gegeben und im Anschluss zentrifugiert wurde, lagen die isolierten Lymphozyten für eine Zellzählung bereit.

3.2.2. Isolation von PBMCs aus humanem EDTA-Vollblut

Für die Isolation von PBMCs aus EDTA-Vollblut wurde gesunden schwangeren Frauen, die sich in unterschiedlichen Trimestern der Schwangerschaft befanden, Blut entnommen. Die Frauen wiesen dabei keine diagnostizierte immunologische oder infektiöse Krankheit auf und haben schriftlich in die Blutentnahme eingewilligt. Die universitätseigene Ethikkommission hat für dieses Projekt getagt und eine Einwilligung erteilt, die unter der Nummer BB 126/13b hinterlegt ist. Für die Blutentnahme wurden jeweils 5×6 ml EDTA-Röhrchen befüllt und bis zur ersten Zentrifugation auf Eis gekühlt. Die Zentrifugation der fünf Röhrchen verlief für 10 min bei $1300 \times g$ und Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das Blutplasma mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Der übriggebliebene Blutkuchen (etwa 2,5 ml), wurde mit der jeweils doppelten Menge PBS (etwa 5 ml) aufgefüllt. In der Zwischenzeit wurde Lymphoprep (Dichte von 1,077 g/ml) in 50 ml Falcons gegeben (jeweils etwa 12,5 ml). Nun wurde das verdünnte Blut vorsichtig auf das Lymphoprep geschichtet. Das Blut wurde

dabei gleichmäßig auf die Falcons verteilt, sodass auf jede 12,5 ml Lymphoprep nicht weniger als 15 ml und nicht mehr als 25 ml Blut kamen. Im Anschluss wurde das Gemisch aus Blut und Lymphoprep bei $800 \times g$ für 20 min bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Damit wurde eine Phasenauftrennung des Blutes durch den Dichtegradienten, erzeugt mit Hilfe von Lymphoprep, erreicht. Aus dem so entstandenen dreiphasigen Gemisch (untere Phase: Erythrozyten und Granulozyten, obere Phase: Lymphoprepgemisch) wurden die Interphasenringe, die die Leukozyten und damit die Lymphozyten enthalten, vorsichtig abpipettiert. Nachdem der Inhalt des Falcons auf 50 ml mit PBS aufgefüllt worden war, erfolgte eine erneute Zentrifugation bei $300 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min. Abhängig von der Farbintensität schloss sich eine Lyse der Erythrozyten an, die nach 4 min Inkubation auf Eis mit 3 ml FBS abgestoppt wurde. Im Falle der Lyse erfolgte eine erneute Zentrifugation bei $300 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min. Das daraus hervorgegangene Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, auf 30 ml PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieses Waschen wurde zweimal durchgeführt. Für die letzte Resuspension, bevor die CD3 Depletion angeschlossen werden konnte, wurde abermals 1 ml PBS verwendet.

3.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

3.2.4. Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Granularität, Größe und Färbung quantitativ analysiert werden können. Die Fluochrome am Antikörper, die an die jeweiligen Zellen binden, emittieren ein optisches Signal, während sie einzeln, aufgrund des fokussierenden Hüllstroms, einen Lichtstrahl passieren. Auch das Streulicht einzelner Zellen kann ausgewertet werden. So hängt beispielsweise das Vorwärtsstreulicht (FSC= *forward scatter*) vom Volumen der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (SSC= *side scatter*) eine Aussage über die Granularität und die Größe des Zellkerns zulässt.

Ein *Photomultiplier* verstärkt das Emissionslicht und wandelt es in elektrische Signale um, die dann digital in Histogrammen dargestellt werden. Auf diese Weise lassen sich auch sehr kleine Populationen aus komplexen Mischungen aus Zellen quantifizieren und charakterisieren (Sack, 2007).

Zur weiteren und genaueren Analyse ist die Verwendung der sogenannten MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) von Vorteil. Damit kann unter den Zellen, die für einen bestimmten Rezeptor positiv sind, die Dichte dieses Rezeptors ermittelt werden. Je größer die Dichte an Rezeptoren ist, desto höher ist das Fluoreszenzsignal. Der MFI-Wert gibt dann die durchschnittliche Leuchtstärke an, wodurch auf die durchschnittliche Expression des jeweiligen Rezeptors geschlossen werden kann.

3.2.5. Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie-Analyse

3.2.5.1. Extrazelluläre Färbung

Die extrazelluläre Färbung wurde für zwei Experimente verwendet. Für die Färbung der murinen IL-21 Rezeptoren wurden $0,5 \times 10^6$ Lymphozyten zusammen mit 1 ml PBS in ein FACS-Röhrchen gegeben. Zur Färbung der Oberflächenantigene der murinen B-Zellen wurden die CD19⁺ Zellen aus der Zellkultur geerntet. Es befanden sich für diese Färbung $0,25 \times 10^6$ Zellen in den FACS-Röhrchen. Beide Färbeprotokolle liefen, bis auf die verwendeten Antikörper, in gleichen Schritten ab. Parallel wurde jeweils ein ungefärbtes FACS-Röhrchen mitgeführt, was in der späteren Auswertung als Negativkontrolle diente. Für die Differenzierung zwischen lebenden und toten Lymphozyten wurde im ersten Schritt *Fixable Viability Dye eFluor 780* (100 µl einer 1:1000 Vorverdünnung in PBS) verwendet. Durch diesen Vitalitätsfarbstoff werden tote Zellen permanent markiert und können bei der Analyse ausgeschlossen werden. Damit wird eine exaktere Messung und so eine genauere Ergebnisinterpretation gewährleistet (Produktinformation FVD 780; eBioscience). Im Anschluss erfolgte die Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungen an die Fc-Rezeptoren BD mit Fc BlockTM *purified anti-mouse* CD16/CD32 mAb (25 µl einer 1:100 Vorverdünnung in FACS). Die Antikörper (anti-IL-21R, anti-B220, anti-CD23, anti-CD21/CD35, anti-CD1d, anti-CD19, anti-CD69, anti-CD80, anti-CD86, anti-MHC-II) wurden hinzugegeben, sorgfältig gevortext und das Probenröhrchen im Kühlschrank 30 Minuten inkubiert. Nach jedem Schritt wurden die Proben mit 1 ml FACS Puffer gewaschen. Nach dem letztmaligen Waschen wurden die Zellen für den IL-21R in 250 µl FACS Puffer resuspendiert und standen für die Messung bereit.

3.2.5.2. Intrazelluläre Färbung

Im Unterschied zur extrazellulären Färbung wurden ca. 10^6 Zellen murine Splenozyten in ein Probenröhrchen gegeben. Die Verwendung von *Fixable Viability Dye*, sowie die Blockierung der unspezifischen Bindungen erfolgte entsprechend der extrazellulären Färbung. Als Antikörper wurden anti-CXCR5 und anti-CD4 verwendet, nach dessen Auftragen das Probenröhrchen gevortext und ebenfalls 30 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Fixierung mit *BD Fixation und Permeabilization Solution* (50 µl). Nach 20-minütiger Inkubation wurde für die Permeabilisierung *BD Perm/ Wash Puffer* (1 ml) verwendet, bevor der intrazelluläre Antikörper (Bcl-6) aufgetragen wurde. Diese wurden erneut sorgfältig gevortext. Eine Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C folgte. Im Anschluss wurde die Probe ein letztes Mal in 1 ml FACS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 250 µl FACS resuspendiert und die Probe konnte direkt gemessen werden.

3.2.5.3. Durchflusszytometrie Apoptose-Detektion nach Nicoletti

Bei dieser Methode handelt es sich um Färbungen der DNA einer Zelle mit dem Ziel der Feststellung der Verringerung des DNA-Anteils eines Zellkerns. Im Falle von apoptotischen Zellen wird die DNA aus dem Zellkern freigesetzt, weshalb sich der DNA-Gehalt innerhalb des Kerns verringert. Die Abnahme des DNA-Anteils kann durch Färbung detektiert werden und somit auf den Vorgang der Apoptose geschlossen werden. Neben der Apoptose können auch weitere Phasen des Lebenszyklus einer Zelle (Proliferation: G-Phase und Mitose) auf diese Weise untersucht werden.

Für die Färbung zur Apoptose-Detektion wurden die murinen CD19⁺ Zellen nach 24 h geerntet und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei $300 \times g$ und 4 °C wurde der Überstand in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut vorsichtig entfernt worden war, resuspendierte man das Zellpellet in 150 µl Propidiumiodid (PI-Stocklösung 1:40 verdünnt in hypotonem Lysepuffer mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml). Die anschließende Analyse im FACS- Gerät erfolgte innerhalb von 15 min.

3.2.5.4. Durchflusszytometrie Färbung der humanen Proben

Für die Färbung der T-Zellen aus den humanen Proben wurden zuerst CD3⁺ Zellen magnetisch angereichert. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen für das Proben- und das Kontrollröhrchen verwendet. Es wurde analog dem Protokoll der extrazellulären Färbung der Mausproben verfahren. Als Antikörper wurden anti-CD4, anti-CXCR5, anti-PD-1 und anti-ICOS verwendet.

3.2.6. Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS)

Bei der magnetischen Zellseparation werden Zellen an magnetische Partikel (*MicroBeads*) gebunden. Die Bindung erfolgt dabei über verschiedene Antikörper, mit denen die *MicroBeads* gekoppelt sind. Damit wird eine Sortierung einer Zellsuspension anhand der Oberflächenmerkmale von Zellen ermöglicht. Durchläuft eine so behandelte Suspension daraufhin eine von einem starken Magnetfeld umgebene Säule, so verbleiben die magnetisch gebundenen Zellen in der Säule. Zellen, die nach Durchlaufen der Säule in selbiger verbleiben, bezeichnet man als positive Selektion, während die aufgefangenen Zellen als negative Selektion bezeichnet werden.

3.2.6.1. CD19⁺ Isolation aus murinen Splenozyten

Nachfolgend werde eine positive Selektion von CD19⁺ Zellen aus Splenozyten betrachtet. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und auf Eis durchgeführt. Von den aus der Milz isolierten Zellen wurden 20×10^6 Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig aspiriert und in MACS Puffer (180 μ l) resuspendiert. 20 μ l der CD19 *MicroBeads* wurden zugegeben, gut vermischt und für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Während des Waschens mit 2 ml MACS Puffer und erneuter Zentrifugation, wurde eine MS Säule im MACS Separator positioniert und mit 500 μ l Puffer äquilibriert. Die in 500 μ l Puffer resuspendierten Zellen wurden auf die Säule gegeben und mit $3 \times 500 \mu$ l MACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule zügig aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein neues 15 ml Tube platziert. Mit Hilfe eines Stempels und 1 ml MACS Puffer wurden die markierten CD19⁺ Zellen aus der Säule gepresst und in einem Tube aufgefangen. Die Zellen waren damit für weiteren Zellkulturexperimente aufbereitet.

3.2.6.2. Positive CD3⁺ Selektion aus humanen peripheren Blutzellen

Auch bei der CD3⁺-Isolation aus den humanen isolierten PBMCs handelt es sich um eine positive Selektion, die ebenfalls unter sterilen Bedingungen und stets auf Eis durchgeführt wurde. Die Anleitung des Herstellers Stemcell™ Technologies wurde bei der Durchführung befolgt (*EasySep™ Human CD3 positive Selection Kit II, Data sheet*). Die Selektion erfolgte dabei mit dem *EasySep™* Magneten, der ein homogenes magnetisches Feld in seinem Inneren generiert und ohne den Einsatz von Säulen zum Separieren von Zellen auskommt (*Datasheet EasySep™ Magnet, Stemcell™ Technologies*).

15 × 10⁶ Zellen wurden in ein 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 300 × g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet blasenfrei in 150 µl MACS Puffer resuspendiert. Nach Hinzugabe von 15 µl des *Human CD3 positiven Selection Cocktail* erfolgte eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Während der letzten 30 s der Inkubation wurden die *Beads (Dextran Rapid Spheres™ 50100)* bereits vorbereitet, indem sie sorgfältig gevortext wurden. Anschließend wurden 9 µl *Dextran Rapid Spheres™ 50100* zur Probe hinzupipettiert und das Tube leicht geschwenkt. Nach weiteren 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 2,326 ml MACS Puffer aufgefüllt und für 3 min in den *EasySep™* Magneten gestellt. Während dieser Zeit kommt es zur Bindung der CD3 positiven Zellen an die *Beads*. Wenn die durch eine kontinuierliche Bewegung ungebundene Phase nach 3 min abgegossen wird, verbleiben CD3⁺ Zellen im ersten Röhrchen und können in 1 ml PBS resuspendiert, zentrifugiert (5 min bei 300 × g bei 4 °C) und erneut in 1 ml PBS resuspendiert werden. Nach einer Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen einer FACS-Färbung unterzogen.

3.2.7. Kultivierung und Konservierung der Zellen

3.2.7.1. CD19⁺: Apoptose und Proliferation

Um den Einfluss von IL-21 auf B-Zellen und deren Sensibilität gegenüber dem Zytokin zu untersuchen, wurden 0,25 × 10⁶ der vorher selektierten CD19⁺ Zellen in einer 48-Well Platte kultiviert. Eine Isolierung dient dem Ausschluss einer möglichen Interaktion mit anderen Zellen. Als Medium wurde RPMI 1640 komplett (mit 10% FBS und 1%

PenStrep) verwendet, das pro Mausprobe auf 12 Wells verteilt gegeben wurde. Im Folgenden wurden LPS (10 µg/ml), anti-IgM (1 µg/ml) und anti-CD40 (1 µg/ml) als jeweils aktivierende Stimulantien hinzugegeben, wobei alle Stimulantien zusätzlich mit IL-21 (30 ng/ml) kombiniert wurden. Keine Zugabe von IL-21 diente jeweils als Kontrollgruppe für die drei verschiedenen Stimulantien. Sowohl LPS, als auch anti-IgM sollten in diesem Experiment eine T-Zell-unabhängige Aktivierung der B-Zellen initiieren. Anti-IgM bindet somit direkt an den BZR (membranverankertes IgM) und aktiviert die B-Zelle. Für eine T-Zell-abhängige Aktivierung wurde anti-CD40 verwendet, welches die Funktion eines CD40L der T-Zellen erfüllen sollte. Für jede Behandlung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid. Dieser Ansatz wurde sowohl für die Experimente der Apoptose und des weiteren Lebenszykluses nach Nicoletti, als auch für eine Färbung der Oberflächenmoleküle der B-Zellen genutzt.

Für eine Zellproliferation und den Zelltod wurde vor Zugabe der Stimulantien und des Mediums eine CSFE-Färbung der Zellen durchgeführt. Diese Markierung von Zellen dient dazu in der Durchflusszytometrie mehrere Generationen mithilfe von Farbstoffverdünnung zurückverfolgen zu können. Aufgrund seiner Lipophilie durchdringt der CSFE-Farbstoff die Plasmamembran und wird dort durch zelleigene Esterasen gespalten. Durch die Spaltung entsteht bei einer aktivierten Form des Farbstoffs eine Fluoreszenz, die sich durch eine kovalente Bindung an die Innenzelle anlagert. Dadurch erreicht die Färbung eine enorme Stabilität und ist auch noch mehrere Tage in einem Zellkulturumfeld als Signal nachweisbar.

Bei jeder Zellteilung kommt es zur Halbierung der Farbstoffmenge und dessen Weitergabe an entstandene Tochterzellen. Somit lässt sich die Proliferation von Zellen bis etwa zur siebten Generation durch Messungen zurückverfolgen. Für besagte Färbung wurden 4×10^6 CD19⁺ in 2 ml PBS (+ 5 % FBS) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 110 µl CSFE (1/50 Verdünnung einer 10 mM Stock Lösung CSFE in PBS) langsam zur Zellsuspension pipettiert, während diese in horizontaler Lage gehalten wurde, wodurch eine Vermischung beider Flüssigkeiten verhindert wurde. Nachdem die gesamte Menge des CSFE hinzugegeben wurde, drehte man das 15 ml Tube auf den Kopf und tippte gegen dessen Außenwand, sodass sich die Flüssigkeiten in wenigen Augenblicken vermischten. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und ein zweifacher Waschschriff mit RPMI 1640 Medium. Die so mit CSFE gefärbten Zellen wurden nach dem bereits oben beschriebenen Ansatz auf einer 48-Well

Platte ausgesät und für 48 h bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen aus den Wells entnommen und in Rundbodenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 × g bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte das Verwerfen des Überstandes und die Färbung von jeweils $0,2 \times 10^6$ Zellen mit *Fixable Viability Dye eFluor 780* (100 µl), indem die Zellen in diesem vorverdünnten Farbstoff (1:1000 in PBS) resuspendiert wurden. Nach einer Inkubation von 30 min im Kühlschrank bei 4 °C wurde die Färbungsreaktion durch die Hinzugabe von 1ml FACS abgestoppt. Die Probe wurde erneut für 5 min bei 300 × g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 150 µl FACS Puffer resuspendiert. Danach konnte die Probe direkt im Durchflusszytometer gemessen werden.

3.2.8. Histologische Techniken – Immunhistochemie und Immunzytochemie

Eine weitere Methode zum Nachweis von spezifischen Zellstrukturen ist die Immunfluoreszenz. Sie zählt zum Bereich der Immunhistochemie und beruht auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörperbindung. Die Antikörper werden hierbei mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und ermöglichen es so deren Zielstrukturen nachzuweisen. Dieses Verfahren wird als direkte Immunfluoreszenz (DIF) bezeichnet. Die Antikörper werden zum Beispiel zusammen mit einem biotinylierten Sekundärantikörper auf das Gewebe gegeben. Diese zumeist eingesetzte Färbemethode wird als *Labelled Streptavidin-Biotin-Methode* (LSAB) bezeichnet und beruht auf der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin. Der Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex ist nun in der Lage das Chromogen zum Leuchten zu bringen, wobei eine Farbreaktion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Weiterhin ist es möglich mehrere unterschiedliche Antigene in einem Präparat durch verschiedene Farben gleichzeitig darzustellen. Dafür werden Antikörper mit unterschiedlicher Epitopspezifität und verschiedenen Fluorochromen unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet.

3.2.8.1. Einbettung

Für eine histologische Untersuchung an den Mäusen wurden deren Milz und der Thymus verwendet. Die Organe wurden entnommen und an der horizontalen Fläche im *Tissue-Tek* Medium eingebettet. Anschließend wurde das so vorbereitete Material im flüssigen Stickstoff fixiert und bis zum Schneiden der Schnitte bei -80 °C gelagert.

3.2.8.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden aus dem gefrorenen Gewebestück 4µm dicke Schnitte angefertigt. Der Objektträger, auf den die Schnitte gezogen wurden, wurde vorher gekühlt. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mit eiskaltem Aceton für 15 min fixiert und erneut 30 min an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden die fixierten Schnitte in Alufolie gewickelt und bei -20 °C gelagert.

3.2.8.3. Färben

Für Färbungen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Um eine Sicherstellung des Verbleibs von später aufgetragenen Antikörper-Lösungen auf den Objektträger zu gewährleisten, wurde mit Hilfe eines Dako Pen ein Kreis um den jeweiligen Gewebeschnitt gezogen. Mit 70 µl PBS (PBS enthält 3 % BSA=bovines Serumalbumin) wurde eine Blockierung für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Da BSA im Überschuss vorhanden ist und mit den Nachweisantikörpern um eine unspezifische Bindung konkurriert, wird eine unspezifische und unerwünschte Bindung seitens der Nachweisantikörper praktisch verhindert. Im Anschluss daran erfolgte ein dreimal wiederholter Waschvorgang mit je 100 µl PBS/FBS. Dazu wurde der Objektträger in einer schrägen Position gehalten und die Lösung so pipettiert, dass der Schnitt von oben nach unten gespült wurde. Es folgte das Färben mit dem Antikörpercocktail und PNA (Verdünnung 1:100). PNA lag dabei in der biotinylierten Form vor, um das Optimum seiner Färbereigenschaften zu ermöglichen. Gekoppelt war der PNA + Biotin-Komplex an Alexa Fluor 555.

	Fluorochrom	Verdünnung
PD-1	Alexa Fluor 647	1:200
IgD	Alexa Fluor 594	1:300
CD4	FITC	1:100
PNA + Biotin	Alexa Fluor 555	1:100
Streptavidin	Alexa Fluor 350	1:500

Tabelle 2: Substanzen und ihre Fluorochrome für die Immunhistochemie (Quelle: Eigene Darstellung)

Das Endvolumen der Antikörper und PNA betrug 70 µl und wurde auf den Gewebeschnitt pipettiert. Ein zweiter Gewebeschnitt, der als Kontrolle dient, wurde mit 70 µl

PBS/FBS behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Nachdem die Probe erneut gewaschen wurde, wurde 70 µl des Proteins Streptavidin auf die Proben gegeben. Streptavidin war mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 350 gekoppelt und ging im Folgenden eine starke Bindung mit Biotin ein. Auch die Verwendung von Streptavidin diente im Folgenden einer verbesserten Signalstärke und erhöhte damit die Empfindlichkeit der Färbung. Nach einer erneuten lichtgeschützten Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Schnitte in Fluormount G fixiert, mit einem Deckgläschen versehen und waren für die Mikroskopie bereit.

3.2.8.4. Mikroskopieren

Unter dem Mikroskop wurde eine visuelle Analyse anhand der Lokalisation und Farbtintensität der verwendeten Antikörper vorgenommen. Die erkennbaren Lymphfollikel wurden nach Verteilung und Anzahl an T- und B-Lymphozyten untersucht. Hierbei sollte die Qualität im Vordergrund stehen. Die Quantität wurde durch die Farbtintensität analysiert.

Eine Lagerung der Objektträger kann in staubfreier Umgebung bei Raumtemperatur stattfinden.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1. ELISA IL-10

Beim ELISA handelt es sich um ein sehr sensitives Nachweisverfahren für lösliche Faktoren. Das zum Beispiel zu untersuchene Zytokin wird zwischen zwei Primärantikörpern gebunden und dadurch detektiert. Die Vorgehensweise gab dem Verfahren auch den Namen "Sandwich"-ELISA. Der Versuch wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde der erste Antikörper (*Capture Antibody: Mouse IL-10*) in einer Konzentration von 1:120 in PBS gelöst und damit eine 96-Well Platte mit jeweils 100 µl beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. An den aufgetragenen Antikörper heftet sich später das zu messende Antigen.

Nach der Inkubation wurde die Platte automatisch im Mikroplatten Waschgerät dreimal mit je 400 µl Wasch Puffer gewaschen. Im letzten Schritt wurde die Flüssigkeit aspiriert und mögliche andere unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl *Reagent Diluent* blockiert. Die anschließende Inkubation fand ebenfalls bei Raumtemperatur für 1 Stunde statt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden geometrisch verdünnte Standardreihe zu je 100 µl von Proben in die Wells gegeben.

Als Proben wurden Zellüberstände verwendet. Diese waren zuvor aus den CD19⁺ Zellkulturen (Stimulationsdauer 24 h und 48 h) gewonnen worden und bei -80 °C gelagert. Die Inkubation der Proben und die in dieser Zeit stattfindende Bindungsreaktion zwischen Antikörper und Antigen lief zwei Stunden und wurden mit dem Waschen beendet. Ungebundene Bestandteile wurden somit entfernt.

Im Folgenden wurden 100 µl des Detektionsantikörpers (*Detection Antibody*), der mit einer Konzentration von 1:60 in *Reagent Diluent* gelöst war, in jedes Well pipettiert. In der anschließenden Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur geht auch dieser Antikörper eine Bindung mit dem Antigen ein. Um diese spezifische Bindung im Folgenden auch nachweisen zu können, bedarf es eines Enzyms, das in der Lage ist, ein Substrat in ein farbiges Reaktionsprodukt umzusetzen. Weiterhin muss es an den Detektionsantikörper, genauer gesagt, an das Biotin des Detektionsantikörpers, binden können. In diesem Fall wurde das an HRP gebundene Streptavidin (S-HRP=Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase) verwendet, das nach erneutem Waschen auf die Platten (100 µl) gegeben wurde. Eine Inkubation wurde hierfür für 20 min lichtgeschützt und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die folgende Zugabe des Substrats A+B (1:1 Gemisch aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin) wurde die Platte durch erneutes Waschen vorbereitet und mit 100 µl Substrat versehen. Bis zum Einsetzen einer blauen Farbreaktion, die etwa 10 min andauerte, verblieb das Substrat auf der Platte. Hierbei geht das farblose Tetramethylbenzidin (TMB) mit dem S-HRP eine enzymatische Reaktion ein, wobei das TMB oxidiert und eine blaue Färbung verursacht.

Gestoppt wird diese Reaktion mit 50 µl Schwefelsäure (2 N H₂SO₄) pro Well, wobei ein gelblicher, stabiler Farbkomplex entsteht, dessen Farbintensität direkt proportional zur gebundenen Antigenmenge ist. Im Mikroplattenfluorometer erfolgte die Absorptionsmessung in einem Wellenlängenbereich von 450 nm. Als Referenzwellenlänge der Negativproben diente der Bereich von 550 nm oder 560 nm.

3.3.2. Immunoassay

Auch einem Immunoassay, der Detektion bestimmter Zytokine oder Immunglobuline, liegt das Grundprinzip des Nachweises mittels Bindungsreaktionen zugrunde. Wie beim ELISA handelt es sich dabei um ein sogenanntes "Sandwich"-Verfahren, wobei das zu messende Analyt zwischen zwei Antikörpern gebunden wird. Im Gegensatz zum ELISA werden die ersten Antikörper (25 µl *Capture Antikörper*) an magnetische *Beads* geschichtet, die nach 30 s auf dem Vortexer, auf jedes Well einer 96-Well Platte gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Diese *Beads* können mit verschiedenen Antikörpern beschichtet werden, so dass mehrere verschiedene Zielstrukturen gleichzeitig detektiert und quantifiziert werden können.

Nachdem die Platten gewaschen wurden (100 µl Wasch Puffer), werden je 50 µl Probe (25 µl Probe in 25 µl *Universal Assay Buffer*) oder 50 µl Standard in jedes Well gegeben. Als Proben wurden die Überstände der für 24 h stimulierten B-Zellen genommen, um die Charakterisierung ihrer Immunglobulin-Profile vorzunehmen. Im Anschluss folgte das Vermischen auf einem Invertierer bei 500 rpm für 1 h. Nach erneutem dreimaligen Waschen werden 25 µl des Detektionsantikörper-Mix (*Detection Antibody Diluent + Detection Antibody*) zugegeben, der mit dem an den ersten Antikörpern gebundenen Analyten bei Inkubation (30 min, 500 rpm, Raumtemperatur) das sogenannte "Sandwich" bildet. Die Detektionsantikörper sind biotinyliert und können nach erneutem Waschen im nächsten Schritt durch einen biotin-affinen Fluoreszenzfarbstoff (60 µl) markiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur ist die Platte für die Messung (*Bio- Plex reader*, Bio- Rad) vorbereitet.

Zur Auswertung der Daten wurden die Werte, die außerhalb der Spannweite lagen, mit Hilfe einer Formel berechnet (LOD/Wurzel2).

Immunglobulin	LOD- Wert
IgG1	0,04
IgG2a	0,03
IgG2b	0,03
IgG3	0,14
IgA	0,06
IgE	0,04
IgM	0,16

Tabelle 3: Immunglobuline und LOD-Wert (Quelle: Eigene Darstellung)

3.3.3. Das Prinzip der Reversen Transkription quantitative PCR (RT-qPCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode, bei der die zu untersuchenden Genabschnitte amplifiziert werden und somit kleinste Mengen an DNA nachgewiesen werden können. Eine exponentielle Amplifizierung kommt zustande, indem in mehreren aufeinanderfolgenden gleichartigen Zyklen gewonnene Produkte wieder als Ausgangsstoff verwendet werden (Kettenreaktion). Bei der RT-qPCR handelt es sich um ein spezielles PCR-Verfahren. Hierbei wird ein inaktiver Fluoreszenzfarbstoff einer PCR zugegeben, dessen Fluoreszenzintensität proportional zu der Menge des entstandenen PCR-Produkts ist und gleichzeitig während der Vervielfältigungszyklen gemessen wird. Somit ist ebenfalls eine quantitative Aussage über die vorliegende Menge an DNA in „Echtzeit“ (*real time=RT*) möglich.

Für unsere Versuche wurde *Power SYBR Green* als Fluoreszenzmittel verwendet, das sich in eine kleine Furche einer Doppelstrang-DNA lagert und nun aktiviert ist. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff zudem aber auch an unspezifische DNA-Produkte anlagert, ist eine Kontrolle der spezifischen Schmelzkurve notwendig. Zur Erzeugung der Schmelzkurve erhöht der Cycler die Temperatur kontinuierlich. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz gemessen. Wird die Schmelztemperatur des hergestellten PCR-Produkts überschritten, wird *Power SYBR Green* freigesetzt und das Fluoreszenzsignal fällt ab. Eine Erweiterung zur ursprünglichen PCR stellt der Schritt der reversen Transkription dar, der der eigentlichen PCR vorgeschaltet wird. Bei diesem Schritt wird die RNA mit Hilfe eines Enzyms (reverse Transkriptase) in cDNA übersetzt. Das sogenannte cDNA-Template stellt im Folgenden das Material für die qPCR dar. Dadurch wurde es ermöglicht, durch Umschreibung von mRNA in cDNA, erstere zu quantifizieren.

Für eine relative Quantifizierung wird ein endogenes Referenzgen (*housekeeping gene*) verwendet, welches in seiner Expression unter den hier verwendeten Bedingungen stabil ist und somit Schwankungen der eingesetzten DNA-Menge ausgleichen kann. In diesem Fall wurde beta-actin verwendet, welches in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war. Des Weiteren wurde der „*cycle threshold*“ (C_t -Wert, dt. Schwellenwert-Zyklus) ermittelt, der den Zeitpunkt angibt, an dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Aus der Differenz (ΔC_t), die sich aus dem C_t -Wert von beta-actin und dem C_t -Wert von IL-10 ergibt, lässt sich letztendlich die relative Menge an DNA errechnen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, Livak & Schmittgen, 2001)

3.3.3.1. Isolierung der RNA

Für die Untersuchung der Level an IL-10 mRNA wurden die Überstände aus den 48 h Zellkulturen der zuvor CD19⁺ isolierten Lymphozyten genommen. Diese sogenannte mRNA ist dabei als eine Kopie des auf der DNA vorliegenden Gens von IL-10 anzusehen. Methodisch wurde, entsprechend den vorherigen Arbeiten, vorgegangen (Doster et al., 2016; Helene Packhäuser et al., 2017).

Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe von TriFast. Nachdem die Zellüberstände abpipettiert worden waren, wurden 250 µl TriFast pro Well auf den Zellrasen gegeben, das für fünf Minuten einwirkte. Das im TriFast enthaltene Guanidinisothiocyanat und Phenol bewirken unter anderem durch eine pH-Wert Absenkung eine Denaturierung der Proteine und führt zu einer Lyse der Zellwände. Im Anschluss an eine gründliche Resuspendierung wurde das Gemisch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

Das Material wurde zur weiteren Verarbeitung später bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 50 µl Chloroform pro Reaktionsgefäß versetzt. Im Vortex-Mixer wurde das Zellmaterial mit dem Chloroform gründlich suspendiert, wodurch eine Phasenbildung ermöglicht wird. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 12000 × g. Das Ergebnis dieser Bearbeitung ist eine aus drei Phasen bestehende Probe, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase zu finden ist, die vorsichtig mit der Pipette (100 µl) abpipettiert und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Unter Zugabe von 125 µl Isopropanol und nach einem vorsichtigen Mischen, indem man die Probe mehrfach über Kopf schwenkte, erfolgte eine weitere Inkubationszeit für 10 min bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 12000 × g, womit die Ausfällung der RNA bewirkt wird. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 250 µl Ethanol gewaschen.

Nach nochmaliger Zentrifugation bei 8000 × g für 5 min wurde der Überstand erneut verworfen, das Zellpellet getrocknet und in 7 µl dd H₂O gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde eine 10-minütige Inkubation bei 60 °C im Thermomixer durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und bis zur Weiterverarbeitung wieder bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA in den Proben wurde mit jeweils 1 µl Probenvolumen im NanoPhotometer Pearl durchgeführt.

3.3.3.2. Reverse Transkription

In diesem Schritt wird mit Hilfe der reversen Transkriptase aus der RNA-Matrize ein cDNA-Strang synthetisiert. Neben der reversen Transkriptase kommen eine Reihe weiterer Reagenzien zum Einsatz, die in einem Master-Mix zusammengefügt und zu je 16 µl in PCR-Tubes vorgelegt werden: ein geeigneter Puffer für die Reaktion (RT Puffer), Startermoleküle (*Random Primer*), desoxy- Ribonukleosidtriphosphate (dNTP) und einen RNase-Inhibitor zum Schutz der RNA vor Ribonukleasen.

Reagenzien	Menge in µl pro Reaktion
10 × RT Puffer	2
25 × d NTP's	0,8
Random Primers	2
RNase Inhibitor	1
Multi Scribe 50 U/µl	1
dd H ₂ O	9,2

Tabelle 4: Master-Mix für Reverse Transkription (Quelle: Eigene Darstellung)

Zu den 16 µl Master-Mix wurden 4 µl der RNA gegeben. Im Thermocycler lief anschließend die Reaktion nach festgelegtem Programm ab. Zu Beginn erfolgt eine Inkubation für zehn Minuten bei 25 °C, während der sich der Primer an das 3' Ende der RNA-Stränge anlagert. Die Anlagerung erfolgt dabei zufällig und dient als Startpunkt für die reverse Transkriptase, die im Folgenden als RNA-abhängige DNA-Polymerase die dNTP's an den RNA-Strang anlagert und somit einen RNA-DNA-Hybridstrang bildet. Der RNA-Anteil dieses Stranges wird durch die RNase-Domäne der Polymerase verdaut, die weiterhin durch ihre Funktion als DNA-abhängige DNA-Polymerase in der Lage ist einen komplementären DNA-Strang zu generieren (120 min bei 37 °C). Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 85 °C werden die Doppelstränge in DNA-Einzelstränge getrennt und verbleiben so bis zum Ende der Reaktion bei 4 °C. Im letzten Schritt wird zu jeder Probe 70 µl dd H₂O gegeben. Zur Aufbewahrung werden die so bearbeiteten Proben bei -20 °C gelagert.

3.3.3.3. Primer

Für den speziell ausgewählten Primer ist der IL-10 kodierende Gen *IL10*-Abschnitt das Zielgen. *Actb* (beta-actin kodierendes Gen) fungierte als Kontrollgen (*housekeeping gene*), das die Eigenschaft besitzt unabhängig vom Zelltyp und äußeren Einflüssen exprimiert zu werden. Auf die Werte von *Actb* konnte *IL10* normiert und somit analysiert werden.

Actb forward:

3' TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC 5'

Actb reverserückwärts:

3' TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC 5'

IL10 forward:

3' GAAGACCCTCAGGATGCGG 5'

IL10 reverse

3' CCTGCTCCACTGCCTTGC 5'

Die Primer wurden von der Firma *Thermo Fisher Scientific* (UK) geliefert.

3.3.3.4. Quantitative PCR

Für jedes Primer-Paar, das durch Verdünnen (1,2 µl Primer + 47,6 µl dd H₂O) auf eine Endkonzentration von 6 µM eingestellt wurde, wurde wie folgt ein Master-Mix hergestellt:

Reagenzien	µl pro Reaktion
Power SYBR Green	5
dd H ₂ O	1
Primer	1 (je 0,5 µl des forward und reverse)

Tabelle 5: Master-Mix für Primer (Quelle: Eigene Darstellung)

Jeweils 7 µl Master-Mix wurden pro Well einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Jede cDNA Probe wurde in 40 µl dd H₂O resuspendiert und darin gelöst. Von der gelösten cDNA wurden 3 µl in jedes Well gegeben und sorgfältig gemischt. Um eine Kontamination auszuschließen, wurden zusätzlich 6 Wells mit Master-Mix inkubiert und anstelle der Primer 3 µl dd H₂O hinzugegeben (NTC). Im Anschluss wurde die Platte mit einer speziellen optischen Folie verschlossen um eine Verdunstung während der rt

PCR zu verhindern. Damit sich das Material vollständig in einem Reaktionsansatz sammeln kann, wurde die Platte mit einer Folie bedeckt und kurz bis 300 × g zentrifugiert.

Mit einem Thermocycler (7300 Real-time PCR System) wurde die PCR initiiert. Das Programm umfasst eine zweiminütige Vorinkubation bei 50 °C des Ansatzes mit einer anschließenden Denaturierungsphase für 10 min bei 95 °C, in der sich die DNA-Stränge trennen und die DNA-Polymerase aktiviert wird. Nach anschließendem kurzzeitigen Erhitzen (15 s) auf 95 °C wird auf 60 °C für eine Minute abgekühlt. In dieser Zeitspanne lagern sich die Primer an die Matrize (*Annealing*) und die DNA-Polymerase beginnt mit der Synthetisierung des komplementären Stranges (*Elongation*). Am Ende der *Elongation*-Phase, die das Ende eines Zykluses darstellt, folgen 39 Wiederholungen des soeben beschriebenen Programms und es wurde der jeweils zugehörige C_T-Wert gemessen.

3.4. Statistische Auswertung

Die Messdaten aus der Behandlung mit IL-21 wurden als normalisierte Prozente angegeben. Eine Normalisierung erfolgte dabei bezüglich des Mittelwerts der entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppen. Die statistische Auswertung hinsichtlich der Mittelwertdifferenz aus Behandlungs- und Kontrollgruppe erfolgte mittels *Student's t-Test*. Zur Prüfung der hierfür notwendigen Voraussetzung von normal verteilten Messwerten wurde unter Berücksichtigung der Einhaltung eines vorgegebenen Signifikanzniveaus bei multiplen Testen der D'Agostino und Pearson Omnibus Normalitätstest verwendet. Mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunnett's Post-hoc-Test ist die Auswertung der MFI Messdaten der IL-21R Expression und Tfh Zellanzahlen in Mäusen durchgeführt worden. Die Messdaten aus dem humanen Experiment wurden einer ANOVA unterzogen. Auch in diesem Fall folgte als weitere Auswertung der Dunnett's Post-hoc-Test, um signifikante Parameterunterschiede hinsichtlich der verschiedenen Behandlungsgruppen auch den betreffenden Gruppen zuordnen zu können. Signifikanzen bezüglich ausgewählter Parameter hinsichtlich einzelner Gruppen sind durch Sternchen gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4. Materialien

4.1. Geräte

Geräte	Gerätetyp	Firma
Analysewaage	MC1 Analytic, C 210P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	VX-150	Systeme GmbH, Linden, Deutschland
Automatischer Flo- ckeneisbereiter	RF0399A	Manitowoc, Bergneustadt, Deutschland
CO2 Inkubator	MCO-18 AIC (UV)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Kryotom	CM 3050 S 1-1-1	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Durchflusszytome- ter	BD FACSCanto™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
EasySep™ Magnet	18000	Stemcell™ Technologies, Köln, Deutschland
Elektrophorese- Netzgerät	PowerPac Basic	bio-rad, Hercules, USA
Fluoreszenz-Mikro- titerplatten-Leser	FLUOstar Optima	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Handdispenser	Multipipette®plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubationsbad	Inkubations- /Inaktivie- rungsbad 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlsystem 4 °C	SN-ST 26186MDF- U333MDF-U53V	Liebherr-International Deutschland GmbH, Bi- berach an der Riß, Deutschland
-20 °C		Sanyo, Moriguchi, Japan
-80 °C		Sanyo, Moriguchi, Japan Air Liquide, Düssel- dorf, Deutschland
Magnet- Separator	Octo MACS 130-042-108	Miltenyi Biotec
Mehrkanalpipette 10- 100 µl	Research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroplatten Waschgerät	Asys Atlantis	Biochrom Asys, Salzburg, Österreich
Mikroskop	Nikon TMS (Lichtmikro- skop) BZ-9000, BIOREVO (Fluo- reszenz-Mikroskop)	Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland, KEYENCE DEUTSCHLAND GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
PCR	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carls- bad, USA

Personal Computer	EliteDesk 800 GI USDT	HP Inc, Palo Alto, USA
Pipetten	Research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl		
10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl		BRAND GMBH und CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe	accu-jet®pro	BRAND GMBH und CO KG, Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator	Polymax 1040 KS-15 CONTROL	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Sicherheitswerk- bank	HERASafe KS9 S@FEFLOW1.2	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA Bio air Instruments srl, Siziano, Italien
Stoppuhr	SKT338N	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NanoPhotometer PEARL	NanoPhotometer™ Pearl 61010-1	IMPLEN, München, Deutschland
Thermocycler	PeqSTAR 96X Universal Gradient	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischabzug	Scala Typ 1200	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Vakuumpumpe	MP86	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortex- Reagenz- glasmischer	Vortex Mixer, neoLab 7- 2020 Analog Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, Deutschland VWR Inter- national GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage	Analytical AC 210P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Typ 1003, Nr. 11513309K	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwe- del, Deutschland
Wärmeplatte	Modell H1 1220, 042321474	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	LO - Laboroptik, Lancing, England
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R Centri- fuge 5415 R Rotilabo®- Mini-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.2. Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel

Produkt	Artikelnummer	Artikelbezeichnung	Hersteller
Alufolie		0,3 m x 150 m, 11µm	
Abdeckfolie für ELISA	100-SEAL-PLT (Non-sterile)	SealPlate®:	Excel Scientific, Victorville, USA
für PCR	676 070	VIEWSEAL ABDECK-FOLIE, TRANSPARENT	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Aufbewahrungsrack für PCR-Tubes	2-2603		neoLab, Heidelberg, Deutschland
und -Strips	2-2604		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Dako Cytomation Pen	S2002		Agilent, Santa Clara, USA
Deckgläser	L 189.1	20 x 26	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ELISA Mikroplatte	DY990	Clear Microplate	R&D Systems, Minneapolis, USA
Einwegskalpell	200130010		FEATHER®, Osaka, Japan
FACS-Röhrchen	55.1579	Röhre 5ml, 75×12mm, PS	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml,	62.554.502	Röhre 15ml, 120×17mm, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml	62.547.254	Röhre 50ml, 114×28mm, PP	
Flüssigkeitsreservoir	E830.1	Rotilabo Flüssigkeits-reservoir, PVC	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämozytometer Deckglas	BAA-26402223		Armin Baack, Schwerin, Deutschland
Handschuhe	0923.1	Cryo-Gloves®, Größe : S	Tempshield, Mount Desert, USA (Bezug: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Handtuchpapier	HE 5402	Zick-Zack Handtücher	Heemann OHG, Falkensee, Deutschland

Indikatorband	8221.1	Indikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Micro-Fine™ innen sterile Insulinspritzen	324827	0,33 mm × 12,7 mm, 1 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Klebeband	C6001210	Scotch® Crystal Clear	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Kryo-Aufbewahrungsboxen	2-2700	mit Deckel	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Labor- und Hygienetücher	16515-00	zetBox©	ZVG Zellstoff-Vertriebs GmbH, Troisdorf, Deutschland
Laborglasflaschen			
50 ml	21 801 17 5		DURAN Group GmbH, Wertheim/Mai, Deutschland
100 ml	21 801 24 5		
250 ml	21 801 36 5		
2000 ml	21 801 63 5		
MACS Separation Columns			Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
LD	120-000-497		
MS	130-042-201		
Messzylinder			DURAN Group GmbH, Wertheim/Mai, Deutschland
100 ml	21 396 24	Rotilabo®-Messzylinder aus PP	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
500 ml	K851.1		
Cell Strainer	REF 352340		Falcon® Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
40µm Nylon (Sieb)			
Mehrkanalpipetten	613-3704 VWR	30-300µl	v. B
Parafilm	PM-996		Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Streifen	710980	8er-SoftStrips® mit Single Cap, 0.2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR-Platte	710880	96 Well Polypropylen Microplatten, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pinzette	91401-14		Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen			Biozym Scientific,

10 µl ohne Filter	720011	Micro Tips Premium	Hessisch Oldendorf, Deutschland Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland
200 µl ohne Filter	70.760.002		
Pipettenspitzen			Eppendorf,
5000 µl ohne Filter	0030.000.978		Hamburg, Deutschland
Direktverdränger- spitzen, unsteril	0030069.234	Combitips® plus	
1 ml	022266306	Combitips® plus	
2,5 ml	022266403	Combitips® plus	
5 ml	022266501	Combitips® plus	
10 ml			
Reaktionsgefäße			
1,5 ml	72.690.001		Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland
2 ml	0030 123.344		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schere	91460-11		Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Serologische			Sarstedt,
Pipetten	86.1253.001		Nürnbergrecht, Deutschland
5 ml	86.1254.001		
10 ml	86.1685.001		
25 ml			
Taschenrechner		Modell: KF01605	Q-CONNECT, Gent, Belgien
Tischständer für Vernichtungsbeutel	951.297		Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland
Transferpipette	86.1171		Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland
Untersuchungs- handschuhe	9421509	Peha-soft®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
	50706	Sterling Nitrile, puderfrei	Ansell, Melbourne, Australien
	700112	Nitra-Tex®	

Vernichtungsbeutel	861.197		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zählkammer		Neubauer Zähl-kammer	LO - Laboroptik, Lancing, England
Zellkulturplatte			
48-Well Mikrotiterplatte	677180	F26 MicroWell™ Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
48-Well Mikrotiterplatte	83.3923.500	TC-Platte 48 Well, Suspension, steril	

4.3. Chemikalien, Reagenzien, Stimulanzen

	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
Aceton, eisgekühlt	CP40.2		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BD Cytotfix/ Cytoperm	554714		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD FACS Flow Sheath Fluid	342003		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD FACS Clean Solution	340345		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD FACS Shutdown Solution	334224		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD Perm/ Wash buffer 10x	554723		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD Phosflow™ Perm/ Wash buffer I 10x	55-7885		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BD anti-mouse, anti-rat CompBeads	552843 552844		BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
BSA bovines Serumalbumin	A7030	lyophilisiertes Pulver, ≥ 98%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CFSE	65-0850-84	10mM	ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Chloroform/ Trichlormethan	3313.2	ROTIPURAN® ≥99%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol 96%		vergällt mit Mercaptoethanol	Universitätsapotheke der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Ethanol	9065.3	ROTIPURAN® ≥ 99,8%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FBS)	P30-3306	Aus Argentinien, Südamerika	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ficoll/ Lymphoprep β 1,077 g/ml	7861	6 x 500ml	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Fixable Viability Dye e-Fluor 780	65-0865-14		ebioscience affymetrix
Fluoprep	75521		Biomerieux, Nürtingen, Deutschland
Isopropanol	1.136.100	2-Propanol, chemsolute®, mind. 99,7%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
LPS B4:0111	L3012-5mg	Stock: 1mg/ml Aus E.Coli	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Munich, Germany)
Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS, steril)	L1825	[-] Calcium, [-] Magnesium, niedriger Endotoxingehalt	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
PBS Trockensubstanz	L 182-50	[-] Calcium, [-] Magnesium	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	P06-07100	100 ml	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
PMA (Phorbol- Myristat-Acetat)	524400-1MG		Merck Millipore Billerica, MA, USA
Power SYBR Green PCR Master Mix	4309155	SYBR Green 1 Farbstoff, AmpliTaq GOLD® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, passive Referenz, Pufferkomponenten	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
RPMI 1640	P04-16500		Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Schwefelsäure	17025	96%	Fluka Analytical/Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
Streptavidin- Meerrettich-Peroxidase	DY998		R&D Systems, Minneapolis, USA
Substrat Reagent Pack	DY999	Color Reagent A (Wasserstoffperoxid), Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tissue- Tek O.C.T Com- pound	545432454 4583	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
TriFast peqGOLD	30-2020	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Triton-X-100	X100-1L	Merck Millipore Billerica, MA, USA

4.4. Medien, Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
MACS- Puffer	0,5% BSA 0,4% 0,5 M EDTA in PBS
PBS- Puffer	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
FACS- Puffer	2% FCS in PBS
RPMI- Medium komplett	10% deplettiertes FBS 1% Pen/Strep 89% RPMI 1614
Lysis- Puffer	0,89% NH ₄ Cl 0,1% KHCO ₃ 0,003% 0,5 M EDTA
1x Lysis-Puffer	9 ml ddH ₂ O + 1 ml 10× Lyse= 10 ml 1× Lyse
Propidiumiodid Stocklösung	2 mg/ml in PBS (aliquotiert bei 4 °C)
hypotone Lysepuffer	0,1% Natriumcitrat 0,1% Triton-X-100 in 200 ml ddH ₂ O (in 50 ml-Aliquots bei -20 °C)
Reagent Diluent	1% BSA in PBS R&D Systems

4.5. Antikörper

Epitop	µl pro Probe	Markierung	Klon	Firma	Artikelnummer
primäre mouse anti-mouse Antikörper für extrazelluläre Färbung					
Fc Block™ purified anti-mouse CD16/CD32 mAb	25		2.4G2	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	553142
CXCR5	0,5	APC	2G8	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	560615
CD4	0,125	FITC	rat RM4-4	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	553055
IL-21 Rezeptor	0,0625	PE	mhalx21	BD Bioscience Franklin Lakes, USA	558607
B220	0,125	Alexa Fluor 647	rat RA3-6B2	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	557683
CD23	0,0625	PE- Cy7	rat B3B4	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	562825
CD21/CD35	0,0625	FITC	rat 7G8	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	553818
CD1d	0,25	PerCP-Cy5.5	rat 1B1	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	562713
CD19	0,03125	PE- Cy7	rat 1D3	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	552854
CD69	0,25	PerCP-Cy5.5	hamster H1.2F3	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	BD Biosciences Franklin Lakes, USA 551113
CD80	0,0625	FITC	hamster 16-10A1	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	BD Biosciences Franklin Lakes, USA 553768
CD86	2,5	PE		miltenyi biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-102-604
MHC2	2,5	APC		miltenyi biotec	130-107-942

				GmbH, Bergisch Gladbach, Deutsch- land	
primäre mouse anti-human Antikörper für extrazelluläre Färbung					
CD4	2,5	PE- Cy7	SK3 mouse	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	557852
CXCR5	2,5	BB515	RF8B2 rat	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	564624
PD-1	2,5	Alexa Fluor 647	EH12.1	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	560838
ICOS	2,5	PerCP- Cy5.5	DX29 mouse	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	562833
primäre mouse Antikörper für intrazelluläre Färbung					
Bcl-6	0,5	PE	K112-91	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	561522
primäre mouse Antikörper für Stimulation von B-Zellen					
CD40			3/23 Rat	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	555587
IgM			Functional grade puri- fied	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	16-5092-85
IL-21 rekombinant mouse				BioLegend, Koblenz, Deutsch- land	574502
Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung: primär					
PD-1		Alexa Fluor 647	11-26c.2a	Cell Signaling Tech- nology, Frankfurt, Deutschland	86163S
IgD		Alexa Fluor 594	11-26c.2a	BioLegend, Koblenz, Deutsch- land	405740
CD4		FITC	Rat RM4-4 RM4-4	BD Biosciences Franklin Lakes, USA	553055
weitere Proteine für die Immunfluoreszenzfärbung					
Streptavidin		Alexa Fluor 350		ThermoFisher Sci- entific, Dreieich, Deutschland	S-11249

PNA + Biotin	Alexa Fluor 555	Fluka Analytical/Sigma-Aldrich, St- Louis, USA	L6135-5MG
--------------	-----------------	------------------------------------------------	-----------

4.6. Kits

Kit	Artikel-nummer	Inhalt	Hersteller
CD19 mouse Micro-Beads	130-052-201		Miltenyi Biotec GmbH, Teterow, Germany
ELISA Kit für IL-10	DY 417-05		R&D DuoSet ELISA Development System
ProcartaPlex Mouse Antibody Isotyping Panel 7-Plex	EPX070-20815-901		eBioscience affinity-matrix, Darmstadt, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966	10x RT Random Primers, 10x RT Buffer, dNTP Mix (100 mM), RNase Inhibitor (2000 U, 20 U/μl), MultiScribe™ MuLV reverse transcriptase (50 U/μl)	Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, USA
EasySep™ Human CD3 positiv Selection Kit II	#17851		Stemcell™ Technologies, Köln, Deutschland

4.7. Software

Software	Beschreibung	Hersteller
FlowJo	V10	FlowJo, Ashland, Oregon
GraphPad	Prism 5 Windows	GraphPad, Kalifornien, USA

5. Ergebnisse

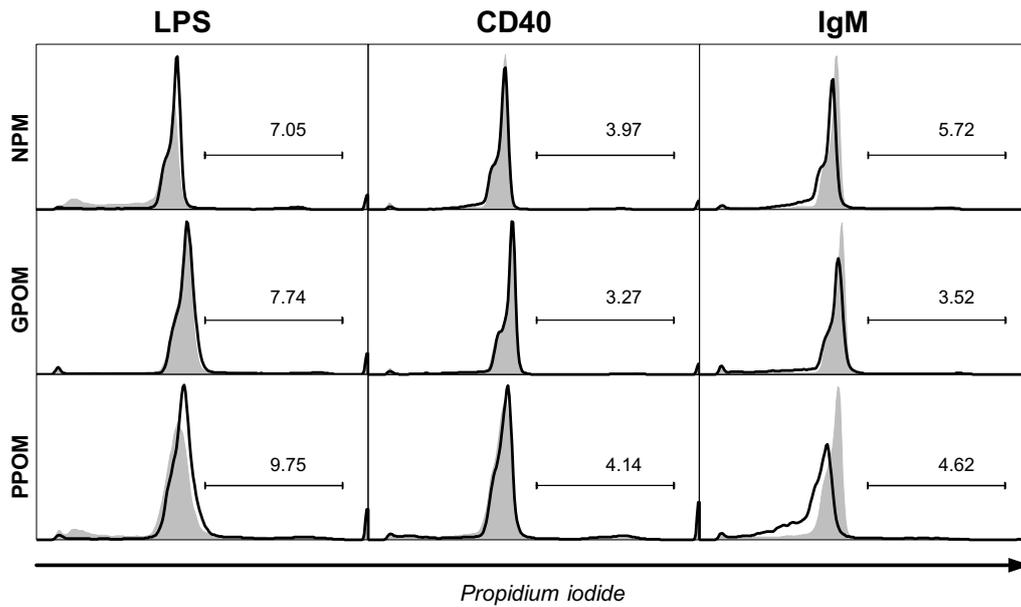
5.1. Der Einfluss von IL-21 auf die Viabilität der B-Lymphozyten

5.1.1. Lebenszyklus der B-Zellen

Zunächst wird der Einfluss von IL-21 auf den Lebenszyklus der B-Zellen untersucht werden. In Abhängigkeit von stimulierenden und kostimulierenden Faktoren ist bekannt, dass IL-21 den Eintritt in die Apoptose bei B-Zellen bedingen kann (Jin et al., 2004). Dabei sollen eventuelle Unterschiede zwischen den nicht-schwangeren (NPM=*non pregnant mice*) und schwangeren CBA/J Mäusen festgestellt werden. Die Gruppe der schwangeren CBA/J Mäuse wurde weiter differenziert: in die Gruppe mit erfolgreichen (GPOM=*good pregnancy outcome mice*) und in die Gruppe mit komplikationsreichen (PPOM=*poor pregnancy outcome mice*) Schwangerschaften.

Die Stimulation mit IL-21 zeigte sowohl in Kombination mit LPS als auch in Kombination mit anti-CD40 nach 24h in keiner der drei Mausgruppen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, einen Einfluss auf die Proliferation der B-Zellen. Bei der Stimulation mit anti-IgM führte IL-21 bei den GPOM und vor allem bei den PPOM zu einer signifikanten Verringerung der Zellen, die sich in der G2- und Mitose-Phase befanden ($68,15 \pm 10,19$ % für GPOM und $60,66 \pm 6,420$ % für PPOM) (**Abb. 1B**).

1A



1B

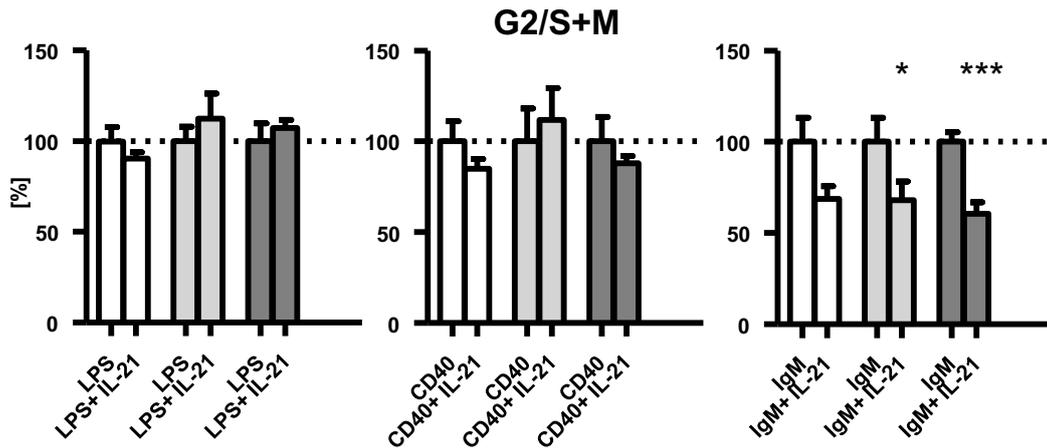


Abbildung 1: IL-21 beeinflusst den IgM-vermittelten Eintritt von CD19⁺-Zellen in die G2/S+M Phase. Es wurden CD19⁺ Splenozyten von schwangeren und nicht schwangeren CBA/2J (H2^k) Weibchen isoliert und für 24 h kultiviert. Als Stimulantien dienten LPS, anti-CD40 oder anti-IgM, jeweils mit und ohne (Kontrolle) IL-21. Das Histogramm spiegelt repräsentative Plots für die Färbung mit Propidiumiodid wider. Es ist die gesamte Zellpopulation dargestellt, wobei nach den Zellen gegatet wurde, die sich in der G2/S+M Phase befinden. Die Zahlen beziehen sich auf den Anteil der durch das Gate einbezogenen Zellen in Bezug auf die Gesamtpopulation. Die Behandlung mit IL-21 ist durch die schwarzen Linien gekennzeichnet und die grau ausgefüllten Bereiche repräsentieren die unbehandelten Kontrollen. Die Balken stellen den zu den entsprechenden Kontrollen normalisierten Prozentteil an Zellen dar, die sich in den Phasen G2/S+M befinden. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM, PPOM. n ≥ 5, t-Test, *p<0,05; ***p<0,001. NPM: non pregnant mice, GPOM: good pregnancy outcome mice, PPOM: poor pregnancy outcome mice.

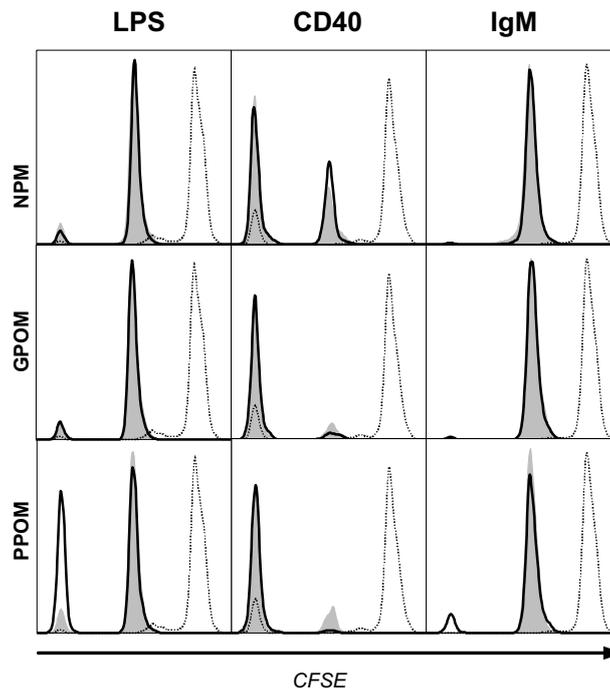
5.1.2. Proliferation der B-Zellen

Mit dem folgenden Experiment sollte die Proliferation der B-Zellen innerhalb ihres Zellzyklus unter dem Einfluss von IL-21 näher charakterisiert werden.

Die Zellen der PPOM zeigten eine leichte Reduktion an Proliferation, nachdem sie für 48 h mit LPS stimuliert worden waren ($92,31 \pm 13,34$ %) (**Abb. 2B**). Bei den verbleibenden Mausgruppen und auch bei den mit anti-CD40 stimulierten Zellen konnten keine signifikanten Veränderungen im Verhalten zu den von IL-21 unbeeinflussten Zellen beobachtet werden.

Den größten Einfluss auf die Zellproliferation hatte IL-21 auf die mit anti-IgM behandelten Zellen. Hier kam es zu einer signifikanten Steigerung an Proliferation bei den PPOM ($224 \pm 21,24$ %) (**Abb. 2B**).

2A



2B

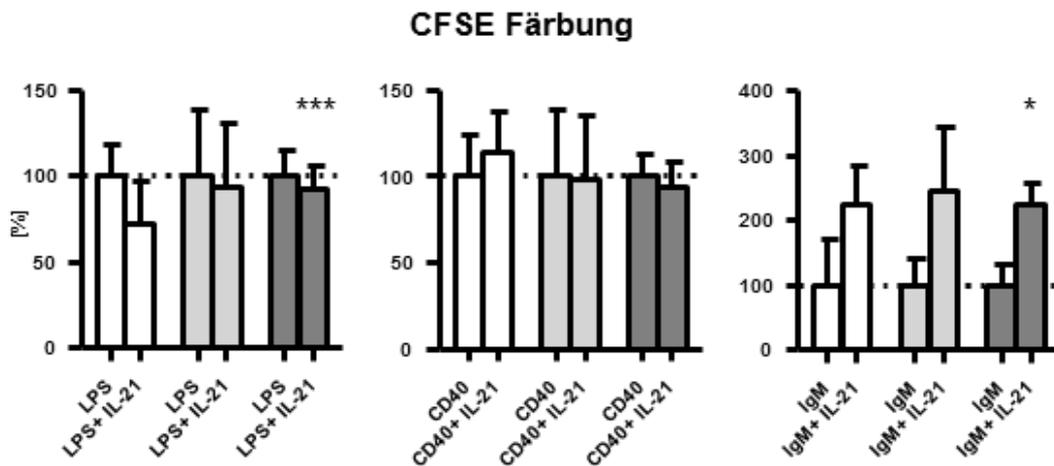


Abbildung 2: IL-21 beeinflusst die Zellproliferation der CD19⁺ Zellen. Es wurden CD19⁺ Splenozyten von schwangeren und nicht schwangeren CBA/2J (H2^k) Weibchen isoliert und für 24 h kultiviert. Als Stimulantien dienten LPS, anti-CD40 oder anti-IgM, jeweils mit und ohne (Kontrolle) IL-21. 2A zeigt die lebenden Zellen aus der CFSE Färbung in einem Histogramm. Die Behandlung mit IL-21 ist durch die schwarzen Linien gekennzeichnet und die grau ausgefüllten Bereiche repräsentieren die Kontrollen. Die gepunktete Linie markiert den Zeitpunkt t=0. (2B) Die Intensität des CFSE Farbstoffes ist als Prozentsatz in den Balken veranschaulicht. Die Werte sind in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen normalisiert. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM, PPOM. n ≥ 5, gepaarte t-Test, *p<0,05; ***p<0,001. NPM: non pregnant mice, GPOM: good pregnancy outcome mice, PPOM: poor pregnancy outcome mice.

5.1.3. Zelltod

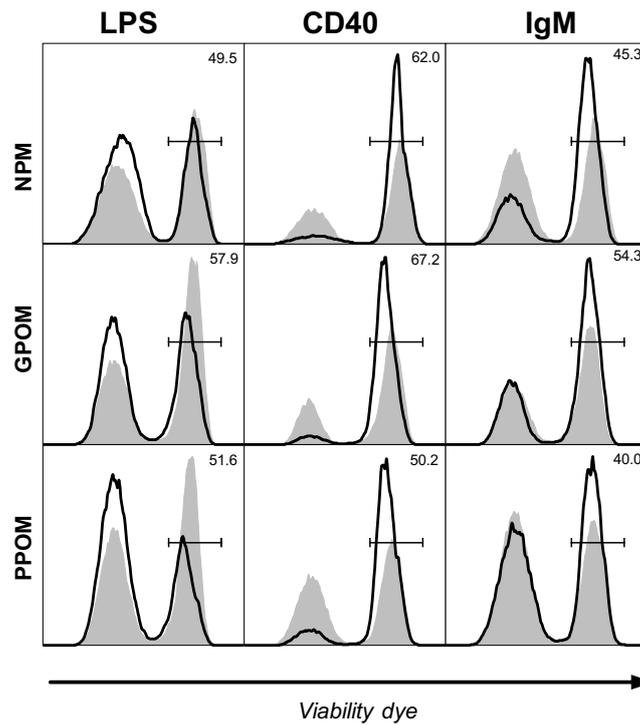
Ein weiteres Experiment beschäftigte sich mit den aktivierenden Stimulanzen der für 48 h kultivierten CD19⁺ Zellen. Neben der Proliferation stand der Zelltod als auch weiterer möglicher Prozess innerhalb eines Zellzyklus der Lymphozyten im Fokus des Interesses.

Im Fall der mit LPS behandelten Zellen konnte bei den NPM keine signifikante Einleitung des Zelltods durch IL-21 beobachtet werden. In den Gruppen der schwangeren Mäuse kam es hingegen bei den so stimulierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg an Zellen, die in den Zelltod eintraten ($147,6 \pm 25,09$ % für GPOM und $151,4 \pm 6,951$ % für PPOM; **Abb. 3B**).

Hingegen hatte eine parallel verlaufende Stimulation mit IL-21 und anti-CD40 andere Auswirkungen. Bei den NPM kam es zu einem signifikanten Rückgang des Zelltods ($80,79 \pm 7,130$ % im Vergleich zur Kontrolle), wohingegen bei den schwangeren Mäusen kein Unterschied festgestellt werden konnte (**Abb. 3B**).

Auch wurde die Antwort des B-Zell-Rezeptors in Bezug auf den Zelltod untersucht. In diesem Fall konnte durch IL-21 kein Unterschied zwischen den jeweiligen Mausgruppen entdeckt werden. Bei allen Gruppen kam es zu einem signifikanten Rückgang an Zelltod ($64,04 \pm 9,756$ % für NPM; $74,54 \pm 11,42$ und $63,25 \pm 3,012$ % für GPOM und PPOM; **Abb. 3B**).

3A



3B

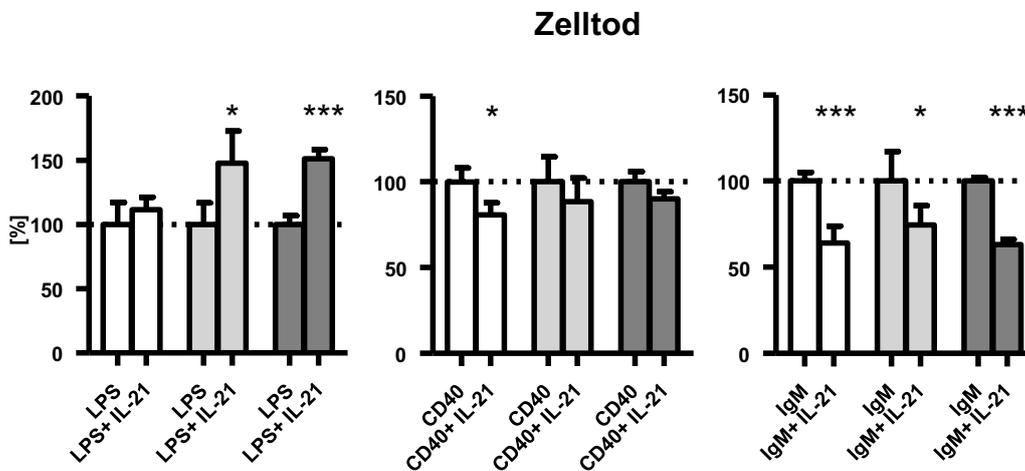


Abbildung 3: IL-21 begünstigt den LPS-vermittelten Zelltod von schwangeren Mäusen. IL-21 ist ein proinflammatorisches Zytokin und verursacht bei B-Zellen einen Eintritt in den Zelltod. Es wurden CD19⁺ Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen isoliert und für 48 h kultiviert. Als Stimulantien dienen LPS, anti-CD40 oder anti-IgM, jeweils mit und ohne (Kontrolle) IL-21. Die Experimente erfolgten in Doppelbestimmungen. In 3A zeigen repräsentative Plots die Gating Strategie nach der *Viability dye* Färbung, mit deren Hilfe die exakte Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich war. Die Behandlung mit IL-21 ist durch die schwarzen Linien gekennzeichnet und die grau ausgefüllten Bereiche repräsentieren die Kontrollen. Der Zelltod wurde entsprechend als Differenz aus Gesamtzahl und lebenden Zellen ermittelt und als normalisierte Werte mit der entsprechenden Kontrolle in Balken präsentiert. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für NPM, GPOM, PPOM. n ≥ 5, gepaarte *t*-Test, *p<0,05; ***p<0,001. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*.

5.1.4. Apoptose

Der nachfolgende Ansatz sollte die nachgeschaltete Regulation des Zelltodes im Zusammenhang mit dem Eintritt in die Apoptose näher charakterisieren.

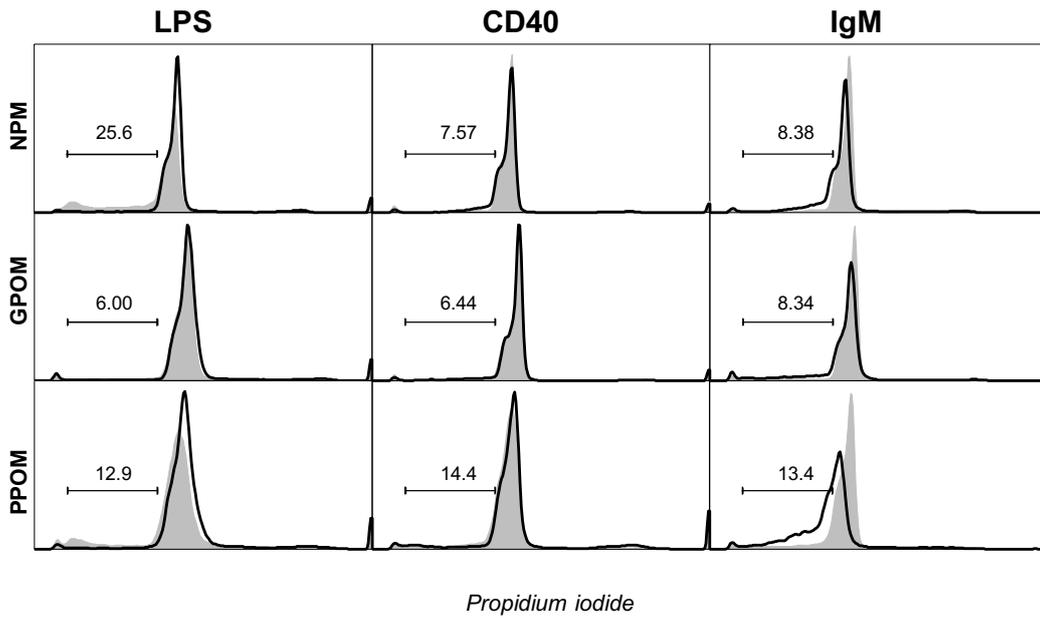
Bei den mit LPS behandelten B-Zellen der NPM- und der PPOM-Gruppe führte die Stimulation mit IL-21 zu einem signifikanten Anstieg an Apoptose ($348,6 \pm 24,06$ % für NPM und $365 \pm 48,23$ % für PPOM) (**Abb. 4B**).

Bei den GPOM konnte im Vergleich zu den mit IL-21 stimulierten B-Lymphozyten keinerlei relevante Veränderung im Verhalten gegenüber der Kontrollgruppe (alleinige Stimulation mit LPS ohne IL-21) festgestellt werden ($135,4 \pm 39,37$ %). In der Gruppe der GPOM konnten generell weniger Apoptose bei den B-Lymphozyten beobachtet werden, als in den anderen beiden Mausgruppen (NPM und PPOM) ($p < 0,05$ und $p < 0,001$). Diese Beobachtung betraf sowohl die nur mit LPS, als auch die mit LPS und IL-21 behandelte Gruppe gleichermaßen.

Bei den B-Zellen, die mit anti-CD40-Antikörper behandelt worden waren, konnte kein Unterschied zwischen (den jeweiligen drei) Kontroll- und (der entsprechenden) Behandlungsgruppe(n) festgestellt werden (**Abb. 4B**).

Bei der Behandlung mit anti-IgM-Antikörper gab es keinen Unterschied innerhalb der NPM. Die beiden anderen Gruppen zeigten jedoch jeweils eine signifikante Verringerung der Apoptose bei den Zellen, die unter dem Einfluss von IL-21 gestanden hatten ($62,41 \pm 10,84$ % GPOM und PPOM $53,00 \pm 5,074$ %).

4A



4B

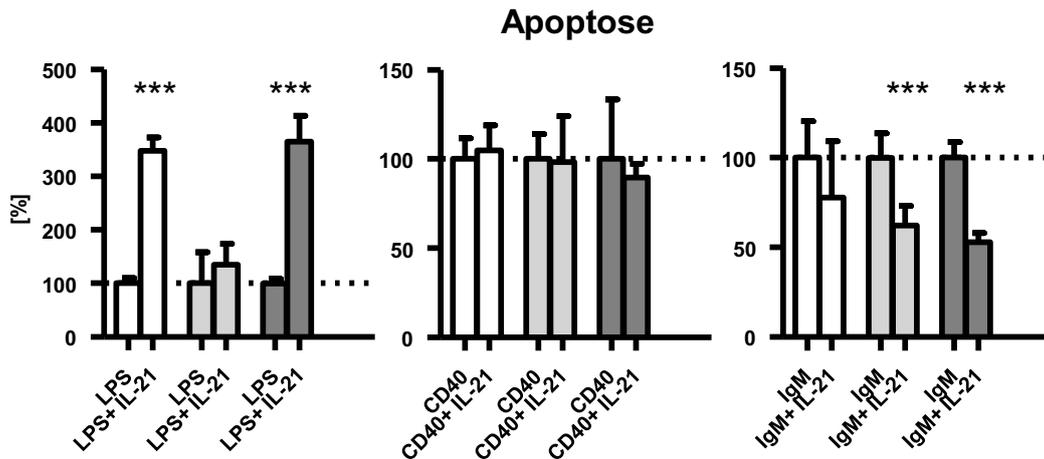


Abbildung 4: IL-21 begünstigt die LPS-vermittelte Apoptose von B-Zellen in NPM und PPOM. Die Untersuchung der Apoptose sollte den Zelltod der CD19⁺ Zellen näher charakterisieren. Es wurden CD19⁺ Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen isoliert und für 24 h kultiviert. Als Stimulantien dienten LPS, anti-CD40 oder anti-IgM, jeweils mit und ohne (Kontrolle) IL-2. Alle Experimente wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. 4A spiegelt repräsentative Plots für die Färbung mit Propidiumiodid wider. Es ist die gesamte Zellpopulation dargestellt, wobei links nach den apoptotischen Zellen gegatet wurde. Die Zahlen beziehen sich auf den Anteil der durch das Gate einbezogenen Zellen in Bezug auf die Gesamtpopulation. Die Behandlung mit IL-21 ist durch die schwarzen Linien gekennzeichnet und die grau ausgefüllten Bereiche repräsentieren die Kontrollen. Die Balken stellen den zu den entsprechenden Kontrollen normalisierten Prozentteil an apoptotischen Zellen dar. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n ≥ 5, gepaarte t-Test, *p<0,05; ***p<0,001. NPM: non pregnant mice, GPOM: good pregnancy outcome mice, PPOM: poor pregnancy outcome mice.

5.4. Der Einfluss von IL-21 auf die Immunglobulin-Produktion der B-Lymphozyten

Nachdem ein deutlicher Einfluss von IL-21 auf die Lebenszyklen und den Zelltod der B-Zellen gemessen werden konnte, galt es den Effekt von IL-21 auf B-Zellen näher zu untersuchen. Das entsprechende Experiment hierzu sollte klären, welchen Einfluss eine Reduktion an apoptotischen Zellen auf die Ig Produktion der B-Zellen hat. Dazu wurden die Überstände aus den bereits erwähnten 24 h Zellkulturen verwendet und ein Bioplex durchgeführt, mit dessen Hilfe es möglich war, mehrere Ig gleichzeitig zu detektieren.

Die mit LPS stimulierten B-Zellen der PPOM zeigten eine erhöhte Freisetzung der Ig unter der Behandlung mit IL-21 ($153,9 \pm 20,98$ % für IgG1; $181,3 \pm 38,73$ % für IgG2a; $232,6 \pm 69,91$ % für IgG2b; $226,0 \pm 62,67$ % für IgG3; $156,5 \pm 21,71$ % für IgA und $164,1 \pm 27,66$ % für IgM; **Abb. 5**). Bei den anderen beiden Gruppen konnte bezüglich dieser Ig keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Hinsichtlich der Freisetzung von IgE konnte auch bei den GPOM eine Erhöhung gegenüber allen anderen Gruppen gemessen werden ($145,4 \pm 36,29$ % für GPOM und $170,3 \pm 22,79$ % für PPOM).

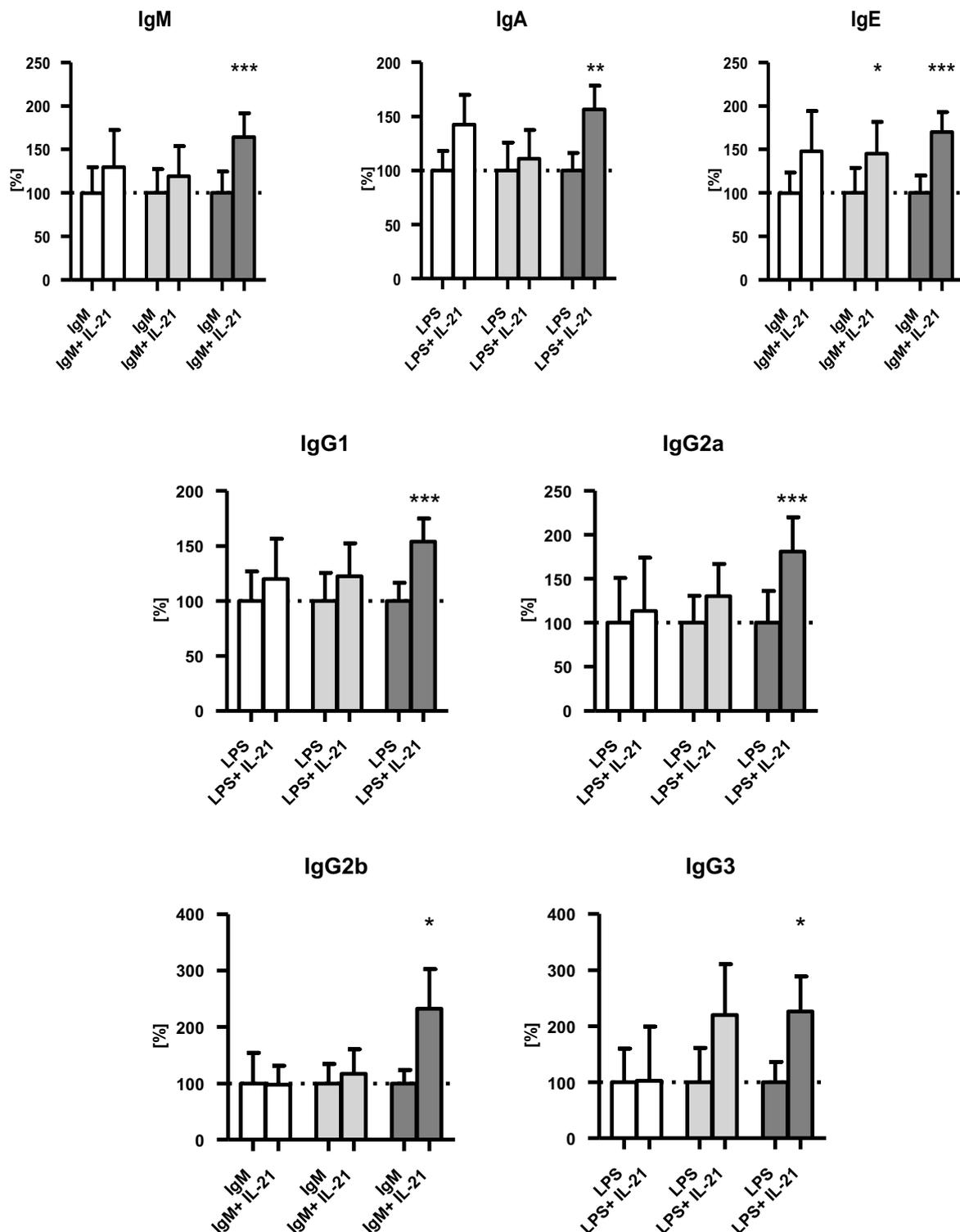


Abbildung 5: IL-21 beeinflusst die Produktion verschiedener Immunglobuline durch CD19⁺ Zellen besonders bei PPOM. Aus Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen wurden CD19⁺-Zellen isoliert und mit LPS und anti-IgM (jeweils mit und ohne IL-21) für 48 h stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Betrachtung produzierten Igs in den Überständen. Als Kontrollgruppen dienen Zellen, die nur mit LPS und anti-IgM stimuliert worden waren. Die Messung der Ig erfolgte in einem Bioplex. Die Balken zeigen den Prozentsatz eines jeden Igs. Die Werte sind in Bezug auf die jeweilige Kontrolle normalisiert worden. Die Werte der Kontrollen entsprechen jeweils dem Wert 100. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n ≥ 5, gepaarte t-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*, Ig: Immunglobuline.

5.5. Der Einfluss von rekombinantem IL-21 auf die IL-10 Produktion der B-Lymphozyten auf mRNA- und Proteinebene

Neben der Ig-Produktion wurde in diesem Experiment der Einfluss von IL-21 auf die IL-10 Produktion der B-Zellen untersucht. Der Einfluss auf die B- und T-Zellen konnte bereits durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Bubier et al., 2009; Yoshizaki et al., 2012), wobei der Einfluss während der Schwangerschaft noch unzureichend untersucht ist. Außerdem ist IL-10 für den erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf ein gut untersuchtes Zytokin (Chatterjee et al., 2014; Cheng and Sharma, 2015). Als Materialien dienten die Überstände der mit LPS behandelten CD19⁺ Splenozyten aus den 24 h und 48 h Zellkulturen, die jeweils mit IL-21 oder nur mit LPS stimuliert worden waren. Mit Hilfe eines ELISAs wurden die Überstände auf Unterschiede im IL-10 Profil untersucht (**Abb. 6 links**).

Es konnte eine zeitabhängige Stimulation des produzierten IL-10 nach 48 h im Vergleich zu den Werten nach 24 h gesehen werden (9-, 18- und 4-facher Anstieg bei NPM, GPOM und PPOM). Dabei zeigte sich in der Gruppe der GPOM der größte Konzentrationsanstieg an IL-10. Diese Mausgruppe war es auch, die unter IL-21 Stimulation als einzige nach 48 h einen signifikanten Anstieg an IL-10 erkennen ließ (von $40,53 \pm 10,66$ pg/ml nach 24 h hin zu $153,4 \pm 24,56$ pg/ml nach 48 h Stimulation: **Abb. 6 links**).

Um die Auswirkungen von IL-21 auf Ebene der mRNA zu untersuchen, wurde eine qPCR der für 48 h kultivierten B-Zellen angefertigt. Dabei fiel auf, dass die Mäuse mit gestörten Schwangerschaften unter IL-21 Stimulation die Fähigkeit verlieren die Expression an *Il10* zu erhöhen. In den beiden anderen Gruppen war diese Fähigkeit erhalten geblieben. So konnte ein Anstieg an *Il10* mRNA nach 48 h unter dem Einfluss von IL-21 beobachtet werden ($228,8 \pm 50,16$ und $244,0 \pm 28,89$ % im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe; **Abb. 6 rechts**).

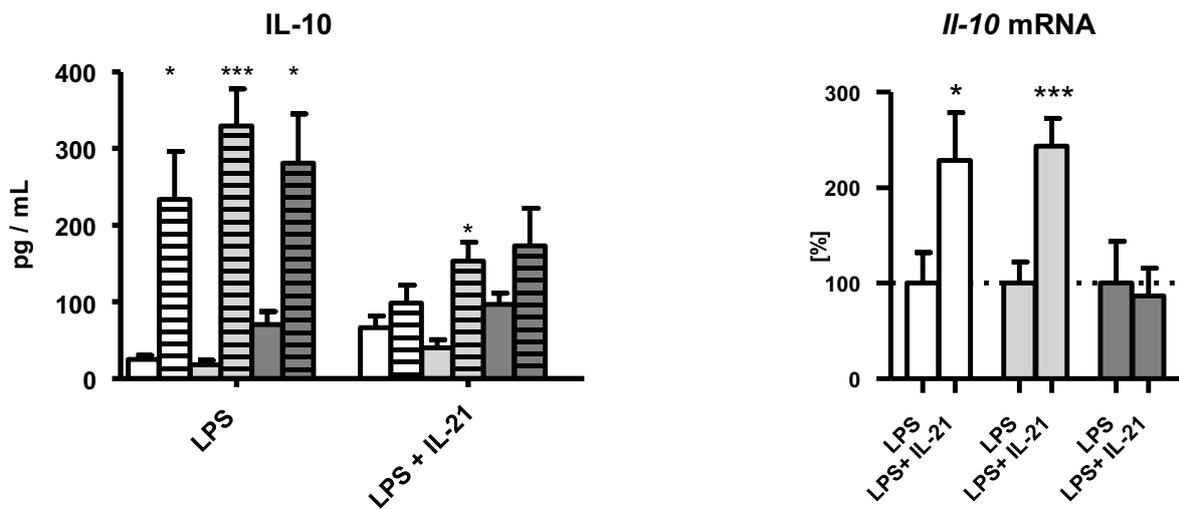


Abbildung 6: Produktion von IL-10 und II10 mRNA Expression in CD19⁺ Zellen nach Stimulation mit IL-21. Aus Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen wurden CD19⁺ Zellen isoliert, mit LPS allein (Kontrolle), oder in Kombination mit IL-21 stimuliert und für 24 h oder 48 h kultiviert. Für die Messung von IL-10 aus den Überständen wurde ein ELISA verwendet. (6 links) Die Werte (pg/ml) an IL-10 sind in den Balken dargestellt. Einfarbige Balken stehen für die Werte an IL-10 aus den Überständen, die 24h kultiviert waren. Die Werte der 48 h Überstände sind durch die gestreiften Balken veranschaulicht. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. $n \geq 5$, gepaarte Studenten *t*-Test.

(6 rechts) IL-21 stimuliert die Zytokinproduktion von IL-10 auf Expressionsebene. CD19⁺ Zellen wurden für 48 h mit LPS und IL-21 inkubiert, die RNA wurde isoliert und die Expression mittels PCR gemessen. Als Kontrollgruppe diente die RNA von Zellen, die nur mit LPS inkubiert worden waren. Die Balken zeigen die Prozente an *Il10* mRNA, die auf ihre jeweilige Kontrolle normalisiert sind. Die Werte der Kontrollen entsprechen jeweils 100%. $n \geq 7$, gepaarten *t*-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*.

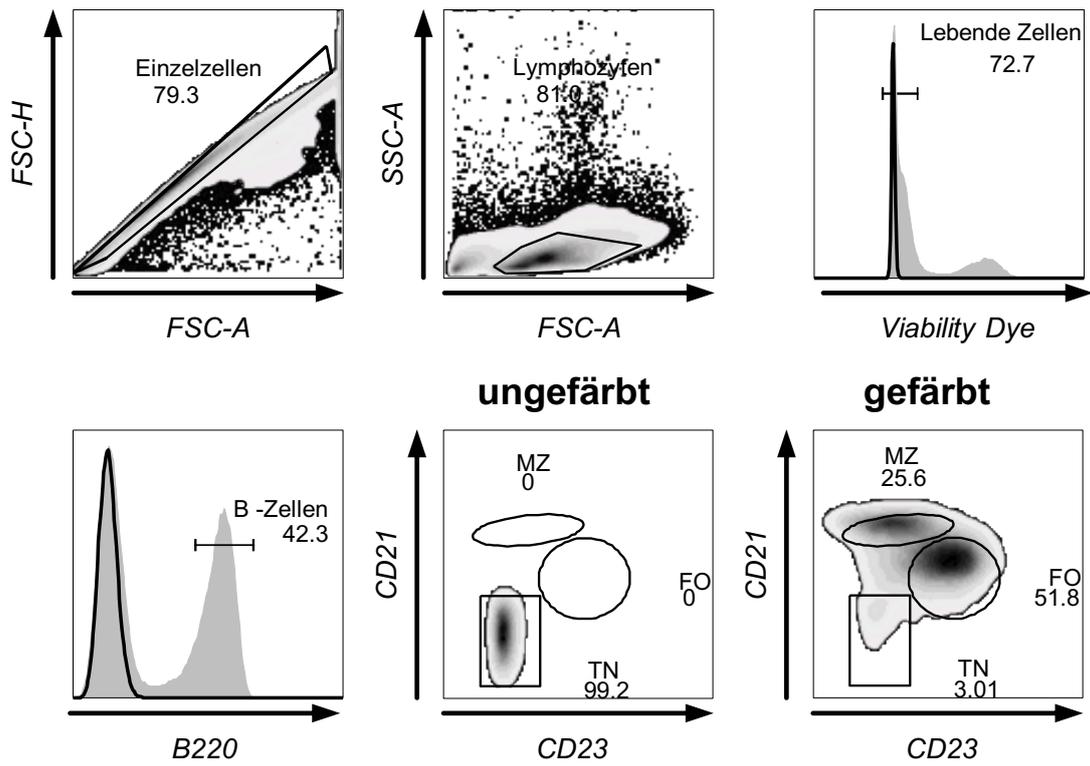
5.6. IL-21 Rezeptor Expression variiert auf B-Zellen

Aus den ersten Experimenten war für die verschiedenen Mausgruppen eine unterschiedliche Sensibilität der B-Zellen gegenüber IL-21 erkennbar. Die Wirkung auf die B-Zellen entfaltet IL-21 über seinen Rezeptor. Das folgende Experiment sollte die Expression der IL-21R auf B-Zellen untersuchen. Verwendet wurden Lymphozyten aus der Milz, deren IL-21R mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern sichtbar und messbar gemacht wurde.

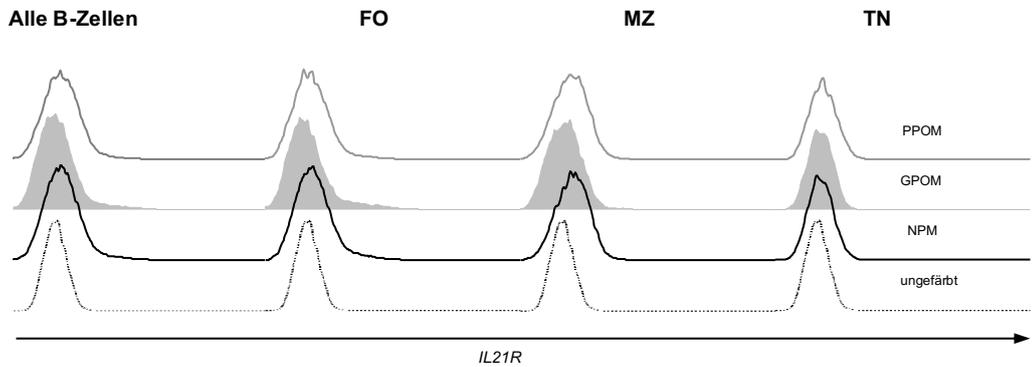
Es konnte beobachtet werden, dass die B-Zellen der GPOM eine niedrigere Expression von IL-21R aufwiesen im Vergleich zu den B-Zellen der PPOM ($8,991 \pm 1,681$ vs. $23,62 \pm 1,924$ MFI; **Abb. 7C**).

Des Weiteren wurde hinsichtlich der drei örtlich fixierten B-Zell-Hauptgruppen MZ, FZ und TZ B-Zellen deren IL-21R Expression untersucht. Innerhalb dieser Aufteilung fiel auf, dass die Expressionsintensität an IL-21R bei den MZ B-Zellen am weitesten auseinanderliegt, sofern man sich auf die GPOM- und PPOM-Gruppe bezieht ($26,00 \pm 1,762$ vs. $43,34 \pm 4,262$ MFI).

7A



7B



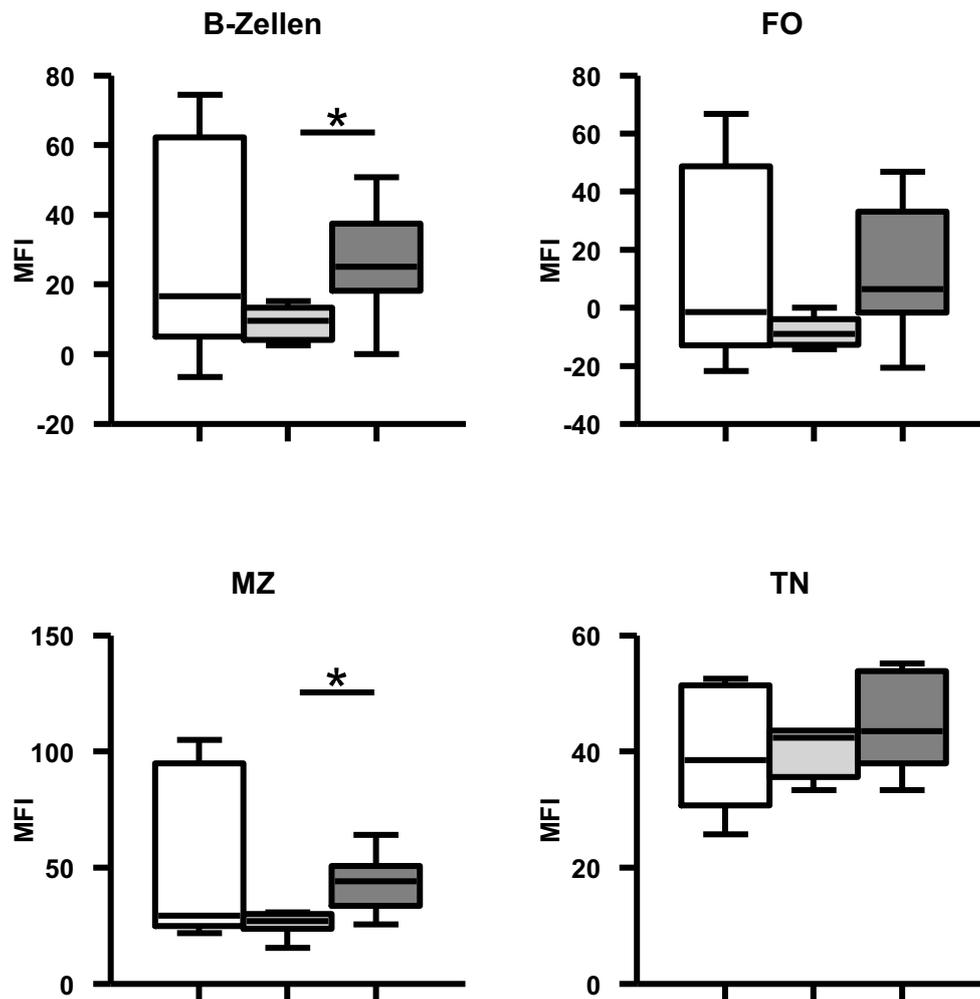


Abbildung 7: Die IL-21R Expression von B-Zellen ist in PPOM höher als in GPOM. (7A) Gezeigt wird die Gating Strategie für die Beurteilung der Expression an IL-21R auf den B-Zellen. Dafür wurden Splenozyten von weiblichen CBA/2J (H2^k) Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle von B-Zellen gefärbt. Im ersten Schritt erfolgte das Gating der einzelnen Zellen. Nachfolgend wurden aus dieser Zellpopulation die Lymphozyten abgegrenzt. Nachdem zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden worden war, erfolgte das Gating nach der Gesamtheit an B-Zellen. Im letzten Schritt vollzog man die Einteilung in die einzelnen Untergruppen: folliculär Zonen (FZ), marginal Zonen (MZ) und transitional Zonen (TN) B-Zellen. Die Beurteilung des IL-21R ist somit innerhalb der gesamten B-Zell Population sowie den einzelnen Untergruppen möglich. In jeder Gruppe wurden die Werte von jeweils acht Mäusen verglichen. Die Zahlen repräsentieren die Prozentanteile der durch die Antikörper markierten Zellen in Bezug auf die mittels Gate ausgewählte Zellpopulation. (7B) Die ineinandergreifenden Histogramme zeigen die IL-21R Expression der jeweils korrespondierenden Untergruppen. (7C) Durch die Balken ist die MFI entsprechend der IL-21R Expression der einzelnen Untergruppen veranschaulicht. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n = 8, Tests nach Kruskal- Wallis von ANOVA, *p<0,05. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*.

5.7. Der Einfluss von IL-21 auf die Expression der Aktivierungsmarker der B-Lymphozyten

Neben dem IL-21R exprimieren reife B-Zellen weitere Oberflächenmoleküle, die zum Teil in ihrer Expressionsintensität durch IL-21 reguliert werden und auf die augenblickliche Aktivität einer jeweiligen Zelle schließen lassen. In vorangegangenen Arbeiten konnten B-Zellen in PPOM mit dem Zustandekommen einer Th17 Antwort auf diese Weise in Verbindung gebracht werden, indem sie die Expression ihrer kostimulierenden Oberflächenmoleküle veränderten (Muzzio et al., 2014a).

Nachdem die unterschiedliche Sensibilität der B-Zellen auf IL-21 und dessen variierende Rezeptorexpression beobachtet werden konnte, sollte der Einfluss von IL-21 auf das Expressionsmuster weiterer Oberflächenmoleküle der B-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die B-Zellen nach oben beschriebenem Ansatz kultiviert und nach 48 h geerntet. Anschließend erfolgte die Färbung von CD69, MHCII und den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86.

In allen Mausgruppen führte die IL-21-Stimulation zu einer Reduktion der CD69-Expression auf den B-Zellen, die mit LPS behandelt worden waren ($47,21 \pm 2,638$ % für NPM, $55,78 \pm 7,146$ % für GPOM und $53,18 \pm 2,689$ % für PPOM verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen; **Abb. 8B**). Hingegen kam es unter identischen Versuchsbedingungen zu einer Hochregulation des Moleküls MHCII in allen Gruppen (**Abb. 8D**). Diese Hochregulation war besonders stark bei den PPOM ausgeprägt verglichen mit den beiden anderen Gruppen ($2789 \pm 391,0$, $263,6 \pm 20,59$ und $246,6 \pm 31,59$ %; $p < 0,001$).

Im Gegensatz zu MHCII hatte eine IL-21 Behandlung in Kombination mit LPS einen negativen Effekt auf die Expressionsintensität von CD80 (**Abb. 8F**) und CD86 (**Abb. 8H**). Hier kam es in allen Gruppen zu einer signifikanten Herunterregulation der Produktion dieser Moleküle ($69,60 \pm 4,476$, $52,72 \pm 5,760$ und $54,96 \pm 4,279$ % für CD80; $13,93 \pm 1,258$, $21,10 \pm 9,559$ und $14,57 \pm 0,6732$ % für CD86 bei NPM, GPOM und PPOM).

Hingegen zeigte IL-21 auf B-Zellen angewendet, die zuvor mit anti-CD40 behandelt worden waren, zum Teil gegenteilige Effekte. So konnte in Bezug auf eine CD69 Expression keinerlei Veränderung beobachtet werden.

Die Expression von MHCII wurde durch IL-21 reduziert, was auf die NPM und die GPOM zutraf ($84,73 \pm 10,73$, $69,65 \pm 8,172$ und $33,81 \pm 1,867$ % für jede Vergleichsgruppe; **Abb. 8C und D**).

Bezüglich der kostimulatorischen Marker kam es zu einem unterschiedlichen Verhalten. So zeigte die Expression von CD86 eine Reduktion, welche in allen Mausgruppen beobachtet werden konnte ($76,39 \pm 8,867$, $64,92 \pm 7,098$ und $79,73 \pm 10,20$ % für jede Vergleichsgruppe; **Abb. 8H**). CD80 hingegen wies nur bei den nicht-schwangeren Mäusen eine signifikante Hochregulation auf ($125,1 \pm 10,07$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe; **Abb. 8F**).

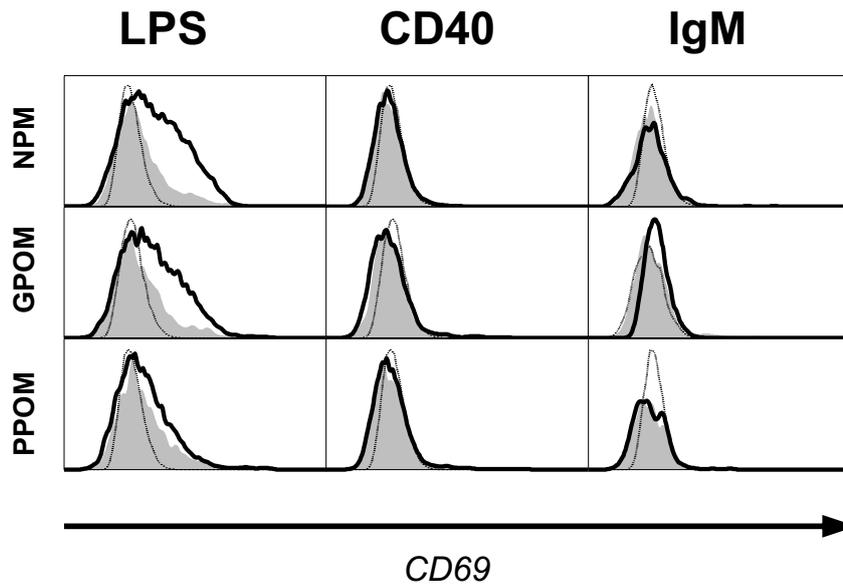
Auch die Kombination aus anti-IgM und IL-21 zeigte einen individuellen Einfluss auf die Expression, der sich zum Teil konträr zu den anderen Ergebnissen verhielt.

Demnach führte IL-21 zu einer Hochregulation von CD69 bei den NPM ($110,2 \pm 15,53$ %), jedoch nicht bei den schwangeren Mäusen (**Abb. 8B**).

Sowohl MHCII als auch CD80 ließen in keiner der Gruppen bezüglich ihrer Expression einen Einfluss unter IL-21 erkennen (**Abb. 8D und F**).

Eine Veränderung war jedoch bei CD86 zugunsten einer verstärkten Expression zu verzeichnen ($144,0 \pm 15,38$, $145,0 \pm 14,21$ und $129,5 \pm 10,20$ % verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe aller drei Gruppen: **Abb. 8H**).

8A



8B

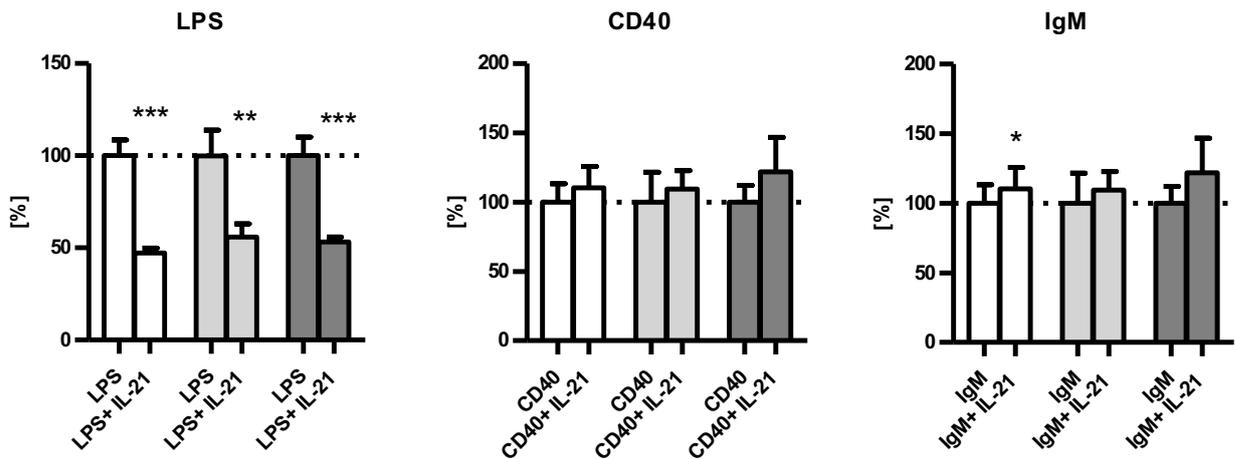
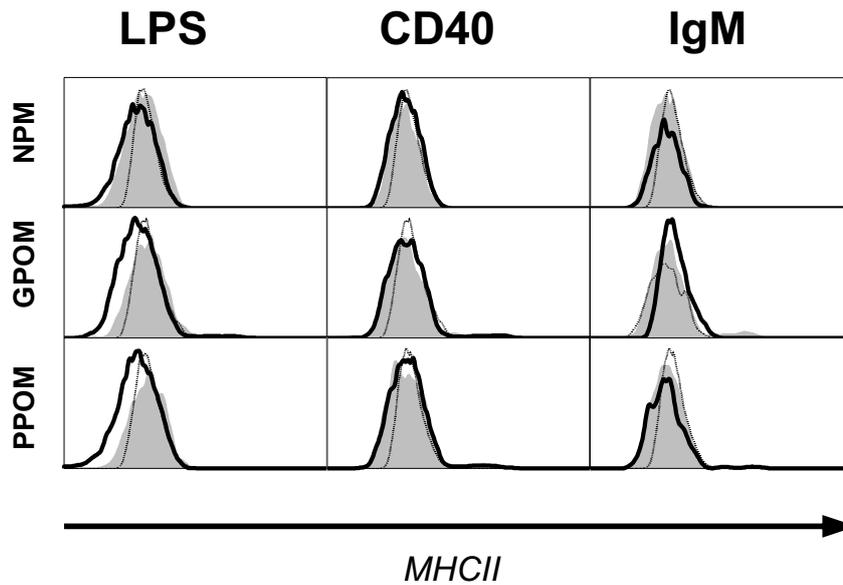


Abbildung 8 A+B: IL-21 beeinflusst die Expression von CD69 auf CD19⁺ Zellen. Aus Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen wurden CD19⁺ Zellen magnetisch isoliert und mit LPS, anti-CD40, oder anti-IgM stimuliert (Kontrollen). Jede der Stimulantien wurde dabei mit IL-21 kombiniert. Die so kultivierten B-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (8A+B) untersucht. Im Histogramm ist die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Oberflächenmarker dargestellt. Das grau ausgefüllte Histogramm repräsentiert dabei die Stimulation mit IL-21, die schwarze Linie zeigt die alleinige Stimulation mit LPS und die gestrichelte Linie steht für die ungefärbte Kontrolle. Die Prozentwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensität sind im Balkendiagramm veranschaulicht. Dabei erfolgte die Darstellung der Werte in Bezug auf die Kontrolle in normalisierter Form. Die Werte der Kontrollen entsprechen jeweils dem Wert 100. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n ≥ 7, gepaarten t-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*

8C



8D

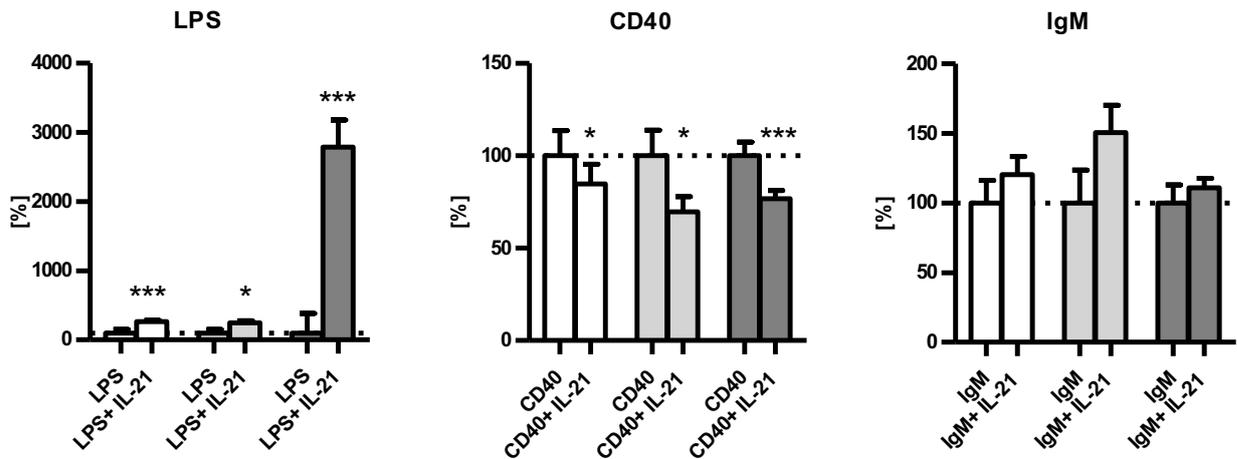
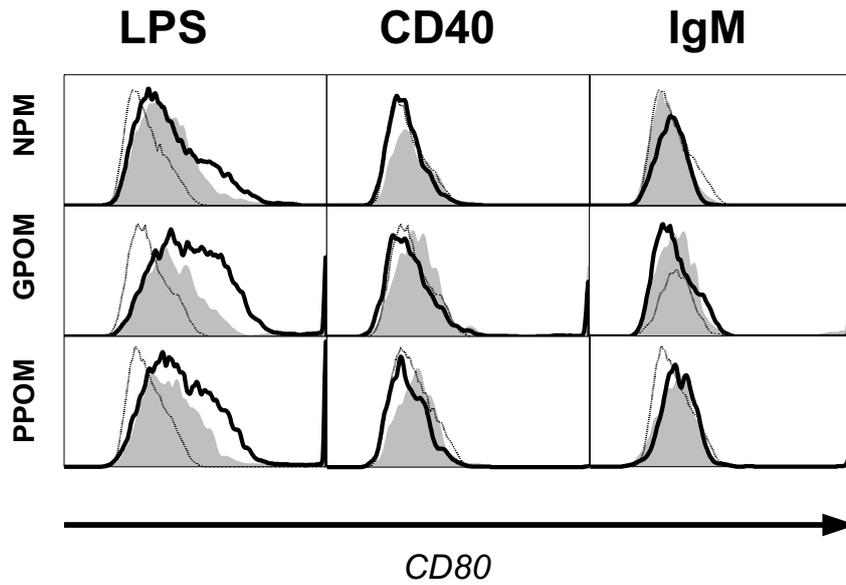


Abbildung 8C+D: IL-21 beeinflusst die Expression von MHCII auf CD19⁺ Zellen. Aus Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen wurden CD19⁺ Zellen magnetisch isoliert und mit LPS, anti-CD40, oder anti-IgM stimuliert (Kontrollen). Jede der Stimulantien wurde dabei mit IL-21 kombiniert. Die so kultivierten B-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression des Aktivierungsmarkers MHCII (8C+D) untersucht. Im Histogramm ist die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Oberflächenmarker dargestellt. Das grau ausgefüllte Histogramm repräsentiert dabei die Stimulation mit IL-21, die schwarze Linie zeigt die alleinige Stimulation mit LPS und die gestrichelte Linie steht für die ungefärbte Kontrolle. Die Prozentwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensität sind im Balkendiagramm veranschaulicht. Dabei erfolgte die Darstellung der Werte in Bezug auf die Kontrolle in normalisierter Form. Die Werte der Kontrollen entsprechen jeweils dem Wert 100. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n ≥ 7, gepaarten t-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*.

8E



8F

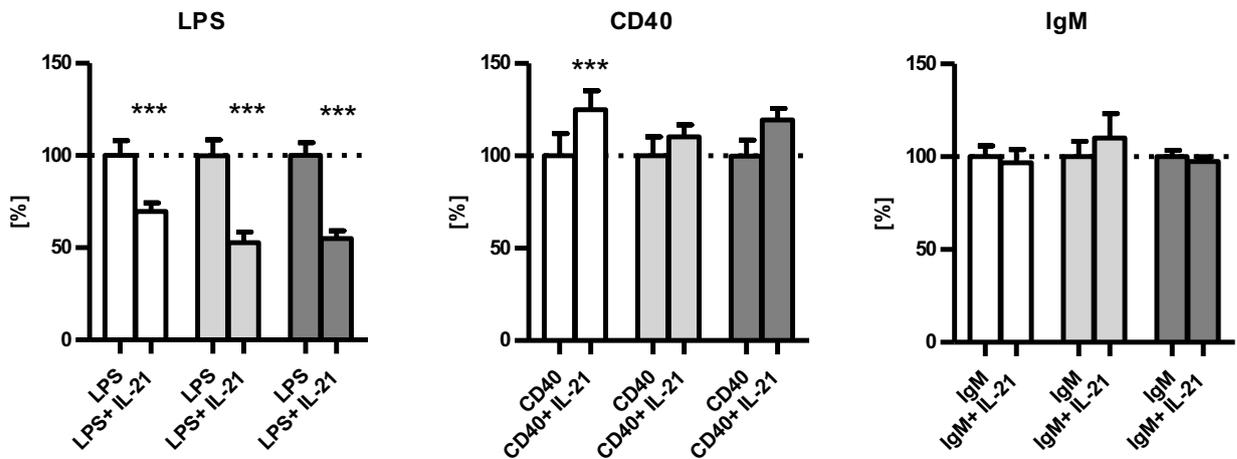
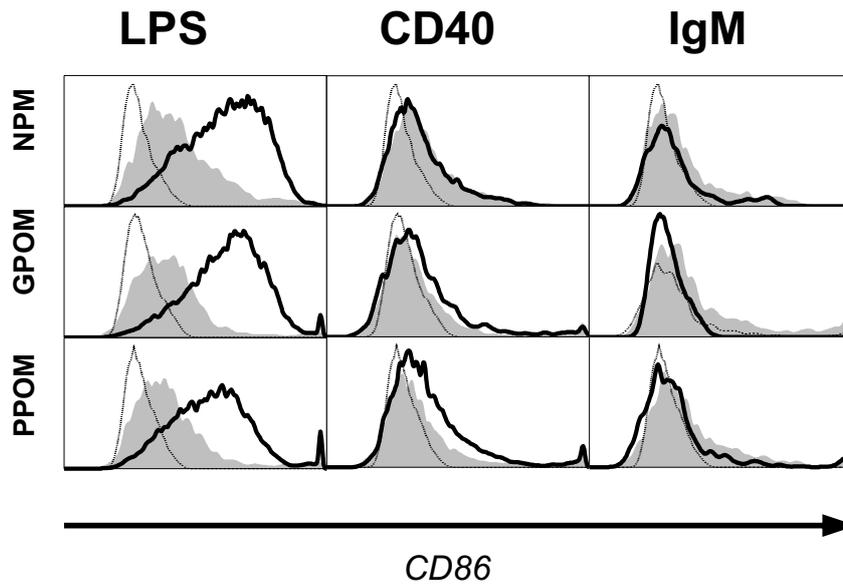


Abbildung 8E+F: IL-21 beeinflusst die Expression von CD80 auf CD19⁺ Zellen. Aus Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen wurden CD19⁺ Zellen magnetisch isoliert und mit LPS, anti-CD40, oder anti-IgM stimuliert (Kontrollen). Jede der Stimulantien wurde dabei mit IL-21 kombiniert. Die so kultivierten B-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression an CD80 (8E+F) untersucht. Im Histogramm ist die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Oberflächenmarker dargestellt. Das grau ausgefüllte Histogramm repräsentiert dabei die Stimulation mit IL-21, die schwarze Linie zeigt die alleinige Stimulation mit LPS und die gestrichelte Linie steht für die ungefärbte Kontrolle. Die Prozentwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensität sind im Balkendiagramm veranschaulicht. Dabei erfolgte die Darstellung der Werte in Bezug auf die Kontrolle in normalisierter Form. Die Werte der Kontrollen entsprechen jeweils dem Wert 100. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n ≥ 7, gepaarten t-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. NPM: non pregnant mice, GPOM: good pregnancy outcome mice, PPOM: poor pregnancy outcome mice.

8G



8H

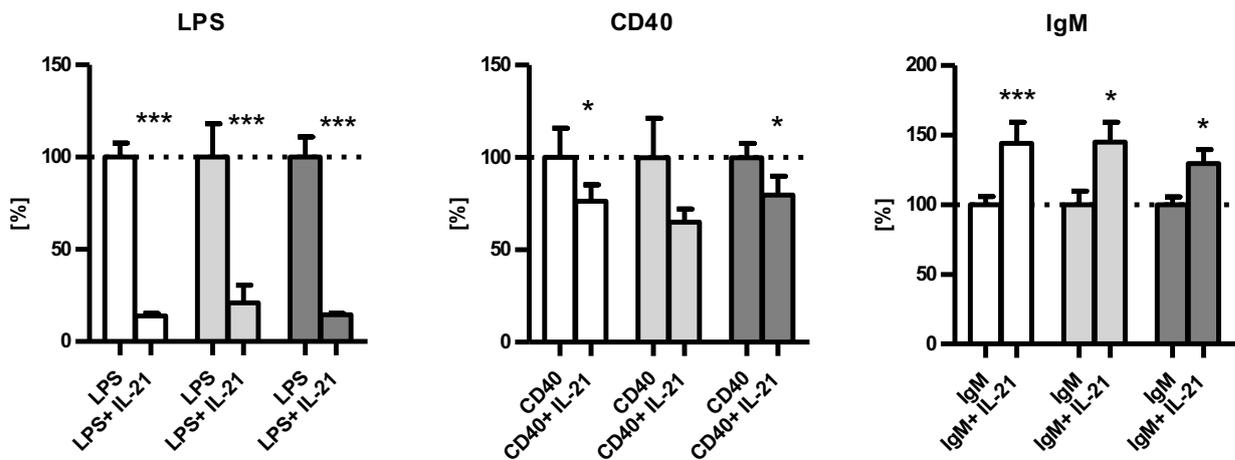


Abbildung 8G+H: IL-21 beeinflusst die Expression von CD86 auf CD19⁺ Zellen. Aus Splenozyten von CBA/2J (H2^k) Weibchen wurden CD19⁺ Zellen magnetisch isoliert und mit LPS, anti-CD40, oder anti-IgM stimuliert (Kontrollen). Jede der Stimulantien wurde dabei mit IL-21 kombiniert. Die so kultivierten B-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression an CD86 (8G+H) untersucht. Im Histogramm ist die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Oberflächenmarker dargestellt. Das grau ausgefüllte Histogramm repräsentiert dabei die Stimulation mit IL-21, die schwarze Linie zeigt die alleinige Stimulation mit LPS und die gestrichelte Linie steht für die ungefärbte Kontrolle. Die Prozentwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensität sind im Balkendiagramm veranschaulicht. Dabei erfolgte die Darstellung der Werte in Bezug auf die Kontrolle in normalisierter Form. Die Werte der Kontrollen entsprechen jeweils dem Wert 100. Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n ≥ 7, gepaarten t-Test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. NPM: *non pregnant mice*, GPOM: *good pregnancy outcome mice*, PPOM: *poor pregnancy outcome mice*.

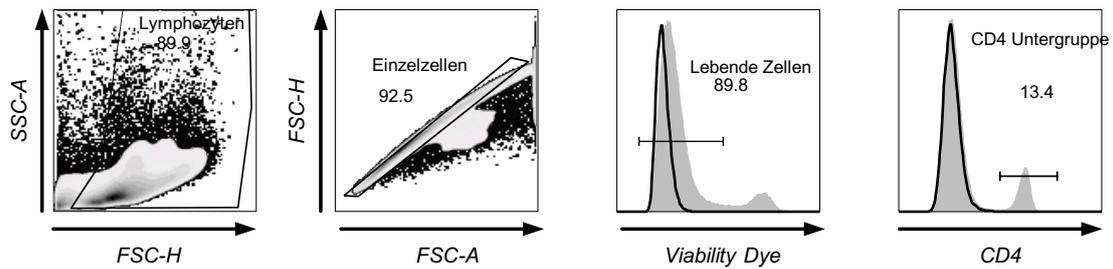
5.8. Tfh-Zellen in Schwangerschaft

Abschließend wurden in einem Experiment die Zellen näher untersucht, die für die Produktion von IL-21 verantwortlich sind. Unter den T-Zellen stellen Tfh-Zellen die Population dar, die sich durch eine besonders intensive IL-21-Produktion auszeichnen und sich hierüber hinaus in einer besonders kleinen Umgebung zu den B-Zellen im Sekundärfollikel befinden.

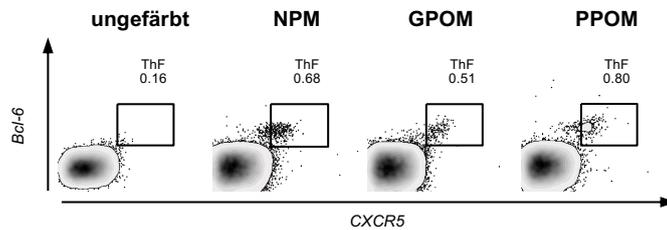
5.8.1. Durchflusszytometrie-Färbung von Tfh-Zellen in Mäusen

Für eine erste Charakterisierung wurde eine Färbung von Lymphozyten aus der Milz durchgeführt. Dabei konnte eine Reduktion der Tfh-Zellen bei den GPOM im Vergleich zu den NPM gesehen werden ($60,587 \pm 7,276$ Zellen für NPM vs. $15,624 \pm 3,528$ Zellen bei GPOM; **Abb. 9C**). Verglichen mit diesen beiden Gruppen zeigten die PPOM ein signifikant vermehrtes Vorkommen an Tfh-Zellen ($93,019 \pm 22,233$ Zellen).

9A



9B



9C

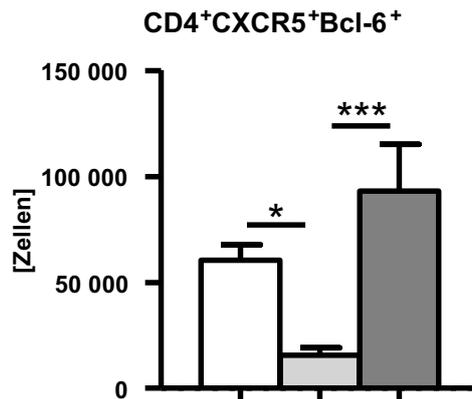


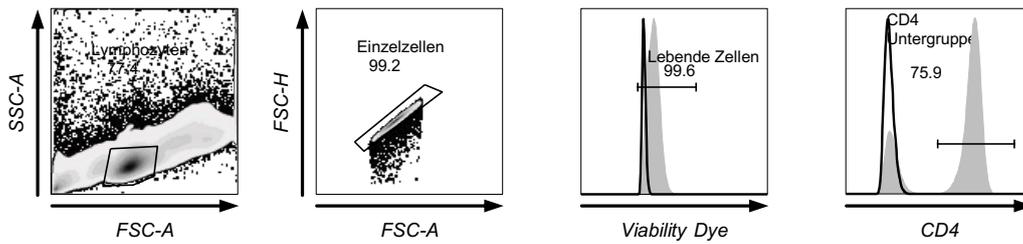
Abbildung 9: Anzahl an Tfh-Zellen in Mäusen. Abschließend sollten die Tfh-Zellen näher charakterisiert werden, die sich durch die Produktion von IL-21 auszeichnen. Splenozyten von weiblichen CBA/2J (H2^k) Mäusen wurden isoliert und mit Antikörpern gegen T-Zell Moleküle gefärbt. (9A) Die Gating-Strategie stellt eine Analysemöglichkeit für die folliculären T-Helfer-Zellen dar. Diese wurden anhand von CD4, CXCR5 und Bcl-6 von der Gesamtheit der Lymphozyten abgegrenzt. Die Werte der Zellzahlen sind für die drei Gruppen in einem Balkendiagramm veranschaulicht (Abb. 9C). Die weißen, hellgrauen und dunkelgrauen Balken stehen für die NPM, GPOM und PPOM. n = 7, Test nach Kruskal-Wallis von ANOVA, *p<0,05;***p<0,001

5.8.2. Färbung von Tfh-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft im humanen Blut

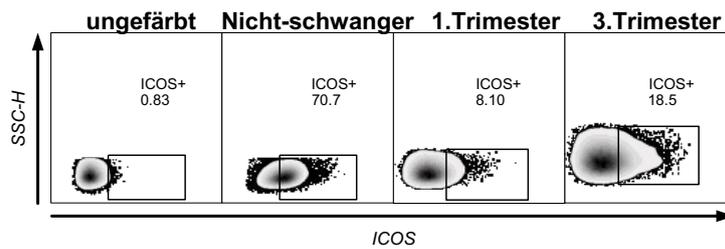
Angeregt durch die Beobachtung von Unterschieden in der Reaktion von Tfh-Zellen während der Schwangerschaft von Mäusen sollten in Analogie die Tfh-Zellen aus humanem Blut untersucht werden. Für dieses Experiment nutzten wir peripheres Blut, das von nicht-schwangeren und schwangeren Frauen im ersten und dritten Trimester gewonnen wurde. Nach Aufbereitung des Blutes wurden mittels positiver Selektion CD3⁺ Zellen gewonnen und für eine Färbung vorbereitet.

Aus der Menge der CD3⁺ Zellen wurde der Prozentsatz von CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺ICOS⁺ Zellen ermittelt, wobei zu Beginn einer Schwangerschaft eine bis zu 3-fachen Reduktion dieser Zellen zu beobachten war (von $5,510 \pm 2,494$ hin zu $1,652 \pm 1,387$ %; **Abb. 10D**).

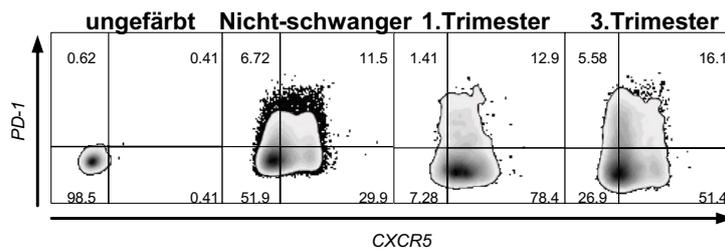
10A



10B



10C



10D

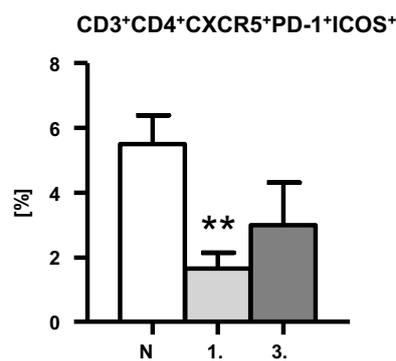


Abbildung 10: Reduzierung der Tfh-Zellen bei schwangeren Frauen. Dargestellt ist die Gating-Strategie für CD4⁺ICOS⁺CXCR5⁺PD-1⁺ Tfh-Zellen, die sich innerhalb CD3⁺ Lymphozyten befinden (10A-C). Die Gates wurden dabei für jede einzelne Probe individuell angepasst. Die Zellen wurden aus dem Blut nicht-schwangerer Frauen und Frauen, die im ersten und dritten Trimester waren, gewonnen (weißer, hellgrauer und dunkelgrauer Balken). Dunnett's Vergleichstest von ANOVA, **p<0,01

5.8.3. Darstellung des Keimzentrums mithilfe der Immunfluoreszenz

Abschließend sollte die Interaktion zwischen Tfh-Zellen und B-Zellen näher untersucht werden, indem das Keimzentrum, als der Ort dieser Interaktion, dargestellt wurde. Dazu wurde das Protokoll einer früheren Arbeit verwendet, die das Vorkommen der Tfh-Zellen im Keimzentrum bereits bei nicht schwangeren Sie-hCD19Tg weiblichen Mäusen mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen hatte (Yusuf et al., 2014). Die Arbeit hatte die Rolle von Tfh-Zellen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunkrankheiten untersucht. Hierbei konnten erhöhte Level der Tfh-Zellen festgestellt werden, die für eine Expansion an autoreaktiven B-Zellen verantwortlich sind. Außerdem wurde das Keimzentrum als der Ort beschrieben, der die Mehrheit der Tfh-Zellen beherbergt. Diese befinden sich in enger Nachbarschaft zu den Keimzentrums B-Zellen, was mit Hilfe der Immunfluoreszenz farblich innerhalb der sekundären lymphatischen Organe gezeigt werden konnte. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen den Anzahlen an Tfh- und Keimzentrums B-Zellen festgestellt werden. Das Ziel bestand darin, nach einem Färbeprotokoll die interagierenden Zellen des Keimzentrums während der Schwangerschaft darzustellen.

Es wurden Schnitte von der Milz schwangerer CBA/2J (H2^k) Mäuse aus der Anpaarung mit Balb/c Männchen angefertigt und die dortigen Zellstrukturen gefärbt (**Abb. 11A-B**). Dabei konnte die Struktur eines Keimzentrums bildlich dargestellt werden, dessen Rand aus noch unreifen B-Zellen besteht. Zur Mitte hin häufen sich reife B-Zellen, in deren Nähe sich wiederholt einzelne Tfh-Zellen befinden. Die Mehrheit der Tfh-Zellen ist in der Nähe der Keimzentrums B-Zellen lokalisiert.

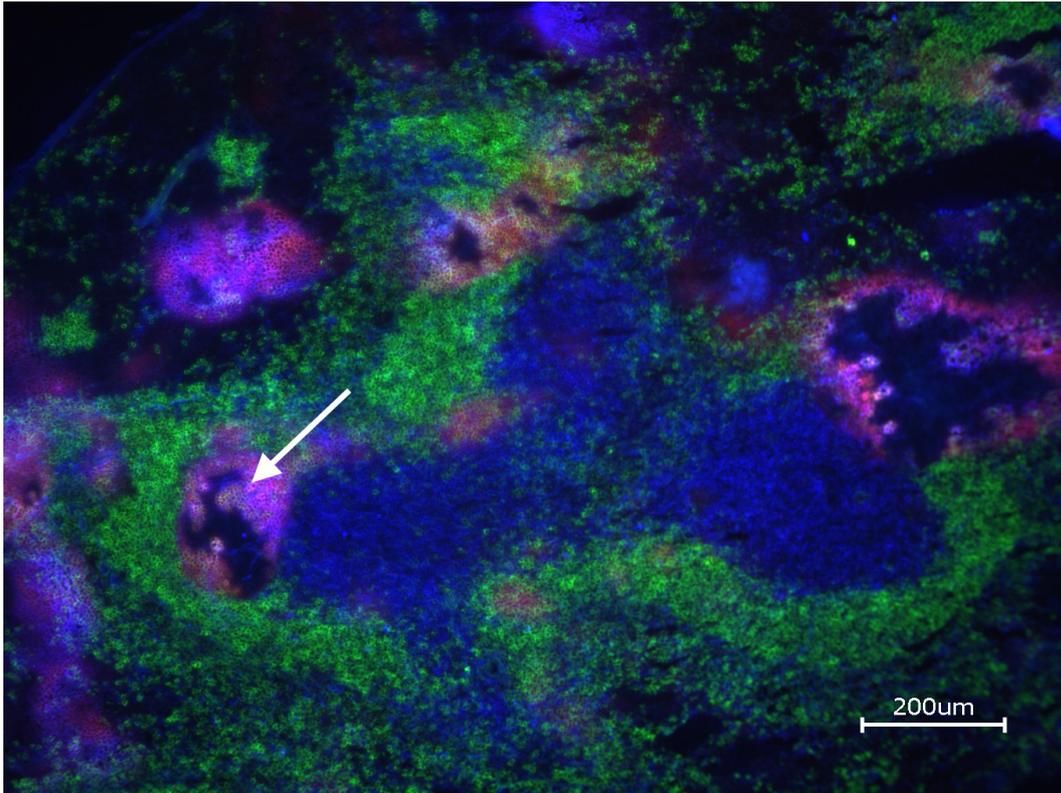


Abbildung 11: Immunfluoreszenzbild eines Keimzentrums in der murinen Milz. Dargestellt sind ein B-Zell-Follikel und ein Keimzentrum. Es wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 4µm von der Milz aus schwangeren CBA/J Mäusen am Tag 14 der Schwangerschaft angefertigt. Die Schnitte wurden mit CD4 (blau), IgD (naïve B-Zellen, grün) und PD-1 (rot) gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Der weiße Pfeil markiert die Tfh-Zellen, die sich durch die Färbung weiß darstellen.

6. Diskussion

Während einer Schwangerschaft finden innerhalb des Immunsystems sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene umfassende Anpassungsvorgänge statt. Für das Aufrechterhalten einer Schwangerschaft ist dabei vor allem ein ausgeglichenes Zusammenspiel der einzelnen Akteure entscheidend (Racicot et al., 2014; Mor et al., 2017). Im Zusammenhang gestörter Verhältnisse innerhalb des Immunsystems konnten verschiedene Komplikationen, wie beispielsweise spontane Aborte, Frühgeburt und Präeklampsie beschrieben werden (Roy Choudhury and Knapp, 2001; Ahmed et al., 2010; Cappelletti et al., 2016).

Dass auch weitere Akteure an den komplexen Vorgängen innerhalb des Immunsystems essentiell beteiligt sind, die bislang im Paradigma einer Schwangerschaft keine Berücksichtigung fanden, wurde durch Arbeiten gezeigt. So wird das Mikrobiom des Reproduktionstraktes mit dem Gelingen und dem Ausgang der Reproduktion in Verbindung gebracht (Nuriel-Ohayon et al., 2016; Eienkel et al., 2019). Ein Zytokin, dessen Einfluss auf den Ausgang einer Schwangerschaft schon in einigen Arbeiten untersucht wurde, ist IL-21 (Zhang et al., 2017). IL-21 gehört zu der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und wurde wiederholt mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten assoziiert (Iwamoto et al., 2014; Qi et al., 2015; Choi et al., 2017; Long et al., 2019). Ein Polymorphismus des *IL21* Gens konnte mit dem Auftreten von Fehlgeburten in Verbindung gebracht werden (Messaoudi et al., 2011). IL-21 bindet den IL-21R auf B-Zellen und nimmt somit Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf (Collins et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von IL-21 auf B-Zellen besonders ausgeprägt ist, da sich ihre Antikörperantwort in Richtung einer T-Zell-unabhängigen Antwort veränderte (Jin et al., 2004). Weiterhin verringert IL-21 die IL-10 Produktion der B-Zellen (Bubier et al., 2009; Yoshizaki et al., 2012). IL-10 ist jedoch mit einem erfolgreichen Schwangerschaftsausgang assoziiert (Chatterjee et al., 2014; Cheng and Sharma, 2015), womit ein weiterer Ansatzpunkt für die Rolle von IL-21 in Bezug auf B-Zellen für den Ausgang einer Schwangerschaft gegeben ist.

So konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass sich während einer Schwangerschaft sowohl die Zellzahl als auch die Funktion der B-Zellen ändert (Medina et al., 1993; Muzzio et al., 2014a; Helene Packhäuser et al., 2017; Eienkel et al.,

2019). Schwangere Mäuse zeigten eine dramatische Reduktion ihrer Vorläuferzellen im Knochenmark, wohingegen die Anzahl an reifen Lymphozyten in den Lymphknoten, die den Uterus drainierenden, anstieg (Medina et al., 1993; Muzzio et al., 2014b). Ferner verläuft die weitere Entwicklung der B-Zellen zugunsten eines bestimmten Subtyps ab: so konnte in verschiedenen Mausstämmen eine Erhöhung der Zellanzahl der MZ B-Zellen nachgewiesen werden (Muzzio et al., 2014b, 2016).

Betrachtet man die lokalen Gegebenheiten von MZ B-Zellen genauer, so stehen diese stets in räumlicher Nähe zu folliculären T-Helfer-Zellen, was zunächst eine damit einhergehende Interaktion zwischen beiden Zelltypen vermuten lässt. Dem Tfh-Zell Subtyp wurde erst kürzlich eine große Assoziation zum Ausgang einer Schwangerschaft nachgewiesen (Zeng et al., 2016). Außerdem sind Tfh-Zellen für ihre IL-21 Produktion bekannt, womit sie an der Schnittstelle zwischen dem zellulären und humoralen Bereich des Immunsystems wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-21 während der Schwangerschaft untersucht. IL-21 ist dafür bekannt eine T-Zell-abhängige B-Zell Antwort zu fördern (Jin et al., 2004). Dabei wurde dessen Wirkung auf die unterschiedlichen B-Zell Subpopulationen betrachtet und deren funktionale Produktionsregulation von Ig und IL-10 ermittelt. Auf Grund der Produktion von IL-21 durch Tfh-Zellen wurden auch diese in die Untersuchung der Zusammenhänge mit einbezogen.

6.1. Die Expression von IL-21R auf B-Zellen

Um detaillierte Aussagen treffen zu können, inwieweit das Zytokin IL-21 B-Zellen während einer Schwangerschaft in ihrem Lebenszyklus beeinflusst, bedarf es zunächst der Charakterisierung der IL-21R Expression von B-Zellen unter normalen Bedingungen. Dass die Einflussnahme von IL-21 über einen Rezeptor einer B-Zelle ebenfalls von weiteren kostimulierenden Faktoren, wie beispielsweise dem Umgebungsmilieu abhängt (Jin et al., 2004; Ozaki et al., 2004; Jin and Malek, 2006; Wu et al., 2016), ist nachfolgend zu berücksichtigen. In Betrachtung kommen ebenso einzelne Untergruppen von B-Zellen, da bezüglich ihrer jeweiligen Zellanzahl in der Schwangerschaft bereits Unterschiede charakterisiert wurden (Muzzio et al., 2014b, 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-21R in den GPOM abnimmt, sofern man sich auf Expressionen aus PPOM bezieht. Dieser interessante Fakt lässt

die Rolle von IL-21 für den Verlauf einer Schwangerschaft in den Fokus rücken. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses könnte im proinflammatorischen Charakter des Zytokins zu finden sein. So wurde IL-21 bisher mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und Fehlgeburten in Verbindung gebracht (Sawalha et al., 2008; Webb et al., 2009; Qi et al., 2015). Eine weitere Arbeit, die sich mit der IL-21R Expression auf B-Zellen im Zusammenhang mit Rheumatoider Arthritis beschäftigte, konnte hier eine Hochregulation des Rezeptors bei allen B-Zellen feststellen (Dam et al., 2018). Präziser auf die einzelnen B-Zell-Untergruppen abgestellt, fällt innerhalb der Gedächtnis-B-Zellen eine gesteigerte IL-21R Expression auf (Dam et al., 2018). Und auch während einer chronisch lymphatischen Leukämie konnte ein veränderter Expressionslevel des IL-21R auf den B-Zellen entdeckt werden (de Toter et al., 2006).

Die umfassende Adaptation, die das Immunsystem während einer Schwangerschaft erfährt, umfasst demnach auch eine Runterregulierung der IL-21R auf den B-Zellen. Dadurch ist es den B-Zellen in einer normalen Schwangerschaft wahrscheinlich möglich, eine Art Resistenz durch eine verringerte Sensibilität gegenüber den durch IL-21 vermittelten Effekten unter LPS Stimulation zu erlangen.

An dieser Stelle sei jedoch auf eine notwendige Balance hingewiesen, die auch bezüglich des IL-21R während der Schwangerschaft stattfinden muss. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass es bei Mäusen, die weder auf den B-Zellen noch auf anderen Immunzellen eine IL-21R Expression aufwiesen, im Falle einer Infektion zu einer gestörten Keimzentrumsreaktion bzw. B-Zell-Antwort im Falle einer Infektion kam (Bessa et al., 2010). Für die Mutter als auch für den Fötus ist es jedoch sehr wichtig, dass die Mutter auf mögliche Infektionserreger mit einer adäquaten Immunantwort reagieren kann.

Diese Ergebnisse stützen weiterhin die bereits postulierten Aussagen, dass MZ B-Zellen eine entscheidende Rolle für den Ausgang einer Schwangerschaft zugesprochen werden kann, was schließlich in ihrer erhöhten Zellanzahl und ihrer bis dahin bekannten Funktionalität nachgewiesen werden konnte (Muzzio et al., 2014a, 2016). In dieser B-Zell-Subpopulation konnten innerhalb der verschiedenen Mausgruppen die stärksten Unterschiede bezüglich des Expressionslevels von IL-21R beobachtet werden. Die MZ B-Zellen der GPOM hatten eine deutlich runterregulierte Expression vom IL-21R im Vergleich zu PPOM. Die Aufgabe der MZ B-Zellen besteht in der Bereitstellung einer schnellen T-Zell-unabhängigen Immunantwort gegen mögliche Pathogene

(Nemazee, 2021). Diese unverzügliche Reaktion scheint vor allem für Schwangere von enormer Bedeutung zu sein, da sich das Immunsystem zugunsten einer Toleranz gegenüber dem Fötus in seiner Aktivität begrenzen muss.

Bisherige Arbeiten über IL-21 zeigten dahingegen, dass das Zytokin diejenigen B-Zellen induzieren kann, die für eine T-Zell-abhängige Antwort verantwortlich sind (Suto et al., 2002; Jin et al., 2004). Eine geringere Sensibilität gegenüber IL-21 könnte demnach die notwendige T-Zell-unabhängige Immunantwort unterstützen. Diese Aussage wird durch unsere experimentellen Ergebnisse vor dem Hintergrund, dass die MZ B-Zellen für eine entgegengesetzte Antwort verantwortlich sind, gestützt. MZ B-Zellen können sich dem Einfluss von IL-21 entziehen, indem sie dessen Rezeptor runterregulieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die von MZ B-Zellen erfüllte Funktion für eine erfolgreiche Schwangerschaft unabdingbar ist und sie sich durch die Fähigkeit einer Verminderung ihrer Expression an IL-21R auf ihrer Oberfläche auszeichnen.

6.1.1. Eintritt in Apoptose oder Proliferation in Abhängigkeit von der IL-21R Expression

Die geringe Sensibilität der MZ B-Zellen gegenüber IL-21 konnte durch das Experiment, in dem wir den Zelltod der Zellen überprüften, von einem anderen Blickwinkel aus betrachtet werden. Obwohl IL-21 in vielen vorangegangenen Arbeiten aufgrund seines Zusammenhangs mit Autoimmunkrankheiten zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt wird, sind pleiotrope Effekte (Proliferation und Apoptose) über B-Zellen bekannt (Spolski and Leonard, 2014).

In Kombination mit einem kostimulierenden T-Zell Signal (T-Zell-abhängige Aktivierung) stimuliert IL-21 die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen (Foster et al., 2000; Jin et al., 2004; Ozaki et al., 2004; Spolski and Leonard, 2014). Während im Falle eines fehlenden T-Zell Signals (T-Zell-unabhängige Aktivierung) oder wenn ein Signal vorliegt, das vom TLR gesendet wurde, induziert IL-21 jedoch bei den B-Zellen einen Eintritt in die Apoptose (Jin et al., 2004; Jin and Malek, 2006; Spolski and Leonard, 2014).

Ruffin et al. untersuchten den IL-21R von B-Zellen während einer HIV-1-Infektion und konnten auch in diesem Fall eine positive Korrelation zwischen der Rezeptorexpression und dem Eintritt von B-Zellen in die Apoptose feststellen (Ruffin et al., 2012). Eine

weitere Arbeit legte den Fokus auf die MZ B-Zellen und konnte bei Mäusen während einer chronischen Erkrankung einen IL-21 vermittelten Eintritt in den Zelltod feststellen (Tortola et al., 2010).

Der Ansatz einer Zellkultur unter T-Zell-abhängigen bzw. T-Zell-unabhängigen Bedingungen bildete die Grundlage, um beide möglichen Effekte von IL-21 auf B-Zellen zu studieren. Der Literatur folgend war zu erwarten, dass die mit LPS und anti-IgM stimulierten B-Zellen durch den Einfluss von IL-21 vermehrt zur Apoptose neigen (T-Zell-unabhängige Aktivierung), wohingegen durch eine Stimulation mit anti-CD40 (T-Zell-abhängige Aktivierung) eine Proliferationssteigerung dieser Zellen erwartet wird.

Bezüglich des erwarteten vermehrten Zelltodes zeigten die Ergebnisse, dass die relative Häufigkeit des Zelltodes und der Eintritt in diesen von der Kombination aus IL-21 und den verwendeten Stimulantien abhängig ist und sich im Vergleich von schwangeren und nicht-schwangeren Mäusen unterscheidet. So zeigten die B-Zellen von den schwangeren Mäusen (GPOM und PPOM) unter IL-21 bei einer vorherigen Stimulation mit LPS einen vermehrten Zelltod, wodurch frühere Arbeiten bestätigt werden konnten (Clark et al., 2002). In der Gruppe der NPM kam es durch die Stimulation zu keinem Anstieg der Zelltode. Im Falle der PPOM scheint eine Hochregulierung des IL-21R die Sensibilität von B-Zellen gegenüber dem Zytokin zuzunehmen, wodurch diese vermehrt in den Zelltod eintreten. Bei den B-Zellen der GPOM kann das Ergebnis jedoch in den Kontext des aktuellen Wissensstandes eingeordnet werden.

Danach konnte bereits gezeigt werden, dass im Verlauf einer Schwangerschaft das Immunsystem eine Adaptation durchläuft, infolgedessen es zu einer Abnahme der B-Zellen in der Milz kommt (Muzzio et al., 2014a). Der hierfür zugrundeliegende Mechanismus ist dabei noch nicht geklärt, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass vielmehr der umfassende Prozess einer Schwangerschaft, als weniger die Stimulation durch IL-21 den Zelltod bei diesen B-Zellen verursacht haben kann.

Für eine genauere Betrachtung des Weges, der zum Zelltod führte, diente die durchgeführte Apoptosemessung. Bezüglich des Einflusses des proinflammatorischen Zytokins IL-21 auf die Apoptose von B-Zellen, gibt es umfangreiche Untersuchungen. So konnte bereits die Signalkaskade als Bim-abhängig identifiziert werden, die nach Bindung an den IL-21R initiiert wird (Jin et al., 2004). Bei Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) handelt es sich um ein proapoptotisches mitochondriales Protein. Die Ergebnisse konnten bezüglich dieser Abhängigkeit eindrucksvolle Unterschiede in den

unterschiedlichen Gruppen erkennen lassen. Bei den mit LPS behandelten B-Zellen der NPM und PPOM konnte IL-21 eine relevante Zunahme an apoptotischen Zellen bewirken, während die B-Zellen der GPOM diese Veränderung nicht zeigten.

An dieser Stelle lässt sich eine plausible Brücke zwischen einer verminderten Expression von IL-21R und einer parallelen Verringerung des apoptotischen Potentials schlagen, das normalerweise durch IL-21 auf LPS-stimulierte B-Zellen ausgeübt wird. Diese Veränderungen, die B-Zellen während ihrer Adaptationsvorgänge in einer Schwangerschaft durchlaufen, scheint eine Gegenreaktion auf die zu beobachtende B-Zell-Verringerung zu sein. B-Zellen entziehen sich so dem Einfluss, der sie in Richtung Apoptose treiben würde und können somit als erste Abwehrlinie gegen mögliche Pathogene bereitstehen. Für genau diese Aufgabe wurden die MZ B-Zellen bereits identifiziert (Cerutti et al., 2013b). Diese Population zeigte in unserem Experiment den niedrigsten IL-21R Level, womit ein Mechanismus beschrieben werden kann, wie sich MZ B-Zellen dem Einfluss von IL-21 entziehen.

Neben der Induktion der Apoptose bei B-Zellen konnte für IL-21 eine weitere Einflussnahme auf B-Zellen nachgewiesen werden. Demnach ist durch frühere Arbeiten gezeigt worden, dass IL-21 B-Zellen, die zuvor mit der aktivierenden Stimulanz LPS kultiviert worden waren, in ihrer Proliferation gehemmt werden (Jin et al., 2004). Diesen Effekt konnten wir ebenfalls nach 48 h bei den B-Zellen der PPOM beobachten. Eine Bestätigung lieferten die Ergebnisse mithilfe der Charakterisierung des Zellzyklus. Zellen der PPOM und der GPOM, die mit anti-IgM stimuliert worden waren, traten weniger häufig in die G2- und Mitosephase ein. Anti-IgM bindet direkt an den BZR und bewirkt so eine Aktivierung einer B-Zellen.

Wurde in früheren Arbeiten beschrieben, dass IL-21 in Kombination mit anti-IgM eine Aktivierung der B-Zellen bewirkt (Jin et al., 2004), so konnte auch dieser Effekt in den hier vorgelegten Ergebnissen bestätigt werden. B-Zellen schwangerer Mäuse zeigten eine deutliche Zunahme an Proliferation. Bei den PPOM war dieser Effekt besonders stark ausgeprägt, was möglicherweise an der gesteigerten Sensibilität dieser Zellen gegenüber IL-21 liegen könnte. Durch die Ergebnisse aus beiden Gruppen ist jedoch offensichtlich, dass sich die Wirkung von IL-21 auf die B-Zellen während einer Schwangerschaft verändert. Damit kann dem Zytokin IL-21 erneut ein negativer Einfluss für die Zeit während der Schwangerschaft bezüglich der Anpassung der B-Zellen zugesprochen werden.

6.1.2. Produktion von Ig und IL-10 in Abhängigkeit von der IL-21R Expression

Es wurde bereits angemerkt, dass es innerhalb einer Schwangerschaft eine Präferenz bezüglich einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort auf mögliche Pathogene gibt. Diese Antwort wird von MZ B-Zellen gegeben, die sich durch eine Runterregulierung ihrer IL-21R dem Einfluss des Zytokins IL-21 in gewisser Weise entziehen. Dadurch konnte abgeleitet werden, dass IL-21 für eine T-Zell-unabhängige Immunantwort keine Bedeutung hat und tendenziell eher hinderlich ist.

Bekannt ist, dass IL-21 die Differenzierung zu Plasmazellen und die Sekretion von Immunglobulinen induziert, wenn es mit anti-CD40 kombiniert wird (Pène et al., 2004; Ettinger et al., 2005). Bezüglich des Einflusses von IL-21 auf eine Antikörperantwort durch B-Zellen konnte bereits an Mäusen, die defizient für den IL-21R waren, gezeigt werden, dass diese Mäuse nach einer Immunisierung mit Ovalbumin höhere IgE und niedrigere IgG1 Level aufwiesen (Kasaian et al., 2002; Ozaki et al., 2002; Suto et al., 2002).

Des Weiteren ist bekannt, dass eine erfolgreiche Schwangerschaft mit einem Ungleichgewicht zugunsten einer Th2 gesteuerten Immunantwort assoziiert ist (Mor et al., 2011). Dabei produzieren die B-Zellen vermehrt IgG1, IgE und IgA, was durch eine Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-5 durch T-Helfer-Zellen beeinflusst wird.

Unsere Ergebnisse der Experimente zeigten nach einer Stimulation mit IL-21 höhere Level an allen untersuchten Ig-Serotypen in den Seren der PPOM im Vergleich zu den Seren der GPOM. Unter den analysierten Ig befanden sich auch die angeborenen Antikörper IgE und IgA. Zu diesen Ergebnissen waren bereits frühere Arbeiten gekommen, die Mäuse untersuchten, die eine Überexpression an IL-21 aufwiesen (Ozaki et al., 2004). Eine erste Erklärung für das Auftreten erhöhter Ig-Level in den Seren von PPOM konnte eine weitere Arbeitsgruppe bieten, die den Th2 eine vornehmliche IL-21 Sekretion zuschrieb (Wurster et al., 2002). Aus den dort dargelegten Ergebnissen geht eher ein quantitativer als ein qualitativer Einfluss von IL-21 auf die Ig-Produktion der B-Zellen aus, ohne dass hierbei gleichzeitig zwischen einer normalen und fehlerhaften Schwangerschaft unterschieden werden kann. Welche Bedeutung einer genauen Charakterisierung der Ig während einer Schwangerschaft zukommt, machen Shakerian et al. deutlich. Sie fanden im Serum von Frauen mit wiederholten Fehlgeburten reduzierte Level an IgG4 (Shakerian et al., 2020). Nach einer monatlichen

intravenösen Gabe von Ig hatten die Frauen erfolgreiche Schwangerschaften (Shakerian et al., 2020).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von IL-21 auf die IL-10 Produktion der B-Zellen untersucht, indem die Zellen zuvor mit LPS stimuliert worden waren. LPS gilt für sich als starker Stimulus für die IL-10 Produktion (Berg et al., 1995). Obwohl die B-Zellen der GPOM eine niedrigere Expression an IL-21R im Vergleich zu den B-Zellen der PPOM aufwiesen, konnte IL-21 bei so vorbehandelten B-Zellen der GPOM eine IL-10 Expression induzieren. Eine solche Induktion konnte bei den B-Zellen der PPOM nicht gesehen werden. Damit konnten frühere Ergebnisse, die für das verwendete Mausmodell bekannt waren, bestätigt werden. Demnach produzierten B-Zellen von CBA/J Weibchen, die mit Balb/c Männchen verpaart worden waren, deutlich höhere Level an IL-10, als es bei gleichen Weibchen, die aber mit DBA/J Männchen verpaart worden waren, der Fall war (Chaouat et al., 2005). Unsere Daten deuten in Abhängigkeit des Ausgangs einer Schwangerschaft darauf hin, dass IL-10-produzierende B-Zellen durch die Reduktion ihres IL-21R vor dem durch IL-21 geförderten Apoptose-Eintritt geschützt sind.

Eine weitere Erklärung für unserer Ergebnisse erhält man durch vorangegangene Arbeiten, die IL-10 mit einem erfolgreichen Ausgang einer Schwangerschaft in Verbindung bringen. Hier wird beschrieben, dass das Fehlen von IL-10 bei schwangeren Mäusen eine fetale Resorption, eine Wachstumsretardierung oder sogar einen Tod des Fötus verursacht (Chaouat et al., 2005; Murphy et al., 2005; Robertson et al., 2007). IL-10 ist ein stark antiinflammatorisches Zytokin (Moore et al., 2001; Hawrylowicz and O'Garra, 2005; Ng et al., 2013), das eine während einer Schwangerschaft ablaufende Entzündung auf ein gesundes Maß begrenzt und damit den erfolgreichen Ausgang dieses Prozesses mitverantwortet.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine verminderte Produktion von IL-21 oder die verminderte Sensibilität von B-Zellen gegenüber diesem Zytokin zu einer Aufrechterhaltung der Subpopulation an IL-10 produzierenden B-Zellen führt und damit zu einer erfolgreichen Schwangerschaft beiträgt.

6.1.3. Expression von Oberflächenmarkern CD69, MHCII, CD80 und CD86 in Abhängigkeit von der IL-21R Expression

Die positiven Effekte, die MZ B-Zellen auf einen positiven Ausgang einer Schwangerschaft ausüben, stehen nicht im Widerspruch zu ihrer Zunahme in absoluten Zahlen und zur verminderten Expression an IL-21R. Tfh-Zellen wurden aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu MZ B-Zellen mit Schwangerschaften in Verbindung gebracht, wobei deren genaue Funktion noch nicht ausreichend erforscht ist. Als IL-21-produzierende Zellen sollten sie als Quelle des von uns untersuchten Zytokins betrachtet und analysiert werden. Bevor diese B-Zell/Tfh-Zell-Interaktion näher beleuchtet werden sollte, wurde der Effekt von IL-21 auf die Expression weiterer Oberflächenmoleküle untersucht. Diese Oberflächenmoleküle sind für die Antigenpräsentation innerhalb einer Interaktion entscheidend.

Obwohl bezüglich des Einflusses von IL-21 auf die Expression der Oberflächenmoleküle keine Unterschiede gesehen werden konnten und alle in ähnlicher Weise auf die Stimulation reagierten, stach ein Molekül innerhalb der mit LPS behandelten Zellen besonders hervor. MHCII ließ in der Gruppe der PPOM eine Hochregulierung erkennen, die sich deutlich von den anderen beiden Gruppen abhob. Diese Hochregulierung an MHCII zeigte eine weitere Arbeit unseres Labors, als die lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems (ILCs) der murinen Milz untersucht wurden. Auch hier kam es bei den PPOM zu einer Hochregulierung, wohingegen die ILCs der GPOM eine Runterregulierung von MHCII erfahren (Einenkel et al., 2020).

Durch MHCII präsentieren B-Zellen das entsprechende Antigen den CD4⁺ T-Helfer Zellen, die dadurch aktiviert werden und nun die B-Zellen in ihrer eigenen Immunantwort beeinflussen. In diesem Fall handelt es sich bei dem stimulierenden Zytokin um IL-21, welches eine Reihe unterschiedlicher Einflüsse auf die Immunantwort der B-Zellen ausüben kann (Jin et al., 2004). Ob die Antwort dabei in Richtung einer Anti- oder Proinflammation läuft, hängt jedoch nicht nur von der Menge des ausgeschütteten Zytokins IL-21 ab, sondern von weiteren kostimulierenden Molekülen (Jin and Malek, 2006; Ozaki et al., 2006; Wu et al., 2016). Eine Immunantwort in Richtung Inflammation konnte auf diesem Weg in früheren Arbeiten gesehen werden (Adler et al., 2017).

In unserer Arbeit zeigten die Ergebnisse neben einer Hochregulation von MHCII auch gleichzeitig eine Runterregulierung weiterer akzessorischer Moleküle. Für die Etablierung einer vollständigen Zell-Zell-Interaktion scheint diese Beobachtung äußerst

untypisch zu sein. Die von uns dargestellte Expression der Oberflächenmoleküle scheint somit als beteiligte Ursache bei der Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen unklar. Die genaue Bedeutung in Bezug auf die Auswirkung auf eine Schwangerschaft, die dieser entgegengesetzten Regulation innewohnt, bedarf weiterer Untersuchungen.

6.2. Anzahl von Tfh-Zellen

Die bislang vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass der Effekt einer Einwirkung von IL-21 auf B-Zellen größer ist, wenn das Antigen, durch welches die B-Zellen stimuliert werden, T-Zell-unabhängig ist. Am deutlichsten fielen die Unterschiede bei B-Zellen der verschiedenen Mausgruppen nach LPS Stimulierung aus. Dass IL-21 eine T-Zell-unabhängigen B-Zell Antwort befördern könnte, wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits postuliert (Jin et al., 2004; Bryant et al., 2007; Yoshizaki et al., 2012). Im Zusammenhang mit der durch IL-21 gesteigerten Produktion an IL-10 in Mäusen mit normalen Schwangerschaften könnte somit ein möglicher Weg aufgezeigt worden sein, der eine IL-10 vermittelte Toleranz herbeiführt.

Gleichzeitig bleibt so das notwendige Potential erhalten, auf Gefahren reagieren zu können. Damit ist der Platz, den IL-10 während einer Schwangerschaft einnimmt, ein weiteres Mal hervorgehoben. Ein unspezifisches Signal ist LPS, das von Gram-negativen Bakterien produziert wird. Vor dem Hintergrund der bereits gewonnenen Erkenntnisse ist LPS für unser Experiment deshalb von Bedeutung, da LPS aus der Mikroflora des Darmtraktes den *Outcome* schwangerer Mäuse beeinflussen kann (Einenkel et al., 2019). Eine Immunantwort, die durch LPS ausgelöst wird, bedrohte eine Schwangerschaft bei Mäusen dahingehend, dass es zu einer Abstoßung des Fötus seitens des mütterlichen Immunsystems kommen kann (Clark et al., 2003).

Neben einer Einflussnahme auf B-Zellen, die zu einer T-Zell-unabhängigen Antwort führt, zeigten die Ergebnisse, dass unterschiedliche IL-21R Expressionen auf B-Zellen existieren. Über diesen Rezeptor besteht ebenfalls eine Möglichkeit, durch die Sekretion von IL-21 Einfluss auf B-Zellen auszuüben. Tfh-Zellen wurden bereits mehrfach als Produzenten von IL-21 angesprochen, wodurch ihnen eine Interaktion mit B-Zellen möglich ist (Ozaki et al., 2002; Bessa et al., 2010; Ma et al., 2012).

Kurz nach Abschluss dieser Arbeit wurde eine Publikation veröffentlicht, die erstmalig den Einfluss der Tfh-Zellen während einer Schwangerschaft bei Mäusen auf den Schwangerschaftsverlauf untersuchte (Zeng et al., 2016). Diese Arbeit stellte eine Assoziation zwischen extrem hohen Level an Tfh-Zellen und der Entstehung von Fehlgeburten dar (Zeng et al., 2016). Nachfolgend konnten die Ergebnisse bestätigt werden (Luan et al., 2017). Der Anstieg an IL-21-produzierenden Zellen lässt abermals auf einen negativen Einfluss einer exzessiven Erhöhung an Tfh-Zellen und IL-21 auf den Ausgang einer Schwangerschaft schließen. Vor diesem Hintergrund ergibt sich ein möglicher Ausblick für folgende Experimente, um den Einfluss der Tfh-Zellen auf B-Zellen noch differenzierter zu betrachten. Somit könnte untersucht werden, inwieweit eine Veränderung der Tfh-Zellanzahl mit einer veränderten Menge an IL-21 zusammenhängt und inwieweit sich dieser Unterschied auf die Interaktion mit den B-Zellen auswirkt.

Die Tfh-Zellen sollten weiterhin die Schnittstelle sein zwischen den aus dem Tiermodell gewonnenen Daten und denen, die aus dem Blut schwangerer und nicht-schwangerer Frauen gewonnen wurden. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden fast ausschließlich humane Tfh-Zellen aus den Tonsillen und dem peripheren Blut gewonnen (Rautajoki et al., 2008). Dem ethischen Aspekt einer Organentnahme folgend, entschieden auch wir uns für peripheres Blut.

Unsere Daten zeigten eine Reduktion der humanen Tfh-Zellen am Beginn einer Schwangerschaft. Nun sind die Tfh-Zellen durch einige Oberflächenmoleküle charakterisiert, die dafür verantwortlich sind, dass diese Zellen im Keimzentrum der sekundär lymphatischen Organe verbleiben, um dort mit den B-Zellen interagieren zu können (Good-Jacobson et al., 2010; Shi et al., 2018). Eine mögliche Erklärung für reduzierte Zellzahlen an Tfh-Zellen im peripheren Blut von schwangeren Probandinnen im Vergleich zu nicht-schwangeren könnte deshalb eine bereits stattgefundene Zellwanderung in Richtung der jeweiligen Zielorgane sein. Damit bleibt die Hypothese, dass eine angemessene Häufung an Tfh-Zellen innerhalb einer Schwangerschaft zu deren erfolgreichen Ausgang beiträgt, wohingegen extrem hohe Level dieser Zellen einen gegenteiligen Effekt zu haben scheinen (Zeng et al., 2016), widerspruchsfrei zu den Messergebnissen der durchgeführten Experimente.

Monteiro et al. zeigten erst kürzlich auf, dass die Anzahl von zirkulierenden Tfh-Zellen vom Menschen von weiteren Faktoren abzuhängen scheint, als sie Tfh-Zellen von

schwangeren und nicht-schwangeren Frauen miteinander verglichen. Festgestellt wurde, dass die Anzahl der Tfh-Zellen bei schwangeren Frauen signifikant höher ist, was mit den ebenfalls höheren Leveln an Östrogen, anti-CMV und anti-Hbs Antikörper korreliert wurde (Monteiro et al., 2017). Vergleicht man diese Erkenntnisse mit den unseren so scheinen sie sich zu widersprechen. Für uns wäre es hierbei interessant gewesen, die untersuchten Frauen ebenfalls auf das Hormon und durchlaufene Infektionen zu untersuchen. Denn möglicherweise liegt hierin die Ursache für den beobachteten Unterschied, der ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Tfh-Zellanzahl hat. Weiterhin konnten auch wir im Verlauf von Schwangerschaften eine ansteigende Tendenz von Tfh-Zellzahlen sehen. In jedem Fall können unsere Daten die Forderung nach einer Erweiterung des Th1/Th2/Th17/Treg Paradigmas (Saito et al., 2010), hin zu einem erweiterten Th1/Th2/Th17/Treg/Tfh Paradigma, unterstützen (Wang et al., 2020).

6.3. Die Bedeutung des IL-21/IL-21R-Systems für die Schwangerschaft

Betrachtet man abschließend alle Daten gemeinsam, so deuten diese darauf hin, dass es während einer Schwangerschaft zu einer Reduktion der IL-21/IL-21R-Produktion bzw. Expression kommen muss, damit ein erfolgreicher Ausgang einer Schwangerschaft Zustandekommen kann. Zytokine bilden dabei das zentrale Bindeglied zwischen vielen einzelnen Einflüssen, deren Bedeutung für eine Schwangerschaft einzeln unter Beweis gestellt wurde. Das Th1/Th2/Th17/Treg Paradigma spricht den beteiligten T-Zell-Subpopulationen und ihrer ausgeglichenen Balance eine enorm große Bedeutung innerhalb einer Schwangerschaft zu (Saito et al., 2010; Li et al., 2013). Inwieweit IL-21 auf diese Balance Einfluss nimmt, ist jedoch noch nicht untersucht, obwohl bekannt ist, dass IL-21 eine Th17 Zellproliferation induzieren und die Entwicklung von Treg reduzieren kann (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007; Zhou et al., 2007). Auch das Vorhandensein des IL-21R auf vielen verschiedenen Zellen des Immunsystems, die innerhalb der Schwangerschaft eine wichtige Rolle einnehmen, bietet viele Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten. In dieser Arbeit wurde postuliert, dass der Einfluss von IL-21 im Rahmen einer Schwangerschaft für mögliche Komplikationen verantwortlich zu machen ist. An anderer Stelle wurde die therapeutische Blockierung des IL-21R bereits an verschiedenen Tiermodellen und in klinischen Versuchen getestet (Spolski and Leonard, 2014). Andere Arbeiten, die IL-21R *knock-out* Mäuse untersuchten,

sprechen im Sinne einer Schwangerschaft für den Nutzen einer IL-21R Blockierung, da die Gesundheit und Fertilität dieser IL-21R *knock-out* Mäuse durch die Blockierung nicht beeinträchtigt war (Collins et al., 2003). Auch die Entwicklung der NK Zellen in diesen Mäusen war ohne Auffälligkeiten (Collins et al., 2003). Ob diese Blockierung auch ein mögliches Werkzeug darstellt problematische Schwangerschaften zu behandeln erfordert dringend weitere Forschungen.

6.4. Die Methoden und ihre Limitationen

Nachdem wir mittels der FACS-Analyse signifikante Unterschiede bezüglich der Tfh-Zellzahlen innerhalb der verschiedenen Mausgruppen beobachtet hatten, sollten diese Ergebnisse anhand anderer Untersuchungsmethoden reproduziert werden. Dabei sollte mit Hilfe der Immunfluoreszenz ein genaueres Bild über die Verteilung und Anordnung der Tfh-Zellen erstellt werden, womit die Charakterisierung dieser Zellen hinsichtlich ihrer Interaktion mit den B-Zellen vorangetrieben werden sollte. Hierfür wurden Schnitte von murinen Milzen verwendet. Für die Färbungen kamen 4 Antikörper (PD-1, IgD, PNA, CD4) zum Einsatz, deren Konzentration wir laut Angaben des Herstellers wählten. Obwohl ein bereits etabliertes Färbeprotokoll einer früheren Arbeit verwendet wurde (Yusuf et al., 2014), konnten so keine zufriedenstellenden Bilder erzeugt werden. Für nachfolgende Arbeiten in diesem Labor wäre es wünschenswert, dass die Optimierung des Färbeprotokolls gelingt und die bereits hergestellten Schnitte bezüglich einer weiteren Charakterisierung der Tfh/B-Zell Interaktion untersucht werden kann.

Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Multiphotonenmikroskops oder eines Konfokalmikroskops. In anderen Arbeitsgruppen konnte auf diese Weise sogar eine dynamische Darstellung der Tfh-Zell-Bewegung innerhalb des Keimzentrums und die anschließende Interaktion mit B-Zellen dargestellt werden (Miller et al., 2003; Qi et al., 2006; Allen et al., 2007; Xu et al., 2013; Liu et al., 2015). Die Tatsache, dass diese Generation der Mikroskopie eine Untersuchung der jeweiligen Strukturen *in vivo* ermöglicht, stellt für zukünftige Forschungsfragen einen großen Gewinn dar, weil so direkte Untersuchungen am Objekt in den Vordergrund rücken können und die Notwendigkeit des Umweges über Tierversuche teilweise entbehrlich wird.

6.5. Das Mausmodell, seine Limitationen und dessen Translation auf den Menschen

Als Grundlage aller hier durchgeführten Experimente diente ein bereits gut untersuchtes Mausmodell, bei dem es zu immunologisch vermittelten Fehlgeburten kommt und welches für die Erforschung von Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. Wachstumsretardierung verwendet wurde. In diesem Modell werden weibliche CBA/2J (H2^k) Mäuse mit DBA/c (H2^d) Männchen verpaart. Diese Stämme sind in etwa der Hälfte ihrer Genloci identisch und zeigten in ersten Untersuchungen eine geringe Rate bezüglich des Zustandekommens von Schwangerschaften (Clark et al., 1980). Die Ursache wurde sehr bald in einer Fehlregulation des Immunsystems vermutet, weshalb dieses Modell im Folgenden vor allem für die immunologische Erforschung von Schwangerschaftskomplikationen Verwendung fand. Weitere Experimente zur Erforschung dieses Modells konnte zeigen, dass es im Falle einer Schwangerschaft zu einer abnormalen Formation des Synzytiums (Gendron and Baines, 1988) und zu einer ausgeprägten Infiltration verschiedener Immunzellen kommt, worin sich diese Schwangerschaften anderer Mausstämmen unterscheiden. Infolge dieser Vorgänge ergeben sich Aborte, die in einer fetalen Resorption enden. Diese Resorption konnte anhand einer dunklen, kleineren und nekrotischen fötalen plazentaren Einheit ausgemacht werden und der Zeitpunkt für das Eintreten der Aborte wurde mit dem Tag 10 bis 12 der Schwangerschaft beschrieben.

In unserem Fall fand die Organentnahme aus den Mäusen am Tag 14 der Schwangerschaft statt. Zu diesem Zeitpunkt konnte die fötale Resorption auch bereits in diesen Mäusen beobachtet werden. Jedoch lag die Rate dieser Fälle des Öfteren unter den mitgeteilten und in der Versuchsplanung angestrebten 20 %. Auch andere Arbeiten hatten diesen Fakt bereits mitgeteilt und mit unterschiedlichen Haltungsbedingungen in Verbindung gebracht. Der Anteil an fötalen Resorptionen zeigte demnach häufig eine hohe Variabilität und befand sich laut Clark et al. zwischen 10 % und 80 % in Bezug auf die Gesamtanzahl an fötalen plazentaren Einheiten (Clark et al., 2003).

Eine mögliche Ursache für die zu geringen Raten könnte sein, dass die fötale Resorption am Tag 14 bereits so weit fortgeschritten war, dass sie nicht mehr eindeutig als solche zu erkennen war. Sofern die Resorption nur noch als eine Anhäufung von Blut sichtbar ist, kann sie pathologisch keiner Resorption mehr zugeordnet werden. Da es sich beim Abort jedoch um nur eine mögliche Schwangerschaftskomplikation handelt,

wurde das Gewicht der Feten ermittelt, um eine intrauterine Wachstumsretardierung als weitere Komplikation feststellen zu können.

Beim Vergleich der GPOM und PPOM Mausgruppen ergaben sich eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Fötus-Gewichte. So zeigten die Föten der Anpaarungen, die zu den immunologisch induzierten Komplikationen führen sollten, im Durchschnitt ein signifikant geringeres Gewicht ($157,0 \pm 6,124$ g), als die Feten der CBA/2J ($H2^k$) \times BALB/c ($H2^d$) Anpaarung ($177,0 \pm 5,574$ g).

Nach Abschluss unserer Experimente etablierten Zeng et al. ein weiteres Mausmodell (BALB/c ($H2^d$) Weibchen \times C57BL/6 Männchen), mit dessen Hilfe sie die follikulären regulatorischen T-Zellen während einer Schwangerschaft untersuchen wollten (Zeng et al., 2020). Ein Vergleich der Fötus-Gewichte beider Mausmodelle wäre für uns eine Bestätigung der Aussagekraft unseres Mausmodells, dahingehend, dass nicht nur die fötale Resorption, sondern auch ein geringeres Fötus-Gewicht für eine problematische Schwangerschaft spricht.

Ein entscheidender Vorteil in der Verwendung von Mäusen ergibt sich aus der Möglichkeit einer Organentnahme. Weiterhin ist es möglich eine Standardisierung des Versuchsaufbaus zu gewährleisten, wodurch Versuche wiederholt und Ergebnisse reproduziert werden können.

Bezüglich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sind, im Hinblick auf das verwendete Mausmodell, bereits einige Kritikpunkte bekannt. So kann das Modell nur für die erste Schwangerschaft angewendet werden, da in nachfolgenden Schwangerschaften das Auftreten der nekrotischen fetalen Einheiten nicht mehr beobachtet werden konnte (Singh et al., 2011). Das lässt den Gedanken aufkommen, inwieweit das Modell dann überhaupt für wiederkehrende Fehlgeburten beim Menschen Anwendung finden kann. Des Weiteren wurde bereits angemerkt, dass das Modell der Mäuse nicht auf schwangere Frauen übertragen werden kann, die innerhalb des ersten Trimesters eine Fehlgeburt erleiden, weil in den Experimenten die Zeitspanne der Schwangerschaft zu etwa 70% durchlebt wurde.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass das CBA/2J ($H2^k$) \times DBA/c ($H2^d$) C Modell ein gutes Potenzial besitzt, um die Vorgänge um das mütterliche Immunsystem aufzuzeigen, mit denen es auf die neue Umgebung innerhalb einer Schwangerschaft reagiert. Mit Hilfe dieses Modells konnten bereits viele zelluläre und humorale Einflüsse, die während einer Schwangerschaft eine Rolle spielen, um sich auf die

neuen Gegebenheiten anzupassen und somit letzten Endes den erfolgreichen Ausgang einer Schwangerschaft zu bedingen, entdeckt werden. Auch können damit weiterhin einzelne Akteure des angeborenen aber auch erworbenen Immunsystems charakterisiert und in ihrer jeweiligen Bedeutung untersucht werden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse werden eine selektionierte Grundlage für weitere Annahmen geben, die im Nachfolgenden dann am Menschen in ausgewählter Weise untersucht werden müssen.

Erst kürzlich wurden die Immunreaktionen während einer Schwangerschaft in Bezug auf mögliche Impfungen für den klinischen Alltag erneut in den Fokus gerückt (Vermillion and Klein, 2018). Die Arbeitsgruppe verwies auf die Risikostellung, die sowohl schwangere Frauen, der ungeborene Fötus, als auch Neugeborene einnehmen. Durch das entweder veränderte oder noch nicht ausgereifte Immunsystem sind alle Beteiligten viel anfälliger für Infektionen. Das Ziel von Vermillion et al. war es, den Zeitpunkt einer möglichen Impfung gegen einige Infektionen auf den bestmöglichen Zeitpunkt während der Schwangerschaft zu terminieren. Im besten Fall sollte so gleichzeitig ein Schutz für alle drei Risikogruppen ermöglicht werden. In der Arbeit wurde mehrmals auf die Wichtigkeit eines umfassenden Verständnisses über die Immunreaktionen und einzelnen Akteure des Immunsystems hingewiesen.

Auch das Robert Koch Institut nahm in Bezug auf die Impfung während der Schwangerschaft, vor dem Hintergrund neuer Studienergebnisse, Veränderungen vor. 2020 veröffentlichte die STIKO im Epidemiologischen Bulletin eine überarbeitete Empfehlung in Bezug auf die Pertussisimpfung. Verschiedene Studien hatten ergeben, dass die Pertussis-spezifischen Antikörperkonzentrationen bei einem Großteil schwangerer Frauen sehr niedrig seien (Healy et al., 2004; Gonik et al., 2005; Smallenburg et al., 2014). Ein Schutz des Neugeborenen durch diaplazentar übertragene Antikörper sei demnach nicht gegeben (Shakib et al., 2010; Smallenburg et al., 2014). Würde die Mutter jedoch während der Schwangerschaft geimpft werden, so sei die Konzentration bei ihr und beim Neugeborenen signifikant höher (Gall et al., 2011; Hardy-Fairbanks et al., 2013). Die überarbeitete Empfehlung der STIKO sieht deshalb neuerdings eine Impfung mit dem Tdap-Kombinationsimpfstoff während der Schwangerschaft vor, um eine Reduzierung von Erkrankungen, Hospitalisierungen und Todesfällen durch Infektionen mit *Bordetella pertussis* bei Neugeborenen und jungen Säuglingen zu bewirken. Infolge unserer Untersuchungsergebnisse sollte eine Arbeitsgruppe der STIKO klären,

wann ein geeigneter Zeitpunkt einer Pertussisimpfung während einer Schwangerschaft existiert (Vygen-Bonnet et al., 2020).

Das Beispiel zeigt eindrücklich wie wichtig das Wissen über die genauen Abläufe innerhalb des Immunsystems während der Schwangerschaft ist. Nur so wird es gelingen den genauen Zeitpunkt einer Impfung auszumachen, um auf der einen Seite die Mutter und auf der anderen Seite den Fötus bzw. das Neugeborene bestmöglich zu schützen.

7. Zusammenfassung

IL-21 gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und ermöglicht als löslicher Botenstoff eine Interaktion zwischen verschiedenen Zellen innerhalb des Immunsystems. Unlängst wurde die Rolle von IL-21 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beschrieben. Dabei kommt es zur Fehlregulation des Immunsystems, so dass infolge körpereigene Strukturen bekämpft werden. Während einer Schwangerschaft kommt es zu umfassenden Anpassungsvorgängen innerhalb des Immunsystems, wobei mögliche Fehlregulationen sowohl für die Mutter als auch für den Fötus verschiedene Komplikationen mit sich bringen kann. Inwieweit IL-21 innerhalb dieser Vorgänge und letzten Endes für den erfolgreichen Ausgang einer Schwangerschaft von Bedeutung ist, ist bislang unbekannt und ist Gegenstand der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungsergebnisse.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass B-Zellen der verschiedenen Mausgruppen (NPM=nicht schwanger, GPOM=normale Schwangerschaften und PPOM=komplizierte Schwangerschaften) unterschiedlich sensibel auf IL-21 reagieren. Diese Beobachtung fußt auf unterschiedlicher Verteilung des IL-21R. Demnach exprimieren B-Zellen der GPOM-Gruppe niedrigere Level an IL-21R, deren Beeinflussung durch das Zytokin IL-21 als gering zu beurteilen ist und deshalb nachfolgend relativ seltener in die Apoptose eintreten. Die größten Differenzen bezüglich der Rezeptorexpression konnten innerhalb der MZ B-Zellen beobachtet werden. MZ B-Zellen wird bereits in früheren Arbeiten eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Schwangerschaft zugeschrieben.

Mittels immunologischer Methoden wurde weiterhin die Produktion von IL-10 untersucht, die bei GPOM am höchsten war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in dieser Situation B-Zellen sich durch eine Herunterregulierung ihrer IL-21R dem Einfluss des Zytokins entziehen und nachfolgend für eine vermehrte Produktion von IL-10 zur Verfügung stehen. Auch IL-10 konnte bereits als ein für eine erfolgreiche Schwangerschaft förderlicher Faktor identifiziert werden.

Als mögliche Quelle von IL-21 und aufgrund der räumlichen Nähe zu den MZ B-Zellen wurden Tfh-Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass diese Zellen gehäuft in der PPOM-Gruppe vorkommen, wodurch auch diese T-Zell Subpopulation für den Ausgang einer Schwangerschaft mit verantwortlich sein kann. Alle Ergebnisse dieser Arbeit sprechen in der Zusammenschau dafür, dass es

zu einer Reduktion des IL-21/IL-21R-Systems kommen muss, um einen erfolgreichen Ausgang der Schwangerschaft zu gewährleisten. Aus diesem Grund sollte auf der einen Seite das IL-21/IL-21R-System verstärkt in den Fokus künftiger Forschung rücken und auf der anderen Seite ist gleichzeitig eine Erweiterung des für eine Schwangerschaft bestehenden Th1/Th2/Th17/Treg Paradigmas um Tfh-Zellen angezeigt.

8. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: IL-21 BEEINFLUSST DEN IGM-VERMITTELTEN EINTRITT VON CD19 ⁺ -ZELLEN IN DIE G2/S+M PHASE	- 54 -
ABBILDUNG 2: IL-21 BEEINFLUSST DIE ZELLPROLIFERATION DER CD19 ⁺ -ZELLEN	- 56 -
ABBILDUNG 3: IL-21 BEGÜNSTIGT DEN LPS-VERMITTELTEN ZELLTOD VON SCHWANGEREN MÄUSEN	- 58 -
ABBILDUNG 4: IL-21 BEGÜNSTIGT DIE LPS-VERMITTELTE APOPTOSE VON B-ZELLEN IN NPM UND PPOM	- 60 -
ABBILDUNG 5: IL-21 BEEINFLUSST DIE PRODUKTION VERSCHIEDENER IMMUNGLOBULINE DURCH CD19 ⁺ -ZELLEN	- 62 -
ABBILDUNG 6: PRODUKTION VON IL-10 UND IL10 MRNA EXPRESSION IN CD19 ⁺ -ZELLEN NACH STIMULATION MIT IL-21	- 64 -
ABBILDUNG 7: DIE IL-21R EXPRESSION VON B-ZELLEN IST IN PPOM HÖHER ALS IN GPOM	- 67 -
ABBILDUNG 8 A+B: IL-21 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON CD69 AUF CD19 ⁺ -ZELLEN.....	- 70 -
ABBILDUNG 8 C+D: IL-21 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON MHCII AUF CD19 ⁺ -ZELLEN...	- 70 -
ABBILDUNG 8 E+F: IL-21 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON CD80 AUF CD19 ⁺ -ZELLEN.....	- 70 -
ABBILDUNG 8 G+H: IL-21 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON CD86 AUF CD19 ⁺ -ZELLEN	- 70 -
ABBILDUNG 9: ANZAHL AN TFH-ZELLEN IN MÄUSEN	- 75 -
ABBILDUNG 10: REDUZIERUNG DER TFH-ZELLEN BEI SCHWANGEREN FRAUEN	- 77 -
ABBILDUNG 11: IMMUNFLUORESCENZBILD EINES KEIMZENTRUM IN DER MURINEN MILZ ..	- 79 -

9. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: CD4+-T-ZELL UNTERGRUPPEN	- 7 -
TABELLE 2: SUBSTANZEN UND IHRE FLUOROCHROME FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE	- 33 -
TABELLE 3: IMMUNGLOBULINE UND LOD-WERT	- 36 -
TABELLE 4: MASTER-MIX FÜR REVERSE TRANSKRIPTION	- 39 -
TABELLE 5: MASTER-MIX FÜR PRIMER	- 40 -

10. Literaturverzeichnis

1. Vygen-Bonnet, S., Hellenbrand, W., Garbe, E., Röbl-Mathieu, M., von Kries, R., Bogdan, C., et al. (2020). Epidemiologisches Bulletin STIKO: Empfehlung der Pertussisimpfung in der Schwangerschaft. Berlin doi:10.25646/6584.
2. Adler, L. N., Jiang, W., Bhamidipati, K., Millican, M., Macaubas, C., Hung, S. chen, et al. (2017). The other function: Class II-restricted antigen presentation by B cells. *Frontiers in Immunology* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00319.
3. Ahmed, A., Singh, J., Khan, Y., Seshan, S. v., and Girardi, G. (2010). A New Mouse Model to Explore Therapies for Preeclampsia. *PLoS ONE* 5, e13663. doi:10.1371/journal.pone.0013663.
4. Allen, C. D. C., Okada, T., Tang, H. L., and Cyster, J. G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315. doi:10.1126/science.1136736.
5. Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 20, 149–157. doi:10.1016/j.coi.2008.03.014.
6. Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Förster, R., Sedgwick, J. D., et al. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309–314. doi:10.1038/35018581.
7. Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D., et al. (2001). Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167, 1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418623> [Accessed May 4, 2018].
8. Ashkar, A. A., di Santo, J. P., and Croy, B. A. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *The Journal of experimental medicine* 192, 259–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899912> [Accessed May 4, 2018].
9. Berg, D. J., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Menon, S., Davidson, N., et al. (1995). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *Journal of Clinical Investigation* 96. doi:10.1172/JCI118290.

10. Bessa, J., Kopf, M., and Bachmann, M. F. (2010). Cutting Edge: IL-21 and TLR Signaling Regulate Germinal Center Responses in a B Cell-Intrinsic Manner. *The Journal of Immunology* 184. doi:10.4049/jimmunol.0903949.
11. Bonney, E. A., and Brown, S. A. (2014). To drive or be driven: the path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction (Cambridge, England)* 147, R153-67. doi:10.1530/REP-13-0583.
12. Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., et al. (2000). Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1545–1552. doi:10.1084/jem.192.11.1545.
13. Bryant, V. L., Ma, C. S., Avery, D. T., Li, Y., Good, K. L., Corcoran, L. M., et al. (2007). Cytokine-Mediated Regulation of Human B Cell Differentiation into Ig-Secreting Cells: Predominant Role of IL-21 Produced by CXCR5 + T Follicular Helper Cells. *The Journal of Immunology* 179. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8180.
14. Bubier, J. A., Sproule, T. J., Foreman, O., Spolski, R., Shaffer, D. J., Morse, H. C., et al. (2009). A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 1518–1523. doi:10.1073/pnas.0807309106.
15. Cappelletti, M., della Bella, S., Ferrazzi, E., Mavilio, D., and Divanovic, S. (2016). Inflammation and preterm birth. *Journal of Leukocyte Biology* 99. doi:10.1189/jlb.3mr0615-272rr.
16. Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013a). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 13, 118–132. doi:10.1038/nri3383.
17. Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013b). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 13, 118–132. doi:10.1038/nri3383.
18. Chaouat, G., Lédée-Bataille, N., Zourbas, S., Ostojic, S., Dubanchet, S., Martal, J., et al. (2003). Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 50, 177–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629021> [Accessed May 3, 2018].
19. Chaouat, G., Meliani, A. A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliot, J., Mosmann, T., et al. (2005). IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating

- combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- τ . *The Journal of Immunology* 175. doi:10.4049/jimmunol.175.5.3447-d.
20. Chaouat, G., Zourbas, S., Ostojic, S., Lappree-Delage, G., Dubanchet, S., Ledee, N., et al. (2002). A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of reproductive immunology* 53, 241–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11730920> [Accessed May 4, 2018].
21. Chatterjee, P., Chiasson, V. L., Bounds, K. R., and Mitchell, B. M. (2014). Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Frontiers in Immunology* 5, 253. doi:10.3389/fimmu.2014.00253.
22. Cheng, S.-B., and Sharma, S. (2015). Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 73, 487–500. doi:10.1111/aji.12329.
23. Choi, J.-Y., Seth, A., Kashgarian, M., Terrillon, S., Fung, E., Huang, L., et al. (2017). Disruption of Pathogenic Cellular Networks by IL-21 Blockade Leads to Disease Amelioration in Murine Lupus. *The Journal of Immunology* 198, 2578–2588. doi:10.4049/jimmunol.1601687.
24. Clark, D. A., Chaouat, G., Clark, D. A., and Gorczynski, R. M. (2002). Thinking outside the box: Mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *American Journal of Reproductive Immunology* 47, 275–282. doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01093.x.
25. Clark, D. A., Chaput, A., and Tutton, D. (1986). Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 136, 1668–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2936806> [Accessed May 4, 2018].
26. Clark, D. A., Mcdermott, M. R., and Szewczuk, M. R. (1980). Impairment of Host-versus-Graft Reaction in Pregnant Mice. 118, 106–118.
27. Clark, D. A., Yu, G., Arck, P. C., Levy, G. A., and Gorczynski, R. M. (2003). MD-1 is a critical part of the mechanism causing Th1-cytokine-triggered murine fetal loss syndrome. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 49, 297–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12854734> [Accessed May 4, 2018].

28. Collins, M., Whitters, M. J., and Young, D. A. (2003). IL-21 and IL-21 Receptor: A New Cytokine Pathway Modulates Innate and Adaptive Immunity. *Immunologic Research* 28. doi:10.1385/IR:28:2:131.
29. Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annual Review of Immunology* 29, 621–663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400.
30. Croy, B. A., Esadeg, S., Chantakru, S., van den Heuvel, M., Paffaro, V. A., He, H., et al. (2003). Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *Journal of reproductive immunology* 59, 175–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12896821> [Accessed May 4, 2018].
31. Dam, E. M., Maier, A. C., Hocking, A. M., Carlin, J., and Buckner, J. H. (2018). Increased binding of specificity protein 1 to the IL21R promoter in B cells results in enhanced B cell responses in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01978.
32. de Toter, D., Meazza, R., Zupo, S., Cutrona, G., Matis, S., Colombo, M., et al. (2006). Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 107. doi:10.1182/blood-2005-09-3535.
33. Delacher, M., Schmidl, C., Herzig, Y., Breloer, M., Hartmann, W., Brunk, F., et al. (2019). Rbpj expression in regulatory T cells is critical for restraining TH2 responses. *Nature Communications* 10. doi:10.1038/s41467-019-09276-w.
34. Deller, T., Kummer, Wolfgang., and Welsch, U. 1940- (2018). *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage. München: Elsevier, Urban et Fischer Available at: <https://www.lehmanns.de/shop/medizin-pharmazie/29905478-9783437444333-sobotta-lehrbuch-histologie> [Accessed May 30, 2018].
35. Donnadieu, E., Reisinger, K. B., Scharf, S., Michel, Y., Bein, J., Hansen, S., et al. (2020). Landscape of T Follicular Helper Cell Dynamics in Human Germinal Centers. *The Journal of Immunology* 205. doi:10.4049/jimmunol.1901475.
36. Doster, A., Schwarzig, U., Zygmunt, M., Rom, J., Schütz, F., and Fluhr, H. (2016). Unfractionated heparin selectively modulates the expression of CXCL8, CCL2 and CCL5 in endometrial carcinoma cells. *Anticancer Research* 36.

37. Einenkel, R., Ehrhardt, J., Hartmann, K., Krüger, D., Muzzio, D. O., and Zygmunt, M. (2020). Hormonally controlled ILC antigen presentation potential is reduced during pregnancy. *Reproduction* 160. doi:10.1530/REP-19-0554.
38. Einenkel, R., Zygmunt, M., and Muzzio, D. O. (2019). Microorganisms in the healthy upper reproductive tract: from denial to beneficial assignments for reproductive biology. *Reproductive Biology* 19. doi:10.1016/j.repbio.2019.04.001.
39. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35. doi:10.1080/01926230701320337.
40. Ettinger, R., Sims, G. P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y. S., Spolski, R., et al. (2005). IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology* 175. doi:10.4049/jimmunol.175.12.7867.
41. Fadeel, B., and Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine* 258, 479–517. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
42. Fan, X., Lin, C., Han, J., Jiang, X., Zhu, J., and Jin, T. (2015). Follicular Helper CD4⁺ T Cells in Human Neuroautoimmune Diseases and Their Animal Models. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–11. doi:10.1155/2015/638968.
43. Foster, D., Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., et al. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63. doi:10.1038/35040504.
44. Gall, S. A., Myers, J., and Pichichero, M. (2011). Maternal immunization with tetanusdiphtheriapertussis vaccine: Effect on maternal and neonatal serum antibody levels. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 204. doi:10.1016/j.ajog.2010.11.024.
45. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. v, et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation* 19, 107–120. doi:10.1038/cdd.2011.96.

46. Gendron, R. L., and Baines, M. G. (1988). Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cellular Immunology* 113, 261–267. doi:10.1016/0008-8749(88)90025-1.
47. Gogada, R., Yadav, N., Liu, J., Tang, S., Zhang, D., Schneider, A., et al. (2013). Bim, a Proapoptotic Protein, Up-regulated via Transcription Factor E2F1-dependent Mechanism, Functions as a Prosurvival Molecule in Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 288, 368–381. doi:10.1074/jbc.M112.386102.
48. Gonik, B., Puder, K. S., Gonik, N., and Kruger, M. (2005). Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in mothers and their newborn infants. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 13. doi:10.1080/10647440500068289.
49. Good-Jacobson, K. L., Szumilas, C. G., Chen, L., Sharpe, A. H., Tomayko, M. M., and Shlomchik, M. J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology* 11. doi:10.1038/ni.1877.
50. Hardy-Fairbanks, A. J., Pan, S. J., Decker, M. D., Johnson, D. R., Greenberg, D. P., Kirkland, K. B., et al. (2013). Immune responses in infants whose mothers received tdap vaccine during pregnancy. *Pediatric Infectious Disease Journal* 32. doi:10.1097/INF.0b013e3182a09b6a.
51. Hawrylowicz, C. M., and O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 5. doi:10.1038/nri1589.
52. Healy, C. M., Munoz, F. M., Rench, M. A., Halasa, N. B., Edwards, K. M., and Baker, C. J. (2004). Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord, and infant serum. *Journal of Infectious Diseases* 190. doi:10.1086/421033.
53. Hedrich, H. J. (2012). *The laboratory mouse*. Academic Press/Elsevier.
54. Helene Packhäuser, K. R., Roman-Sosa, G., Ehrhardt, J., Krüger, D., Zygmunt, M., and Muzzio, D. O. (2017). A kinetic study of CD83 reveals an upregulation and higher production of sCD83 in lymphocytes from pregnant mice. *Frontiers in Immunology* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00486.

55. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2017). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Journal of Immunology* 198. doi:10.1126/science.1079490.
56. Iwamoto, T., Suto, A., Tanaka, S., Takatori, H., Suzuki, K., Iwamoto, I., et al. (2014). Interleukin-21-Producing c-Maf-Expressing CD4+ T Cells Induce Effector CD8+ T Cells and Enhance Autoimmune Inflammation in Scurfy Mice. *Arthritis & Rheumatology* 66, 2079–2090. doi:10.1002/art.38658.
57. Jensen, F., Muzzio, D., Soldati, R., Fest, S., and Zenclussen, A. C. (2013). Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biology of reproduction* 89, 90. doi:10.1095/biolreprod.113.110791.
58. Jin, H., Carrio, R., Yu, A., and Malek, T. R. (2004). Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173, 657–65. doi:10.4049/JIMMUNOL.173.1.657.
59. Jin, H., and Malek, T. R. (2006). Redundant and unique regulation of activated mouse B lymphocytes by IL-4 and IL-21. *Journal of Leukocyte Biology* 80, 1416–1423. doi:10.1189/jlb.0206096.
60. Kasaian, M. T., Whitters, M. J., Carter, L. L., Lowe, L. D., Jussif, J. M., Deng, B., et al. (2002). IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16, 559–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11970879> [Accessed May 4, 2018].
61. Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333. doi:10.1038/333742a0.
62. Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., et al. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448, 484–487. doi:10.1038/nature05970.
63. Krey, G., Frank, P., Shaikly, V., Barrientos, G., Cordo-Russo, R., Ringel, F., et al. (2008). In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice. *Journal of Molecular Medicine* 86, 999–1011. doi:10.1007/s00109-008-0379-2.

64. Kumararatne, D. S., and MacLennan, I. C. M. (1981). Cells of the marginal zone of the spleen are lymphocytes derived from recirculating precursors. *European Journal of Immunology* 11, 865–869. doi:10.1002/eji.1830111104.
65. Lash, G. E., and Ernerudh, J. (2015). Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology* 108, 83–89. doi:10.1016/j.jri.2015.02.003.
66. Lebien, T. W., and Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: How they develop and function. *Blood* 112. doi:10.1182/blood-2008-02-078071.
67. Li, X., Wang, B., Li, Y., Wang, L., Zhao, X., Zhou, X., et al. (2013). The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice. *Journal of Ethnopharmacology* 145. doi:10.1016/j.jep.2012.10.059.
68. Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., et al. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517. doi:10.1038/nature13803.
69. Long, D., Chen, Y., Wu, H., Zhao, M., and Lu, Q. (2019). Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 99, 1–14. doi:10.1016/j.jaut.2019.01.013.
70. Luan, X., Kang, X., Li, W., and Dong, Q. (2017). An investigation of the relationship between recurrent spontaneous abortion and memory T follicular helper cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 78. doi:10.1111/aji.12714.
71. Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M., and Tangye, S. G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 1241–1253. doi:10.1084/jem.20120994.
72. Ma, C. S., and Phan, T. G. (2017). Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. *Immunology* 152. doi:10.1111/imm.12793.
73. Mackay, C. R. (2000). Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of experimental medicine* 192, F31-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104811> [Accessed October 30, 2018].

74. Medina, K. L., Smithson, G., and Kincade, P. W. (1993). Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *The Journal of experimental medicine* 178, 1507–15. doi:10.1084/JEM.178.5.1507.
75. Messaoudi, S., Al-Khateeb, G. M., Dendana, M., Sater, M. S., Jazia, K. B., Nouria, M., et al. (2011). Genetic variations in the interleukin-21 gene and the risk of recurrent idiopathic spontaneous miscarriage. *European Cytokine Network* 22, 123–126. doi:10.1684/ecn.2011.0287.
76. Miller, M. J., Wei, S. H., Cahalan, M. D., and Parker, I. (2003). Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100. doi:10.1073/pnas.2628040100.
77. Monteiro, C., Kasahara, T. M., Castro, J. R., Sacramento, P. M., Hygino, J., Centurião, N., et al. (2017). Pregnancy favors the expansion of circulating functional follicular helper T Cells. *Journal of Reproductive Immunology* 121. doi:10.1016/j.jri.2017.04.007.
78. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
79. Mor, G., Aldo, P., and Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology* 17. doi:10.1038/nri.2017.64.
80. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., and Guller, S. (2011). Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1221, 80–7. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.
81. Murphy, S. P., Fast, L. D., Hanna, N. N., and Sharma, S. (2005). Uterine NK Cells Mediate Inflammation-Induced Fetal Demise in IL-10-Null Mice. *The Journal of Immunology* 175. doi:10.4049/jimmunol.175.6.4084.
82. Muzzio, D. O., Soldati, R., Ehrhardt, J., Utpatel, K., Evert, M., Zenclussen, A. C., et al. (2014a). B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biology of reproduction* 91, 115. doi:10.1095/biolreprod.114.122366.

83. Muzzio, D. O., Soldati, R., Rolle, L., Zygmunt, M., Zenclussen, A. C., and Jensen, F. (2014b). B-1a B cells regulate T cell differentiation associated with pregnancy disturbances. *Frontiers in immunology* 5, 6. doi:10.3389/fimmu.2014.00006.
84. Muzzio, D. O., Ziegler, K. B., Ehrhardt, J., Zygmunt, M., and Jensen, F. (2016). Marginal zone B cells emerge as a critical component of pregnancy well-being. *Reproduction (Cambridge, England)* 151, 29–37. doi:10.1530/REP-15-0274.
85. Nemazee, D. (2021). Natural history of MZ B cells. *Journal of Experimental Medicine* 218. doi:10.1084/JEM.20202700.
86. Neumann, Jürgen. (2008). *Immunbiologie.* , ed. J. Neumann Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-540-72569-5.
87. Ng, T. H. S., Britton, G. J., Hill, E. v., Verhagen, J., Burton, B. R., and Wraith, D. C. (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00129.
88. Nhan-Chang, C.-L., Romero, R., Kusanovic, J. P., Gotsch, F., Edwin, S. S., Erez, O., et al. (2008). A role for CXCL13 (BCA-1) in pregnancy and intra-amniotic infection/inflammation. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 21, 763–775. doi:10.1080/14767050802244946.
89. Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H., and Koren, O. (2016). Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01031.
90. Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483. doi:10.1038/nature05969.
91. Ozaki, K., Hishiya, A., Hatanaka, K., Nakajima, H., Wang, G., Hwu, P., et al. (2006). Overexpression of interleukin 21 induces expansion of hematopoietic progenitor cells. *International Journal of Hematology* 84. doi:10.1532/IJH97.06036.
92. Ozaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P. R., and Leonard, W. J. (2000). Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 11439–11444. doi:10.1073/pnas.200360997.

93. Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., et al. (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173, 5361–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494482> [Accessed May 4, 2018].
94. Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., et al. (2002). A Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science* 298, 1630–1634. doi:10.1126/science.1077002.
95. Pène, J., Gauchat, J.-F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., et al. (2004). Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG₁ and IgG₃ by Human B Cells. *The Journal of Immunology* 172.
96. Pesce, J., Kaviratne, M., Ramalingam, T. R., Thompson, R. W., Urban, J. F., Cheever, A. W., et al. (2006). The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *The Journal of clinical investigation* 116, 2044–55. doi:10.1172/JCI27727.
97. Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S. T. (2005). MARGINAL ZONE B CELLS. *Annual Review of Immunology* 23, 161–196. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728.
98. Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C., and Germain, R. N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312. doi:10.1126/science.1125703.
99. Qi, J. H., Qi, J., Xiang, L. N., and Nie, G. (2015). Association between IL-21 polymorphism and systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Genetics and Molecular Research* 14. doi:10.4238/2015.August.14.22.
100. Racicot, K., Kwon, J. Y., Aldo, P., Silasi, M., and Mor, G. (2014). Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 72. doi:10.1111/aji.12289.
101. Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396. doi:10.1038/24055.

102. Rautajoki, K. J., Kyläniemi, M. K., Raghav, S. K., Rao, K., and Lahesmaa, R. (2008). An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Annals of Medicine* 40. doi:10.1080/07853890802068582.
103. Robertson, S. A., Care, A. S., and Skinner, R. J. (2007). Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biology of Reproduction* 76. doi:10.1095/biolreprod.106.056143.
104. Robson, A., Harris, L. K., Innes, B. A., Lash, G. E., Aljunaidy, M. M., Aplin, J. D., et al. (2012). Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *The FASEB Journal* 26, 4876–4885. doi:10.1096/fj.12-210310.
105. Rosamond, J. (1995). The cell cycle: an introduction. *Trends in Genetics* 11. doi:10.1016/s0168-9525(00)89128-3.
106. Roy Choudhury, S., and Knapp, L. A. (2001). Human reproductive failure I: Immunological factors. *Human Reproduction Update* 7. doi:10.1093/humupd/7.2.113.
107. Ruffin, N., Lantto, R., Pensieroso, S., Sammicheli, S., Hejdeman, B., Rethi, B., et al. (2012). Immune activation and increased IL-21R expression are associated with the loss of memory B cells during HIV-1 infection. *Journal of Internal Medicine* 272. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02550.x.
108. Sack, U. (2007). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie; 163 Tabellen*. Karger Available at: <https://books.google.de/books?id=HrFvAE2AJAYC&hl=de> [Accessed May 3, 2018].
109. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., and Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 63, 601–610. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x.
110. Sawalha, A. H., Kaufman, K. M., Kelly, J. A., Adler, A. J., Aberle, T., Kilpatrick, J., et al. (2008). Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67. doi:10.1136/ard.2007.075424.

111. Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of experimental medicine* 192, 1553–62. doi:10.1084/JEM.192.11.1553.
112. Schütt, C., and Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag doi:10.1007/978-3-8274-2647-5.
113. Shakerian, B., Moghtaderi, M., and Heidari, N. (2020). Immunoglobulin G4 deficiency can be a new entity for primary recurrent miscarriage: Successful pregnancy in two cases after treatment with intravenous immunoglobulin. *Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology* 16. doi:10.4274/tjod.galenos.2019.02650.
114. Shakib, J. H., Ralston, S., Raissy, H. H., Stoddard, G. J., Edwards, K. M., and Byington, C. L. (2010). Pertussis antibodies in postpartum women and their newborns. *Journal of Perinatology* 30. doi:10.1038/jp.2009.138.
115. Shevyrev, D., and Tereshchenko, V. (2020). Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Frontiers in Immunology* 10. doi:10.3389/fimmu.2019.03100.
116. Shi, J., Hou, S., Fang, Q., Liu, X., Liu, X., and Qi, H. (2018). PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity* 49. doi:10.1016/j.immuni.2018.06.012.
117. Simard, N., Konforte, D., Tran, A. H., Esufali, J., Leonard, W. J., and Paige, C. J. (2011). Analysis of the Role of IL-21 in Development of Murine B Cell Progenitors in the Bone Marrow. *The Journal of Immunology* 186. doi:10.4049/jimmunol.1004040.
118. Singh, J., Ahmed, A., and Girardi, G. (2011). Role of Complement Component C1q in the Onset of Preeclampsia in Mice. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175919.
119. Smallenburg, L. C. S., van Welie, N. A., Elvers, L. H., van Huisseling, J. C. M., Teunis, P. F. M., and Versteegh, F. G. A. (2014). Decline of IgG pertussis toxin measured in umbilical cord blood, and neonatal and early infant serum. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 33. doi:10.1007/s10096-014-2110-2.

120. Spolski, R., and Leonard, W. J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 379–395. doi:10.1038/nrd4296.
121. Suto, A., Nakajima, H., Hirose, K., Suzuki, K., Kagami, S. I., Seto, Y., et al. (2002). Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C ϵ transcription of IL-4 - stimulated B cells. *Blood* 100. doi:10.1182/blood-2002-04-1115.
122. Sykes, L., MacIntyre, D. A., Yap, X. J., Teoh, T. G., and Bennett, P. R. (2012). The Th1:Th2 Dichotomy of Pregnancy and Preterm Labour. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/967629.
123. Tortola, L., Yadava, K., Bachmann, M. F., Müller, C., Kisielow, J., and Kopf, M. (2010). IL-21 induces death of marginal zone B cells during chronic inflammation. *Blood* 116. doi:10.1182/blood-2010-05-284547.
124. Vermillion, M. S., and Klein, S. L. (2018). Pregnancy and infection: Using disease pathogenesis to inform vaccine strategy. *npj Vaccines* 3. doi:10.1038/s41541-017-0042-4.
125. Vince, G. S., and Johnson, P. M. (2000). Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. *Biochemical Society transactions* 28, 191–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816125> [Accessed May 4, 2018].
126. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D., and MacLennan, I. C. M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annual Review of Immunology* 34, 335–368. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055605.
127. Waldeyer, A., Anderhuber, F., Pera, F., and Streicher, J. eds. (2012). *Waldeyer - Anatomie des Menschen*. Berlin, Boston: DE GRUYTER doi:10.1515/9783110228632.
128. Wang, W., Sung, N., Gilman-Sachs, A., and Kwak-Kim, J. (2020). T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Frontiers in Immunology* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.02025.

129. Webb, R., Merrill, J. T., Kelly, J. A., Sestak, A., Kaufman, K. M., Langefeld, C. D., et al. (2009). A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 60. doi:10.1002/art.24658.
130. Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today* 14, 353–356. doi:10.1016/0167-5699(93)90235-D.
131. Wu, Y., van Besouw, N. M., Shi, Y., Hoogduijn, M. J., Wang, L., and Baan, C. C. (2016). The biological effects of IL-21 signaling on B-cell-mediated responses in organ transplantation. *Frontiers in Immunology* 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00319.
132. Wurster, A. L., Rodgers, V. L., Satoskar, A. R., Whitters, M. J., Young, D. A., Collins, M., et al. (2002). Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon γ -producing Th1 cells. *Journal of Experimental Medicine* 196. doi:10.1084/jem.20020620.
133. Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., et al. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496. doi:10.1038/nature12058.
134. Xue, L., Gyles, S. L., Wetley, F. R., Gazi, L., Townsend, E., Hunter, M. G., et al. (2005). Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, 6531–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272307> [Accessed May 3, 2018].
135. Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D. J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E. I., et al. (2012). Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491, 264–268. doi:10.1038/nature11501.
136. Yu, M., Caverio, V., Lu, Q., and Li, H. (2015). Follicular helper T cells in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* 34, 1489–1493. doi:10.1007/s10067-015-3028-5.
137. Yusuf, I., Stern, J., McCaughy, T. M., Gallagher, S., Sun, H., Gao, C., et al. (2014). Germinal Center B Cell Depletion Diminishes CD4+ Follicular T Helper Cells in Autoimmune Mice. *PLoS ONE* 9, e102791. doi:10.1371/journal.pone.0102791.

138. Zeng, W., Liu, Z., Zhang, S., Ren, J., Ma, X., Qin, C., et al. (2016). Characterization of T follicular helper cells in allogeneic normal pregnancy and PDL1 blockage-induced abortion. *Scientific Reports* 6, 36560. doi:10.1038/srep36560.
139. Zeng, W., Qin, S., Wang, R., Zhang, Y., Ma, X., Tian, F., et al. (2020). PDL1 blockage increases fetal resorption and Tfr cells but does not affect Tfh/Tfr ratio and B-cell maturation during allogeneic pregnancy. *Cell Death and Disease* 11. doi:10.1038/s41419-020-2313-7.
140. Zhang, M., Xu, J., Bao, X., Niu, W., Wang, L., Du, L., et al. (2017). Association between genetic polymorphisms in interleukin genes and recurrent pregnancy loss - A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0169891.
141. Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., DeRoos, P., Kim, J. M., Chu, T. T., et al. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature* 458. doi:10.1038/nature07674.
142. Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., et al. (2007). IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 8, 967–974. doi:10.1038/ni1488.

11. Anhang

11.1. Publikationsliste (Stand 05/2021)

11.1.1. Originalarbeiten

Fröhlich, C., Ehrhardt, J., Krüger, D., Trojnarska, D., Zygmunt, M., Muzzio, D. O. (2020). Pregnancy status alters IL-21-mediated effects on murine B lymphocytes. *Society for Reproduction and Fertility* 159, 351-359 doi: 10.1530/REP-19-0407

11.1.2. Texte

Weinhold, C., Muzzio, D. O., Tüngler, A., Heidecke, O. J., Packhäuser, K., Zygmunt, M. (2015) Follicular T Helper Cells: New Players in Disturbed Pregnancy. SRI 63rd Annual Scientific Meeting. Abstract Number 650877

11.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Marek Zygmunt für die Möglichkeit bedanken diese interessante Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können und dass hierfür alle notwendigen Mittel bereitgestellt wurden. In dem Jahr meiner Labortätigkeit habe ich einen umfassenden Einblick in die hier stattfindenden Forschungsarbeiten erhalten. Als einen Höhepunkt der Anerkennung meiner Labortätigkeit werte ich meine Teilnahme an Kongressen. Für diese Möglichkeit möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums bedanke ich mich bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. med. Damian Muzzio für die stetige Betreuung im Labor, sowohl bei der Planung der Experimente und deren Durchführung als auch bei der Ergebnisauswertung. Auch beim Verfassen meines ersten Papers und der Anfertigung dieser Arbeit stand er mir stets mit Rat zur Seite. Ich danke dir für deine Geduld, die du mir bei all den technischen Fragen stets entgegengebracht hast und ich danke dir für unsere Freundschaft, die mit Sicherheit die Zeit unserer gemeinsamen Arbeit im Labor überdauern wird.

Großen Dank schulde ich auch allen Mitarbeitern des Labors. Vielen Dank Diana Krüger, für deine Unterstützung bei den Experimenten und deine aufmunternden Worte. Vielen Dank Rebekka Eienkel für deine wertvollen fachlichen Einwände und die vielen Stunden, die du mit den Korrekturen meiner Arbeit zu tun hattest. Besonderer Dank gilt auch dir, Jens Ehrhardt, für deine Unterstützung bei den Experimenten und vor allem für deine zahllosen kulinarischen Meisterleistungen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Schwiegereltern für ihre Ausdauer bei der finalen Durchsicht sagen.

Aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich immerwährend in allen Bereichen bedingungslos unterstützt und mir so oft sagt, dass ihr stolz auf mich seid.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Titus Fröhlich, mit dessen Hilfe und Unterstützung ich immer wieder neue Motivation schöpfe und an dessen Seite ich das Gefühl habe alles erreichen zu können. Dafür danke ich dir von ganzem Herzen.

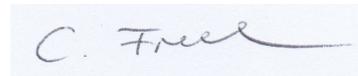
11.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass seine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

16. Januar 2022

A handwritten signature in black ink on a light blue rectangular background. The signature reads "C. Freil" in a cursive script.