

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Klinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Hecher

## **Die Rolle regulatorischer T-Zellen in der Verbesserung des Verlaufs und Ausgangs zweiter Schwangerschaften**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lisa Sophie Ahrendt  
aus Hamburg

Hamburg, 2024

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.11.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Andreas H. Guse**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Petra C. Arck**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Allgemein</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Immunologische Adaptation während der Schwangerschaft</b> .....	<b>1</b>
1.2.1	Klinische Konsequenz einer eingeschränkten immunologischen Anpassung .....	6
1.3	<b>Die Plazenta</b> .....	<b>7</b>
1.4	<b>Mausmodelle und Reporter-Mäuse</b> .....	<b>9</b>
1.4.1	Allgemein .....	9
1.4.2	DEREG-Mausmodell .....	11
1.4.3	OVA-Mausmodell und OVA-Tetramer .....	12
1.4.4	Fir/Tiger Reporter Mäuse .....	13
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1	<b>Literaturrecherche</b> .....	<b>15</b>
3.2	<b>Materialien</b> .....	<b>18</b>
3.2.1	Chemikalien .....	18
3.2.2	Kits.....	20
3.2.3	Primer .....	20
3.2.4	Antikörper .....	21
3.2.5	Plastikmaterial und andere Materialien .....	23
3.2.6	Equipment und Instrumente .....	24
3.2.7	Software .....	25
3.2.8	Mäuse.....	25
3.2.9	Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von C57BL6/J- DEREG- und Act-mOVA-Mäusen .....	26
3.3	<b>Versuchsaufbau</b> .....	<b>27</b>
3.3.1	Einfluss von regulatorischen T-Zellen in erster und zweiter Trächtigkeit	28
3.3.2	Erfassung Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen in der ersten und zweiten Trächtigkeit.....	30

3.3.3	Adoptiver Zelltransfer von unterschiedlich geprägten regulatorischen T-Zellen	31
<b>3.4</b>	<b>Ausgang der Trächtigkeit</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Gewebeentnahme</b>	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Gewebeverarbeitung</b>	<b>36</b>
3.6.1	Uterus-drainierende Lymphknoten oder inguinale Lymphknoten	36
3.6.2	Uterus	36
3.6.3	Blut	37
3.6.4	Milz	37
3.6.5	Zellzahlbestimmung	38
3.6.6	Durchflusszytometrie	38
<b>3.7</b>	<b>Histologie</b>	<b>39</b>
3.7.1	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	39
3.7.2	Markierung von Stammzellen in Mausembryonen an Tag 7,5 der Schwangerschaft zur Analyse in der konfokalen Mikroskopie	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der Literaturrecherche</b>	<b>42</b>
4.1.1	Vergleich des Geburtsgewichts in der ersten und zweiten Schwangerschaft	42
4.1.2	Schwangerschaftskomplikationen in der ersten und zweiten Schwangerschaft	44
<b>4.2</b>	<b>Die Funktion regulatorischer T-Zellen in der Schwangerschaft</b>	<b>48</b>
4.2.1	Funktionelle Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Trächtigkeit	49
4.2.2	Identifikation Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen	54
4.2.3	Die Funktion Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen und potenzieller regulatorischer Gedächtnis-T-Zellen	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Resümee und Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Appendix</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Summary</b>	<b>96</b>

<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>120</b>
<b>14</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>121</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemein**

Verschiedene empirische, klinische Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit, eine gesunde zweite Schwangerschaft zu haben, größer ist, wenn die erste Schwangerschaft ebenfalls komplikationslos verlief. So zeigen sich Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie oder Frühgeburtlichkeit in zweiten Schwangerschaften deutlich seltener, wenn die erste Schwangerschaft der Frau einen unkomplizierten Verlauf hatte und mit der Geburt eines gesunden, reifen Neugeborenen endete (Regan, Braude and Trembath, 1989; Bhattacharya *et al.*, 2008). Im klinischen Alltag wird zudem häufig beobachtet, dass Neugeborene in Folgeschwangerschaften schwerer sind. Fragt man allerdings nach Gründen für dieses Phänomen, sind die Antworten rar. Auch die Literatur legt auf den ersten Blick keine zufriedenstellende Antwort dar. Der physiologische Prozess der Schwangerschaft und aller Folgeschwangerschaften geht hinter der Pathologie, den Schwangerschafts- und fetalen Komplikation peripartal und postnatal, verloren. Darüber hinaus sind auch die Gründe, welche zweite Schwangerschaften, sowie das neonatale Outcome im Idealfall verbessern können, noch weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit mit einem Teilgebiet, welches zur Verbesserung des Ausgangs zweiter Schwangerschaften führen kann: der Schwangerschaftsimmunologie und wie hierbei die regulatorischen T-Zellen (Treg) eine besondere Rolle spielen.

## **1.2 Immunologische Adaptation während der Schwangerschaft**

Während der Schwangerschaft steht das mütterliche Immunsystem vor einer paradox wirkenden Herausforderung. Zum einen muss die Fähigkeit zur Bekämpfung von Krankheitserregern aufrechterhalten werden, zum anderen wird der heranwachsende semi-allogene Fetus, der zur Hälfte aus fremdem (väterlichem) genetischem Material besteht nicht abgestoßen, sondern toleriert und versorgt. Normalerweise hat das Immunsystem die Aufgabe fremde Antigene sowie Pathogene zu erkennen und möglichst präzise und effizient zu eliminieren, um Erkrankungen zu verhindern oder zu bekämpfen. Zusätzlich muss es zwischen Antigenen und Autoantigenen unterscheiden, um letztere zu tolerieren und Autoimmunität zu verhindern.

1953 definierte Sir Peter Medawar als erster den heranwachsenden Fetus als „Semi-Allograft“, der gleichzeitig jeweils zur Hälfte mütterliche und väterliche Antigene exprimiert und durch Suppression der gegenseitigen Immunantwort überleben konnte (Medawar, 1953). Damals herrschte die Annahme vor, dass die Plazenta als physische Barriere zwischen Fetus und Mutter den direkten Kontakt verhinderte und die Blutkreisläufe beider gänzlich getrennt waren (Medawar, 1953). Spätestens mit der Entdeckung des Mikrochimärismus, bei dem sich fetale Zellen in der Mutter finden und umgekehrt, wurde diese Theorie widerlegt (Adams and Nelson, 2006). Auch die Annahme einer globalen Immunsuppression während der Schwangerschaft konnte nicht bestätigt werden, da die Funktion zur Abwehr von Pathogenen größtenteils erhalten bleibt. Während der Schwangerschaft herrscht trotzdem eine gewisse Immuntoleranz, was sich beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose mit einer reduzierten Schubfrequenz zeigt (Confavreux *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu tritt bei einer Influenzainfektion bei Schwangeren mutmaßlich durch diese schwangerschaftsinduzierte, periphere Immuntoleranz eine höhere Sterblichkeit auf (World Health Organization, 10AD). Zusätzlich zu dieser peripheren Immuntoleranz ist vor allem eine lokale und hochspezifische Immunanpassung an der feto-maternalen Grenzfläche, der Dezidua, für die Toleranz des Feten garantiert notwendig (Cardenas, 1989). An dieser fein abgestimmte Immunantwort sind unterschiedliche Mechanismen, sowie Zellgruppen des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt.

Zu seinem eigenen Schutz exprimiert der heranwachsende Fetus keine klassischen Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA) (Hunt, Andrews and Wood, 1987). HLA gehören zur Klasse der Immunglobuline. Sie sind als Glykoproteine in der Zellmembran verankert und wirken daran mit, dass der Körper adäquat zwischen körpereigenen und körperfremd differenzieren kann. HLA-codierende Genabschnitte werden als Haupthistokompatibilitätskomplexe (*engl. major histocompatibility complex*; MHC) bezeichnet. Der Fetus exprimiert keine klassischen MHC I Moleküle (wie HLA-A oder HLA-B) oder MHC II Molekül (HLA-DP, HLA-DRQ oder HLA-DR), was eine gezielte T-Zell Reaktion, wie man sie beispielsweise bei Transplantatabstoßung sieht, verhindert (Munoz-Suano, Hamilton and Betz, 2011). Da eine gänzlich fehlende Expression von MHC I und II Molekülen eine zytotoxische Immunreaktion vermittelt durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) hervorrufen würde,

exprimiert der Fetus stattdessen HLA-C und nicht-klassische HLA-Moleküle, wie HLA-E, HLA-G und HLA-F, was die Entstehung eines anti-inflammatorischen Milieus fördert (Rouas-Freiss *et al.*, 1997) und eine Abstoßung verhindert (Munoz-Suano, Hamilton and Betz, 2011; Arck and Hecher, 2013; Hackmon *et al.*, 2017).

Neben dieser Immunevasion durch den Fetus ist ebenso eine aktive mütterliche Immunadaptation notwendig, um die Toleranz gegenüber dem Fetus sowie seine Versorgung bis zur Geburt sicherzustellen.

So wandern die Zellen des angeborenen Immunsystems, vornehmlich NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (*dendritic cells*; DCs), sowie Zellen des adaptiven Immunsystems, vor allem T-Zellen, in die Dezidua ein oder proliferieren vor Ort.

Die dezidualen NK-Zellen (dNK-Zellen), ein spezieller, weniger zytolytischer Subtyp der NK-Zellen (Moffett-King, 2002; Kopcow *et al.*, 2005; Hanna *et al.*, 2006), machen mit über 70% einen Großteil der dezidualen Leukozyten zu Beginn der Schwangerschaft aus (Cooper, Fehniger and Caligiuri, 2001; Moffett-King, 2002; Pearson, 2002; Koopman *et al.*, 2003; Erlebacher *et al.*, 2007). dNKs tragen während der Implantation der Blastozyste unter anderem zur Umbau der mütterlichen Spiralarterien bei, was für die adäquate Etablierung der Plazenta relevant ist (King *et al.*, 1997; Moffett and Colucci, 2014).

Die DCs, als wichtigste professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) gegenüber den T-Zellen in der Dezidua werden in einem tolerogenen Entwicklungsstatus gehalten (Kämmerer *et al.*, 2003; Blois *et al.*, 2005; Miwa *et al.*, 2005). Diese tolerogenen DCs (tDC) produzieren vermehrt das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin (IL) -10, was ein wesentlicher Bestandteil in der Erhaltung peripherer Toleranz ist (Wakkach *et al.*, 2003). Zusätzlich unterstützen die tDCs die Proliferation von Zellen des adaptiven Immunsystems, vor allem regulatorischer T-Zellen (Treg) (Arck *et al.*, 2007) und fördern die Differenzierung von naiven *Cluster of Differentiation* (CD) 4<sup>+</sup> T-Zellen zu Tregs, was für die Toleranz des Fetus unerlässlich ist (Blois *et al.*, 2007).

Die Proliferation der Tregs beginnt bereits durch den Kontakt der mütterlichen Immunzellen zur väterlichen Seminalflüssigkeit in der Vaginalschleimhaut (Robertson *et al.*, 2009; Guerin *et al.*, 2011; Balandya *et al.*, 2012; Liu, Wang and Sun, 2013; Teles *et al.*, 2013). Das könnte daran liegen, dass in den Spermien eine sehr hohe

Konzentration des transformierenden Wachstumsfaktor B (engl. *Transforming growth factor B* (TGF-B)) enthalten ist (Clark, Fernandes and Banwatt, 2008). Es wird bereits hier eine für die Implantation unerlässliche Toleranz gegenüber väterlichen Antigenen geschaffen. In der Dezidua werden dann weitere Tregs durch dNKs und tDCs aktiviert. Tregs können die Proliferation von proinflammatorischen T-Helfer-Zellen (Th) 1, B-Zellen (Lim *et al.*, 2005), proinflammatorischen DCs und Makrophagen (Cederbom, Hall and Ivars, 2000; Misraet *al.*, 2004; Taams *et al.*, 2005) unterdrücken bzw. deren Zytokin-Sekretion und Antikörperproduktion hemmen. Tregs sind in der Lage IL-10 (Hara *et al.*, 2001) und TGF-B (Wahl *et al.*, 2004) zu produzieren. Beide Botenstoffe gelten als immunsuppressiv und können die Proliferation und Funktion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen hemmen (von Boehmer, 2005; Miyara and Sakaguchi, 2007). Dies funktioniert vor allem über den Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (Foxp3), der auch als ihr Hauptkennungsmerkmal gilt. FoxP3 ist ein 47 kDa großes Protein, welches eine Forkhead-Domäne trägt, die für die Kernlokalisierung und Desoxyribonukleinsäure (*Desoxyribonuclein acid*; DNA)-Bindung verantwortlich ist (Ziegler, 2007). Die Tregs erlangen hierüber ihre unterdrückende Funktion gegenüber nicht-Treg Zellen. Auch die Expression von CD25 ist den Tregs zuzuordnen. Dies geschieht im Gegensatz zu FoxP3 jedoch nicht exklusiv, da 10-15% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls CD25 exprimieren. Das ist dadurch zu erklären, da CD25 die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors ist, welcher auf allen aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen hochreguliert ist (Sanchez *et al.*, 2012; La Rocca *et al.*, 2014; Plitas and Rudensky, 2016). IL-2 ist für T-Lymphozyten sowohl auto- als auch parakrin der zentrale Proliferationsmarker zur Expansion bei einer Immunreaktion.

Vor allem zu Beginn der Schwangerschaft muss durch die Tregs ein ausgewogenes Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Immunzellen an der fetomaternalen Grenze geschaffen werden. Neben der Toleranz gegenüber den fetalen Antigenen ist hier auch ein pro-inflammatorisches Milieu zur Invasion der Trophoblastenzellen in das Endometrium erforderlich (Cardenas, 1989; Haddad *et al.*, 2006). Insbesondere in der Frühschwangerschaft konnte daher gezeigt werden, dass die Anzahl der Tregs in den Uterus-drainierenden Lymphknoten kurz vor und in den ersten Tage nach der Implantation stärker erhöht ist, als im nicht-schwangeren Zustand (Aluvihare, Kallikourdis and Betz, 2004; Shima *et al.*, 2015). Zusätzlich sind die Tregs für ein implantationsförderndes Milieu in der Uterusschleimhaut

(mit)verantwortlich. Letzteres konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden (Teles *et al.*, 2013) und ist auch für die humane Schwangerschaft anzunehmen. Tregs regulieren zusätzlich die Aktivierung der T-Helferzellen (Th-Zellen) in der Dezidua, indem sie das Verhältnis von proinflammatorischen Th1 und Th17-Zellen in Richtung der immunsuppressiven Th2-Zellen verlagern, was ebenfalls zur Toleranzinduktion gegenüber dem Fetus notwendig ist (Mosmann *et al.*, 1986; Wegmann *et al.*, 1993). Jasper *et al.* zeigten 2006, dass infertile Frauen weniger Treg-mRNA in der Uterusschleimhaut aufweisen als fruchtbare Frauen (Jasper, Tremellen and Robertson, 2006). Darauf folgend steigt die Anzahl der Tregs vor allem in den ersten beiden Trimestern rapide an und wird auf einem konstanten Level gehalten (Heikkinen *et al.*, 2004; Somerset *et al.*, 2004; Mjösberg *et al.*, 2009), bis die Anzahl zum Ende der Schwangerschaft wieder sinkt. Die Initiation der Geburt benötigt, wie ganz zu Beginn die Plazentation, ein pro-inflammatorisches Milieu (Galazka *et al.*, 2009). Ist die Anzahl der Tregs gravierend reduziert oder gänzlich abwesend, kann das zur Abstoßung des Feten, einem Abort oder zu schwerwiegenden Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise einer Frühgeburt führen (Sasaki *et al.*, 2004; Arruvito *et al.*, 2009; Guerin, Prins and Robertson, 2009; Leber, Teles and Zenclussen, 2010). Dieses Phänomen zeigt sich allerdings nur in allogenen und nicht in syngeneten Verpaarungskonstellationen in Mäusen, was dafür spricht, dass Tregs für die Entwicklung der Toleranz gegenüber den fetalen Alloantigenen essentiell sind (Aluvihare, Kallikourdis and Betz, 2004; Zhao, Zeng and Liu, 2007). Immer mehr Aufmerksamkeit erhält in diesem Zusammenhang auch die Antigen-spezifische Treg-Immunantwort. Kahn *et al.* zeigten 2010, dass syngen verpaarte Mäuse, bei denen nur die männlichen Feten Antigene präsentieren, in der Mutter eine Antigen-spezifische Immunantwort auslösen. Nach Depletion der Tregs in den Müttern zeigte sich ein geringeres Überleben der männlichen Feten. Daraus schlussfolgerten Kahn *et al.*, dass die fetale Antigen-Spezifität der Treg-Immunantwort, die während der Schwangerschaft entsteht, einen Beitrag zur feto-maternalen Toleranz leistet (Kahn and Baltimore, 2010). Shima *et al.* zeigten, dass während der Trächtigkeit in allogenen verpaarten Mäusen Tregs spezifisch für das väterliche Antigen im Lymphknoten und Uterus proliferieren (Shima *et al.*, 2015). Insbesondere im Kontext von Folgeschwangerschaften stellt sich die Frage, inwieweit insbesondere Antigen-spezifische Zellen den Verlauf und Ausgang der Schwangerschaft beeinflussen können.

Neben der immunologischen Adaptation gibt es in der Schwangerschaft zusätzlich eine hormonelle Umstellung, welche auch auf die immunologische Adaptation Einfluss hat. Sowohl die Schwangerschaftshormone Progesteron und humanes Choriongonadotropin (hCG) als auch der Progesteron-induzierte-Blockierfaktor (PIBF) unterstützt diese immunologische Adaptation an unterschiedlichen Stellen. PIBF inhibiert die proinflammatorische Aktivierung von NK-Zellen (Faust *et al.*, 1999; Laškarin *et al.*, 1999). Progesteron und PIBF treiben die Proliferation der Th2- gegenüber den Th1-Zellen voran (Piccinni *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2011). Auch hCG unterstützt die Dominanz von Th2-Zellen in der Schwangerschaft (Khan *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass dies durch eine Beeinträchtigung der Proliferation und der Induktion der Apoptose proinflammatorischer T-Zellen hervorgerufen wird (Kayisli *et al.*, 2003).

### **1.2.1 Klinische Konsequenz einer eingeschränkten immunologischen Anpassung**

Bereits geringe Fehlregulationen dieser Anpassung können zu schweren Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit oder einer fetalen Wachstumsretardierung (engl. *fetal growth restriction* (FGR) oder *intrauterine growth restriction* (IUGR) oder *small for gestational age* (SGA)) führen (Yang *et al.*, 2010a; Cotechini, Komisarenko, Sperou, Macdonald-Goodfellow, Michael A. Adams, *et al.*, 2014; Cappelletti *et al.*, 2016a; Jafri and Ormiston, 2017; Helmo *et al.*, 2018). Bei letzterer unterscheiden sich die verschiedenen Bezeichnungen durch unterschiedliche Diagnosekriterien. SGA bedeutet ein kontinuierliches Wachstum des Fetus unter der 10. Perzentile. Bei einer IUGR besteht auch ein Wachstum unter der 10. Perzentile, zusätzlich sind aber mütterliche oder fetale Dopplerparameter pathologisch oder es besteht ein Oligohydramnion beim Fetus (Kehl *et al.*, 2017). FGR hingegen beschreibt den perzentilenunabhängigen aber stagnierenden Gewichtsverlauf des Fetus und ist vor allem im dritten Trimenon bei *late-onset* FGR relevant. Ungefähr 15% aller Schwangerschaften sind von einer solchen Schwangerschaftskomplikation betroffen (WHO, United Nations Population Fund UNICEF and The World Bank, 2017). Die Präeklampsie zeichnet sich durch erhöhte Blutdrücke und eine weitere Organmanifestation, häufig als Nephropathie mit Proteinurie ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) aus. Insbesondere durch die

stetig drohende Eklampsie (generalisierter Krampfanfall), die in etwa 1/200 Fällen auftritt, stellt diese Komplikation eine vitale Bedrohung für Mutter und Fetus dar.

Der spontane Abort ist definiert als ein Verlust des Embryos oder Fetus vor der Lebensfähigkeit, die ab der 24. SSW besteht. Unterschieden werden kann hier in Frühabort vor oder in der 12. SSW und Spätabort zwischen der 13. und 24. SSW, ab der 24. SSW spricht man vom intrauterinem Fruchttod (IUFT).

Die Frühgeburt ist definiert als Geburt des Kindes vor der vollendeten 37. SSW.

### **1.3 Die Plazenta**

Die Plazenta ist das ‚Organ‘ der Schwangerschaft, welches primär für den Gasaustausch und die Versorgung des heranwachsenden Fetus mit Nährstoffen zuständig ist. Daneben ist die Plazenta in der Lage, Hormone wie Progesteron und hCG zu produzieren. Zusätzlich entsteht durch das Einwachsen des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua die feto-maternale Grenzfläche.

Sowohl Menschen als auch Mäuse haben eine hämochoriale Plazenta, was bedeutet, dass die mütterlichen Blutzellen (und damit auch Immunzellen) in direktem Kontakt zum fetalen Gewebe stehen.

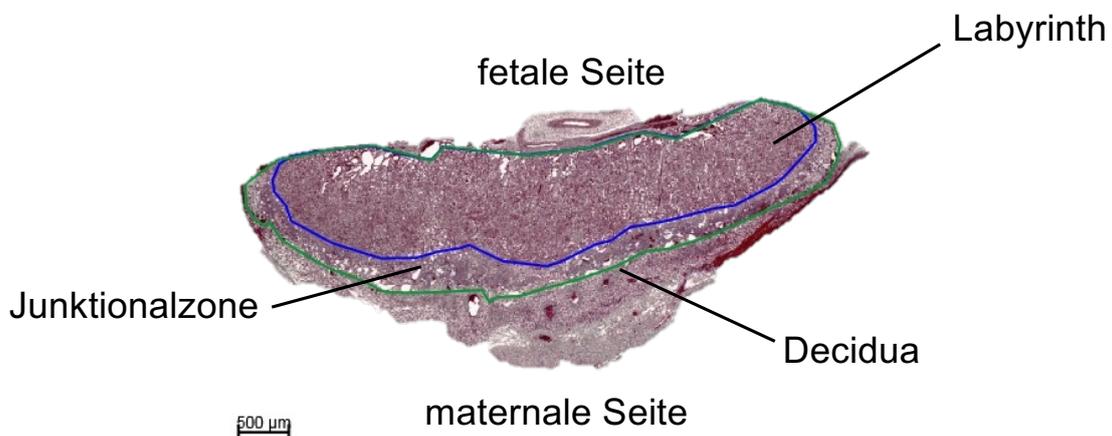
Unter dem Einfluss von Progesteron bereitet sich das Endometrium auf die Implantation der befruchteten Eizelle im Mehrzellstadium (Blastozyste) vor. Dieser Prozess besteht unter anderem aus der Modifizierung endometrialer Stromazellen, uteriner Drüsen und Gefäße, sowie einer Rekrutierung von Immunzellen (Lunghi *et al.*, 2007).

Die Blastozyste dockt mit ihrem embryonalen Pol an die Dezidua an. Anschließend differenziert sich der Trophoblast in den Synzytiotrophoblasten und den Zytotrophoblasten, welche schlussendlich gemeinsam die Plazenta bilden. Der Synzytiotrophoblast wächst in die Dezidua ein, während der Zytotrophoblast das Grundgerüst der Trabekel bildet, in welchen später die fetalen Blutgefäße laufen. Die Ernährung des Fetus erfolgt zunächst aus eingelagertem Glykogen aus den Zellen der Dezidua. Um den wachsenden Energiebedarf des Fetus zu decken, entwickelt sich der direkte Gas- und Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Kind über die Nabelschnur. Im Synzytiotrophoblasten entstehen Lakunen, in welche die uterinen Spiralarterien einwachsen und im Verlauf durch lytische Enzyme arrodieren, sodass die Lakunen mit mütterlichem Blut gefüllt sind. Die Trabekel entwickeln sich so weit,

bis in ihnen fetale Gefäße laufen, die Anschluss an die Nabelschnur haben. So findet dort weiterhin ein sowohl passiver als auch aktiver Gas- und Nährstoffaustausch statt. Zusätzlich ist die Plazenta durch ihre Filterfunktion in der Lage bestimmte Toxine zu eliminieren (Ulfig, 2005; Moore et al., 2013).

In ähnlicher Art und Weise entsteht auch eine murine Plazenta (Abb. 1). Diese kann in 3 Teile eingeteilt werden: die mütterliche Dezidua begrenzt durch die trophoblastischen Riesenzellen, der Junktionalzone, welche ihrerseits aus glykogengefüllten und spongiotrophoblastischen Zellen besteht und dem Labyrinth (Abb. 1 blau umrandeter Teil) zusammengesetzt aus trophoblastischen Septen und fetalen Blutgefäßen (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2009).

Die Plazentaareale können mit Hilfe einer Software direkt ausgemessen werden (Abb. 1). Gemessen wird die gesamte Plazentafläche (Abb. 1 grün umrandeter Teil) und das Labyrinth (Abb. 1 blau umrandeter Teil). Die Differenz der beiden Flächen ergibt die Junktionalzone. Zusätzlich kann das plazentare Verhältnis (engl. *placental ratio*) aus Labyrinth und Junktionalzone gebildet werden. Dieses Verhältnis kann Hinweise auf die fetale Versorgung geben. Ein reduziertes plazentares Verhältnis kann mit einer eingeschränkten fetalen Versorgung einhergehen.



**Abbildung 1: Histologisches Bild der analysierten Plazenta einer Maus.**

Beispielbild für histologisch aufgearbeitete und analysierte Plazenta. Das Labyrinth ist blau umrandet, die Junktionalzone grün. Maternale und fetale Seite der Plazenta sind markiert, ebenso die Dezidua.

## **1.4 Mausmodelle und Reporter-Mäuse**

Aufgrund ethischer Gründe ist es größtenteils nicht erlaubt, Experimente der Grundlagenforschung an Menschen, insbesondere an schwangeren Frauen, durchzuführen (Burton, Jauniaux und Watson, 1999). Jeder invasive Eingriff an der fetoplazentaren Einheit birgt das Risiko eines iatrogen induzierten Abortes. Selbst bei Routineeingriffen zu diagnostischen Zwecken (beispielsweise Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie) zu einem deutlich späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft besteht ein Fehlgeburtsrisiko von ca. 0,5-1 % (Kozlowski A; Stressig, R, 2008). Das Mausmodell stellt hierfür eine sehr geeignete Alternative dar.

### **1.4.1 Allgemein**

Trotz aller Unterschiede sind weibliche Mäuse eine solide, gut etablierte und vergleichbare Option, um die Schwangerschaft und ihre Komplikationen zu untersuchen (Clark, 2016). Obwohl eine kürzlich veröffentlichte Publikation beispielsweise den Mausmarkis (Roberts, 2019) als valideres, dem Menschen genetisch näheres Tier für Experimente beschreibt, gibt es dazu in der reproduktiven Immunologie bisher keine neueren Erkenntnisse. Daher wird die Maus, vor allem aufgrund der hohen Korrelationen mit humanen Daten (Clark, 2008, 2016; Miyagawa *et al.*, 2010) weiterhin als Experimenttier der Wahl zur Gewinnung neuer Erkenntnisse genutzt. Zusätzlich haben Maus und Mensch beide eine hämochoriale Plazenta, welche sich durch den direkten Kontakt von fetalem zu mütterlichem Blut auszeichnet (Enders and Carter, 2012).

Von Vorteil zeigt sich im Mausmodell insbesondere die kurze Trächtigkeitsdauer, große Wurfgrößen sowie die Möglichkeit durch Inzucht eine genetische Homogenität der Tiere zu schaffen. Letzteres erlaubt Experimente mit immer gleichen Grundvoraussetzungen zu wiederholen, wodurch innerhalb kürzerer Zeit eine geeignete Gruppengröße erzeugt werden kann. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, zum einen zu jedem möglichen Zeitpunkt der Trächtigkeit Untersuchungen durchzuführen, zum anderen auch ganze Organe und Organsysteme zu analysieren. Auch der direkte fetale Ausgang der Trächtigkeit kann im Mausmodell durch Erhebung des fetalen sowie plazentaren Gewichts und der Plazentagröße zu verschiedenen Zeitpunkten der Trächtigkeit bestimmt werden. Eine strukturelle Untersuchung der Plazenta und des Embryos, sowie eine Gewichtsschätzung ist in humanen Schwangerschaften in der Regel nur über Ultraschalluntersuchungen möglich. Die

sonographische Diagnostik ist eine sehr untersucherabhängige Methode, welche eine gute Ausbildung und viel Erfahrung erfordert. Durch das Aufstellen von objektiven Kriterien zur Bewertung von erhobenen Daten kann der Untersucherabhängigkeit entgegengewirkt werden. Diese Methode ist daher nie so exakt wie die direkte Erhebung von Gewicht und Größe, welche im Mausmodell möglich ist.

In humanen Studien können diese exakten Daten häufig nur bei Schwangerschaften erhoben werden, die in einem Abort oder einer Frühgeburt enden, aber keine physiologischen Schwangerschaftsverläufe darstellen.

Mausmodelle liefern, nach Versuchen *in vitro*, beispielsweise in Zellkulturen, häufig die ersten Hinweise auf Mechanismen *in vivo*, welche im nächsten Schritt in humanen Studien verifiziert werden müssen. Häufig dauert diese Translation jedoch Jahre.

Da außer eineiigen Zwillingen jeder Mensch ein einzigartiges Genom besitzt, werden für die möglichst exakte Nachstellung der menschlichen Schwangerschaft im Mausmodell Mäuse aus zwei unterschiedlichen Stämmen miteinander verpaart. In der Regel werden C57BL6/J-stämmige Weibchen mit Balb/c-stämmigen Männchen allogon verpaart, um den größtmöglichen genetischen Unterschied zu erzielen. Im Unterschied dazu gibt es auch Versuchsreihen mit syngenen Verpaarungen, hier werden Mäuse aus dem gleichen Stamm verpaart.

Darüber hinaus gibt es bereits etablierte Mausmodelle, welche durch die spezifische Verpaarung von Mäusen beziehungsweise durch einen adoptiven Zelltransfer eine sehr exakte Untersuchung der mütterlichen Immunadaptation während der Trächtigkeit in Mäusen erlauben. Die Identifikation spezifischer, zu untersuchender Zielzellen kann durch unterschiedliche Methoden mittels Schlüssel-Schloss-Prinzip zum einen durch Antigen-Präsentation und die Bindung eines Tetramers zur Identifikation (Rowe *et al.*, 2012) erreicht werden. Zum anderen können transgenen Mäusen, die ein bestimmtes Antigen präsentieren, Zellen transferiert werden, die ebenfalls durch transgene Modifikation eines spezifischen Rezeptors exklusiv an das präsentierte Antigen binden und proliferieren. Daraus ist zu schlussfolgern, dass diese Zellen als Antigen-spezifisch für das präsentierte Antigen gelten (Erlebacher *et al.*, 2007). Bei beiden Methoden findet die Auswertung durchflusszytometrisch statt.

Die Ergebnisse tierexperimenteller Studien müssen in jedem Fall immer durch humane Studien validiert werden.

Trotz des enormen Zuwachses an tierexperimentellen Möglichkeiten in der reproduktiven Immunologie insbesondere im Maus- und Rattenmodell in den letzten 30 Jahren sollten im Sinne des 3R- (*refine, replace, reduce*; verbessern, ersetzen, reduzieren) Prinzips vor Beginn eines neuen Experimentes immer Alternativen für den Gebrauch von experimentellen Tieren in Erwägung gezogen werden (Arck, 2019). Die Optimierung einer wertschätzenden Lebensumgebung und ein geschulter Umgang für und mit experimentell genutzten Tieren sollte heutzutage eine Selbstverständlichkeit darstellen. Zusätzlich wird kontinuierlich an Modellen geforscht, die langfristig die genutzten Experimentiere ersetzen oder reduzieren können, beispielsweise durch das Züchten von künstlichem plazentarem Gewebe (Turco *et al.*, 2018) oder durch longitudinale Untersuchungsmethoden wie beispielsweise Ultraschall.

#### **1.4.2 DEREK-Mausmodell**

Für die Untersuchung der Funktion von Tregs eignet sich das DEREK (von engl. *Depletion of regulatory T-cells* (Lahl *et al.*, 2007)) Mausmodell. Hierfür wurde von Lahl *et al.* ein bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) generiert, welches im FoxP3-Lokus für ein Fusionsprotein aus humanem Diphtherietoxin-Rezeptor und grün fluoreszierendem Protein (GFP) kodiert. Diese Tatsache erlaubt so unter der Kontrolle des FoxP3-Promotors nur eine Transkription des Fusionsproteins in Treg-Zellen. Folglich sind Treg-Zellen aus DEREK-Mäusen einfach über die GFP-Expression beispielsweise in der Durchflusszytometrie zur erkennen, da nur diese Zellen den Diphtherietoxin-Rezeptor exprimieren. Zusätzlich erleichtert die GFP-Markierung die genetische Typisierung der Tiere mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR), welche bei heterozygoter Vererbung erforderlich ist. Durch die Expression des Diphtherietoxin-Rezeptors auf den Tregs ist eine gezielte Depletion dieser möglich. Mittels Injektion von Diphtherietoxin (DT) in die Maus kann in den Tregs die Apoptose induziert werden (Thorburn, Frankel and Thorburn, 2003; Miyake *et al.*, 2007). Hierdurch werden Tregs, wie andere nicht funktionsfähige Körperzellen, regelhaft abgebaut und es entstehen keine proinflammatorischen Signale. Daher kann die Depletion der Tregs als immunologisch neutral angesehen werden (Bennett *et al.*, 2005). Neben dem Einsatz dieses Modells in der Erforschung von Tumoren, Allergien und Infektionen kann dies auch für die Erforschung der Tregs in der Schwangerschaft dienen.

### 1.4.3 OVA-Mausmodell und OVA-Tetramer

Zur genaueren Untersuchung der fetalen Antigen-Spezifität der Zellen, insbesondere der CD4<sup>+</sup>-Tregs, wird ein Mausmodell verwendet, welches die Möglichkeit bietet, eben diese Zellen durch einen bekannten Surrogatmarker zu erkennen. Im genutzten Modell ist dieser exklusive Marker das Ovalbumin (OVA). OVA ist ein Protein, welches in Hühnereiweiß gefunden wurde und in einer Vielzahl von immunologischen Studien Anwendung findet. OVA bietet daher neben der Anwendung in der reproduktiven Immunologie ebenfalls die Möglichkeit der Untersuchung einer durch OVA induzierten Hyperreagibilität der Atemwege im Sinne einer Asthmaerkrankung (Zazara *et al.*, 2018). In einem für diese Arbeit durchgeführten Experiment wurden Act-mOVA-Mäuse als Männchen zu Verpaarung verwendet. Diese exprimieren das OVA-Antigen systemisch über den ubiquitär exprimierten Beta-Actin-Promotor (Ehst, Ingulli and Jenkins, 2003). Auch in der Erforschung von Autoimmunität und Tumorimmunologie spielt das OVA-Antigen in unterschiedlichen transgenen Mausmodellen eine Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in der Verpaarung von weiblichen Wildtyp-Mäusen mit transgen veränderten OVA-Männchen das OVA-Antigen auch über die in die Decidua einwachsenden (fetalen) Trophoblastenzellen exprimiert wird (Moldenhauer *et al.*, 2009). Man kann daher davon ausgehen, dass das OVA-Antigen in diesem Kontext als exklusiver fetaler Marker dienen kann.

Mit Hilfe eines spezifischen MHC-Tetramers, welches exklusiv an das OVA-Antigen auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bindet, besteht die Möglichkeit diese OVA-Antigen-spezifischen Zellen zu erkennen (Barnden *et al.*, 1998; Moon *et al.*, 2007; Landais *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass dies nicht nur in spezifisch genetisch dafür veränderten OT-Mäusen, welche einen transgen veränderten T-Zell-Rezeptor besitzen, der exklusiv das OVA-Antigen bindet, funktioniert. Auch in Wildtypmäusen konnte gezeigt werden, dass nach intraperitonealer Injektion von OVA-Peptid eine OVA-spezifische Immunantwort entsteht (Moon *et al.*, 2007).

Durch ein direkt an das Tetramer gekoppeltes Flouorchrom können Tetramer-markierte Zellen in der Durchflusszytometrie erkannt und quantifiziert werden.

Im Kontext der reproduktiven Immunologie wurde das Tetramer jedoch noch nicht genutzt. Es könnte eine Möglichkeit bieten, Fetal-Antigen-spezifische T-Zellen, die während der Schwangerschaft entstehen, im Mausmodell nachzuweisen.

#### 1.4.4 Fir/Tiger Reporter Mäuse

Die Funktion der Reportermause basiert durch einen genetischen *knock in* auf der gleichzeitigen Expression eines spezifischen Zielproteins und eines Fluoreszenzproteins. Dies bietet unter anderem die Möglichkeit spezifische Zellen ohne vorherige Fixierung, Permeabilisierung und intrazelluläre Färbung in der Durchflusszytometrie zu identifizieren.

Eine solche Reportermaus-Linie wurde für viele Experimente dieser Arbeit als weibliche Kohorte genutzt. Die zweifach knock-in FOXP3-IRES-mRFP (Fir)/IL-10 IRES GFP-enhanced (Tiger) abgekürzt Fir/Tiger Maus bietet den Vorteil der direkten durchflusszytometrischen Identifikation von FoxP3 und IL-10 durch jeweils grün und rot fluoreszierende Proteine (Yisong Y Wan and Flavell, 2005; Kamanaka *et al.*, 2006). Da für diese Arbeit die Tregs von essentieller Bedeutung waren, welche durch FoxP3 identifiziert werden können, zeigte sich die Fir/Tiger-Reportermaus für diese Experimente äußerst geeignet.

## **2 Fragestellung**

Das Ziel dieser Arbeit war, zur weiteren Aufklärung der funktionellen Rolle von CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in der mütterlichen Immunadaptation in der ersten und zweiten Schwangerschaft beizutragen. Dafür wurden die folgenden Fragestellungen definiert:

**2.1** Durchführung einer systematischen Literaturrecherche zum Schwangerschaftsausgang sowie zu Schwangerschaftskomplikationen in ersten und zweiten humanen Schwangerschaften

**2.2** Erfassung des Einflusses von regulatorischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Depletion nach der ersten Trächtigkeit im Mausmodell

**2.3** Evaluation der funktionellen Rolle Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen in erster und zweiter Trächtigkeit im Mausmodell

Um der korrekten Bezeichnung gerecht zu werden wird der Begriff „Schwangerschaft“ für die humane Gravidität und der Begriff „Trächtigkeit“ für die murine Gravidität verwendet.

### **3 Material und Methoden**

Dieses Kapitel behandelt die verschiedenen Materialien und analytischen, sowie experimentellen Methoden, welche für die Literaturrecherche und die Experimente genutzt wurden. Alle Tierexperimente wurden im Vorhinein durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer G12/016).

#### **3.1 Literaturrecherche**

Zur Erfassung von Information über das Geburtsgewicht sowie Komplikationen in der ersten und zweiten Schwangerschaft wurde eine umfassende Literaturrecherche basierend auf den PRISMA Leitlinien (Moher *et al.*, 2015) über die Plattform „PubMed“ durchgeführt. Es wurden nur Studien am Menschen inkludiert. Die Suche erfolgte in englischer Sprache. Die Suchbegriffe waren: „(second pregnancy OR subsequent pregnancy OR consecutive pregnancy OR parity OR parous) AND women“. Durch verschiedene Einstellungen der Plattform ‚PubMed‘ wurden nur Artikel gezeigt, die alle oben genannte Schlüsselbegriffe in Titel oder Abstract aufwiesen. Für diese Suche fanden sich insgesamt 18.592 Publikationen (Abbildung (Abb.) 2). Anschließend wurden verschiedene Suchbegriffe unabhängig voneinander zur Suche hinzugefügt, um Publikationen zu finden, die sich mit spezifischen Schwangerschaftskomplikationen und deren Ausgang in erster und zweiter Schwangerschaft auseinandersetzten. Hierdurch entstanden sieben Untergruppen: „(spontaneous abortion OR miscarriage)“, „(gestational hypertension OR pregnancy induced hypertension)“, „gestational diabetes“, „(preeclampsia OR pre-eclampsia)“, „Preterm“, „(SGA OR IUGR)“ and „(birth weight OR birthweight)“. Anhand strenger Einschlusskriterien (aufeinanderfolgende menschliche Schwangerschaft, dargestellter Schwangerschaftsausgang und die jeweilige Schwangerschaftskomplikation) wurde bei allen Publikationen sorgfältig der Titel, sowie der Abstract auf einen möglichen Einschluss überprüft. Folgende Parameter schlossen eine Publikation aus der Analyse aus: nur eine Schwangerschaft berücksichtigt (entweder die erste oder zweite), Mehrlingsschwangerschaften (Zwillinge, Drillinge etc.), Interventionsstudien, Fall-Kontroll-Studien, Geburt durch Kaiserschnitt, mütterlicher Drogen-, Nikotin- oder Alkoholkonsum während der Schwangerschaft, spezifische mütterliche Grunderkrankungen z.B. Krebs, Malaria, HIV-Infektion, Schwangerschaftsentstehung durch In-vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI),

induzierter Abort, Cerclage oder Konisation der Zervix, vorzeitiger Blasensprung (engl.: *premature rupture of membranes*; PROM) sowie Sphinkter- oder andere Geburtsverletzungen durch die vaginale Geburt.

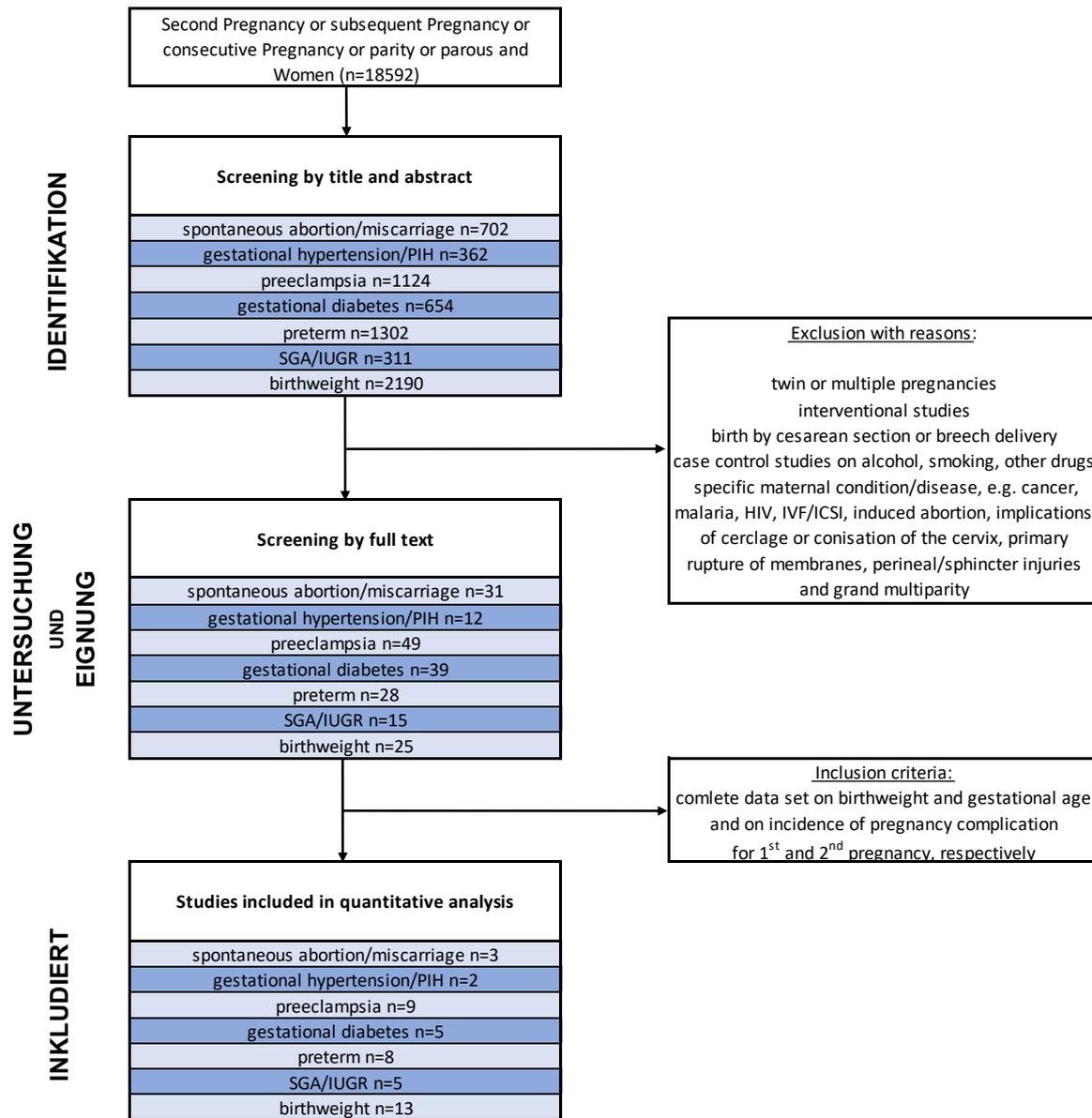
Bei allen Publikationen, die durch Titel und Abstract als geeignet erschienen, wurde der Volltext evaluiert. Publikationen wurden als geeignet gewertet und in die Analyse inkludiert, wenn die Inzidenz der jeweiligen Schwangerschaftskomplikation in der ersten und zweiten Schwangerschaft vorhanden war oder das Geburtsgewicht und die Schwangerschaftslänge für die erste und zweite Schwangerschaft angegeben war. Hieraus ergaben sich 37 geeignete Studien. Einige dieser Studien erwiesen sich als geeignet für die Analyse des Geburtsgewichts und/oder einer oder mehrerer Schwangerschaftskomplikationen und wurden daher mehrfach verwendet. Folglich wurden 13 Publikationen zum Geburtsgewicht, drei Publikationen zu spontanem Abort/Fehlgeburt, zwei Publikationen zu schwangerschaftsinduziertem Hypertonus, neun Publikationen zu Präeklampsie, fünf Studien zu Gestationsdiabetes, acht Publikationen zu Frühgeburtlichkeit und fünf Publikationen zu FGR/SGA/IUGR analysiert.

Aus den 13 identifizierten Publikationen, die vollständige Daten zum Geburtsgewicht und der Schwangerschaftslänge der ersten und zweiten Schwangerschaft angaben, wurde die relative Gewichtsänderung der Neugeborenen von der zweiten zur ersten Schwangerschaft berechnet:

$$\text{Relative Gewichtsänderung} = \frac{\text{Mittleres Geburtsgewicht in der 2. Schwangerschaft}}{\text{Mittleres Geburtsgewicht in der 1. Schwangerschaft}}$$

Bei den Schwangerschaftskomplikationen wurde zum einen das relative Risiko für das Wiederauftreten einer bestimmten Komplikation nach erster Schwangerschaft mit ebendieser oder die Wahrscheinlichkeit für die erneute Abwesenheit einer bestimmten Komplikation nach unkomplizierter erster Schwangerschaft berechnet. Folglich wurde die relative Risikoerhöhung oder -reduktion im Vergleich zur ersten Schwangerschaft berechnet:

$$\text{Relatives Risiko} = \frac{\text{Erkrankungsinzidenz in der 2. Schwangerschaft}}{\text{Erkrankungsinzidenz in der 1. Schwangerschaft}}$$



**Abbildung 2: Fließdiagramm zur Identifikation passender Studien**

Das Fließdiagramm zeigt den Weg der Identifikation, Untersuchung und Inklusion der Publikationen in die quantitative Analyse.

Abkürzungen: PIH: pregnancy induced hypertension; HIV: Humanes Immundefizienz-Virus.

Abbildung modifiziert nach (Thiele, Ahrendt, *et al.*, 2019)

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Chemikalien

Alle genutzten Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Chemikalien**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
CitiFlour™ AF Covering medium	Electron Microscopy Science, Hatfield, Großbritannien
Collagenase vom Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC) treated Water	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nukleosidtriphosphate (dNTPs) 100 mM	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Diphtherietoxin (DT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Deoxyribonucleic acid (DNA) Loading Dye 6X	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanoic Acid (1%)	J.T.Baker, Center Valley, Pennsylvania, USA
Ethanol (99%), denaturiert	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland
Eukitt medium	Eukitt, O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Formaldehyde solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Goldner 1 (azophloxine solution)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Goldner 2 (phosphotungstic acid)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Goldner 3 (light-green SF solution)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hyaluronidase from bovine	Sigma- Aldrich Chemie GmbH. München, Deutschland
Invitrogen™ UltraPure™ 10 mg/ml-Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 50 mM	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Normal Rat Serum	Jackson ImmunoResearch Laboratories West Grove, Pennsylvania, USA
Paraffin	DCS, Hamburg, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA)	Biochemica, Billingham, Großbritannien
Polymerase chain reaction (PCR) Buffer (no magnesium chloride) 10X	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Platinum Taq DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Red blood cell (RBC) Lysis Buffer	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA
RNAlater®	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-Acetate-EDTA-Buffer (TAE) 10X	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypan Blue Stain (0.4%)	0.4 %, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Weigert's iron hematoxylin (equal ratio of Ferric Hematoxylin solution A and B)	Waldeck, Münster, Deutschland
Xylene Substitut	XEM, d-Limonene C10H16, DiaTech GmbH & Co. KG, Bamberg, Deutschland

### 3.2.2 Kits

Genutzte Kits werden in Tabelle 2 aufgelistet. Es wurde stets der Anleitung des Herstellers gefolgt.

**Tabelle 2: Kits**

Name	Firma
DNeasy Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
FoxP3Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA

### 3.2.3 Primer

Die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benötigten Primer stehen in Tabelle 3. Alle zusätzlichen Materialien, die für die PCR genutzt wurden sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 3: Primer für die PCR**

Primer	Sequenz 5'>3'	Firma
b-Actin fwd.	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	Europhins Genomics
bActin rev.	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	Europhins Genomics
eGFP 3'	CGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCTC	Europhins Genomics
eGFP 5'	CCTACGGCGTGACAGTGCTTCAGC	Europhins Genomics

### 3.2.4 Antikörper

Alle Antikörper, die für die Durchflusszytometrie genutzt wurden sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Antikörper Durchflusszytometrie**

Antikörper	Konjugiertes Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Firma
Anti-CD3	PE eFlour610	145-2C11	1:200	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
	BV421	145-2C11	1:100	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
	PE-Cy7	145-2C11	1:200	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-CD4	Pacific Blue	RM4-5	1:100	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
	FITC	RM4-5	1:400	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
	AF700	GK1.5	1:200	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
	BV605	RM4-5	1:200	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-CD8	BV650	53-6.7	1:100	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-CD25	APC	PC61	1:200	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

	BV605	PC61	1:100	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-CD44	Pacific Blue	IM7	1:200	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
	BV785	IM7	1:100	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-CD45	APC-Cy7	30-F11	1:400	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-FoxP3	PE	FJK-16s	1:200	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD16/CD3 2 Block		93	1:200	TrueStain fcX™, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fixable Viability Dye eFlour™	eFluor™ 506	nicht angegeben	1:1000	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
OVA Tetramer	PE	42747 I-A(d)	1:10	Sequence: ISQAVHAAHAEINEA GR

Abkürzungen: FITC: Fluorescein Isothiocyanate; PE: R-phycoerythrin; Cy: Cyanine;  
APC: Allophycocyanin; BV: Brilliant Violet

### **Tabelle 5: Antikörper-Konfokalmikroskopie**

Alle Antikörper, die für die Konfokalmikroskopie genutzt wurden, sind in Tabelle 5 aufgelistet.

<b>Antikörper</b>	<b>Konjugiertes Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
DAPI	eFlour 405	Nicht angegeben	1:1000	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SOX2	eFlour 570	Btjce	1:100	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA
NANOG	eFlour 660	eBioMLC-51	1:200	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA

### 3.2.5 Plastikmaterial und andere Materialien

Alle benutzten Plastikmaterialien und weitere genutzte Materialien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Plastikmaterial und andere Materialien**

<b>Instrument</b>	<b>Company</b>
12-Kammer-Platte	Ibidi Martinsried, München, Deutschland
Blut-Monovette (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Zellsieb (40µm Nylon)	Falcon Brand Products, Corning, New York, USA
Einbettungskassette „Macro“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorfer Röhrchen 1,5ml (Eppendorf Tubes ® 310X)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen 15ml, 50ml	CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Röhrchen	Corning, New York, USA

Pasteur Pipette 3ml	Pastette, Alpha Laboratories Limited, Eastleigh, Hampshire, Großbritannien
PCR-Streifen 8 Tube	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Standard Mikroskop	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Kannüle 26G x ½ " 0,45 x 12mm	B. Braun Melsungen AG, Hessen, Deutschland
Spritze 1ml	Omnifix-F, B. Braun Melsungen AG, Hessen, Deutschland

### 3.2.6 Equipment und Instrumente

Genutztes Equipment und Instrumente sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Instrumente**

Name	Firma
Digitale Herdplatte mit magnetischem Rührer	Scilogex, Rocky Hills, Connecticut, USA
Flow cytometer (FACS) LSR Fortessa	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Gel-Dokumentations-System Gel Doc XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mastercycler® nexus GX2	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Kaps, Asslar/Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	SM2010R, Leica, Bensheim, Deutschland
Mikrowelle	Robert Bosch GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Slide scanner Mirax Midi	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland

### 3.2.7 Software

Software, die zur Analyse der Daten genutzt wurde, ist in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 8: Software**

<b>Software</b>	<b>Company</b>
FACSDiva™ Software version 8.0.1	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo version 9.9.6 für Apple Mac	TreeStar, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism version 7	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
ZEN 2.3 (Blaue Edition)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland

### 3.2.8 Mäuse

Die Mäuse wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in einer keimfreien Umgebung in belüfteten Käfigen gehalten. In einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden hatten die Mäuse Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Die männlichen Mäuse wurden individuell, die weiblichen Mäuse in Gruppen von vier bis sechs Tieren, gehalten.

**Tabelle 9: Mauslinien**

Name	Abkürzung	Herkunft	Referenz
C57BL6/J	-	Charles River	-
Balb/cJ	-	Zucht UKE	-
CByJ.SJL(B6)- Ptprc <sup>a</sup> /J_C57BL/6-Tg(CAG- OVA)916Jen/J	Act-mOVA- Balb/C	Zucht UKE	(Ehst, Ingulli and Jenkins, 2003)
FOXP3-IRES-mRFP (Fir)/IL-10 IRES GFP-enhanced (Tiger)	Fir/Tiger	Zucht UKE	(Y. Y. Wan and Flavell, 2005; Kamanaka <i>et al.</i> , 2006)
C57BL/6-Tg(Foxp3- HBEGF/EGFP)23.2Spar/Mmjax	DEpletion of REGulatory T cells (DEREG)	Zucht UKE	(Lahl <i>et al.</i> , 2007)

### 3.2.9 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von C57BL6/J-DEREG- und Act-mOVA-Mäusen

Von allen C57BL6/J-DEREG- und Act-mOVA-Nachkommen wurden Schwanzbiopsien entnommen. Die DNA hieraus wurde mit Hilfe des „DNeasy Blut und Gewebe“-Kits nach Anleitung des Herstellers isoliert. Der PCR-Mastermix enthielt für jede Probe 5 µl des Puffers, 2 µL MgCl<sub>2</sub>, 5 µl Nukleosidtriphosphate (dNTPs) (2 mM), 1 µl jedes Primers, 0,25 µl Platinum Taq-Polymerase (thermostabile Polymerase) und 28,75 µl deionisiertes, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes und 0,22 µm membrangefiltertes Wasser. 45 µl Mastermix und 5 µl isolierte DNA wurden in einen PCR-Streifen pipettiert. Zur Amplifikation wurde für die DEREG-PCR folgendes Programm genutzt: Zunächst wurde ein Heißstart (engl. *hot-start*) bei 94 °C für zehn Minuten durchgeführt, darauf folgten 40 Zyklen mit je 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 64 °C und 30 Sekunden bei 72 °C. Schließlich wurden die Proben noch einmal für fünf Minuten bei 72 °C Hitze zur vollständigen, abschließenden Synthese aller DNA-Produkte gehalten. Zur Amplifikation wurde für die Act-mOVA-PCR folgendes Programm genutzt: Zu Beginn einmalig fünf Minuten bei 95 °C (*hot-start*), danach 35 Zyklen von jeweils einer Minute bei 95 °C, einer Minute bei 58 °C, einer

Minute bei 72 °C und zum Schluss noch einmalig 10 Minuten bei 72 °C. Danach wurden alle Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. In einem 2,5%igen Agarose-Gel wurde die Banden-Größe der DNA analysiert. Hierfür wurden 5 g trockenes Agarosepulver in 200 ml einmal verdünntem Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer aufgelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Suspension für das Gel abgekühlt war, wurden 4 µl Ethidium-Bromid hinzugefügt, um die DNA-Banden später in fluoreszierendem Licht sichtbar zu machen. Das Gel wurde anschließend in eine dafür vorgesehene Kammer gegossen und für 30 Minuten zum Abkühlen stehen gelassen. Nachdem das Gel fest war, wurde die Kammer mit einfach verdünntem TAE-Puffer gefüllt. Vor dem Beladen des Gels mit den DNA-Proben wurden diese einfach mit DNA-Lade-Farbstoff verdünnt. Der DNA-Lade-Farbstoff enthält Bromphenolblau und Xylencyanol, was den Verlauf der DNA im Agarose-Gel sichtbar macht. Es wurden jeweils 20 µl der mit Ladepuffer verdünnten DNA-Probe in die Tasche des Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei 100 Volt (V) für 80 Minuten. Das Gel wurde anschließend bei ultraviolettem (UV)-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm analysiert. Bei den DEREK-Mäusen zeigten Wildtyp (WT)-Mäuse nur ein Fragment bei 150 Basenpaaren, die transgenen DEREK Mäuse zeigten zwei Fragmente bei 150 und 350 Basenpaaren. Bei den Act-mOVA exprimierenden Mäuse zeigten sich zwei Fragmente bei 250 und 500 Basenpaaren, bei WT-Mäusen zeigte sich nur bei 200 Basenpaaren eine Bande. Die jeweiligen Gele wurden in der Analyse-Kammer mit einem dafür vorgesehenen Gerät fotografiert und mit ImageJ analysiert.

### **3.3 Versuchsaufbau**

Weibliche und männliche Mäuse wurden in allen Versuchsreihen allogon verpaart. Die Verpaarung der Tiere erfolgte ab dem Nachmittag eines Tages für maximal sieben Tage. Während der Verpaarung erfolgte jeden Morgen bei allen Weibchen eine Kontrolle des Scheideneingangs auf einen Vaginalpfropf. Dieser sprach für eine erfolgte Insemination durch das Männchen während der Nacht. Der Tag des Vaginalpfropfs galt stets als Tag (Gd) 0,5 der Trächtigkeit. Erste und zweite Trächtigkeit erfolgten zeitlich abgestimmt. So wurden zunächst die sechs bis acht Wochen alten Weibchen verpaart. Nachkommen aus der ersten Trächtigkeit wurden am Tag der Geburt getötet, um die Laktation und damit verbundene Hormonumstellungen zu vermeiden und möglichst schnell wieder einen nicht-

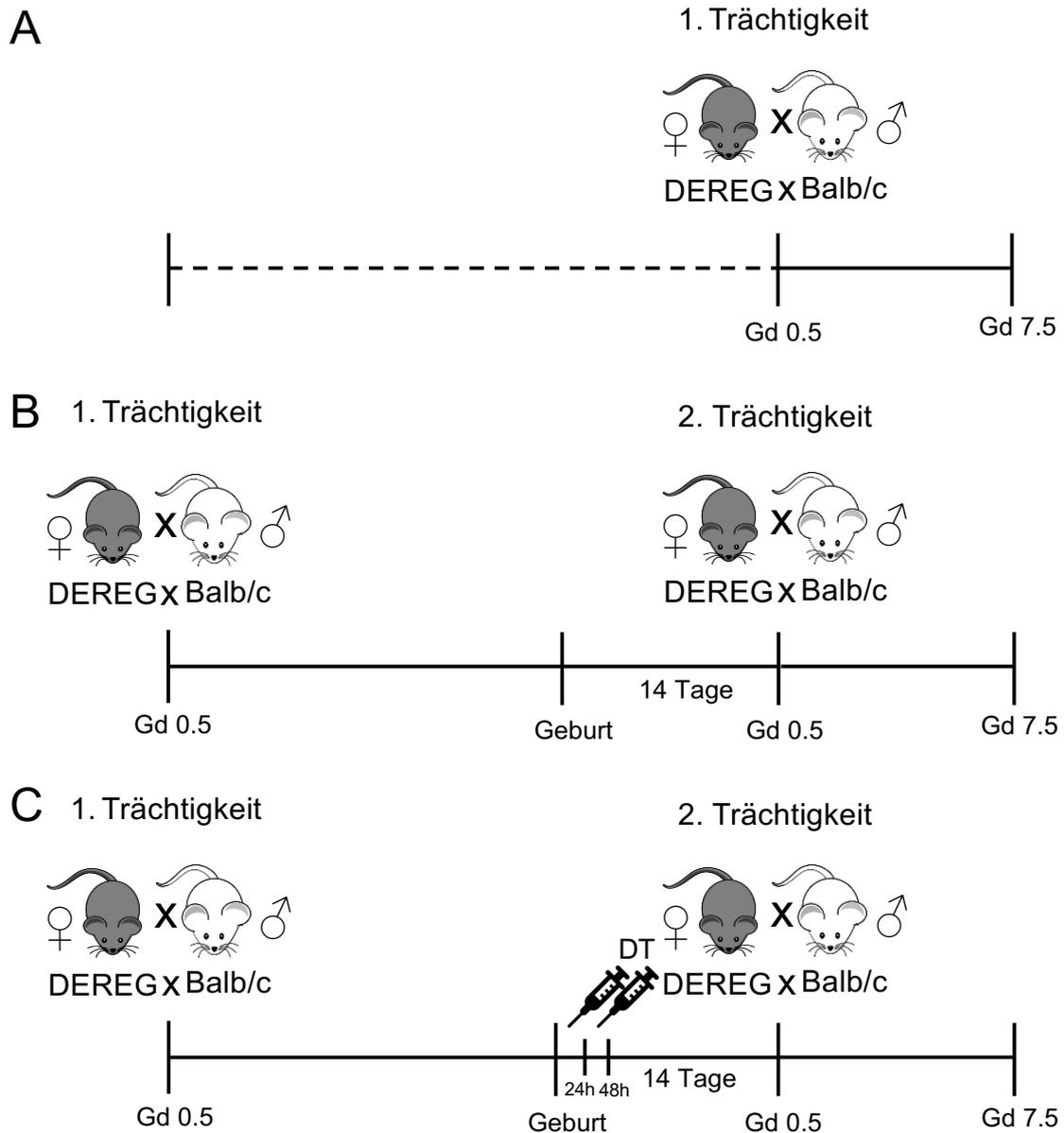
trächtigen Hormonstatus zu erreichen. Um dies zu unterstützen wurde nach der ersten Geburt 14 Tage bis zur erneuten Verpaarung abgewartet. Dann wurden die Weibchen erneut mit demselben Männchen und alterskontrolliert die Weibchen der Kontrollgruppe erstmalig mit einem Männchen verpaart.

Die Tötung der Tiere erfolgte abhängig vom Versuch an Tag 7,5 oder 15,5 der Trächtigkeit.

### **3.3.1 Einfluss von regulatorischen T-Zellen in erster und zweiter Trächtigkeit**

#### **3.3.1.1 Terminierte Trächtigkeit**

Für diesen Versuchsaufbau wurden acht bis zehn Wochen alte C57BL6/J-DEREG-Weibchen, allogon mit Balb/c-Männchen verpaart. Alterskontrolliert erfolgte die Verpaarung in drei Gruppen: eine Gruppe für die erste Trächtigkeit (Abb. 3 A), eine Gruppe für zweimalige aufeinanderfolgende Trächtigkeit (Abb. 3 B) und eine Gruppe mit zweimaliger Trächtigkeit, bei der nach der ersten Trächtigkeit die Tregs mittels Diphtherietoxin (DT) depletiert wurden (Abb. 3 C). Zunächst wurden zwei Drittel der Weibchen verpaart. All diese Mäuse hatten eine ungestörte erste Trächtigkeit und wurden nach der Geburt schnellstmöglich vom Wurf getrennt. Die Hälfte dieser Mäuse fungierte als Kontroll-Gruppe für zweimalige, aufeinanderfolgende und ungestörte Trächtigkeit (Abb. 3 B), bei der anderen Hälfte wurde DT zur Depletion der Tregs intraperitoneal injiziert. Nach 14 Tagen wurden alle Weibchen erneut verpaart (Abb. 3 B, C). Zeitgleich wurden die Mäuse der Kontrollgruppe für die erste Trächtigkeit verpaart (Abb. 3 A). Die Sektion der Weibchen erfolgte an Tag 7,5 der Trächtigkeit.



**Abbildung 3: Mausmodell zur Untersuchung des Einflusses von Tregs auf die Trächtigkeit.**

DEREG-Weibchen wurden allogon mit Balb/c-Männchen in unterschiedlichen Kohorten verpaart. Kohorte (A) war die Kontrollgruppe für die erste Trächtigkeit. Kohorten (B) und (C) hatten zunächst eine ungestörte Trächtigkeit. 24 und 48 h nach der Geburt erhielten Weibchen der Kohorte (C) zur Deletion aller regulatorischen T-Zellen (Tregs) eine intraperitoneale Injektion mit 500 ng Diphtherietoxin (DT). 14 Tage später wurden Kohorte (A) zeitgleich mit Kohorten (B) und (C) für die zweite Trächtigkeit verpaart. Die Mäuse wurden an Tag (Gd) 7,5 der Trächtigkeit zur Analyse getötet.

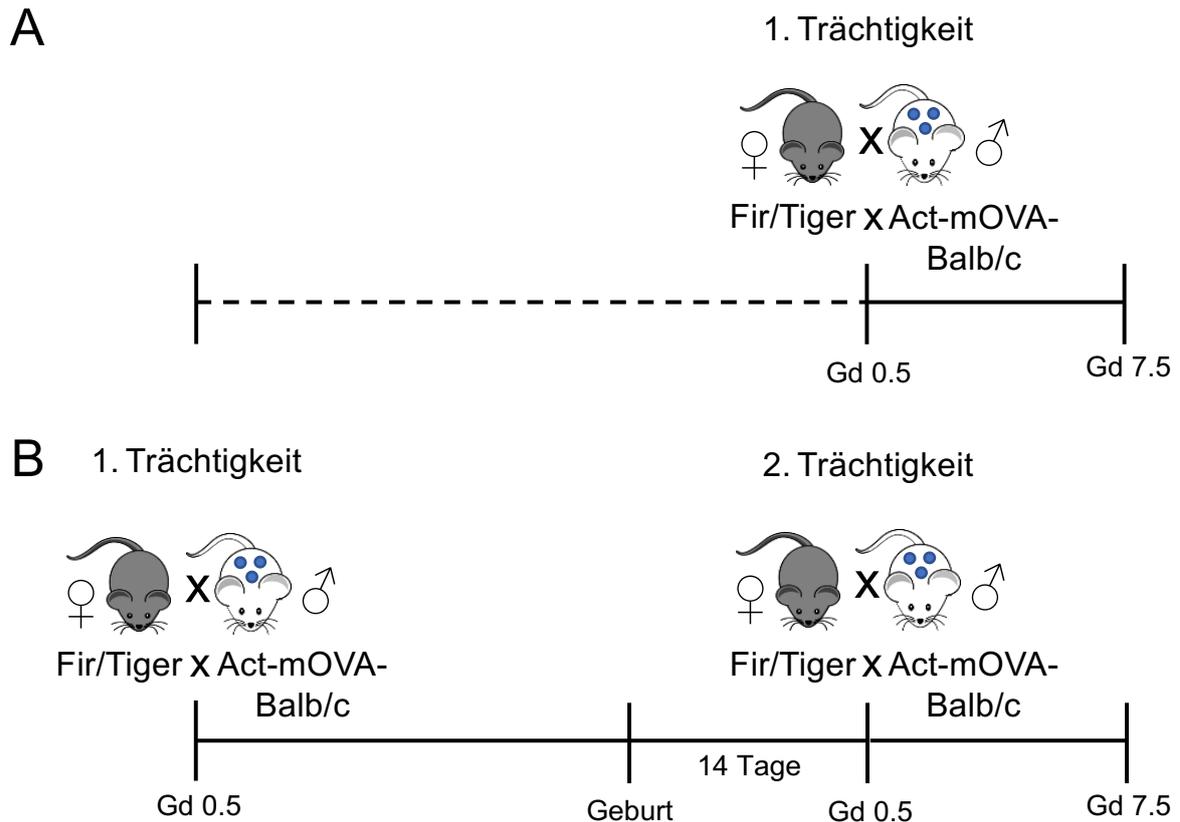
### **3.3.1.2 Depletion regulatorischer T-Zellen durch Diphtherietoxin-Injektion in DEREK-Mäusen**

Zur Depletion aller regulatorischen T-Zellen im DEREK-Mausmodell nach der ersten Trächtigkeit erhielten die Mäuse der entsprechenden Gruppe eine intraperitoneale Injektion mit DT unter sterilen Bedingungen.

Das DT wurde in Aliquots zu je 10 µg/µl bei -80 °C gelagert und nur einmalig zur Injektion aufgetaut. Die Injektionslösung wurde unter einer sterilen Werkbank vorbereitet. Hierfür wurden 2 µg/µl des DT Aliquots in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS oder PBS) 1:40 verdünnt. Diese verdünnte DT-Lösung wurde erneut in sterilem PBS zu einer Konzentration von 1:100 verdünnt. Davon wurden 100 µl (entspricht 500 ng DT) mit einer sterilen 26 Gauge (G) Kanüle in die Mäuse injiziert. Die Injektion erfolgte zweimal 24 und 48 Stunden nach der Geburt (Abb. 2 B). 72 Stunden nach der Geburt wurde die erfolgreiche Depletion der Tregs durch eine Blutprobe der Mäuse durchflusszytometrisch kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle des Stresses, der durch die intraperitoneale Injektion entsteht, erhielten auch die Weibchen anderer Gruppen entweder 24 und 48 Stunden nach der ersten Geburt oder vor der ersten Verpaarung eine intraperitoneale Injektion mit 100 µl sterilem PBS. Nach der Injektion wurde das Wohlbefinden der Mäuse regelmäßig kontrolliert. Systemische, toxische Effekte durch die Injektion des DT wurden in vorangegangenen Experimenten in der Arbeitsgruppe ausgeschlossen.

### **3.3.2 Erfassung Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen in der ersten und zweiten Trächtigkeit**

Zur Erfassung Fetal-Antigen-spezifischer Tregs wurden Fir/Tiger-Weibchen allogon mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen verpaart. Alterskontrolliert erfolgte die Verpaarung in zwei Gruppen: eine Gruppe für die erste Trächtigkeit (Abb. 4 A) und eine Gruppe für die zweite Trächtigkeit (Abb. 4 B). Vor der erneuten Verpaarung für die Mäuse, die eine zweite Trächtigkeit erwarteten, wurde 14 Tage abgewartet. Die Sektion der Mäuse erfolgte an Tag 7,5 der Trächtigkeit.



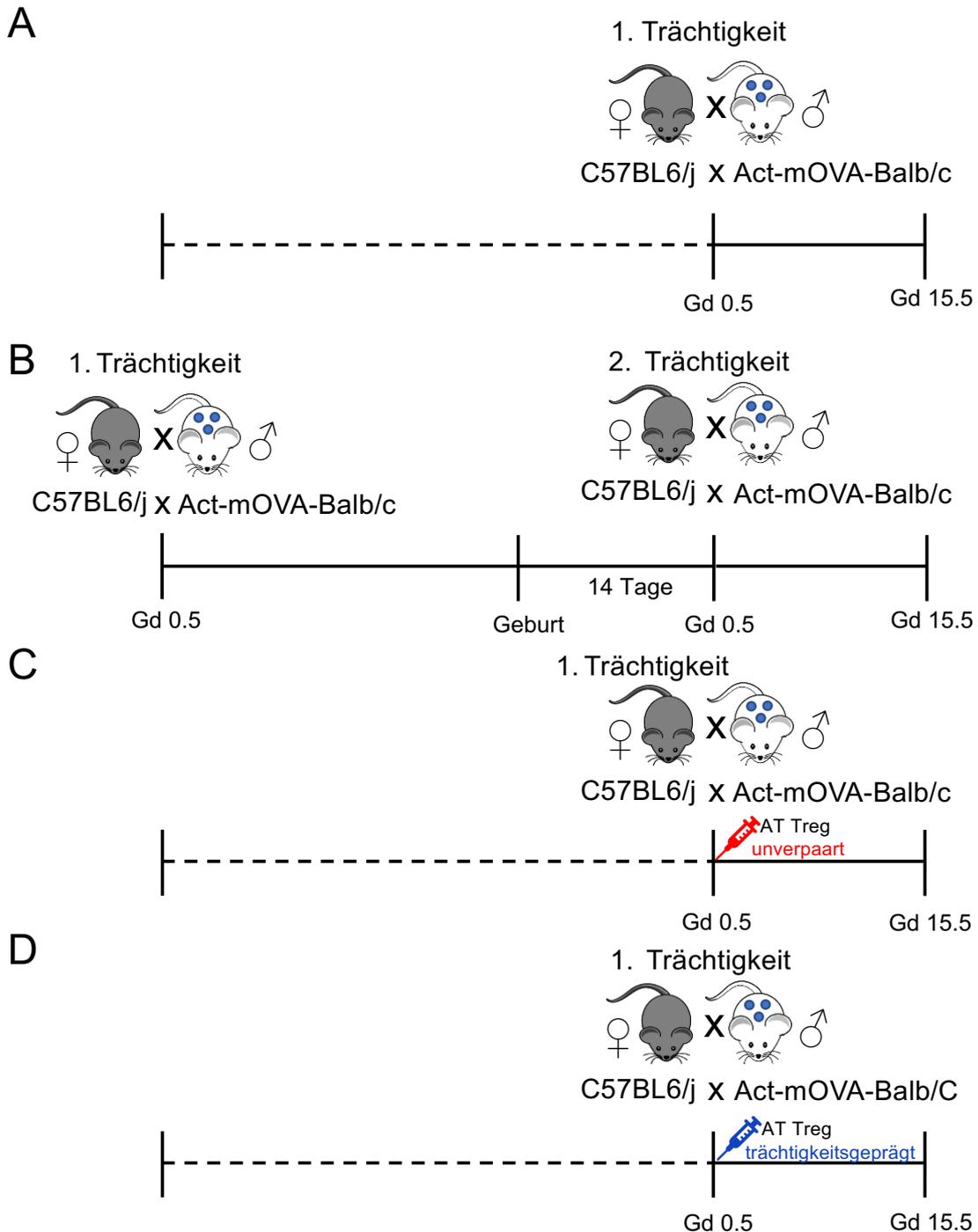
**Abbildung 4: Mausmodell zur Identifikation Fetal-Antigen-spezifischer Zellen.** Fir/Tiger-Weibchen wurden allogam mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen (blauer Punkt kennzeichnet OVA-Antigen) in zwei Kohorten verpaart. Mäuse der Kohorte (A) hatten eine ungestörte Trächtigkeit. Mäuse der Kohorte (B) hatten zunächst eine ungestörte Trächtigkeit. 14 Tage nach der Geburt wurden Mäuse der Kohorte (B) für die zweite Trächtigkeit zur selben Zeit wie Kohorte (A) verpaart. Die Mäuse wurden an Tag (Gd) 7,5 der Trächtigkeit zur Analyse getötet.

### 3.3.3 Adoptiver Zelltransfer von unterschiedlich geprägten regulatorischen T-Zellen

Zur genaueren Untersuchung der funktionellen Kapazität von Tregs hinsichtlich der Verbesserung des Trächtigkeitsergebnisses wurde ein adoptiver Zelltransfer von unterschiedlich geprägten Tregs vorgenommen (Abb. 5). Der adoptive Zelltransfer bietet die Möglichkeit Migration und Verteilung von transferierten Zellen *in vivo* zu untersuchen. Die Zellen können über Oberflächenzellmarker verfolgt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden.

C57BL/6J-Weibchen wurden allogon mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen in zwei Kontrollgruppen für die erste (Abb. 5 A) und zweite Trächtigkeit (Abb. 5 B) verpaart. In zwei weiteren Gruppen wurden die C57BL/6J-Weibchen zeitlich abgestimmt mit den Act-mOVA-Balb/c-Männchen verpaart und bekamen jeweils am Tag des Vaginalpfropfs 150.000 Tregs von unverpaarten Mäusen (Abb. 5 C) oder trächtigkeitsgeprägte Tregs (Abb. 5 D) intravenös (i.v.) injiziert. Am Tag der Vaginalpfropfkontrolle wurde anhand der Anzahl der Vaginalpfropfe bei den verpaarten C57BL/6J-Weibchen entschieden wie viele Spendertiere für den adoptiven Zelltransfer an diesem Tag benötigt wurden. Die 150.000 trächtigkeitsgeprägten Tregs wurden am Tag des Vaginalpfropfs aus den paraaortalen Lymphknoten und dem Uterus zweimal trächtig gewesener Fir/Tiger-Weibchen gewonnen, wobei die letzte Trächtigkeit mindestens sieben Tage her sein musste. Die Trächtigkeit entstanden im Vorfeld durch die Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Für die naiven Tregs wurden aus unverpaarten Fir/Tiger-Weibchen 150.000 Tregs aus den paraaortalen Lymphknoten, dem Uterus und zusätzlich der Milz gewonnen, da die Anzahl der Tregs aus paraaortalen Lymphknoten und dem Uterus alleine nicht ausreichte. Als Spendertiere wurden Fir/Tiger-Weibchen ausgewählt, da diese in der Theorie das Wiederfinden der injizierten Tregs ohne weitere Färbung mit zusätzlichen Antikörpern in C57BL/6J-Weibchen in der Durchflusszytometrie erlauben.

Die Sektion und Analyse der Mäuse, Feten und Plazenten erfolgte an Tag 15,5 der Trächtigkeit.



**Abbildung 5: Mausmodell zur Evaluation der funktionellen Rolle von Tregs in der Trächtigkeit.** C57BL6/J-Weibchen wurden allogren mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen in vier Kohorten verpaart. Die Kohorten (A) und (B) dienen als Kontrollgruppen für die erste (A) und zweite (B) Trächtigkeit. Mäuse der Kohorte (A) hatte eine ungestörte Trächtigkeit. Mäuse der Kohorte (B) hatten zunächst eine ungestörte Trächtigkeit. 14 Tage nach der Geburt wurden Mäuse der Kohorte (B) für die zweite Trächtigkeit zur selben Zeit wie Kohorte (A) sowie (C) und (D) verpaart Die Kohorten (C) und (D) waren

die Interventionsgruppen. Mäusen der Kohorte (C) wurden nach Verpaarung am Tag des Vaginalpropfs (Gd 0,5 der Schwangerschaft) 150.000 unverpaarte (naive) Tregs, welche unmittelbar zuvor aus einem unverpaarten Fir/Tiger-Spenderweibchen gewonnen wurden, intravenös injiziert. Mäuse der Kohorte (D) erhielten am Tag des Vaginalpropfs 150.000 trächtigkeitsgeprägte Tregs intravenös, welche ebenfalls unmittelbar zuvor aus einem Fir/Tiger-Spenderweibchen, welches zweimal trächtig gewesen war, gewonnen wurden. Die Tiere wurden an Gd 15,5 der Trächtigkeit für die Analyse getötet.

### **3.3.3.1 Gewinnung und Aufbereitung der Zellen für den adoptiven Zelltransfer**

Die für den adoptiven Zelltransfer benötigten naiven (unverpaarten) Tregs (nTregs) wurden aus unverpaarten Fir/Tiger-Weibchen gewonnen.

Zur Gewinnung von trächtigkeitsgeprägten Tregs wurden Fir/Tiger Spenderweibchen mit Act-mOVABalb/c Männchen verpaart. Diese Weibchen hatten zweimal eine ungestörte Trächtigkeit. Es ist davon auszugehen, dass Tregs, welche durch diese Verpaarung generiert wurden, auch potenzielle, durch die Trächtigkeit geprägte, Gedächtnis-Tregs (engl. *memory Tregs* (mTregs)) enthalten. Die Weibchen wurden innerhalb von sieben Tagen nach der zweiten Geburt als Spendermaus getötet, abhängig davon, wann im Experiment (Abb. 5 D) ein Vaginalpfropf auftrat.

Die Spendermäuse wurden durch eine 80%ige CO<sub>2</sub> und 20%ige O<sub>2</sub>-Narkose anästhesiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Die weitere Präparation und Organ-, sowie Zellgewinnung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zur Gewinnung der Spenderzellen wurden bei den Mäusen nach zweimaliger Trächtigkeit die inguinalen und paraaortalen Lymphknoten, sowie der Uterus gewonnen, bei unverpaarten Mäusen wurde zusätzlich die Milz entnommen. Alle Organe wurden zu Einzelzelllösungen verarbeitet (genaue Details zur Verarbeitung siehe 3.6.1 und 3.6.2 sowie 3.6.4). Die Zellen wurden anschließend gefärbt und im BD Aria Fusion nach CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> sortiert (Daten nicht gezeigt). Kumulativ wurden 150.000 Zellen aus den Organen gesammelt. Die sortierten Zellen wurden in einem 15ml Falcon Tube aufgefangen, welches innen mit fetalem Kalbsserum (engl. *fetal calf serum* (FCS)) beschichtet wurde. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit sterilem PBS gewaschen, um das FCS zu entfernen (8 Minuten bei 4 °C und 450 g). Danach wurden die Zellen in 1 ml sterilem PBS suspendiert und erneut zentrifugiert.

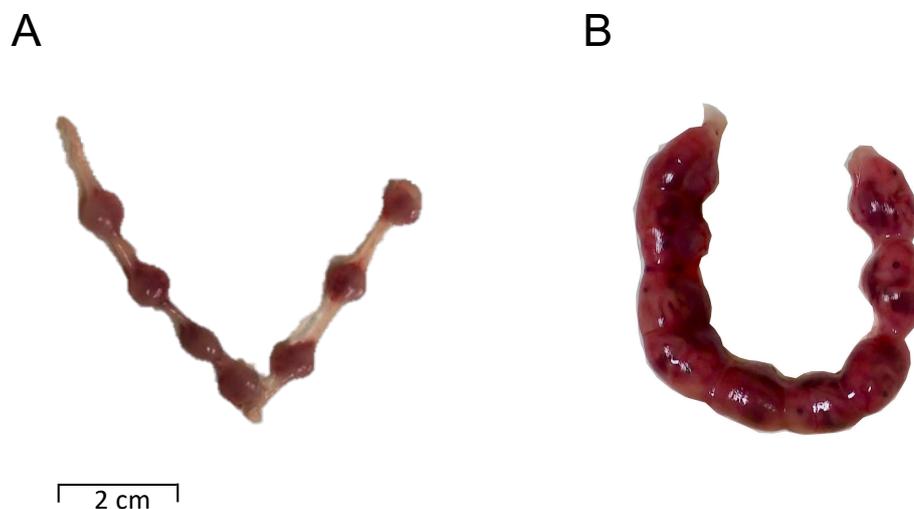
Nachdem der Überschuss abgekippt wurde, wurden die Zellen in 100 µl sterilem PBS suspendiert und in eine sterile Spritze aufgezogen.

### 3.3.3.2 Adpotiver Transfer der Zellen

Die Zellen (mTregs oder nTregs) wurden den Empfängermäusen am Tag des Vaginalpropfs mit einer 26 G-Kanüle in den retroorbitalen Venenplexus injiziert. Hierfür wurden die Tiere kurz mit dem oben genannten CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Gasgemisch anästhesiert. Das Wohlbefinden der Mäuse wurde danach regelmäßig kontrolliert.

### 3.4 Ausgang der Trächtigkeit

Der Ausgang der Trächtigkeit wurde abhängig vom Versuchsaufbau an Tag 7,5 oder 15,5 der Trächtigkeit untersucht. An Tag 7,5 war es nur möglich die Anzahl der Implantationen zu erfassen (Beispielbild Abb. 6 A). An Tag 15,5 war es möglich, neben der Anzahl der Feten auch die Aborte zu quantifizieren. Letztere stellten sich als hämorrhagische Flecken dar. Zusätzlich wurde an Tag 15,5 das Gewicht der Feten und Plazenten bestimmt und dokumentiert (Beispielbild Abb. 6 B).



**Abbildung 6:** Exemplarischer trächtiger Uterus an Tag 7,5 links (A) mit sieben Implantationen/Embryonen und 15,5 rechts (B) mit neun Feten.

### 3.5 Gewebeentnahme

Für die Gewebeentnahme wurden die Mäuse zunächst mit einem 80%igen CO<sub>2</sub> und 20%igen O<sub>2</sub>-Gasgemisch anästhesiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Vor der zervikalen Dislokation wurde den anästhesierten Mäusen Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen, welches in einem EDTA beschichteten

Röhrchen aufgefangen wurde. Die Bauchdecke inklusive Peritoneum wurde eröffnet. Die paraaortalen Lymphknoten wurden entnommen und in einem 10ml Falcon-Tube gefüllt mit PBS auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Uterus entnommen, vom umgebenden Gewebe gesäubert und in einer Petrischale gefüllt mit PBS ebenfalls auf Eis gelagert. Fand die Sektion der Mäuse an Tag 7,5 statt, wurde der Uterus längs inzidiert, die Implantationen entnommen und jeweils einzeln in einem mit RNA-later® gefüllten Eppendorf-Tube gelagert. Je eine Implantation wurde zur histologischen Aufarbeitung für 24h in Formaldehyd und anschließend in PBS gelagert. An Tag 15,5 wurden die Feten einzeln sehr vorsichtig aus dem aus dem eröffneten Uterus entfernt, gewogen und danach einzeln in „Macro“-Kassetten in Bovine gelagert. Die Plazenten wurden ebenfalls vorsichtig entfernt. Eine Hälfte der Plazenten wurde jeweils einzeln gewogen und in mit RNA-later® gefüllten Eppendorf-Tubes 24 h bei 4 °C im Kühlschrank und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die andere Hälfte wurde für die histologische Aufarbeitung in „Macro“-Kassetten für 24 h bei 4 °C in 4 % Formaldehyd und danach in PBS gelagert.

### **3.6 Gewebeverarbeitung**

Zur bestmöglichen Sicherung der Zellqualität wurden alle Schritte der Gewebeverarbeitung auf Eis durchgeführt. Es wurde nur davon abgewichen, wenn es das Protokoll verlangt hat. Die Zentrifugation wurde stets bei 450 g und 4 °C für 8 Minuten durchgeführt.

Alle Protokolle zur Gewebeverarbeitung waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert.

#### **3.6.1 Uterus-drainierende Lymphknoten oder inguinale Lymphknoten**

Die den Uterus drainierenden, paraaortalen Lymphknoten wurden mit Hilfe des Kolbens einer 1 ml Spritze durch ein 40 µm Nylon-Sieb in einer Petrischale zerdrückt. Das Sieb wurde mehrfach mit PBS gespült. Die Suspension wurde mit Hilfe einer 3 ml Einweg-Pasteur-Pipette in ein neues 15 ml Falcon-Tube transferiert und zentrifugiert. Der Überschuss wurde verworfen, das Zell-Pellet wurde in 1 ml PBS suspendiert und auf Eis gelagert, bis die Zellen weiterverarbeitet wurden.

#### **3.6.2 Uterus**

Mit einer kleinen Schere wurde der entleerte Uterus in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube, als Vorbereitung auf den enzymatischen Verdau, in sehr kleine Stückchen

zerschnitten. Für den Verdau wurden in einem 15 ml Falcon-Tube 5 mg Bovine Serum Albumin (BSA), 5 mg Kollagenase und 1,4 mg Hyaluronidase in 5 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gelöst. Der zerkleinerte Uterus wurde zum Verdauungsansatz hinzugegeben. Für den Verdau wurde das Falcon-Tube inklusive eines magnetischen Rührstäbchens für eine konstante Bewegung des Gewebes während des Verdauens bei 37 °C für 20 min und bei 500 rpm auf einer magnetischen Herdplatte im vorgeheizten Wasserbad belassen. Anschließend wurde das Falcon-Tube für 2 Minuten auf Eis gestellt, 3 ml des Überstandes über ein 40 µm Nylon-Sieb in ein neues 50 ml Falcon-Tube gefiltert und 3 ml frisches HBSS zum Verdauungsansatz gegeben. Der Verdauungsansatz wurde erneut für 20 Minuten im Wasserbad verdaut. Danach wurde der gesamte Verdauungsansatz über das 40 µm Nylon-Sieb gefiltert und mehrfach mit PBS gespült. Die Suspension wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 1 ml PBS suspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **3.6.3 Blut**

Das Blut wurde mit Hilfe einer 3 ml Einweg-Pasteur-Pipette aus dem EDTA-beschichteten Röhrchen in ein 50 ml Falcon-Tube transferiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurde 5 ml Red Blood Cell (RBC) Lyse Buffer hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzugeben von 40 ml kaltem PBS gestoppt. Die Suspension wurde zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet wurde in 1 ml PBS suspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **3.6.4 Milz**

Die Milz wurde mit Hilfe eines 40 µm Nylon-Siebs auf einem 50 ml Falcon-Tube mit dem Kolben einer 1 ml Spritze zerdrückt. Das Sieb wurde anschließend mit reichlich PBS gespült. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überschuss wurde verworfen. Anschließend wurden die Erythrozyten, wie in 3.6.3 beschrieben mit 3 ml RBC-Lyse Buffer lysiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzugeben von 40 ml kaltem PBS gestoppt. Nach Beendigung der Lyse wurde die Suspension zentrifugiert und der Überschuss verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS suspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### 3.6.5 Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) wurde die Konzentration der Zellen in den jeweiligen Zellsuspensionen bestimmt. Eine 10 µl Suspensionsprobe wurde 1:10 (Uterus) oder 1:50 (Lymphknoten und Milz) in Trypanblau-Lösung verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Die Zellen in allen vier Quadranten wurden gezählt und der Mittelwert wurde ermittelt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet: Mittelwert x Verdünnungsfaktor (10 oder 50) x  $10^4$  =Zellzahl/ml).

### 3.6.6 Durchflusszytometrie

Zur Färbung der Zellen mit Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse wurden  $1 \times 10^6$  Zellen jedes Organs benutzt. Die Zellen wurden in spezielle durchflusszytometrische (engl. *Flourescence Activated Cell Sorting*, FACS) Röhrchen pipettiert und nach Hinzugabe von 1ml PBS zentrifugiert (450 g, 4°C, 8 Minuten). Der Überschuss wurde verworfen und unspezifische Bindungen am  $F_c$ -Rezeptor, sowie an der Zelloberfläche wurden im Zellpellet durch die Inkubation mit einem Ratten Anti-Maus CD16/CD32 Antikörper ( $F_c$  Block) und normalem Rattenserum (NRS; Oberflächen-Block) für 15 Minuten bei 4° an einem dunklen Platz (Kühlschrank) inkubiert. Danach wurden die Zellen je nach Experiment mit den unterschiedlichen Antikörper-Mixen für die oberflächliche Zellmarkierung gefärbt und für 30 Minuten bei 4°C in der Dunkelheit inkubiert. Die optimale Konzentration für jeden Antikörper wurde bereits vorher in der Arbeitsgruppe etabliert. Alle Antikörper und deren Konzentration sind in Tabelle 4 aufgelistet. Zeitgleich mit dem Antikörper-Mix erfolgte die Inkubation mit *eFlour506 Fixable Viability Dye* zur Identifikation toter Zellen. Hiernach wurden die Zellen mit 1ml PBS gewaschen (4°C, 8 Minuten, 450 g). Der Überschuss wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 300µl PBS suspendiert.

Zur durchflusszytometrischer Analyse der Tregs aus den C57BL/6J-Mäusen im adoptiven Zelltransfer-Experiment (Abb.5) war es notwendig, die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren, um den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 zu färben. Zur Fixation der Zellen sowie zur intrazellulären Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 wurde das Kit „FoxP3/ Transkriptionsfaktor Fixier- und Zellpermeabilisierungskonzentrat“ von eBioscience™ benutzt. Es wurden die Herstelleranweisungen zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen befolgt. Darauf folgte die intrazelluläre Färbung der Zellen mit den Antikörpern CD45 und FoxP3 zur Identifikation der Tregs.

Durchflusszytometrische Daten wurden mit dem BD LSR Fortessa II und der dazugehörigen DIVA-Software erhoben (UKE FACS Core facility).

Von jedem Antikörper wurde für jedes Organ *Flourescence minus one* (FMO) Kontrollen erstellt, um positive und negative Zellpopulationen sicher abgrenzen zu können. Ebenso wurden alle Flouochrome gegeneinander kompensiert, um falsch-positive Signale, welche durch Überlagerung der Emissionswellen verschiedener Farben entstehen können, auszuschließen. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der FlowJo- Software analysiert.

### **3.7 Histologie**

#### **3.7.1 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung**

Für die histologische Analyse der verschiedenen Plazentaareale wurden die in Formalin fixierten Plazenten in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden die eingebetteten Plazenten im Medianschnitt in 4µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die Schnitte wurden zweimal jeweils 10 Minuten lang mit Xylolersatz entparaffinisiert und anschließend jeweils fünf Minuten lang in einer abgestuften Reihe von Ethanol rehydriert. Danach wurde die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung nach dem im Labor etablierten Protokoll durchgeführt: zunächst wurden die Objektträger für acht Minuten in Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert. Als nächstes wurden die Objektträger kurz in einprozentigen Chlorwasserstoffalkohol eingetaucht, danach mit demineralisiertem Wasser gespült und anschließend für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Objektträger für acht Minuten in Goldner-Lösung 1 (0,33 g Ponceau de Xylidin, 0,1 g Acid Fuchsin, 3 ml Essigsäure ad 500 ml destilliertes Wasser) inkubiert und anschließend zweimal mit einprozentiger Essigsäure für jeweils 30 Sekunden gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für neun Minuten in Goldner-Lösung 2 (20,0 g Molybdophosphorsäure-Hydrat und 10,0 g Orange G und 500 ml destilliertes Wasser) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 30 Sekunden mit einprozentiger Essigsäure wurden die Objektträger für drei Minuten in Goldner-Lösung 3 (1,0 g Light Green SF gelblich und 1 ml Essigsäure ad 500 ml destilliertes Wasser) inkubiert. Danach wurden die Plazenta-Objektträger erneut zweimal für 30 Sekunden und zwei Minuten mit einprozentiger Essigsäure gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 % jeweils für zwei bis drei Minuten) und Xylene Substitut (XEM) zweimal für fünf Minuten rehydriert. Zuletzt wurden die

Objektträger mit dem Eindeckmedium „Eukitt“ und einem Deckglas abgedeckt und mit dem Mirax Midi Slide Scanner gescannt.

Die histomorphologische Analyse der unterschiedlichen Plazentaareale wurde mit Hilfe des Analyseprogramms ZEN lite blue durchgeführt. Nach der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung erscheinen Zellkerne dunkelbraun, Muskeln und Zytoplasma dunkelrot, Erythrozyten leuchtend orange und Bindegewebe grün.

Die Analyse der Plazenta erfolgte nach histologischer Aufarbeitung digital durch die Vermessung der verschiedenen Plazentaanteile mit Hilfe der ZEN Blue Software.

### **3.7.2 Markierung von Stammzellen in Mausembryonen an Tag 7,5 der Schwangerschaft zur Analyse in der konfokalen Mikroskopie**

Diese Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Judith Eckert durchgeführt. Um Rückschlüsse auf die fetale Entwicklung an Tag 7,5 der murinen Trächtigkeit zu ziehen, wurden die embryonalen Stammzellen mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um sie in der konfokalen Mikroskopie sichtbar zu machen. Die embryonalen Stammzellen leisten durch die Bildung der Keimblätter den größten Beitrag zur Embryogenese, da sie unter anderem über ein pluripotentes Potenzial und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verfügen. Die Aufrechterhaltung der Pluripotenz dieser Stammzellen hängt von der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, beispielsweise SOX2, OCT4 und NANOG, ab (Swain *et al.*, 2020).

Die Implantationen/Embryonen wurden in PBS auf Eis vorsichtig aus dem Uterus entnommen und in eine frische Schale überführt. Die Dezipua wurde entfernt und der Trophoblast wurde vom Embryo abgeschält. Unmittelbar darauf folgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd für 30 Minuten. Anschließend wurden die Embryonen dreimal mit PBS gewaschen. Um die Embryonen für die konfokale Mikroskopie durchlässig zu machen, wurden sie in eine Lösung von 0,5 % Triton in PBS gegeben. Anschließend wurden die Embryonen dreimal eine Stunde lang in PBS-Tween (0,1 % Tween 20 in PBS) und 4 mg/ml BSA (PBS-T/BSA) gewaschen.

Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Embryonen mit jeweils drei Antikörpern, SOX2, NANOG und DAPI, gefärbt. Die Embryonen wurden mit dem in PBS-T/BSA verdünnten Antikörpercocktail SOX2 (1:100) und NANOG (1:200) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen dreimal in PBS-T/BSA gewaschen, gefolgt von einer 15-minütigen DAPI-Färbung (1:1000 in PBS-T/BSA).

Die Embryonen wurden mit dem Eindeckmedium Citiflour auf speziell dafür vorgesehene Kammerschalen aufgebracht und sofort zum konfokalen Mikroskop transportiert.

Dort fand unter dem Objektiv X20 die Analyse statt. Die optischen Schnitte waren 5–7,5 µm dick und bei den meisten Embryonen konnte eine Tiefe von etwa 250 µm erreicht werden, was knapp der Hälfte des Embryos entspricht. Die Embryonen wurden nacheinander in verschiedenen Kanälen gescannt. Die Bilder wurden in der Imaris-Software analysiert.

## **4 Ergebnisse**

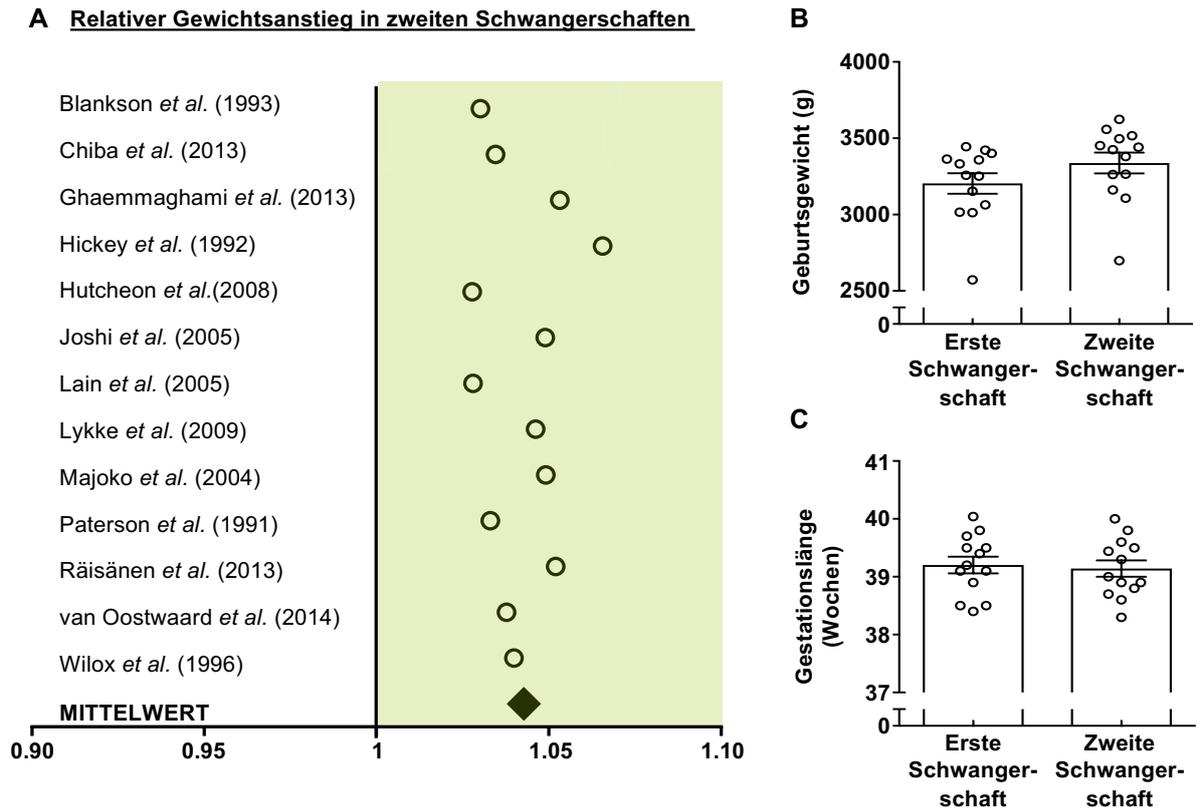
### **4.1 Ergebnisse der Literaturrecherche**

Zur allgemeinen Erhebung eines klinischen Anhaltspunktes für alle folgenden, grundlagenbasierten Experimente wurden in einer größeren Literaturrecherche humane Studien identifiziert, die Informationen zum Geburtsgewicht in der ersten und zweiten Schwangerschaft sowie die Länge der Schwangerschaft und/oder Inzidenzen von Schwangerschaftskomplikationen in erster und zweiter Schwangerschaft bereitstellten. Das Geburtsgewicht wurde als Messgröße für das fetale Outcome der Schwangerschaft festgelegt. Die bekanntesten Schwangerschaftskomplikationen wurden anschließend separat analysiert. Es wurde stets die erste mit der zweiten Schwangerschaft verglichen.

#### **4.1.1 Vergleich des Geburtsgewichts in der ersten und zweiten Schwangerschaft**

Für die Untersuchung des Geburtsgewichtes in der ersten und zweiten Schwangerschaft wurden insgesamt 13 Studien aus unterschiedlichen Ländern eingeschlossen (Tabelle 9).

Es konnte gezeigt werden, dass Neugeborene der ersten Schwangerschaft ein durchschnittliches Geburtsgewicht von  $3204 \text{ g} \pm 243 \text{ g}$ , Neugeborene der zweiten Schwangerschaft ein durchschnittliches Geburtsgewicht von  $3338 \text{ g} \pm 246 \text{ g}$  hatten (Abb. 7 A, B). Resultierend zeigte sich ein um 4,2 % höheres Geburtsgewicht bei Neugeborenen der zweiten Schwangerschaft. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Länge der Schwangerschaft in beiden Gruppen annähernd gleich war, welches die Schwangerschaftslänge als verfälschenden Faktor ausschloss (Abb. 7 C). Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 7: Analyse des Geburtsgewichts in der ersten und zweiten Schwangerschaft.** Relativer Anstieg des Geburtsgewichts in der zweiten Schwangerschaft im Vergleich zur ersten Schwangerschaft (A), die Referenz für jede Studie ist auf der linken Seite dargestellt, der relative Anstieg des Gewichts ist auf der rechten Seite dargestellt. Absoluter Anstieg des Geburtsgewichts (B), und Länge der Schwangerschaft (C). Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die Daten für B und C stammen aus denselben Studien wie in A gezeigt. Abbildung modifiziert nach (Thiele, Ahrendt, *et al.*, 2019).

**Tabelle 9: Übersicht aller inkludierter Studien in die Analyse des Geburtsgewichts in der ersten und zweiten Schwangerschaft.**

<b>Publikation</b>	<b>Herkunft der Studienpopulation</b>	<b>n</b>
(Blankson <i>et al.</i> , 1993)	Alabama, USA	737
(Chiba, Ebina and Kashiwakura, 2013)	Japan	560
(Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2013)	Iran	858
(Hickey CA, Cliver SP, Goldenberg RL, 1992)	Alabama, USA	152
(Hutcheon and Platt, 2008)	Montreal, Kanada	1 220
(Joshi <i>et al.</i> , 2005)	Maharashtra, Indien	770
(Lain, Krohn and Roberts, 2005)	Pennsylvania, USA	6 148
(Lykke, Paidas and Langhoff-Roos, 2009)	Dänemark	536 419
(Majoko F, Nyström L, Munjanja SP, Mason E, 2014)	Simbabwe	10 569
(Paterson and Saunders, 1991)	Großbritannien	75 974
(Räisänen <i>et al.</i> , 2013)	Finnland	686 114
(Van Oostwaard <i>et al.</i> , 2014)	Niederlande	503
(Mark A. Wilcox, Chang and Johnson, 1996)	Großbritannien	3 457

#### **4.1.2 Schwangerschaftskomplikationen in der ersten und zweiten Schwangerschaft**

Neben der Analyse des Geburtsgewichts in der ersten und zweiten Schwangerschaft wurde auch die Wahrscheinlichkeit verschiedener Schwangerschaftskomplikationen in der ersten und zweiten Schwangerschaft untersucht. Die Ergebnisse werden für jede Schwangerschaftskomplikation einzeln präsentiert.

Im Appendix findet sich eine Tabelle, die alle Studien und deren Population, sowie das Herkunftsland festhält (Tabelle 15).

##### **4.1.2.1 Spontaner Abort/Fehlgeburt**

Aus den drei eingeschlossenen Studien zur Schwangerschaftskomplikation „spontaner Abort/Fehlgeburt“ wurde eine Inzidenz von 10,9 % in der ersten

Schwangerschaft berechnet. Das Risiko, eine erneute Fehlgeburt in der Folgeschwangerschaft zu erleiden war 23,8 %, was eine Risikoerhöhung um das 2,2-fache bedeutet (Abb. 8 rechts). Bei Frauen, die eine unkomplizierte erste Schwangerschaft hatten, zeigte sich eine Reduktion des Risikos für einen spontanen Abort in der zweiten Schwangerschaft um 54 % auf 4,9 % (Abb. 8 links).

#### **4.1.2.2 Präeklampsie und schwangerschaftsinduzierte Hypertonie (SIH)**

Für die Schwangerschaftskomplikation Präeklampsie, zu der 9 Studien eingeschlossen wurden, zeigte sich in der ersten Schwangerschaft eine Inzidenz von 4,8 %. Litt eine Frau in der ersten Schwangerschaft an einer Präeklampsie, so zeigte sich das Risiko in der zweiten Schwangerschaft um das 3-fache erhöht. Daraus errechnet sich eine Wiederholungsrisiko von 13,9 % (Abb. 8 B rechts). Frauen, deren erste Schwangerschaft gesund und unkompliziert verlief, entwickelten nur in 1,6 % der Fälle eine Präeklampsie in ihrer zweiten Schwangerschaft.

Separat davon wurde ebenfalls die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie (SIH) untersucht, da diese in eine Präeklampsie übergehen kann. Es wurden nur zwei Publikationen für diese Schwangerschaftskomplikation gefunden (Tabelle 10). Die Inzidenz für eine SIH in der ersten Schwangerschaft lag bei 6 %. Das Rezidivrisiko in der zweiten Schwangerschaft war 3,2-fach erhöht und lag bei 19,6 %. Die Studien beschreiben jedoch unterschiedliche Ergebnisse: Boghossian et al. zeigten, dass sich das Rezidivrisiko der SIH in der zweiten Schwangerschaft erhöht, wohingegen Wallace et al. zeigten, dass sich ebendieses reduziert.

#### **4.1.2.3 Frühgeburt**

Es konnten 8 Studien zur Schwangerschaftskomplikation „Frühgeburt“, per Definition die Geburt eines lebenden Neugeborenen vor 37 vollendeten Schwangerschaftswochen, gefunden werden. Aus den inkludierten Studien ergab sich insgesamt eine Inzidenz für eine Frühgeburt in der ersten Schwangerschaft von 7,8 %. Das Risiko, in der Folgeschwangerschaft erneut eine Frühgeburt zu erleiden, zeigte sich mit 21,5 % 3-fach erhöht (Abb. 8 C rechts). Bei einem am Termin geborenen Kind in der ersten Schwangerschaft, wurde das Risiko, in der darauffolgenden Schwangerschaft eine Frühgeburt zu erleiden, auf 4,6 % reduziert (Abb. 8 C links).

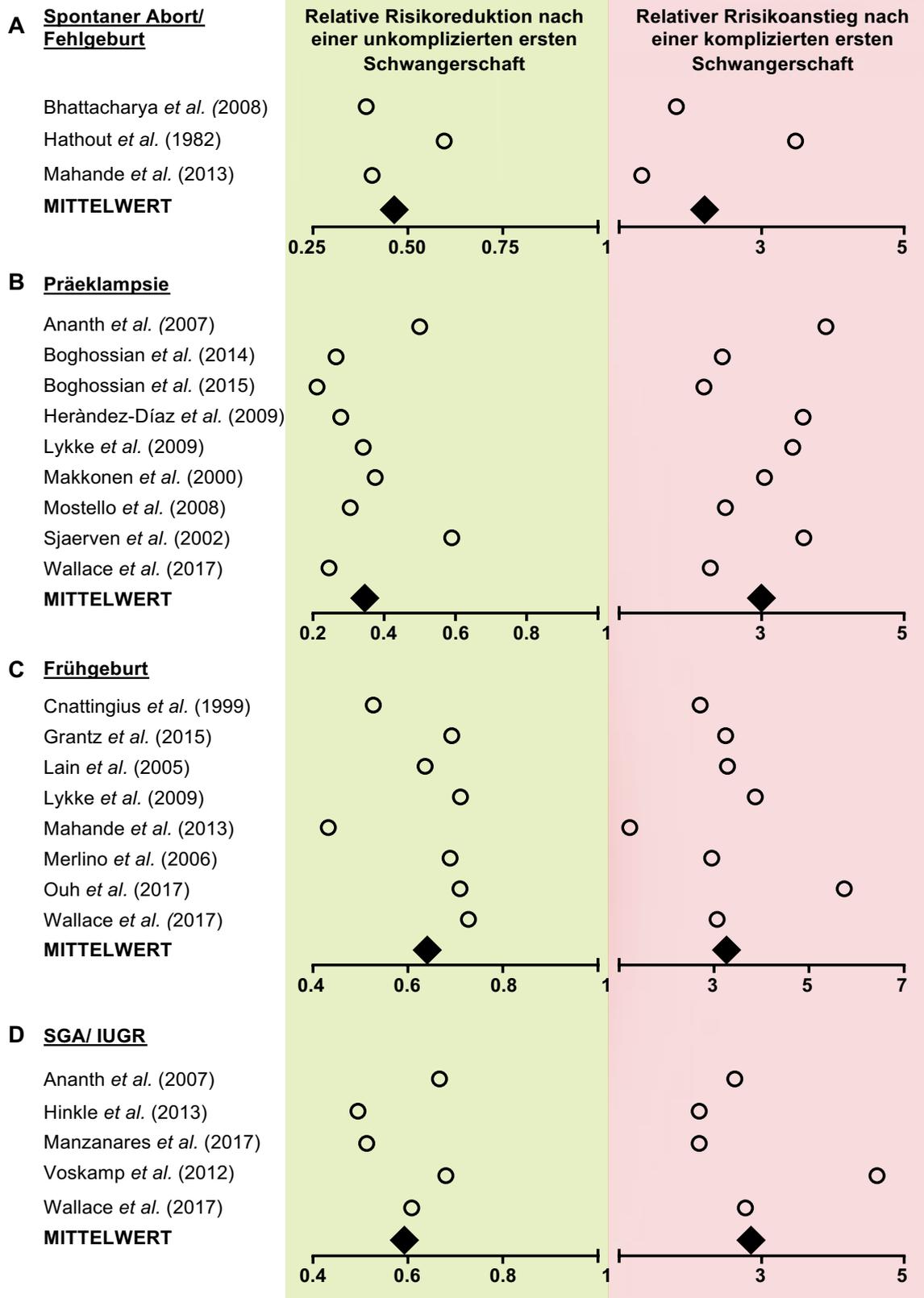
#### **4.1.2.4 Fetale Wachstumsrestriktion: Small for gestational age (SGA)/ intrauterine growth restriction (IUGR)**

Die Schwangerschaftskomplikationen SGA und IUGR wurden gemeinsam behandelt. Wie in der Einleitung erläutert, unterscheiden sich diese Komplikationen durch die pränatale sonographische Diagnostik, wurden jedoch für die Analyse als ähnlich angesehen und daher gemeinsam ausgewertet.

Aus den fünf inkludierten Studien errechnete sich eine Inzidenz von 9,1 % für einen von SGA/IUGR betroffenen Feten in der ersten Schwangerschaft. Mit einer Risikoerhöhung um das 2,9-fache zeigte sich in der zweiten Schwangerschaft bei 24,1 % der Frauen erneut ein von SGA oder IUGR betroffener Fetus (Abb. 8 D rechts). Ein um 41 % reduziertes Risiko zeigte sich bei Frauen, die in der ersten Schwangerschaft ein normalgewichtiges Kind zur Welt brachten. Hier lag die Inzidenz für ein von SGA oder IUGR betroffenen Fetus bzw. Neugeborenes in der zweiten Schwangerschaft bei 5,28 % (Abb. 8 D links).

#### **4.1.2.5 Gestationsdiabetes mellitus (GDM)**

Insgesamt 5 Studien konnten identifiziert werden, die sich passend für die Analyse mit dem Gestationsdiabetes als Schwangerschaftskomplikation auseinandergesetzt haben. Die errechnete mittlere Inzidenz für einen Gestationsdiabetes in der ersten Schwangerschaft war 3,5 %. Das Rezidivrisiko zeigte sich in der zweiten Schwangerschaft mit 49,6 % um das 16,8-fache erhöht (Tabelle 10). Nach einer unkomplizierten ersten Schwangerschaft war das Risiko für einen GDM in der zweiten Schwangerschaft mit 3 % ähnlich hoch wie das Risiko für eine erste Schwangerschaft. Die Angaben der Studien, insbesondere zum Rezidivrisiko variierten sehr (Tabelle 10).



**Abbildung 8: Risiko für Schwangerschaftskomplikationen in der ersten und zweiten Schwangerschaft.** Relative Risikoreduktion (links) für die Komplikationen spontaner Abort/Fehlgeburt (A), Präeklampsie (B), Frühgeburtlichkeit (C), small for gestational age (SGA); intrauterine growth restriction (IUGR) (D) nach einer

unkomplizierten ersten Schwangerschaft und relative Risikoerhöhung (rechts) für die zweite Schwangerschaft nach einer ersten Schwangerschaft, die von der jeweiligen Komplikation geprägt war. Abbildung modifiziert nach (Thiele, Ahrendt, *et al.*, 2019).

**Tabelle 10: Risiko für schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Gestationsdiabetes mellitus in erster und zweiter Schwangerschaft**

Referenz	Relative Risikoreduktion nach <b>unkomplizierter</b> erster Schwangerschaft	Relative Risikoerhöhung nach <b>komplizierter</b> erster Schwangerschaft
<b>Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie (SIH)</b>		
(Boghossian <i>et al.</i> , 2015)	0,2	2,17
(Wallace <i>et al.</i> , 2016)	0,27	0,89
<b>Durchschnitt</b>	<b>0,24</b>	<b>1,53</b>
<b>Gestationsdiabetes (GDM)</b>		
(Nansi S. Boghossian <i>et al.</i> , 2014)	1,05	37,95
(Ehrlich <i>et al.</i> , 2011)	0,77	8,30
(England <i>et al.</i> , 2015)	0,87	15,90
(Getahun, Fassett and Jacobsen, 2010)	1,08	10,59
(Khambalia <i>et al.</i> , 2013)	0,73	11,14
<b>Durchschnitt</b>	<b>0,90</b>	<b>16,78</b>

#### 4.2 Die Funktion regulatorischer T-Zellen in der Schwangerschaft

Nachdem die Literatur so eindruckliche klinische Ergebnisse darlegte, war das primäre Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob Tregs und potenzielle geprägte Gedächtniszellen dieser Tregs eine Auswirkung auf den Verlauf und vor allem den fetalen Ausgang der Schwangerschaft in der zweiten Schwangerschaft haben. Dies wurde in verschiedenen Experimenten im Mausmodell untersucht.

#### **4.2.1 Funktionelle Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Trächtigkeit**

Zunächst erfolgte, wie im Methoden-Teil unter 3.3.1 beschrieben, eine Experimentreihe im DEREK-Mausmodell, um die Funktionalität der Tregs für den Trächtigkeitserfolg herauszustellen.

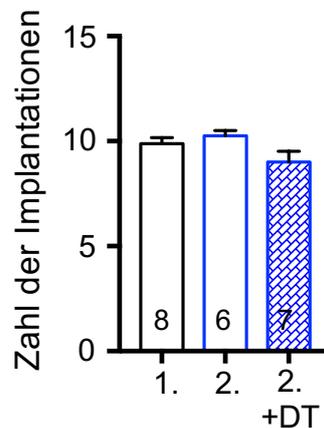
##### **4.2.1.1 Implantationen**

Als Anhaltspunkt für den Trächtigkeitserfolg an Tag 7,5 der murinen Trächtigkeit wurden die Implantationen im Uterus gezählt. Zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit ist es (noch) nicht möglich, zwischen erfolgreicher (später Fetus) und erfolgloser (später Abort) Implantation zu unterscheiden. Die Implantationsrate zeigte sich in allen Gruppen ähnlich (Abb. 9). Mäuse in der Gruppe während ihrer ersten Trächtigkeit (n=8) hatten im Durchschnitt 9,8 Implantationen. Mäuse während ihrer zweiten Trächtigkeit (n=6) zeigten im Schnitt 10,25 Implantationen und Mäuse, deren Tregs nach der ersten Trächtigkeit mittels DT depletiert wurden (n=6), zeigten in der zweiten Trächtigkeit durchschnittlich 9 Implantationen.

Zur Untersuchung eines weiteren fetalen Parameters wurden die vorsichtig aus dem Uterus entnommenen Embryonen durch Prof. Dr. Judith Eckert nach Aufarbeitung mit NANOG-, SOX-2- sowie DAPI-Antikörpern gefärbt und in der konfokalen Mikroskopie analysiert. NANOG und SOX-2 sind jeweils Transkriptionsfaktoren für die Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen und erlauben in der konfokalen Mikroskopie die Quantifizierung von Stammzellen. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher zur Markierung der DNA genutzt wird. Durch die Färbung von Zellen mit DAPI werden die Zellkerne aller kernhaltigen Zellen in der konfokalen Mikroskopie sichtbar gemacht.

Es konnte gezeigt werden, dass die absolute Anzahl der NANOG- und SOX-2-gefärbten Zellen in Embryonen von Mäusen in ihrer zweiten Trächtigkeit ohne Depletion höher war als bei Embryonen von Mäusen während der ersten Trächtigkeit (Daten nicht gezeigt). Durch die Depletion der Tregs und potenziellen mTregs nach der ersten Trächtigkeit blieb die Erhöhung der NANOG- und SOX-2-gefärbten Zellen in Embryonen von Mäusen während der zweiten Trächtigkeit aus (Daten nicht gezeigt). Diese Embryonen zeigten ähnliche absolute Zellzahlen wie Embryonen während der ersten Trächtigkeit (Daten nicht gezeigt). Auch in der relativen Darstellung von SOX zu DAPI bzw. NANOG zu DAPI zeigte sich ein höheres Verhältnis bei Embryonen von Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit verglichen mit Embryonen von Mäusen

während ihrer ersten Trächtigkeit. Embryonen von Mäusen in der zweiten Trächtigkeit, deren Tregs und mTregs nach der ersten Trächtigkeit depletiert wurden, zeigten ein deutlich niedrigeres Zell-Verhältnis als Embryonen von Mäusen der anderen beiden Gruppen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 9: Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit verändert die Implantationsrate nicht.** Zahl der Implantationen an Tag 7,5 der Trächtigkeit nach Verpaarung von C57BL6/J-DEREG-Weibchen mit Balb/c- Männchen bei Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit (schwarze Säule), Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit (blaue Säule) und Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit nach Depletion der Tregs im Anschluss an die erste Trächtigkeit (blau schraffierte Säule). Gezeigt wird der Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler, Gruppengröße auf jeder Säule markiert.

#### 4.2.1.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zur mütterlichen Immunadaptation

Ziel des Versuchs war es, herauszufinden, welchen Einfluss die Depletion der Tregs und potenziellen Gedächtnis-Tregs nach der ersten Trächtigkeit auf die Immunadaptation während einer zweiten Trächtigkeit an Tag 7,5 der Trächtigkeit hat. Die Ergebnisse der mütterlichen Immunadaptation wurden anhand der durchflusszytometrisch erhobenen Daten ausgewertet.

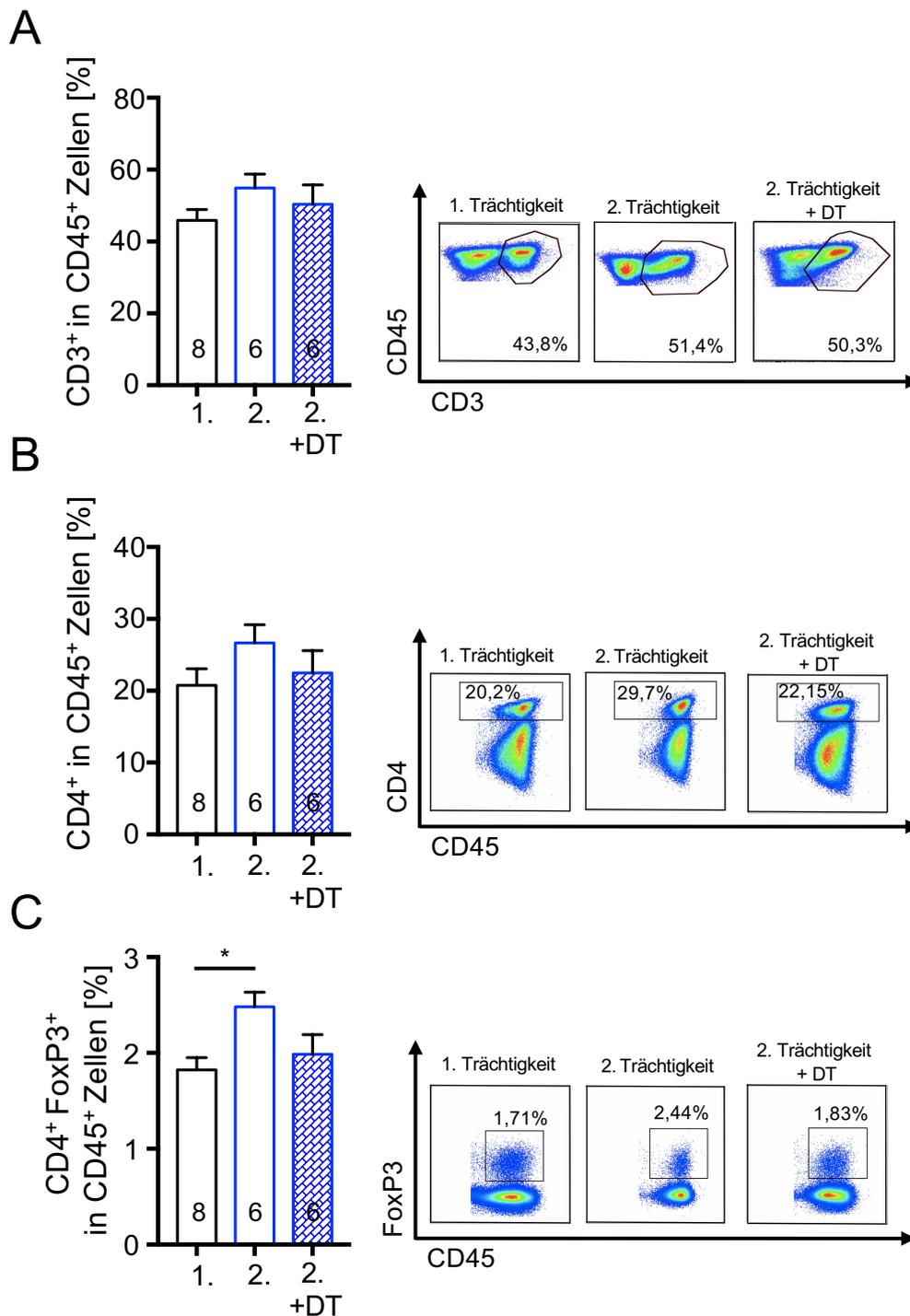
In den Uterus-drainierenden Lymphknoten zeigte sich in der Gruppe von Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit ohne Depletion der Tregs ein höherer Anteil von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in CD45<sup>+</sup> Zellen, verglichen mit der Gruppe von Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit (Abb. 10 A). Eine Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit führte während der zweiten Trächtigkeit zu einem niedrigeren Anteil der CD3<sup>+</sup> T-Zellen

als bei Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit ohne Depletion und einem höheren Anteil als bei Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit (Abb. 10 A).

Des Weiteren wurden aus den CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> T-Zellen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen und in allen CD45<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Mäuse während ihrer zweiten Trächtigkeit ohne Depletion hatten einen größeren Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Mäuse während ihrer ersten Trächtigkeit (Abb. 10 B). Mäuse, deren Tregs nach der ersten Trächtigkeit depletiert wurden, zeigten während der zweiten Trächtigkeit einen etwas höheren Anteil an CD3<sup>+</sup> T-Zellen als Mäuse während ihrer ersten Trächtigkeit und einen kleineren Anteil als Mäuse während ihrer zweiten Trächtigkeit ohne Depletion (Abb. 10 B).

Die Unterschiede zwischen den Gruppen für CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren statistisch nicht signifikant.

Auch die Tregs, charakterisiert durch CD4<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup>, wurden in allen CD45<sup>+</sup> Zellen gemessen. Hier zeigte sich der Anteil der Tregs in der Gruppe von Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion verglichen mit der Gruppe von Mäusen während der ersten Trächtigkeit signifikant höher (Abb. 10 C). Die Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit führte in der zweiten Trächtigkeit zu einem niedrigen Anteil von Tregs als bei Mäusen in der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion und einem etwas höheren Anteil als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit (Abb. 10 C).



**Abbildung 10: Depletion von Tregs nach der ersten Trächtigkeit beeinflusst die Immunadaptation in der folgenden Trächtigkeit.** Durchflusszytometrische Analyse der mütterlichen Immunadaptation an die Trächtigkeit an Tag 7,5 der Trächtigkeit, hinsichtlich der Frequenzen von CD3<sup>+</sup> (A), CD4<sup>+</sup> (B) und CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs (C) gemessen in CD45<sup>+</sup> Zellen der Uterus-drainierenden Lymphknoten. Die Säulen von links nach rechts zeigen: Mäuse während ihrer ersten Trächtigkeit (schwarze Säule), Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit (blaue Säule) und Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit nach Depletion der Tregs im Anschluss an die erste Trächtigkeit

(blau schraffierte Säule). Links werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler und Gruppengrößen der jeweiligen Gruppen (Gruppengröße markiert auf den Säulen) gezeigt. Rechts werden repräsentative Punktauftragungen (engl. *dotplots*) für jede Gruppe mit den jeweiligen Zellpopulationen gezeigt. Statistische Signifikanz gekennzeichnet durch \*  $<0,05$ .

Die Analyse der Uteruszellen zeigte im Vergleich bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit und Mäusen mit depletierten T-Zellen nach der ersten Trächtigkeit eine etwas höhere Frequenz der CD3<sup>+</sup> T-Zellen als bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion (Tabelle 11). In der Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich in der Gruppe der Mäuse während der ersten Trächtigkeit ein minimal höherer Anteil als bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion. Die Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit führte bei diesen Mäusen in der zweiten Trächtigkeit zu einem etwas höheren Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit und Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion (Tabelle 11). Die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs zeigten sich in der Gruppe der Mäuse während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion höher als in der Gruppe von Mäusen während der ersten Trächtigkeit. Eine Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit führte bei diesen Mäusen in der zweiten Trächtigkeit zu einer niedrigeren Frequenz von Tregs als bei Mäusen während der ersten und zweiten Trächtigkeit ohne Depletion (Tabelle 11). Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.

**Tabelle 11: Analyse des Uterus mittels Durchflusszytometrie.** Es wird der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben, ebenso die Gruppengröße (n).

<b>Uterus Gd 7,5</b>	<b>1. Trächtigkeit</b>	<b>2. Trächtigkeit</b>	<b>2. Trächtigkeit + DT</b>
CD3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	16,33 $\pm$ 0,778 (8)	15,78 $\pm$ 0,7044 (6)	16,89 $\pm$ 1,286 (6)
CD4 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	2,083 $\pm$ 0,3096 (8)	1,97 $\pm$ 0,2315 (6)	2,147 $\pm$ 0,3154 (6)
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	0,5833 $\pm$ 0,1152 (8)	0,671 $\pm$ 0,0787 (6)	0,4686 $\pm$ 0,06501 (6)

Die Analyse des Blutes bezüglich der systemischen maternalen Immunadaptation an Tag 7,5 der Trächtigkeit ergab in allen Gruppen sehr ähnliche Frequenzen der Immunzellen. Die festgestellten Unterschiede waren nur marginal. Die Frequenz der CD3<sup>+</sup> T-Zellen war in der Gruppe der Mäuse während ihrer zweiten Trächtigkeit ohne

Depletion am höchsten (Tabelle 12). Durch die Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit zeigte sich bei diesen Mäusen in der zweiten Trächtigkeit eine etwas niedrigere Frequenz an CD3<sup>+</sup> T-Zellen als bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion, aber eine etwas höhere Frequenz als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit. Die Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren bei Mäusen während der ersten und zweiten Trächtigkeit sehr ähnlich. Die Depletion der Tregs führte zu einer etwas niedrigeren Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der zweiten Trächtigkeit. Die Frequenz der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs war bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion höher als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit (Tabelle 12). Die Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit führte in der zweiten Trächtigkeit zu einer ähnlichen Frequenz der Tregs wie bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit (Tabelle 12). Die Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.

**Tabelle 12: Analyse des Blutes mittels Durchflusszytometrie.** Es wird der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben, ebenso die Gruppengröße (n).

<b>Blut Gd 7,5</b>	<b>1. Trächtigkeit</b>	<b>2. Trächtigkeit</b>	<b>2. Trächtigkeit + DT</b>
CD3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	24,83 $\pm$ 1,865 (8)	28,16 $\pm$ 1,945 (6)	26,12 $\pm$ 3,156 (6)
CD4 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	13,42 $\pm$ 2,098 (8)	13,85 $\pm$ 0,9702 (6)	12,35 $\pm$ 1,947 (6)
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	0,6875 $\pm$ 0,1087 (8)	0,7033 $\pm$ 0,06736 (6)	0,66 $\pm$ 0,101 (6)

#### **4.2.2 Identifikation Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen**

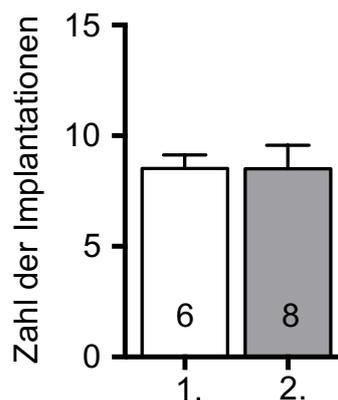
Nachdem im vorherigen Experiment die funktionelle Rolle der regulatorischen T-Zellen genauer untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob diese Zellen spezifisch für das fetal intrauterin präsentierte Antigen sind. Darum wurde in einem neuen Experiment, erläutert im Material-Teil unter 3.3.2, versucht, eine andere Methode zu etablieren, Fetal-Antigen-spezifische Zellen in der Durchflusszytometrie zu erfassen. Durch die spezifische Verpaarung von Fir/Tiger-Weibchen und Act-mOVA-Balb/c-Männchen wurde das OVA-Antigen in den Experimenten exklusiv von den männlichen Mäusen und infolgedessen auch von allen, im Weibchen heranwachsenden, Feten exprimiert. Daher wird fortan „Fetal-Antigen-spezifisch“ und „OVA-spezifisch“ synonym verwendet. Zur Identifikation dieser Fetal-Antigen-spezifischen Zellen wurde ein

spezielles Tetramer genutzt, welches exklusiv an das OVA-Antigen bindet. Als primäres Versuchsergebnis wurde die mütterliche Immunadaptation in Mäusen während ihrer ersten, verglichen mit Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit, erfasst.

Zur Vergleichbarkeit mit dem vorangegangenen Experiment wurden auch diese Versuche an Tag 7,5 der Trächtigkeit durchgeführt.

#### 4.2.2.1 Implantationen

Es zeigte sich zunächst kein Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Implantationsrate. Beide Gruppen (erste Trächtigkeit n=6, zweite Trächtigkeit n=8) zeigten eine durchschnittliche Anzahl von 8,5 Implantationen (Abb. 11)



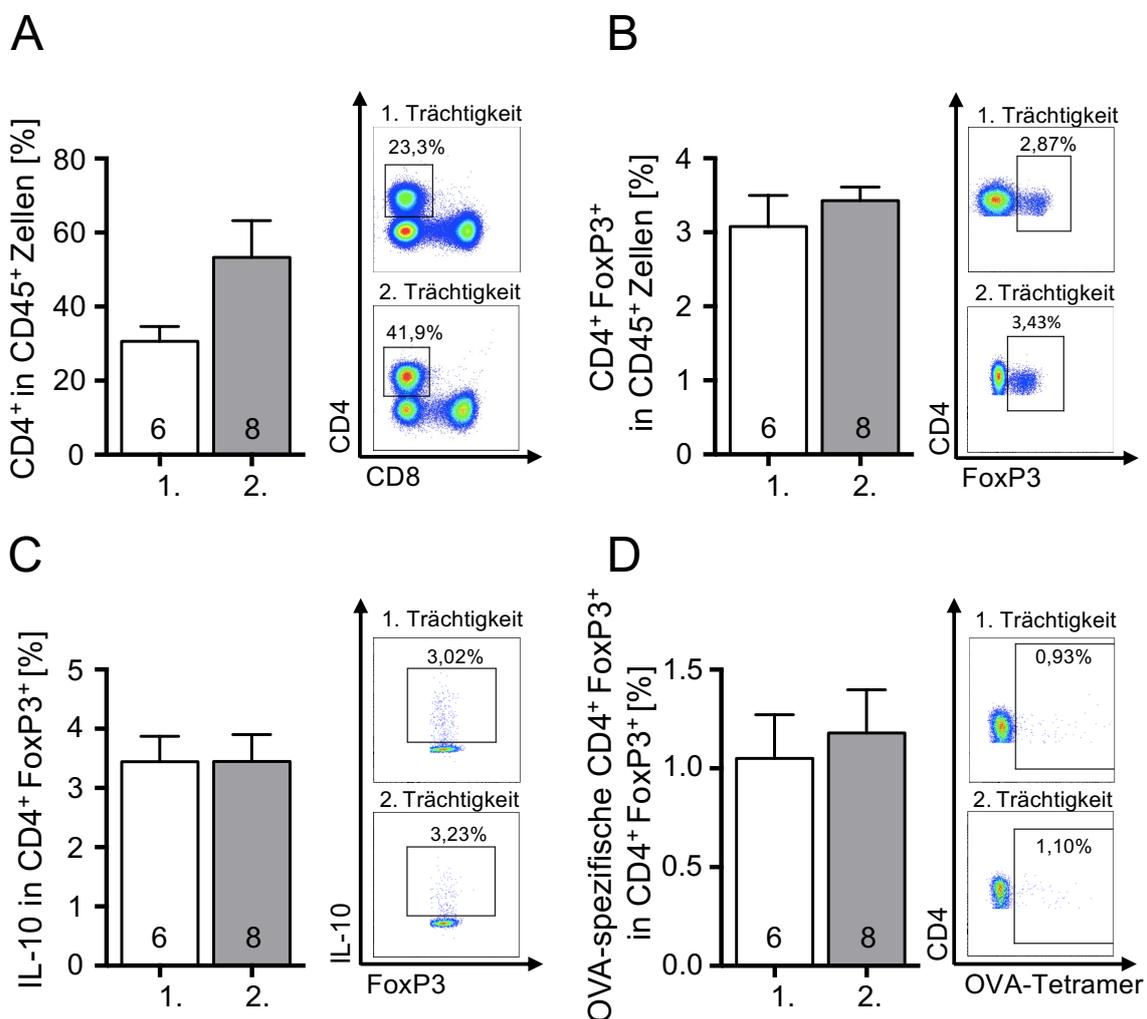
**Abbildung 11: Kein Unterschied in der Implantationsrate zwischen erster und zweiter Trächtigkeit.** Anzahl der Implantationen aus der Verpaarung von Fir/Tiger-Weibchen und Act-mOVA-Balb/c Männchen an Tag 7,5 der Trächtigkeit während ihrer ersten (weiße Säule) und zweiten (graue Säule) Trächtigkeit. Es wird der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt, die Gruppengrößen sind auf den Balken markiert.

#### 4.2.2.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zur mütterlichen Immunadaptation

Hinsichtlich der maternalen Immunadaptation, insbesondere mit Blick auf die Anzahl der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen, zeigte sich in den Uterus-drainierenden Lymphknoten die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit fast doppelt so hoch, verglichen mit Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit (Abb. 12 A).

Auch die Anzahl der Tregs zeigte sich in der Gruppe von Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher (Abb. 12 B). Beide Zellpopulationen wurden in allen CD45<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Das von den Tregs produzierte IL-10 war in beiden Gruppen nahezu identisch (Abb. 12 C).

Unter allen Tregs wurden die fetal-Antigen-spezifischen Tregs subgruppiert. Es zeigte sich eine höhere Anzahl der fetal-Antigen-spezifischen Tregs bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit (Abb. 12 D). Insgesamt war die Anzahl dieser Zellen sehr niedrig. Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 12: Höhere Frequenz Fetal-Antigen-spezifischer Tregs in der zweiten Trächtigkeit.** Durchflusszytometrisch erhobene Daten von Fir-Tiger-Weibchen gepaart mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen an Tag 7,5 der Trächtigkeit aus den Uterus-drainierenden Lymphknoten zur Quantifizierung der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen. Die weiße Säule zeigt die Ergebnisse von Mäusen während ihrer ersten, die graue Säule die Ergebnisse von Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit, rechts neben

den Graphen sind jeweils repräsentative Punktauftragungen (engl. *dotplots*) für jede Zellpopulation zu sehen. Gezeigt werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A), CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs (B) jeweils in CD45<sup>+</sup> sowie IL-10 (C) und OVA-spezifische Tregs (D) jeweils in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs.

Gezeigt wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, die Gruppengrößen sind auf den Säulen markiert.

In den untersuchten Uteruszellen zeigten sich die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit niedriger als bei Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit (Tabelle 13). Weiterhin zeigten sich auch die Tregs bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit im Vergleich niedriger (Tabelle 13). Die Menge des produzierten IL-10 zeigte sich bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit jedoch höher als bei Mäusen in der ersten Trächtigkeit (Tabelle 13). Auch der Anteil der Fetal-Antigen-spezifischen Tregs zeigte sich bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Durchflusszytometrisch erhobene Daten des Uterus an Tag 7,5 der Trächtigkeit zur Quantifizierung der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen.** Gezeigt werden der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler und die Gruppengröße (n).

<b>Uterus Gd 7,5</b>	<b>1. Trächtigkeit</b>	<b>2. Trächtigkeit</b>
CD4 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	1,75 $\pm$ 0,3509 (6)	1,939 $\pm$ 0,5671 (8)
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	0,195 $\pm$ 0,0505 (6)	0,0986 $\pm$ 0,026 (8)
FoxP3 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	13,77 $\pm$ 9,835 (6)	21,71 $\pm$ 25,62 (8)
OVA-Tetramer in CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	5,772 $\pm$ 7,086 (6)	8,981 $\pm$ 6,081 (8)

Die Analyse des Blutes zeigte eine niedrigere Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit im Vergleich zu Mäusen in der ersten Trächtigkeit (Tabelle 14). Die Anzahl der Tregs ebendieser Mäuse war marginal niedriger als bei Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit (Tabelle 14). Die Menge des produzierten IL-10 zeigte sich bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher als bei Mäusen in der ersten Trächtigkeit (Tabelle 14). Auch die Subgruppe der Fetal-Antigen-spezifischen Tregs war bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher (Tabelle 14). Der Anteil dieser Zellen war jedoch insgesamt gering.

Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.

**Tabelle 14: Durchflusszytometrisch erhobene Daten des mütterlichen Blutes an Tag 7,5 der Trächtigkeit zur Quantifizierung der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen.** Gezeigt werden neben den Ergebnissen der Standardfehler und die Gruppengröße (n).

<b>Blut Gd 7,5</b>	<b>1. Trächtigkeit</b>	<b>2. Trächtigkeit</b>
CD4 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	18,89 ± 2,129 (6)	16,61 ± 1,358 (8)
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup>	0,915 ± 0,2363 (6)	0,89 ± 0,1575 (8)
FoxP3 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> in CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	2,97 ± 0,356 (6)	4,7 ± 0,201 (8)
OVA-Tetramer in CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	0,07667 ± 0,0328 (6)	0,1 ± 0,0366 (8)

#### **4.2.3 Die Funktion Fetal-Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen und potenzieller regulatorischer Gedächtnis-T-Zellen**

Nachdem zum einen auf die Funktion der regulatorischen T-Zellen in erster bzw. zweiter Trächtigkeit eingegangen wurde, folglich die Antigen-spezifität dieser Zellen untersucht wurde, sollte im letzten Experiment auf die Funktionalität der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen eingegangen werden.

Ziel dieses Experimentes war, anhand der Anzahl der Feten, des fetalen Gewichts und der Flächen-Verhältnisse in der Plazenta an Tag 15,5 der Trächtigkeit die funktionale Kapazität von unterschiedlich geprägten (trächtigkeitsgeprägten und naiven bzw. ungepaarten) Tregs zu untersuchen.

Wie im Material-Teil unter 3.3.3 beschrieben wurden dafür C57BL6/j-Weibchen nach Verpaarung am Tag des Vaginalpfropfs zwei verschiedene Arten von Tregs transferiert: „trächtigkeitsgeprägte“ Tregs (mTregs), von Mäusen, die zweimal trächtig waren und naive (ungepaarte, ungeprägte) Tregs (nTregs) von Mäusen, die bisher nicht verpaart, folglich nie trächtig waren und keine potentielle Prägung der Tregs stattgefunden hat.

Um eine Erhebung über den fetalen Ausgang der Trächtigkeit anhand des fetalen Gewichts und der Analyse der Plazenta zu machen, wurden diese Experimente an Tag 15,5 der Trächtigkeit durchgeführt.

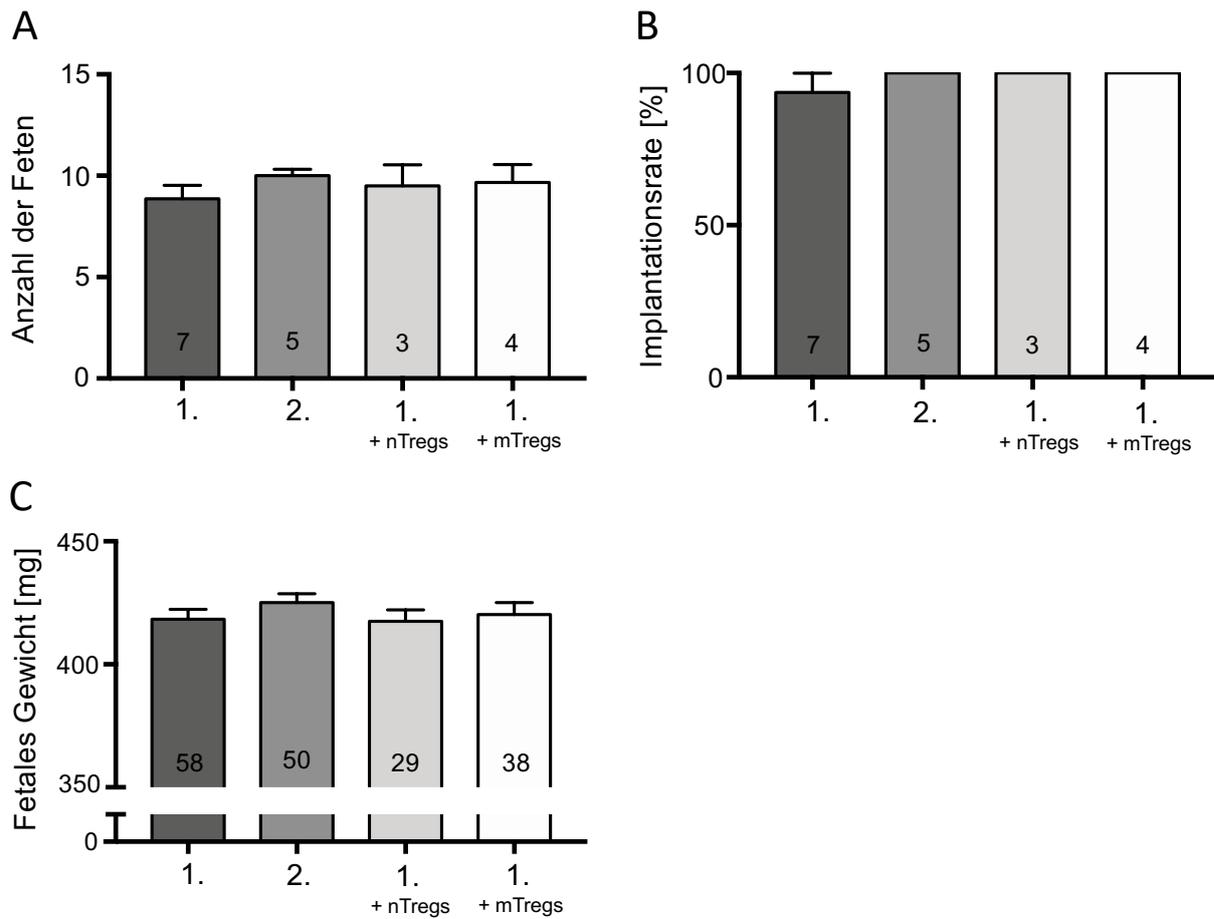
#### **4.2.3.1 Ausgang der Trächtigkeit**

Die Anzahl der Feten war in allen Gruppen sehr ähnlich (Abb. 13 A). In der Gruppe von Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit zeigte sich die höchste Anzahl an Feten verglichen mit den anderen Gruppen. In der Gruppe der Mäuse während ihrer ersten Trächtigkeit ohne Injektion von zusätzlichen Tregs zeigten sich die wenigsten Feten (Abb. 13 A). Dazwischenliegend zeigte sich bei den Mäusen in ihrer ersten Trächtigkeit die nTregs oder mTregs injizierten bekamen eine sehr ähnliche Anzahl an Feten (Abb. 13 A).

Es zeigte sich im gesamten Experiment nur ein Abort in der Gruppe der Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion von Tregs (Abb. 13 B).

Beim fetalen Gewicht zeigte sich eine deutlichere Tendenz der Unterschiede. Feten von Mäusen während der zweiten Trächtigkeit waren etwas schwerer als Feten von Mäusen in ihrer ersten Trächtigkeit (Abb. 13 C). Feten von Mäusen, denen mTregs injiziert wurden, waren etwas schwerer als Feten von Mäusen, denen nTregs injiziert wurden. Feten von Mäusen, denen nTregs injiziert wurden waren etwas leichter als Feten von Mäusen in der zweiten Trächtigkeit. Das Gewicht der Feten von Mäusen während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion von Tregs und Mäusen, die nTregs injizierten bekamen, war nahezu identisch (Abb. 13 C).

Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 13: Fetaler Ausgang der Trächtigkeit an Tag 15,5.**

Die C57BL6/j-Weibchen wurden nach der Verpaarung mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen an Tag 15,5 der Trächtigkeit hinsichtlich der Anzahl der Feten (A), der Implantationsrate (B) und des fetalen Gewichts (C) untersucht. Die Säulen zeigen von links nach rechts: Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion von Tregs; Mäuse während der zweiten Trächtigkeit; Mäuse, denen zu Beginn ihrer ersten Trächtigkeit nTregs injiziert wurden; Mäuse, denen zu Beginn ihrer ersten Trächtigkeit mTregs injiziert wurden. Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, die Gruppengrößen sind auf den jeweiligen Säulen markiert.

#### 4.2.3.2 Plazentafunktion

Die Analyse der gesamten Plazentafläche zeigte in der Gruppe der Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion eine größere Fläche als in der Gruppe von Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit (Abb. 14 A). Es zeigte sich ebenfalls, dass die Plazenten der Mäuse, denen nTregs injiziert wurden größer waren als die Plazenten der Mäuse, die mTregs injiziert bekamen. Die Mäuse, die nTregs injiziert bekamen, hatten ebenfalls eine größere Plazentafläche als die Gruppe der Mäuse

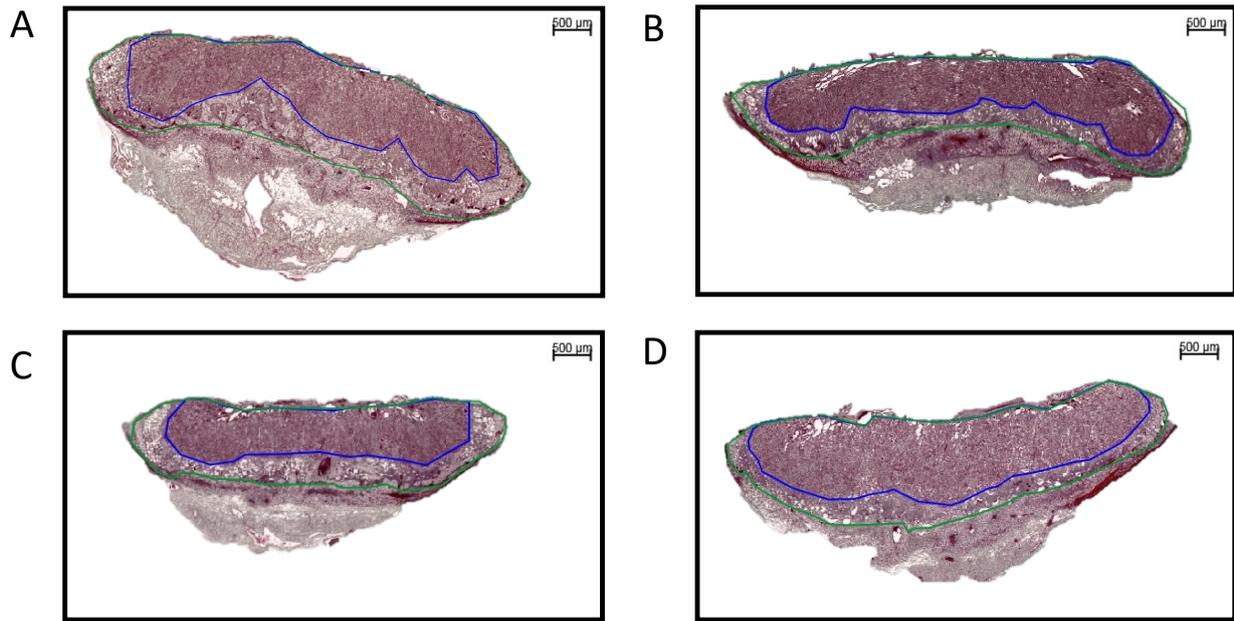
während der zweiten Trächtigkeit. Insgesamt zeigte sich die größte Plazentafläche in der Gruppe der Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion.

Die Analyse der Junktionalzone zeigte bei Mäusen in der ersten Trächtigkeit ohne Injektion eine größere Fläche als bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit (Abb. 14 B). Mäuse, die zu Beginn der ersten Trächtigkeit nTregs injiziert bekamen, zeigten eine größere Fläche der Junktionalzone als Mäuse, die zu Beginn der ersten Trächtigkeit mTregs injiziert bekamen (Abb. 14 B). Insgesamt war die Junktionalzone bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit und Mäusen, die nTregs injiziert bekamen, ähnlich groß (Abb. 14 B). Die Fläche der Junktionalzone war bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit und Mäusen, die mTregs injiziert bekamen, ebenfalls ähnlich groß (Abb. 14 B). Die Junktionalzone nahm in allen Gruppen insgesamt etwas weniger als die Hälfte der Gesamtfläche ein.

Die Fläche des Labyrinths zeigte sich in allen vier Gruppen von nahezu identischer Größe (Abb. 14 C). In der Gruppe der Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion von Tregs zeigte sich die größte Labyrinthfläche, bei Mäusen, die mTregs injiziert bekamen, zeigte sich die kleinste Labyrinthfläche (Abb. 14 C).

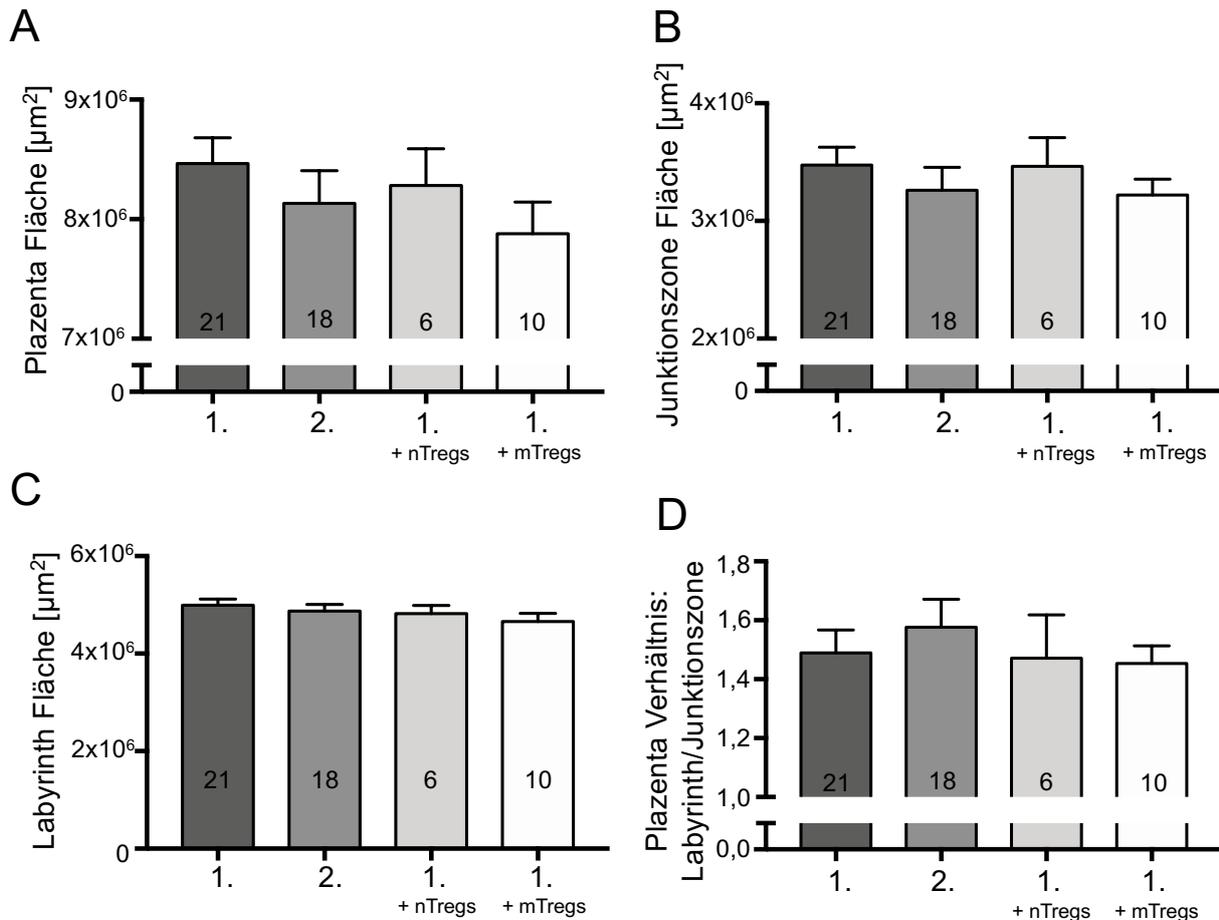
Das Verhältnis zwischen Labyrinth und Junktionalzone zeigte sich bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion kleiner als bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit (Abb. 14 D). Bei Mäusen, die nTregs und mTregs erhielten, zeigte sich eine ähnliche Größe des Verhältnisses, wie bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion (Abb. 14 D). Insgesamt zeigte sich das Verhältnis bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit größer als in den drei anderen Gruppen (Abb. 14 D).

Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 14: Histologische Analyse der Plazenta an Tag 15,5 der Trächtigkeit.**

Die Plazenta wurde an Tag 15,5 der Trächtigkeit nach histologischer Aufarbeitung und Färbung nach Masson-Goldner analysiert. Die maternale Seite der Plazenta befindet sich am oberen Rand jedes Bildes, die fetale Seite am unteren Rand. Die gesamte Plazentafläche ist in grün umrandet, das Labyrinth in blau umrandet. Die Bilder sind Plazenten von Mäusen während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion (A), Mäusen während der zweiten Trächtigkeit (B), Mäusen in ihrer ersten Trächtigkeit, denen nTregs (C) und mTregs (D) injiziert wurden.



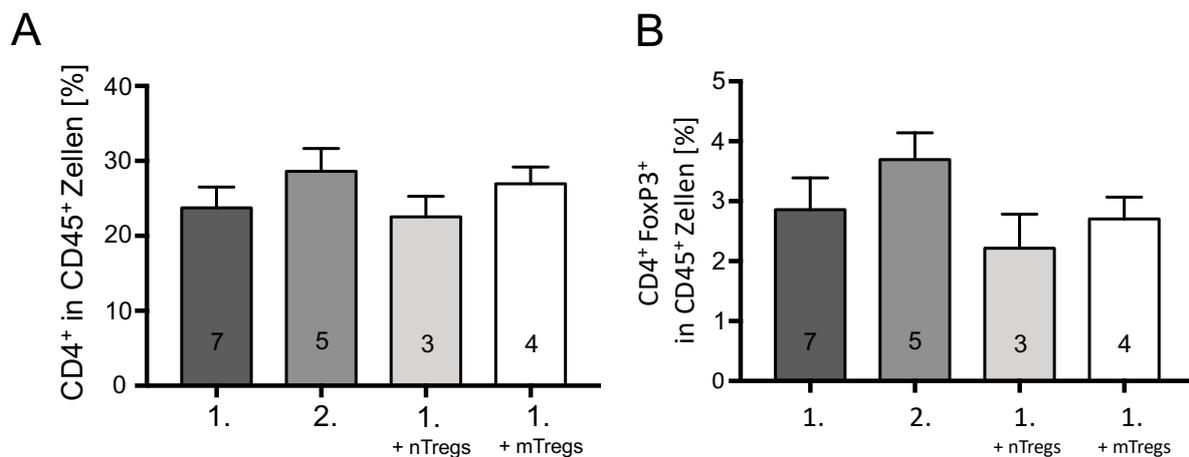
**Abbildung 15: Analyse der Plazentaflächen an Tag 15,5 der Trächtigkeit.** Dargestellt sind die Fläche der gesamten Plazenta (A) und die separat analysierten Einzelareale Junktionalzone (B) und Labyrinth (C). Ebenfalls dargestellt ist das plazentare Verhältnis von Labyrinth zu Junktionalzone (D). Die Säulen zeigen von links nach rechts: Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion von Tregs; Mäuse während der zweiten Trächtigkeit; Mäuse, denen zu Beginn ihrer ersten Trächtigkeit nTregs injiziert wurden; Mäuse, denen zu Beginn ihrer ersten Trächtigkeit mTregs injiziert wurden. Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, die Gruppengrößen sind auf den jeweiligen Säulen markiert.

#### 4.2.3.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zur mütterlichen Immunadaptation

In der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen der Uterus-drainierenden Lymphknoten zeigte sich die Anzahl der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen bei Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit ohne Injektion niedriger als bei Mäusen während ihrer zweiten Trächtigkeit (Abb. 16 A). Mäuse, die nTregs injiziert bekamen, zeigten eine ähnliche

Frequenz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie Mäuse in ihrer ersten Trächtigkeit ohne Injektion und eine niedrigere Frequenz als Mäuse, die mTregs injiziert bekamen (Abb. 16 A). Mäuse, die mTregs injiziert bekamen, zeigten ähnliche Frequenz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie Mäuse während der zweiten Trächtigkeit, eine höhere Frequenz als Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion und als Mäuse, die nTregs injiziert bekamen (Abb. 16 A).

Die Tregs zeigten sich bei Mäusen in der zweiten Trächtigkeit höher als bei Mäusen in ihrer ersten Trächtigkeit ohne Injektion (Abb. 16 B). Mäuse, die mTregs injiziert bekamen, hatten eine höhere Frequenz an Tregs als Mäuse, die nTregs injiziert bekamen (Abb. 16 B). Insgesamt zeigte sich die Frequenz der Tregs bei Mäusen, die nTregs oder mTregs injiziert bekamen, niedriger als bei Mäusen, die ein- oder zweimal ungestört trüchtig waren (Abb. 16 B). Die Frequenz der Tregs war bei Mäusen in der zweiten Trächtigkeit im Vergleich zu den anderen Gruppen am höchsten (Abb. 16 B). Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 16: Höhere Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Tregs in zweiter Trächtigkeit und bei Mäusen in der ersten Trächtigkeit nach Injektion von trüchtigkeitsgeprägten Tregs**

Durchflusszytometrisch erhobene Daten von C57BL6/j-Weibchen gepaart mit Act-mOVA-Balb/c-Männchen an Tag 15,5 der Trächtigkeit aus den Uterus-drainierenden Lymphknoten zur Quantifizierung der CD4<sup>+</sup> (A) und CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen (B) gemessen in CD45<sup>+</sup>. Die Säulen zeigen von links nach rechts: Mäuse während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion von Tregs; Mäuse während der zweiten Trächtigkeit; Mäuse, denen zu Beginn ihrer ersten Trächtigkeit nTregs injiziert wurden; Mäuse, denen zu Beginn ihrer ersten Trächtigkeit mTregs injiziert wurden. Gezeigt wird der

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, die Gruppengrößen sind auf den jeweiligen Säulen markiert.

In den untersuchten Uteruszellen zeigten sich die CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Mäusen in ihrer zweiten Trächtigkeit niedriger als bei Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit ohne Injektion (Tabelle 14). Bei Mäusen, die nTregs injiziert bekamen, zeigten sich die CD4<sup>+</sup> T-Zellen höher als bei Mäusen, die mTregs injiziert bekamen und ebenfalls höher als bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit (Tabelle 14). Die Anzahl der Tregs zeigte sich bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit ohne Injektion und Mäusen während der zweiten Trächtigkeit sehr ähnlich (Tabelle 14). Außerdem zeigte sich die Anzahl der Tregs bei den Mäusen, die nTregs injiziert bekamen am höchsten. Mäuse, die mTregs injiziert bekamen hatten die niedrigste Anzahl an Tregs (Tabelle 14). Diese Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz.

**Tabelle 14 Durchflusszytometrisch erhobene Daten des Uterus an Tag 15,5 der Trächtigkeit zur Quantifizierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs.** Gezeigt werden der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler und die Gruppengröße (n).

	Erste Trächtigkeit	Zweite Trächtigkeit	Erste Trächtigkeit + nTregs	Erste Trächtigkeit + mTregs
CD4 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup> Zellen [%]	3,336 $\pm$ 0,594 (7)	2,88 $\pm$ 0,646 (5)	3,477 $\pm$ 0,845 (3)	2,12 $\pm$ 0,558 (4)
CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> in CD45 <sup>+</sup> Zellen [%]	0,5837 $\pm$ 0,06688 (7)	0,5854 $\pm$ 0,09067 (5)	0,6155 $\pm$ 0,1638 (3)	0,4344 $\pm$ 0,03972 (4)

#### 4.2.3.4 Analyse der injizierten Zellen

Die injizierten und je nach Spendertier geprägten und sortierten nTregs oder mTregs konnten an Tag 15,5 der Trächtigkeit nicht in einer zufriedenstellenden Menge mittels durchflusszytometrischer Analyse wiedergefunden werden (Daten nicht gezeigt).

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte durch eine Literaturrecherche gezeigt werden, dass das Geburtsgewicht von Neugeborenen zweiter Schwangerschaften höher ist als jenes von Neugeborenen einer ersten Schwangerschaft, obwohl die Schwangerschaftsdauer nahezu gleich ist. Auch zeigte sich das Risiko, an einer immunologisch assoziierten Schwangerschaftskomplikation zu leiden, in der zweiten Schwangerschaft deutlich reduziert, wenn die erste Schwangerschaft komplikationslos verlief. Frauen hingegen, die in der ersten Schwangerschaft an einer Schwangerschaftskomplikation litten, zeigten in der zweiten Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko erneut zu erkranken. Experimentell konnte gezeigt werden, dass durch die Depletion der Tregs nach der ersten Trächtigkeit die Anzahl der Tregs in der zweiten Trächtigkeit vergleichbar hoch war wie in der ersten Trächtigkeit. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Tregs und Fetal-Antigen-spezifische Tregs in der zweiten Trächtigkeit in höherem Maße vorhanden waren als in der ersten Trächtigkeit. Nach dem Transfer von trächtigkeitsgeprägten Tregs zeigte sich das fetale Gewicht im Vergleich zu Mäusen, die naive Tregs transferiert bekamen, höher.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich daraus schlussfolgern, dass neben der kardiovaskulären (Clapp and Capeless, 1997; Melchiorre, Sharma and Thilaganathan, 2012; Morris *et al.*, 2015; Meah *et al.*, 2016), renalen (Jeyabalan and Lain, 2007), pulmonalen (LoMauro and Aliverti, 2015) und metabolischen (Parrettini, Caroli and Torlone, 2020; Qiao *et al.*, 2022) Anpassung an die Schwangerschaft im Menschen bzw. Trächtigkeit in Mäusen vor allem die immunologische Anpassung eine sehr wichtige Rolle für das Gelingen einer gesunden Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit spielt. Ebenso stellen diese Ergebnisse weitere Hinweise für die Existenz eines immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses in Form von Gedächtnis-Tregs bereit, die nach der Schwangerschaft in der Mutter persistieren und bei erneutem Antigen-Kontakt in einer weiteren Schwangerschaft rapide expandieren und die Adaptation an die Schwangerschaft schneller vermitteln als herkömmliche Tregs.

In der weitreichenden Literaturrecherche konnte zum einen gezeigt werden, dass bei gleicher Schwangerschaftslänge das Geburtsgewicht Zweitgeborener höher ist als jenes Erstgeborener. Zum andern konnte, wie bereits häufig in Studien untersucht, auch in dieser Analyse ein erhöhtes Wiederholungsrisiko für spezifische Schwangerschaftskomplikationen in der Folgeschwangerschaft gezeigt werden. Viel

bemerkenswerter und in der Literatur nicht deutlich genug und alleinstehend abgebildet, stellte sich das in der Klinik häufig fast als selbstverständlich genommene deutlich verminderte Risiko für Schwangerschaftskomplikationen in einer Folgeschwangerschaft nach gesunder erster Schwangerschaft dar.

Die hier durchgeführte Analyse des Geburtsgewichts bestätigte die sonographisch erhobenen Daten von Kiserud et al., die ebenfalls zeigten, dass Neugeborene zweiter Schwangerschaften schwerer sind (Kiserud *et al.*, 2017). Die Qualität der hier durchgeführten Analyse lässt sich vor allem durch die große Anzahl an eingeschlossenen Patientinnen und die Multinationalität beschreiben. Besonders markant war, dass das Phänomen des höheren Geburtsgewichtes auch im internationalen Vergleich sichtbar war. So zeigte sich das Geburtsgewicht einer indischen Studie (Joshi *et al.*, 2005) mit durchschnittlich 2691 g deutlich niedriger, als das durchschnittliche deutsche Geburtsgewicht von 3480 g (Kiserud *et al.*, 2017). Gleichwohl zeigte sich das Geburtsgewicht in der zweiten Schwangerschaft in beiden Ländern höher. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der ethnische Hintergrund lediglich das Geburtsgewicht an sich, welches unter anderem maßgeblich von der körperlichen Konstitution der Eltern abhängt, nicht jedoch die physiologischen Mechanismen, die zu einem höheren Geburtsgewicht in der zweiten Schwangerschaft beitragen, beeinflusst. Die für diese Arbeit durchgeführte Analyse umfasste mit den 13 inkludierten Studien mehr als 100 000 Frauen. Durch die große Anzahl eingeschlossener schwangerer Frauen in dieser Analyse ist eine Normalverteilung von potenziellen Störfaktoren (Alter, Gewicht, Aktivität, Stress etc.) wahrscheinlicher.

Darwinistisch-evolutionär erscheint ein höheres Geburtsgewicht mit einer niedrigeren Säuglingssterblichkeit gemäß der These „Überleben des Stärksten“ (engl. *survival of the fittest*) assoziiert zu sein. Dies ist auch in Studien belegt. So ist das Risiko für postnatale Morbidität und Mortalität für reife Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unter der dritten Perzentile höher, als für Neugeborene mit Geburtsgewichten in höheren Perzentilen (McIntire *et al.*, 1999). Zusätzlich sind makrosome Neugeborene (Geburtsgewicht >4000 g) unabhängig von Risikofaktoren der Mutter, wie beispielsweise GDM, ebenfalls verschiedenen postnatalen Risiken, wie Hypoglykämie und Atemnotsyndrom in höherem Maße ausgesetzt als normalgewichtige Neugeborene (Das *et al.*, 2009; Esakoff *et al.*, 2009; Beta *et al.*, 2019). Auch höhergradige Geburtsverletzungen und postpartale Hämorrhagien, sowie

Geburtskomplikationen wie eine Schulterdystokie treten bei makrosomen Neugeborenen deutlich häufiger auf (Beta *et al.*, 2019).

In prospektiven Studien wurde bereits beobachtet, dass das Geburtsgewicht nicht nur auf die unmittelbare Gesundheit direkt nach der Geburt Einfluss hat, sondern auch mit gesundheitlichen Ereignissen im späteren Leben assoziiert sein kann. Ein niedriges Geburtsgewicht (< 2500 g) ist für Frauen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen assoziiert (Wang *et al.*, 2022). Ein Geburtsgewicht > 4500 g ist für Frauen und Männer mit einem erhöhten Risiko für Krebssterblichkeit assoziiert (Risnes *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2022).

Schlussfolgernd scheint es so zu sein, dass ein durchschnittliches Geburtsgewicht vorteilhaft ist. In der Literaturrecherche für diese Arbeit bewegen sich die Geburtsgewichte in erster und zweiter Schwangerschaft in einem durchschnittlichen (2500 – 4000 g) Rahmen. Spekulativ scheinen die physiologischen Adaptationsmechanismen des mütterlichen Körpers an die Schwangerschaft die Fähigkeit zu haben, Prozesse so zu optimieren, dass das Geburtsgewicht in der zweiten Schwangerschaft etwas höher, jedoch nicht makrosom wird. Durch diesen physiologischen Mechanismus besteht die Möglichkeit postnatale Morbidität und Mortalität zu reduzieren.

Das höhere Geburtsgewicht in der zweiten Schwangerschaft könnte sich auch über die Theorie des immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses erklären lassen. Translatiert aus der Infektionsimmunologie würden auch für das immunologische Schwangerschaftsgedächtnis Immunzellen, beispielweise Tregs, während der Schwangerschaft zu einem Gedächtnisphänotyp verändert werden. In der Theorie persistieren diese im mütterlichen Organismus über das Intervall zwischen den Schwangerschaften und können bei erneutem Antigen-Kontakt im Sinne einer erneuten Schwangerschaft mit dem gleichen Partner expandieren. Vorteilhaft würde sich das auf die notwendige immunologische Adaptation an die Schwangerschaft und Toleranzinduktion gegenüber dem semi-allogenen Fetus auswirken. Sind die Antigene einer Gedächtniszell-Population bereits bekannt, könnte diese Adaptation schneller initiiert werden und die Implantation und Plazentation könnten schneller vorangetrieben werden. Dies würde die fetale Nährstoffversorgung frühzeitig sichern, was dadurch am Ende der zweiten Schwangerschaft zu einem höheren Geburtsgewicht führen könnte als in der ersten Schwangerschaft. Die Theorie des immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses ist antigenspezifisch, was

bedeutet, dass der Partner in beiden Schwangerschaften derselbe sein muss. Im Falle eines neuen Partners würden dem mütterlichen Immunsystem unbekannte Antigene präsentiert werden. Dieses müsste daraufhin eine gänzlich neue Immunadaptation starten und hätte nicht die Möglichkeit, auf bereits vorhandene Gedächtniszellen zurückzugreifen, die eine schnellere Immunadaptation initiieren könnten. Für diese Theorie spricht ebenfalls, dass die Schwangerschaftslänge nahezu identisch war. Zusätzlich konnte in Studien gezeigt werden, dass die Neugeborenen der Frauen mit neuem Partner in der zweiten Schwangerschaft ein niedrigeres Geburtsgewicht zeigten als in der ersten Schwangerschaft im Vergleich zu Neugeborenen der Frauen mit dem selben Partner in beiden Schwangerschaften (Vatten and Skjaerven, 2003; Robillard *et al.*, 2021).

Schwangerschaftskomplikationen und deren mögliche Ursachen wurden in Studien bereits umfangreich untersucht. So ist, trotz unvollständiger Aufklärung der Pathogenese, hinlänglich bekannt, dass Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie (Tsuda *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2021), Frühgeburtlichkeit (Sykes *et al.*, 2012; Cappelletti *et al.*, 2016b; Gomez-Lopez *et al.*, 2020), spontaner Abort (Yang *et al.*, 2010b) oder FGR (Cotechini, Komisarenko, Sperou, Macdonald-Goodfellow, Michael A Adams, *et al.*, 2014) mit einer pathologischen Verlagerung der mütterlichen Immunantwort beispielsweise durch eine erniedrigten Anzahl von Tregs (Green *et al.*, 2021) oder einer Verschiebung des Verhältnisses von Th1- und Th2-Zellen (Sykes *et al.*, 2012), sowie einer verminderten Modellierung der Spiralarterien durch Inflammation (Cotechini, Komisarenko, Sperou, Macdonald-Goodfellow, Michael A Adams, *et al.*, 2014) einhergehen. Aufgrund der Pathogenese scheinen in der Entstehung anderer Schwangerschaftskomplikationen wie GDM und SIH metabolische (Jovanovic and Pettitt, 2001; Lancet, 2019) und kardiale (Sanghavi, Rutherford and Chb, 2014; Kintiraki *et al.*, 2015) Adaptationsmechanismen vordergründig ursächlich zu sein.

Die Schwangerschaftskomplikationen spontaner Abort, Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit und fetale Wachstumsrestriktion zeigten nach komplizierter erster Schwangerschaft ausnahmslos ein bis zu dreifach erhöhtes Wiederholungsrisiko und nach unkomplizierter erster Schwangerschaft eine um 35 - 65 % reduzierte Auftretenswahrscheinlichkeit in der Folgeschwangerschaft. Diese Ergebnisse

sprechen dafür, dass neben bekannten unveränderbaren und veränderbaren Risikofaktoren wie Ethnie, Familienanamnese, maternales Alter, Gewicht, Nikotinabusus, Ernährung und Stress ein anderer Mechanismus existiert, beispielsweise das zuvor erwähnte immunologische Schwangerschaftsgedächtnis, welches die Fähigkeit besitzt, den Verlauf und Ausgang der Folgeschwangerschaft abhängig vom Verlauf der ersten Schwangerschaft zu beeinflussen. Insbesondere unter Berücksichtigung des immunologischen Hintergrundes dieser Schwangerschaftskomplikation kann auch hier auf die Existenz eines immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses geschlossen werden. Gestärkt wird diese Annahme insbesondere dadurch, dass, ähnlich wie die Reduktion des Geburtsgewichtes durch einen neuen Partner, das Risiko an einer Präeklampsie zu erkranken in der zweiten Schwangerschaft genauso hoch ist wie in der ersten Schwangerschaft, wenn die zweite Schwangerschaft mit einem neuen Partner entstanden ist (Tubbergen *et al.*, 1999; Tuffnell *et al.*, 2005).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine niedrigere Anzahl der für eine gesunde Schwangerschaft unerlässlichen Tregs, gemessen in peripherem Blut, in der Dezidua und im Nabelschnurblut mit einem erhöhten Risiko für Präeklampsie korreliert ist (Rahimzadeh *et al.*, 2016). Ebenso zeigten Sasaki *et al.*, dass proportional sowohl deziduale als auch periphere Tregs in Frauen, die an Präeklampsie leiden im Vergleich zu gesunden Frauen erniedrigt sind (Sasaki *et al.*, 2007). Niedrigere Level an Tregs oder deren Dysfunktion sind damit als potenzieller Risikofaktor, eine Schwangerschaftskomplikation wie beispielsweise Präeklampsie zu erleiden, anzusehen (Hsu *et al.*, 2012; Quinn and Parast, 2013). Dazu passend könnte auch hier das immunologische Schwangerschaftsgedächtnis eine Rolle spielen. Durch die Existenz der Gedächtnis-Tregs und deren Expansion in einer zweiten Schwangerschaft, sind die Tregs in der zweiten Schwangerschaft in höherem Maße vorhanden (Rowe *et al.*, 2012). Das Risiko für eine Präeklampsie könnte dadurch reduziert werden, was ebenfalls das niedrigere Risiko für eine Präeklampsie in der zweiten Schwangerschaft erklären könnte. Um jedoch weiter zu spezifizieren, ob die Korrelation der Tregs mit der Auftretenswahrscheinlichkeit einer Präeklampsie kausal zusammenhängen, sind weitere Experimente nötig. Durch bereits etablierte Mausmodelle (Waker, Kaufman and Brown, 2021) sowie sehr realitätsnahe transgene Rattenmodelle (Geusens *et al.*, 2010) besteht die Möglichkeit einer Nachahmung der Präeklampsie im Tiermodell, was die Beantwortung dieser Frage ermöglichen könnte.

Eine mögliche Rolle in der Entstehung des immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses und dessen Einfluss auf die Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen scheint auch die Länge des vor der Konzeption bestehenden Sexualkontaktes zu spielen. Verschiedene Studien berichten über eine Reduktion der Schwangerschaftskomplikation Präeklampsie bei länger andauerndem, Sexualkontakt ohne Kondom vor Eintritt der Schwangerschaft, was für eine bessere Immunanpassung während der Schwangerschaft spricht (Robillard *et al.*, 1994; Einarsson, Sangi-Haghpeykar and Gardner, 2003; Saftlas *et al.*, 2014). Diese Theorie wurde jedoch von einer Gruppe widerlegt, welche keine Korrelation zwischen längerem Sexualkontakt und der Reduktion des Risikos an einer Präeklampsie zu erkranken zeigen konnte (Ness *et al.*, 2004). Eine weitere Gruppe zeigte einen Zusammenhang zwischen kürzerer sexueller Beziehung und SGA-Feten, sowie einem erhöhten Risiko für eine Plazentainsuffizienz mit pathologischen uterinen Dopplerparametern, jedoch ohne Hinweise auf eine Assoziation zu einer Präeklampsie (Andraweera *et al.*, 2018). Die Studienlage ist in diesem Punkt also uneindeutig. Ausgehend davon, dass der Großteil der Studien einen Vorteil für Frauen in länger andauernden sexuellen Beziehungen zeigte, könnten als Erklärung hierfür die Ergebnisse von Studien durch Robertson *et al.* herangezogen werden. Diese gehen davon aus, dass die männlichen Spermien bereits vor einer Schwangerschaft beim Koitus das mütterliche Immunsystem durch den Kontakt zu Immunzellen in der Vaginalschleimhaut prägen (Robertson, Bromfield and Tremellen, 2003; Robertson *et al.*, 2019). Durch die Prägung der mütterlichen Immunzellen vor der Konzeption, welche in der Theorie durch eine länger bestehende sexuelle Beziehung präziser werden, könnten Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie bereits durch ein vor der Schwangerschaft etabliertes immunologisches Gedächtnis reduziert werden. Dieses bereits präkonzeptionell angelegte immunologische Gedächtnis würde durch den Eintritt einer Schwangerschaft weiterwachsen und an Präzision gewinnen, um als immunologisches Schwangerschaftsgedächtnis für Folgeschwangerschaften mit dem selben Partner effektiver zu sein, als das präkonzeptionell angelegte.

Die postulierten Gedächtniszellen scheinen jedoch nicht nur vorteilig zu sein. Da das Wiederholungsrisiko nach stattgehabter komplizierter erster Schwangerschaft erhöht ist, scheint auch eine nachteilhafte Prägung der Immunzellen möglich zu sein. Als

Folge dessen könnte es in zukünftigen Schwangerschaften zu einer beeinträchtigten immunologischen Adaptation kommen, welche ihrerseits die höhere Rate an Schwangerschaftskomplikationen in der Folgeschwangerschaft herbeiführen könnte.

Die hier präsentierten Ergebnisse bezüglich der Schwangerschaftskomplikationen gehen nur auf das Wiederholungsrisiko der einzelnen Schwangerschaftskomplikationen ein. Den epidemiologischen Daten des norwegischen Geburtsregisters ist jedoch auch ein sogenanntes „Überkreuz-Risiko“ (engl. *cross-risk*) zu entnehmen. Hier wurde gezeigt, dass eine Frühgeburt in der ersten Schwangerschaft als Risikofaktor für Präeklampsie, vorzeitige Plazentalösung und fetale Wachstumsrestriktion in der Folgeschwangerschaft gilt (Kvalvik *et al.*, 2020). Diese Korrelation deutet an, dass durch molekulare Mechanismen, wie beispielsweise eine veränderte immunologische Situation durch die erste Schwangerschaft, die Möglichkeit besteht, eine andere als die initiale Schwangerschaftskomplikation in Folgeschwangerschaften zu bedingen. Erklären lässt sich dies unter anderem durch die überlappende Pathogenese dieser Erkrankungen, wie beispielsweise eine erniedrigte Anzahl an Tregs bei der Präeklampsie und bei der Frühgeburtlichkeit (Gomez-Lopez *et al.*, 2020; Green *et al.*, 2021). Eine beeinträchtigte immunologische Adaptation durch die erste Schwangerschaft kann in der Folgeschwangerschaft durch das Überkreuz-Risiko folglich auch andere oder sogar mehrere Komplikationen gleichzeitig verursachen, da diese Komplikationen auf der Maladaptation ähnlicher Zellpopulationen beruhen. Wie genau sich die unterschiedlichen Mechanismen untereinander beeinflussen, ist bis dato nicht erforscht und bedarf insbesondere zum Schutz gefährdeter schwangerer Frauen weiterer Forschung.

Für die Schwangerschaftskomplikationen SIH und GDM zeigten sich in der Literaturrecherche andere Ergebnisse als für die Schwangerschaftskomplikationen Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit, FGR und spontaner Abort. Für diese beiden Komplikationen ergab sich durch die erste Schwangerschaft keine Risikoreduktion der Komplikation für Folgeschwangerschaften. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf die unterschiedlichen Pathomechanismen der Komplikationen.

In den meisten Studien werden SIH und Präeklampsie gemeinsam untersucht, weshalb sich weniger Studien finden, die nur über den SIH alleine berichten. Für diese Arbeit konnten zwei Arbeiten gefunden werden, welche exklusiv den SIH in

Folgeschwangerschaften untersucht haben und für die zweite Schwangerschaft jeweils unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Nach erster Schwangerschaft mit SIH zeigten Boghossian et al. ein erhöhtes Wiederholungsrisiko, während Wallace et al. ein erniedrigtes Wiederholungsrisiko zeigten. Zum genaueren Verständnis und zur Einordnung dieses Ergebnisses sollte die Pathogenese des SIH genauer betrachtet werden. Für die adäquate Versorgung des wachsenden Fetus kommt es während der Schwangerschaft zu signifikanten Änderungen der kardiovaskulären und hämodynamischen Situation. Das mütterliche Plasmavolumen (Rodger *et al.*, 2015), das Herzzeitvolumen (Bader *et al.*, 1955), sowie die Herzfrequenz steigen physiologisch an (Sanghavi and Rutherford, 2014). Der periphere Gefäßwiderstand und damit einhergehend der systemische Blutdruck hingegen sind erniedrigt (Ouzounian and Elkayam, 2012). Die Erhöhung des Plasmavolumens geht auf eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zurück. Da dieses blutdrucksteigernd wirkt, werden kompensatorisch mehr vasodilatative Mediatoren ausgeschüttet. Dazu gehören unter anderem Prostacyclin, Stickstoffmonoxid und vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Valdes *et al.*, 2009; van Drongelen *et al.*, 2012). Man geht davon aus, dass das auslösende Ereignis für einen SIH eine verminderte uteroplazentare Perfusion als Folge einer gestörten Trophoblasteninvasion an den Spiralarterien ist (Gerretsen, Huisjes and Elema, 1981; Saftlas *et al.*, 1990; Cheung and Lafayette, 2013). Dies führt zu einer plazentaren Ischämie, welche ihrerseits zu einer umfassenden Aktivierung bzw. Fehlfunktion des mütterlichen vaskulären Endothels führt (Granger *et al.*, 2001). Durch fehlende Vasodilatoren und erhöhte Mediatoren, die zu einer Blutdrucksteigerung führen, entsteht der SIH.

Der SIH ist daher, anders als beispielsweise Frühgeburtlichkeit, FGR oder Präeklampsie, als Komplikation auf das Herz-Kreislaufsystem zurückzuführen.

Damit einhergehend weist auch die Schwangerschaftskomplikation GDM eine andere Pathophysiologie auf. Der GDM entsteht während der Schwangerschaft ohne vorher bekannten Diabetes mellitus. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung eines GDM gehören unter anderem Übergewicht/Adipositas, fortgeschrittenes mütterliches Alter oder eine positive Familienanamnese für jede Art von Diabetes (Plows *et al.*, 2018). In den meisten Fällen ist die Ursache eine beeinträchtigte Glucose-Toleranz durch eine bisher ungeklärte Dysfunktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen, welche für die

Insulinproduktion zuständig sind. Gleichzeitig zeigt sich bei Frauen mit GDM eine Erhöhung der inflammatorischen Zytokine IL-6 und des Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) verglichen mit gesunden schwangeren Frauen (Atègbo *et al.*, 2006), weshalb auch diese Schwangerschaftskomplikation eine gewisse inflammatorische Komponente besitzt. Schober *et al.* vermuten zusätzlich eine eingeschränkte funktionelle Kapazität der Tregs bei Patientinnen mit GDM (Schober *et al.*, 2014). Basierend auf der immunologischen Komponente dieser Schwangerschaftskomplikation wäre die Entwicklung eines immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses auch bei dieser Komplikation denkbar. In der Literaturrecherche zeigte sich mit fast 50 % im Vergleich zu allen anderen Komplikationen ein sehr hohes Wiederholungsrisiko in der Folgeschwangerschaft. Das Risiko für gesunde Frauen in der zweiten Schwangerschaft einen GDM zu entwickeln, blieb allerdings ähnlich hoch wie das Risiko für eine erste Schwangerschaft. Hier zeigte sich somit kein Vorteil, was gegen die Entwicklung eines protektiven immunologischen Gedächtnisses spricht. Vordergründig könnten hierfür multifaktorielle Pathomechanismen, wie beispielsweise metabolische Komponenten und Adaptationsmechanismen, verantwortlich sein. Besonders interessant ist, dass eine Änderung des Body-Mass-Index (BMI) zwischen zwei Schwangerschaften das Risiko für einen erneuten GDM modulieren kann. Ehrlich *et al.* suggerieren, dass eine Erhöhung des BMI zwischen zwei Schwangerschaften zu einem erhöhten Risiko in der nächsten Schwangerschaft führt. Gegensätzlich dazu führte eine Reduktion des BMI, insbesondere bei übergewichtigen Frauen, zu einem Schutz vor GDM in der nächsten Schwangerschaft (Ehrlich *et al.*, 2011). In Anbetracht des Risikoprofils für diese Schwangerschaftskomplikation erscheint eine Optimierung ebendieses protektiver zu sein als das für andere Komplikationen postulierte immunologische Schwangerschaftsgedächtnis.

Resultierend aus den klinischen Ergebnissen scheint das immunologische Schwangerschaftsgedächtnis eine Fähigkeit zu haben, die auf der einen Seite zur Verbesserung und auf der anderen Seite ebenso zur Verschlechterung des Verlaufes sowie des mütterlichen und fetalen Ausgangs zweiter Schwangerschaften beitragen kann. CD4<sup>+</sup>-Tregs stellen für die Entwicklung immunologischer Toleranz gegenüber dem heranwachsenden Fetus eine kritische Zellpopulation des mütterlichen Immunsystems dar. Zusätzlich wurde gezeigt, dass beim Auftreten verschiedener

Schwangerschaftskomplikationen eine Imbalance zwischen Tregs und proinflammatorischen Zellen zum Nachteil der Tregs herrscht (Zhu *et al.*, 2017; Eghbal-Fard *et al.*, 2019). Aus diesem Grund scheinen Tregs, vor allem Fetal-Antigen-spezifische Tregs (Tubbergen *et al.*, 1999), in die Pathogenese von Schwangerschaftskomplikationen involviert zu sein, weshalb sie der Mittelpunkt der für diese Arbeit durchgeführten Experimente waren.

Wie in der Literaturrecherche der humanen Daten gezeigt, scheint es für gewisse Schwangerschaftskomplikationen ein immunologisches Gedächtnis zu geben, welches den mütterlichen und fetalen Ausgang der Schwangerschaft verbessern kann. Da die Tregs für die mütterliche Immunadaptation während der Schwangerschaft eine große Bedeutung haben und die Anzahl der Tregs in der zweiten Schwangerschaft höher ist, sollte in diesem Experiment die funktionelle Rolle der Tregs mittels Depletion dieser nach der ersten Trächtigkeit in Mäusen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse während der zweiten Trächtigkeit eine vorteilhafte immunologische Adaptation an die Trächtigkeit haben, verglichen mit Mäusen während der ersten Trächtigkeit und Mäusen, deren Tregs nach der ersten Trächtigkeit depletiert wurden, insbesondere in Hinblick auf die Population der Tregs.

Vorexperimente der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Depletion von Tregs nach der ersten Trächtigkeit einen Einfluss auf den fetalen Ausgang der Trächtigkeit, gemessen am fetalen Gewicht und die Abortrate an Tag 15,5 der Trächtigkeit hat. Die Nachkommen von Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion zeigten ein höheres Gewicht als die beiden anderen Gruppen, welche ähnliche Gewichte zeigten. Die Abortrate war in der Gruppe mit Mäusen während der ersten Trächtigkeit und den Mäusen während der zweiten Trächtigkeit nach Depletion der Tregs ähnlich hoch. Mäuse während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion hatten eine niedrigere Abortrate. Ausgehend von diesem Ergebnis war das Ziel der Wiederholung dieses Experimentes an Tag 7,5 der Trächtigkeit und vor allem die fetale Entwicklung und die immunologische Adaptation der Mäuse zu einem Zeitpunkt in der Mitte der Trächtigkeit zu betrachten, um dadurch Rückschlüsse auf vorteilige Effekte durch mögliche Treg-Gedächtniszellbildung zu ziehen.

Die mittels konfokaler Mikroskopie erhobenen Daten der Embryonen aus diesem Experiment spiegeln das Bild einer vorteilhaften mütterlichen Immunadaptation an Tag 7,5 der Trächtigkeit wider. Ähnlich wie die Experimente an Tag 15,5 zeigte sich ein Wachstumsvorteil für die Embryonen aus der Gruppe der Mäuse während der zweiten

Trächtigkeit ohne Depletion. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Embryonen der Mäuse während der zweiten Trächtigkeit nach ungestörter erster Trächtigkeit, anders als Embryonen von Mäusen, deren potenzielle Gedächtnis-Tregs nach der ersten Trächtigkeit depletiert wurden, von vorhandenen Gedächtnis-Tregs im Sinne eines Wachstumsvorteils profitieren könnten.

In der mütterlichen Immunadaptation zeigte sich bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit ohne Depletion eine signifikant höhere Anzahl der Tregs in den paraaortalen, Uterus-drainierenden Lymphknoten als Mäuse während der ersten Trächtigkeit. Mäuse, deren gesamte Tregs nach der ersten Trächtigkeit depletiert wurden, darin inbegriffen auch alle potenziellen Gedächtniszellen, zeigten in der Folgeträchtigkeit an Tag 7,5 Treg-Level ähnlich denen der Mäuse während ihrer ersten Trächtigkeit, obwohl dies ihre zweite Trächtigkeit war. In den untersuchten Uteruszellen zeigte sich ein ähnliches Bild, allerdings waren die Unterschiede kleiner als im Lymphknoten. Dieses Ergebnis unterstützt damit die Theorie der Treg-Gedächtniszellbildung während der ersten Trächtigkeit in Mäusen.

Gedächtniszellen dieser CD4<sup>+</sup>-Tregs (Gedächtnis-Tregs) sind bislang wenig erforscht. Durch zunehmende experimentelle Hinweise kann mittlerweile jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Zellen die Eigenschaften herkömmlicher Gedächtniszellen teilen. Die Arbeitsgruppen von Rowe et al. und Chen et al. haben gezeigt, dass in artifiziellen Tiermodellen mit Überexpression des fetalen Antigens durch spezifische Tetramer-Anreicherung Fetal-Antigen-spezifische Tregs mit Gedächtniszellphänotyp nachweisbar sind. Diese sind jedoch nicht durch einen alleinstehenden spezifischen Marker charakterisierbar und es bleibt lediglich eine Mutmaßung, dass diese Zellen existieren. Diese entstehen während der ersten Schwangerschaft, persistieren unter Vermeidung der Apoptose nach der Schwangerschaft im mütterlichen Organismus und können bei erneutem Antigenkontakt expandieren, was mutmaßlich durch schneller etablierte, fetale Toleranz und folglich schnellere Implantation Einfluss auf den reproduktiven Erfolg in den Folgeschwangerschaften hat (Rowe *et al.*, 2012; Chen, Darrasse-Jèze, Bergot, Courau and Churlaud, 2013).

Übertragen wurde die Idee des immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses aus der Infektionsimmunologie. Hier wurden im Rahmen einer viralen Infektion Gedächtnis-Tregs im Mausmodell nachgewiesen (Sanchez *et al.*, 2012; Brincks *et al.*,

2013). Die Identifikation dieser Zellen als Tregs erfolgt über die eindeutigen Zellmarker CD4, CD25 und FoxP3. Einen eindeutigen, einzigartigen Oberflächenzellmarker, der Gedächtnis-Tregs allein identifiziert, konnte bislang nicht gefunden werden. Zur Identifikation der Gedächtnis-Tregs wurden herkömmliche Gedächtniszellmarker wie CD44<sup>hi</sup> und CD62L<sup>low</sup> herangezogen, welche die vorherige Aktivierung einer Zelle markiert, jedoch nicht Gedächtnis-Treg spezifisch ist (Rosenblum, Sing Way and Abbas, 2016). Durch deren Antigen-Spezifität sowie die eindeutige Identifizierung dieser Zellen als Tregs und die Markierung vorheriger Aktivierung durch CD44<sup>hi</sup> und CD62L<sup>low</sup> wurde in diesen Studien angenommen, dass die gefundenen Zellen Gedächtnis-Tregs sind. Fraglich ist aber, ob CD62L (L-Selectin) ein günstiger Marker zur Bestimmung der Zellen ist, da dieser sowohl von naiven, als auch von reaktivierten zytotoxischen T-Zellen und reifen zentralen Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird (Ivetic, Hoskins Green and Hart, 2019). Denkbar wäre es daher, die Identifikation der Gedächtnis-Tregs auf ihre verbesserte Aktivität und Funktionalität zurückzuführen, welche sich in der zellspezifischen Sekretion von IL-10 äußert. Dies als Identifikationsparameter anzusehen ist jedoch unsicher. Trotzdem und passend dazu zeigten Sanchez et al., dass Gedächtnis-Tregs mehr IL-10 produzieren, als herkömmliche Tregs (Sanchez *et al.*, 2012).

Zusammenfassend basieren die genannten Experimente auf Tetrameranreicherung bei bekanntem Antigen bzw. Pathogen. Neben der Identifikation der Zellen über Oberflächenmarker ist auch die Identifikation über die Analyse epigenetischer Veränderungen denkbar. Rosenblum et al. gehen davon aus, dass die vorherige Aktivierung der Zellen epigenetisch sichtbar sein muss (Rosenblum, Way and Abbas, 2016). Dies könnte in der Theorie über den Vergleich mit voll ausgereiften Tregs möglich sein, da diese definierte epigenetische Marker tragen (Morikawa and Sakaguchi, 2014). Bislang bleibt diese Annahme jedoch eine Theorie und wurde bis dato nicht experimentell belegt.

Herauszufinden bleibt ebenfalls, ob und inwiefern für die Existenz der Gedächtnis-Tregs im Organismus ein kontinuierlicher Antigenstimulus oder eine Auffrischung ähnlich einer Impfung notwendig ist. Ein kontinuierlicher Antigenstimulus, wie er auch bei chronischen Erkrankungen oder Krebserkrankungen durch Pathogene vorhanden sein kann, könnte gegen das Vorhandensein eines klassischen immunologischen Gedächtnisses sprechen. Es bestünde keine Notwendigkeit für Gedächtniszellen, da

die Immunreaktion durch den kontinuierlichen Stimulus aufrechterhalten wird. Im Rahmen von chronischen Erkrankungen führt dies jedoch zu Endorganschäden und Erschöpfung des Immunsystems, vor allem der T-Effektor-Zellen (Wherry and Kurachi, 2015). Im Gegensatz dazu sorgen Impfungen und vor allem Auffrischungsimpfungen durch abgeschwächte Erreger lediglich für einen zeitweisen Antigen-Stimulus des Immunsystems, wodurch die Bildung neuer Gedächtniszellen angeregt wird, um den Immunschutz aufzubauen bzw. aufrecht zu erhalten. Hierdurch wird das Immunsystem nicht überstimuliert und erschöpft (Kaufmann, Meinke and Von Gabain, 2009). In beiden Fällen geht es aber vor allem um T-Effektor-Gedächtniszellen. Im Falle der Gedächtnis-Tregs wurde gezeigt, dass diese nach Entfernung des Antigens bzw. Pathogens 50 - 100 Tage im Organismus nachweisbar waren (Sanchez, 2010; Rowe *et al.*, 2012; Brincks *et al.*, 2013), was deutlich kürzer ist, als beispielsweise T-Effektor- oder B-Zell-Gedächtniszellen, welche über Jahre persistieren können (Crotty and Ahmed, 2004). Nicht beobachtet wurde, ob diese Zellen, wie zuvor genannte andere Gedächtniszellen, auch längere Zeit, letztendlich sogar Jahre nach dem immunisierenden Ereignis, noch im Organismus nachweisbar sind. Interessant wäre dies, da die Dauer, die Gedächtniszellen im Falle einer Schwangerschaft überleben müssten, mehrere Monate bis Jahre beträgt. Geht man davon aus, dass die Gedächtnis-Tregs, anders als eine Impfung einen kontinuierlichen Stimulus benötigen, ist es denkbar, dass dieser durch fetal mikrochimäre Zellen gebildet wird. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass fetal mikrochimäre Zellen bis zu 27 Jahre nach der Geburt im mütterlichen Organismus persistieren (Weissler and Caton, 2014; Kinder, 2017). Ob fetal mikrochimäre Zellen den kontinuierlichen Antigen-Stimulus zur Existenz der schwangerschaftsgeprägten (bzw. murin: trächtigkeitsgeprägten) (Gedächtnis)-Tregs bilden oder ob diese Zellen ohne Antigenstimulus existieren, könnte experimentell evaluiert werden. Die Zellen der männlichen Mauslinie sollte ähnlich den Act-mOVA-Mäusen einen exklusiven Marker exprimieren, beispielsweise ein fluoreszierendes Protein und zusätzlich selektiv depletierbar sein, ähnlich der Tregs im DEREK-Modell. So könnte es nach allogener Verpaarung mit C57BL6/j-Weibchen möglich sein, die fetal mikrochimären Zellen in der Mutter zu verfolgen und ebenfalls ähnlich dem DEREK-Modell durch Injektion eines spezifischen Moleküls zu eliminieren. Folglich könnte man in verschiedenen Gruppen den Effekt der fetal mikrochimären Zellen auf die Lebensdauer der Gedächtnis-Tregs untersuchen. In verschiedenen Gruppen würden die Zellen mit Abstand nach der Trächtigkeit in der

einen Gruppe depletiert werden und in der anderen nicht. Mittels Durchflusszytometrie könnte zum einen die Anzahl der fetal mikrochimären Zellen und zum anderen die Anzahl der trächtigkeitsgeprägten (Gedächtnis-) Tregs erfasst werden. Daraus könnte man schlussfolgern, welchen Effekt die fetal mikrochimären Zellen auf die Gedächtnis-Tregs und ihre Persistenz nach der Trächtigkeit im mütterlichen Organismus haben. Zu welchem Ergebnis dieses Experiment kommen würde kann nur gemutmaßt werden. Es wäre definitiv möglich, dass die Gedächtnis-Tregs die fetal mikrochimären Zellen als kontinuierlichen Antigen-Stimulus für ihre Existenz brauchen. Dies würde diese Zellen jedoch als Gedächtnis-Zellen im herkömmlichen Sinne disqualifizieren. Möglich ist dennoch, dass die trächtigkeitsgeprägten, Fetal-Antigen-spezifischen Tregs, wie bereits in den Experimenten von Rowe und Chen gezeigt, bei erneutem Antigenkontakt in einer weiteren Trächtigkeit bzw. Schwangerschaft expandieren und wie Gedächtniszellen fungieren, obwohl sie „nicht-klassische“ Gedächtniszellen wären. Möglich wäre jedoch auch, dass diese Zellen auch nach Depletion der fetal mikrochimären Zellen in der Mutter persistieren und keinen kontinuierlichen Antigen-Stimulus benötigen und die fetalen mikrochimären Zellen hierfür keine Rolle spielen. In letzterem Szenario könnte es sein, dass Gedächtnis-Tregs, ähnlich vieler anderer Gedächtnis-Zellen, eine Auffrischung brauchen, welche in Form einer erneuten Trächtigkeit bzw. Schwangerschaft passieren würde.

Passend zu der Frage nach dem Stimulus für Gedächtnis-Tregs, zeigte eine kanadische klinische Studie, dass ein kürzeres Intervall von 6 - 11 Monaten zwischen den Schwangerschaften ein niedrigeres Risiko für Präeklampsie darstellt als bei einem Intervall zwischen den Schwangerschaften von 18 - 23 beziehungsweise über 60 Monaten (Hanley *et al.*, 2017). Dieses Ergebnis zeigt, dass ein kürzeres Intervall zwischen Schwangerschaften das Wiederholungsrisiko einer immunologisch assoziierten Schwangerschaftskomplikation senken kann. Immungedächtniszellen sind in der Theorie dann noch in größerem Maße vorhanden und haben durch die Fähigkeit der schnellen Initiation der Immunadaptation einen größeren Einfluss auf den Verlauf und Ausgang der Folgeschwangerschaft als bei längerem Intervall zwischen den Schwangerschaften.

Da insbesondere für die Präeklampsie gezeigt werden konnte, dass das Risiko an ebendieser zu erkranken, in der zweiten Schwangerschaft ähnlich hoch ist wie in der ersten Schwangerschaft, wenn der Vater in der zweiten Schwangerschaft ein anderer

ist (Tubbergen *et al.*, 1999; Tuffnell *et al.*, 2005), ist eine Antigen-spezifität der Immunadaptation an die Schwangerschaft anzunehmen. Zur genaueren Charakterisierung der Antigen-spezifischen Immunantwort in der Schwangerschaft konnte im nächsten Experiment gezeigt werden, dass eine höhere Anzahl fetal Antigen-spezifischer Tregs in der zweiten Trächtigkeit, verglichen mit der ersten Trächtigkeit, vorhanden ist.

Um die Schwierigkeit der Identifikation Fetal-Antigen-spezifischer Tregs und potenzieller Gedächtniszellen zu überkommen wurde ähnlich den Experimenten von Rowe, Chen, Sanchez und Brinks die durchflusszytometrische Identifikation dieser Zellen durch das bekannte Antigen mittels MHC-Tetramer gewählt. Anders als in den zuvor genannten Experimenten ist das hier genutzte Mausmodell kein artifizielles, sondern ein natürlicheres Modell, welches annähernd der humanen Realität entspricht. Gezeigt werden konnte, dass im Lymphknoten sowohl die Anzahl der Tregs als auch der Fetal-Antigen-spezifischen Tregs in Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher war, verglichen mit Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit. Im Uterus zeigte sich bezüglich der Tregs kein signifikanter Unterschied zum Lymphknoten. Interessanterweise zeigte sich im Uterus jedoch, dass das IL-10 in der Gruppe mit Mäusen während der zweiten Trächtigkeit wesentlich höher war als in der Gruppe von Mäusen während der ersten Trächtigkeit. Dieses Ergebnis bestätigt, was Sanchez *et al.* bereits 2012 beschrieben. Gedächtnis-Tregs sind in der Lage mehr IL-10 zu produzieren als normale Tregs (Sanchez *et al.*, 2012). Des Weiteren war auch die Anzahl Fetal-Antigen-spezifischer Tregs im Uterus bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit, obwohl die Gesamtzahl der Tregs niedriger war als während der ersten Trächtigkeit. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da im Kontext von Autoimmunerkrankungen und Transplantation gezeigt wurde, dass Antigen-spezifische Tregs ein höheres Potenzial in der Regulation und Verbesserung der Immuntoleranz haben als reguläre Tregs (Selck and Dominguez-villar, 2021). Dieses Potenzial könnten auch die in der Trächtigkeit entwickelten Fetal-Antigen-spezifischen Tregs und mutmaßliche Gedächtnis-Tregs in noch höherem Maße in der zweiten Trächtigkeit haben. Vorteilhaft zeigt sich dies, wie bereits zuvor erwähnt, in einer schnelleren Induktion der Toleranz gegenüber dem Fetus sowie schnellerer Immunadaptation an die Trächtigkeit, unter anderem durch Expansion der Fetal-Antigen-spezifischen Tregs zu Beginn der Trächtigkeit. Dies wiederum resultiert, wie hier gezeigt, in einer höheren

Anzahl Fetal-Antigen-spezifischer Tregs in der zweiten Trächtigkeit. Fraglich und durch dieses Experiment nicht zu beantworten ist, ob sich das verbessernde Potenzial zwischen Fetal-Antigen-spezifischen Tregs und deren möglichen Gedächtniszellen unterscheidet. Insbesondere zu bedenken ist dies, da nicht abschließend geklärt ist, ob die persistierenden Zellen, wie zuvor diskutiert, Gedächtniszellen im herkömmlichen Sinne oder kontinuierlich durch fetal mikrochimäre Zellen stimulierte, sich dadurch erneuernde Zellen sind. Beide Zelltypen würden bei erneutem Antigenkontakt rasch expandieren, dennoch stellt sich die Frage nach dem Unterschied des Potenzials beider Zellen. Herauszufinden ist dies möglicherweise ebenfalls durch das zuvor beschriebene Experiment im Mausmodell, das eine selektive Depletion der fetal mikrochimären Zellen und gleichzeitig eine Detektion der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen erlaubt.

Warum sich die Immunantwort zwischen lokalem (bspw. Uterus) und peripherem (bspw. Lymphknoten) immunologisch aktivem Gewebe unterscheidet, ist bisher nicht vollständig verstanden. Sanchez et al. zeigten ebenfalls, dass nach viraler Infektion Pathogen-spezifische Tregs vor allem in den Lymphknoten und nur in kleinerer Anzahl im betroffenen Organ zu finden sind (Sanchez *et al.*, 2012). Auch zu erklären ist dies über die konstante Migration der Zellen zwischen Lymphknoten und Peripherie (Krummel, Bartumeus and Gérard, 2016).

Die gefundenen Fetal-Antigen-spezifischen Zellen konnten in der Durchflusszytometrie leider nur in sehr kleiner Menge identifiziert werden, sodass eine Differenzierung dieser anhand herkömmlicher Gedächtniszellmarker, wie beispielsweise CD44<sup>hi</sup> und CD62<sup>low</sup> nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Um diese Schwierigkeit zu überwinden, bietet die Einzelzellsequenzierung eine methodisch detaillierte Analyse einzelner Zellen. Damit ist es möglich, den Unterschied in Expressionsprofilen bzw. Gen-Karten zwischen den Zellen aus verschiedenen Gruppen zu verdeutlichen. Diese Methode erstellt für jede analysierte Zelle ein eigenes Zellprofil über die Expression von Genen. Mit Hilfe dieser Methode könnte es möglich sein, Gene zu identifizieren, die in normalen, Fetal-Antigen-spezifischen oder Gedächtnis-Tregs zum einen in Gruppen der gleichen Mäuse übereinstimmen und sich zum anderen zwischen den Gruppen unterscheiden. Diese Analyse könnte eine Möglichkeit bieten, Gene zu identifizieren, die beispielsweise in Tregs bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit anders herauf- oder herunterreguliert sind als in der ersten Trächtigkeit. Viele Arbeiten beschäftigen sich bereits mit der

Einzelzellsequenzierung von Tregs in unterschiedlichen Organen. Mögliche Gedächtnis-Tregs wurden aber mit dieser Methode bisher noch nicht untersucht.

Nach den zuvor genannten Hinweisen stellt sich die Frage nach den klinischen Einsatzmöglichkeiten und dem therapeutischen Nutzen der Erkenntnisse über Gedächtnis-Tregs für Frauen und ungeborene Kinder. Zunächst müssen die Frauen identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko für eine immunologisch-assoziierte Schwangerschaftskomplikation haben und von einer spezifischen bzw. immunologischen Therapie profitieren könnten. Neben der Anamnese und Familienanamnese, welche bereits Aufschlüsse über Risikofaktoren liefern kann, ist ein Versuch, Biomarker zu finden, die beispielsweise eine Frühgeburt vorhersagen können (Stelzer *et al.*, 2021). Bisher wurden in diesem Forschungsgebiet Grundsteine für die Entwicklung von Blut-Analysen zur Identifikation von Frauen mit erhöhtem Risiko gelegt. Eindeutige, exklusive Biomarker wurden bisher nicht beschrieben. Nach der Identifikation der Frauen, die ein Risiko haben, bleibt die Frage, ob eine artifizielle Vorbereitung bzw. Prägung der Zellen außerhalb des Mutterleibes einen vorteiligen Effekt für die immunologische Schwangerschaftsadaptation erzeugen kann, wie experimentell gezeigt. Robertson *et al.* postulieren, dass bereits die Insemination als ein immunisierendes Ereignis angesehen werden muss, bei dem das mütterliche Immunsystem für eine verbesserte Implantation des Embryos und eine erfolgreiche Schwangerschaft vorbereitet wird (Robertson, Bromfield and Tremellen, 2003). Fraglich ist daher, ob gehäufte Koitus mit Insemination bereits eine Vorbereitung bzw. Prägung der mütterlichen Immunzellen hervorruft. Relevant könnte dies in entfernter Zukunft als therapeutische Möglichkeit bei Problemen der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft oder ungewollter Kinderlosigkeit werden. Bei Männern, die beispielsweise an Oligozoospermie leiden, deren Ejakulat eine sehr geringe Anzahl an Spermien enthält, könnte das mütterliche Immunsystem möglicherweise durch die geringe Spermienzahl, welche auch eine geringere Antigenexposition gegenüber dem mütterlichen Immunsystem bedeutet, nicht ausreichend durch Insemination vorbereitet werden, wie es ein Mann mit normaler Spermienzahl könnte. In diesem Fall wäre die Vorbereitung bzw. Prägung mütterlicher Zellen mit väterlichem Antigen *in vitro* vielleicht eine Behandlungsmöglichkeit der Zukunft. Ein solcher Ansatz zur Behandlung von schwangerschaftsspezifischen Komplikationen durch die Manipulation der Treg-Anzahl *in vivo* und *ex vivo* sowie der adoptive Zelltransfer zuvor

geprägter Zellen konnte bisher nicht etabliert werden. Durch kürzlich publizierte Ergebnisse aus präklinischen Mausmodellen und die eindrucksvolle Weiterentwicklung von Treg-Therapien bei Autoimmunprozessen, beispielsweise der Beitrag zur Toleranz bei Allotransplantaten und der Behandlung von Autoimmunerkrankungen durch Manipulation der Treg-Anzahl (Cobbald *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2008), könnte ebenfalls die Möglichkeit der Treg-Intervention bei Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie bestehen (Selck and Dominguez-villar, 2021). Diese Ansätze beinhalten typischerweise einen adoptiven Zelltransfer von *ex vivo* manipulierten Zellen oder die Induktion von FoxP3-Expression in naiven Lymphozyten (Verbsky, 2007). Häufig geht es hier jedoch nur um die reine Anzahl der Tregs und nicht um die Antigen-spezifität, welche bei der Behandlung von Schwangeren von enormer Bedeutung zu sein scheint. Übertragen auf die Behandlung von ungewollter Kinderlosigkeit und zur Prävention von immunologisch assoziierten Schwangerschaftskomplikationen wäre die Entnahme von mütterlichem Blut vor der Schwangerschaft mit folgender Isolation von beispielsweise Tregs sowie dessen Exposition gegenüber väterlichen Antigenen *in vitro* denkbar. Anschließend könnte die Kultivierung und Vermehrung der Zellen erfolgen, um sie dann mittels adoptivem Zelltransfer in den mütterlichen Organismus zurückzubringen. Diese Zellen wären dann bereits väterlich Antigen-spezifisch und böten im Falle des Eintritts einer Schwangerschaft, bei dem dann folgenden erneutem Antigenkontakt die Vorteile, die auch Gedächtnis-Tregs in zweiten Schwangerschaften bieten könnten. Wie Robertson *et al.* bereits postulieren, ist die Behandlung mit *ex vivo* vermehrten Tregs beim Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise Präeklampsie, bei der bekannt ist, dass die Anzahl der Tregs im peripheren Blut und in der Dezidua erniedrigt sind (Saito *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012), sowie deren suppressive Kapazität eingeschränkt ist (Darmochwal-Kolarz *et al.*, 2012; Steinborn *et al.*, 2012), ebenfalls denkbar (Robertson *et al.*, 2019). Es könnte daher im experimentellen Setting ein „Rettungsversuch“ durch Treg-Injektion beispielsweise in der Mitte der Schwangerschaft zur Prävention oder sogar Therapie der Präeklampsie vielversprechend sein. Die Funktionalität eines solchen Rettungsversuches muss zunächst im Mausmodell überprüft werden. Es gibt viele verschiedene Ansätze eines Präeklampsie-Mausmodelles, beispielsweise durch ein Trophoblasten-spezifisches Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-) 1 $\alpha$ -Mausmodell, in dem Mäuse durch prolongierte HIF-1 $\alpha$ -Expression des Trophoblasten Präeklampsie-spezifische Symptome, wie

Bluthochdruck und Proteinurie entwickeln (Albers *et al.*, 2019). Wie in dem Experiment zum adoptiven Zelltransfer in dieser Arbeit (Kapitel 3.3.3) könnten auch für einen Rettungsversuch Tregs aus gesunden und/oder trächtigen Mäusen extrahiert werden und trächtigen HIF-1 $\alpha$ -Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Trächtigkeit injiziert werden, um zu überprüfen, ob ein adoptiver Zelltransfer von Tregs den Trächtigkeitsverlauf verbessern, eine Präeklampsie verhindern oder sogar eine Heilung herbeiführen kann. Ebenso könnte untersucht werden, ob trächtigkeitsgeprägte Tregs hierbei einen anderen Verlauf herbeirufen, als naive Tregs.

Um das volle therapeutische Potenzial solcher Methoden zu erreichen, bedarf es zum einen noch weiterer Aufklärung der vollständigen Pathogenese der Schwangerschaftskomplikationen, um die Therapie so effektiv wie möglich zu gestalten und zum anderen weiterer Forschung der Methoden zur Behandlung.

In den ersten beiden Experimenten für diese Arbeit wurde gezeigt, dass die Implantationsrate in der ersten und zweiten Trächtigkeit bzw. in der zweiten Trächtigkeit nach Depletion der Tregs annähernd gleich war. Fraglich ist daher, ob mögliche Gedächtnis-Tregs für die Anzahl der Implantationen überhaupt eine Rolle spielen. Wie viele Implantationen eine Maus letztendlich hat hängt stark davon ab, wie viele Eizellen zum Zeitpunkt der Ovulation vorhanden sind und wie viele von diesen dann befruchtet werden. Im Durchschnitt ovulieren Mäuse ca. zehn Eizellen, die anschließend befruchtet werden (Shindo *et al.*, 2022). Wie auch im Menschen ist dieser Vorgang hormonell gesteuert. So sind vor allem das Follikel Stimulierende Hormon (FSH), sowie das Luteinisierende Hormon (LH) und die Hormone Progesteron und Estradiol entscheidend (Kim, Bagchi and Bagchi, 2009). Falls sich die Hormonspiegel in den unterschiedlichen experimentellen Gruppen nicht unterscheiden, könnte die gleiche Anzahl an Implantationen dadurch zu erklären sein. Tregs spielen erst zum Zeitpunkt der Implantation und zur Vorbereitung auf diese eine Rolle (Shima *et al.*, 2010a), jedoch gibt es keine publizierte Evidenz dafür, dass diese etwas mit der Ovulation zu tun haben. Ein weiterer Parameter, der die Ovulation beeinflussen kann, ist Stress. Wagenmaker *et al.* zeigten in einem ihrer Experimente, dass Mäuse, die akutem psychosozialen Stress (häufiger Käfigwechsel, Transport in einen neuen Raum etc.) ausgesetzt waren, einen gestörten Zyklus und damit eine gestörte, unregelmäßige Ovulation entwickelten (Wagenmaker and Moenter, 2017). In

den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurde darauf geachtet, eine ruhige und stressfreie Umgebung für die Mäuse zu schaffen. So kann der Störfaktor Stress nicht komplett, aber mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, was sich in ähnlichen Implantationsraten in allen Gruppen widerspiegelt und für eine regelrechte Ovulation spricht. In Folgeexperimenten sollten zusätzlich in allen Gruppen die Hormon-Werte erhoben werden und weiterhin psychosozialer Stress vermieden werden, um daraus weitere Schlüsse auf die Anzahl der Implantationen zu ziehen. Zusätzlich ist die Beurteilung einer erfolgreichen Implantation oder eines Aborts an Tag 7,5 der Trächtigkeit noch nicht möglich, weshalb auch eine Wiederholung des Experimentes zur fetalen Antigen-Spezifität mit der Auswertung des fetalen und mütterlichen Ausgangs der Trächtigkeit zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise an Tag 15,5 sinnvoll erscheint. Die Arbeitsgruppe konnte zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit in anderen Experimenten bereits zeigen, dass die Abortrate in der Folgeträchtigkeit niedriger und das fetale Gewicht höher ist als in der ersten Trächtigkeit.

Um den Effekt, den Gedächtnis-Tregs auf Folgeschwangerschaften haben, welcher in den beiden vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, zu verdeutlichen, konnte im letzten Experiment mittels adoptivem Zelltransfer gezeigt werden, dass der fetale Ausgang der Trächtigkeit an Tag 15,5 von Mäusen während der ersten Trächtigkeit, die am Tag des Vaginalpfropfs schwangerschaftsinduzierte mutmaßliche Gedächtnis-Tregs injiziert bekamen, in der Tendenz vergleichbar war mit Mäusen, während der zweiten ungestörten Trächtigkeit, im Vergleich zu Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit und Mäusen, die am Tag des Vaginalpfropfs naive Tregs injiziert bekamen. Die Herangehensweise des adoptiven Zelltransfers als Rettungsversuch bzw. als Beitrag zur Verbesserung einer Trächtigkeit oder des Trächtigkeitsergebnisses ist keine Neuheit. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass durch den adoptiven Zelltransfer trächtigkeitsgeprägter Tregs in abortgefährdete Mäuse die Zahl der Aborte reduziert werden kann (Zenclussen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014). Besonders herauszustellen ist, dass der „Rettungseffekt“ nach dem Transfer von trächtigkeitsgeprägter Tregs deutlich größer war als beim Transfer von naiven Tregs. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Gedächtnis-Tregs, welche den Mäusen in der ersten Trächtigkeit injiziert wurden, eine verbessernde Kapazität für den fetalen Ausgang der Trächtigkeit darstellten. Im Vergleich dazu zeigten Feten von

Mäusen, die naive Tregs injiziert bekamen ungefähr ähnliche Gewichte, wie Feten von Mäusen während der ersten Trächtigkeit. Die Injektion von naiven Tregs in Mäuse am Tag des Vaginalpfropfs während der ersten Trächtigkeit scheint daher keinen verbessernden Effekt im Vergleich zur Injektion von Gedächtnis Tregs auf den fetalen Ausgang der Trächtigkeit an Tag 15,5 der Trächtigkeit zu haben. Insgesamt zeigten sich die Unterschiede im fetalen Gewicht und der Abortrate sehr klein, daher bleibt die Frage, wie die Effektstärke erhöht werden könnte. Die bereits erwähnten Experimente von Zenclussen *et al.* und Wang *et al.* hatten eine andere Zielsetzung, dennoch stand auch ein „Rettungsversuch“ im Vordergrund. Daher ähnelt sich die methodische Herangehensweise. Es sollte jedoch auf einzelne methodische Unterschiede eingegangen werden, die möglicherweise den Ausgang der Experimente maßgeblich beeinflussen können und in Folgeexperimenten zur Erhöhung der Effektstärke führen könnten. Zum einen unterscheidet sich der Zeitpunkt der Injektion. In dem für diese Arbeit durchgeführten Experiment wurden die Zellen am Tag des Vaginalpfropfs injiziert, damit die diese bereits an Tag 0,5 der Trächtigkeit in der Maus vorhanden sind und die Möglichkeit haben, ihre volle (verbessernde) Kapazität von Beginn an zu entfalten. Wang *et al.* injizierten die Zellen zwei Tage vor der Verpaarung (Wang *et al.*, 2014), Zenclussen *et al.* injizierten die Zellen in den ersten zwei Tagen bzw. an Tag 7 der Trächtigkeit (Zenclussen *et al.*, 2005). Hier zeigte sich allerdings, dass die Injektion an Tag 7 der Trächtigkeit keinen vorteiligen Effekt hatte. Dies ist durch die Tatsache zu erklären, dass die Implantation der Embryonen nur unter Anwesenheit von Tregs erfolgreich ist (Shima *et al.*, 2010b). Da Wang *et al.* zeigten, dass die Injektion der Zellen bereits zwei Tage vor der Verpaarung einen positiven Effekt hatte, wäre es denkbar in zukünftigen Experimenten weitere Zeitpunkte der Injektion, beispielsweise zwei Tage vor der Verpaarung und zwei oder sieben Tage nach Auftreten des Vaginalpfropfs, durchzuführen und folglich den Effekt auf die mütterliche Immunadaptation und den fetalen Ausgang der Trächtigkeit zu untersuchen. Die Erwartung wäre, dass die Mäuse von einer Injektion von Gedächtnis-Tregs um den Zeitpunkt des Vaginalpfropfs deutlich mehr profitieren als an Tag sieben der Trächtigkeit. Die Induktion der fetalen Toleranz beginnt mit der Präsenz väterlicher Antigene, daher spielen die Gedächtnis-Tregs und ihre verbessernde Kapazität zu diesem Zeitpunkt eine größere Rolle als an Tag sieben der Trächtigkeit.

Anders als in dem für diese Arbeit durchgeführten Experiment, bei dem 150.000 Zellen injiziert wurden, transferierten die anderen beiden Gruppen in ihren Experimenten jeweils 200.000 Tregs. Während Zenclussen et al. für den Transfer Zellen aus Milz und Thymus nutzten, gewannen Wang et al. die Tregs aus den Deziduen trächtiger Mäuse an Tag 14 der Trächtigkeit. Die für dieses Experiment gewonnenen Zellen aus Uterus und uterus-drainierenden Lymphknoten erscheinen jedoch zur Beurteilung am geeignetsten, da die maßgebliche Immunantwort während der Trächtigkeit in ebendiesen Organen geschieht. Ebenfalls zu beachten ist, dass Zellen aus der Dezidua lediglich trächtigkeitsgeprägt sind, somit aber wahrscheinlich einen geringeren Anteil an Gedächtniszellen enthalten und Zellen von zweimal trächtig gewesenen Mäusen aus Lymphknoten und Uterus neben trächtigkeitsgeprägter Tregs auch Gedächtnis-Tregs beinhalten. Das ursprüngliche Ziel der Injektion von rein Fetal-Antigen-spezifischen (OVA-positiven) Zellen war durch die kleine Anzahl dieser Zellen nicht möglich. Daher wurde entschieden, alle Tregs aus oben genannten Organen zu nutzen, wobei davon ausgegangen wird, dass diese auch die Fetal-Antigen-spezifischen Tregs enthalten.

Für die Injektion einer höheren Zellzahl oder sogar der Injektion rein Fetal-Antigen-spezifischer Zellen wäre das Bündeln (*engl. pooling*) dieser aus verschiedenen Donor-Mäusen nötig gewesen. Ein weiterer Ansatz, die injizierte Zellzahl zu erhöhen, wäre die repetitive Injektion von Zellen während einer Trächtigkeit an mehreren aufeinander folgenden Tagen, beginnend mit dem Tag des Vaginalpfropfs, wenn ein Bündeln der Zellen vermieden werden soll. Auf der anderen Seite bedeutet eine repetitive Injektion deutlich mehr Stress für die Maus als eine singuläre Injektion, weshalb in einem Experiment mit repetitivem Transfer die Höhe der Stresshormone, beispielsweise Cortisol, im Blut bestimmt werden könnte. Sollte es in zukünftigen Experimenten gelingen, wenigstens doppelt so viele Zellen (mind. 300.000 Zellen) zu injizieren, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass die injizierten Zellen im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse wiedergefunden werden können, was in diesem Experiment nicht der Fall war. Wäre das Wiederfinden dieser Zellen möglich, wäre insbesondere hier eine Einzelzellanalyse dieser Zellen sehr interessant und mutmaßlich aufschlussreich. Grundsätzlich sollte bedacht werden, dass weiterhin die Möglichkeit besteht, dass injizierte Zellen nicht wiedergefunden werden konnten, da diese durch die Empfänger-Maus als fremd erkannt wurden und mittels Apoptose eliminiert wurden.

In der mütterlichen Immunadaptation des adoptiven Zelltransfer Experimentes zeigte sich in den paraaortalen Lymphknoten ein ähnliches Ergebnis wie für den fetalen Ausgang der Trächtigkeit. CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Tregs waren bei Mäusen während der zweiten Trächtigkeit höher als bei Mäusen während der ersten Trächtigkeit. Ebenso zeigten Mäuse, die Gedächtnis-Tregs erhielten höhere Level an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Tregs als Mäuse, die naive Tregs erhielten. Dies spricht dafür, dass die durch den adoptiven Zelltransfer injizierten trächtigkeitsgeprägten Tregs gegenüber naiven Tregs einen gewissen Vorteil in der immunologischen Trächtigkeitsadaptation erbringen, welcher sich in einer höheren Anzahl von Tregs äußert. Welchen Vorteil dies für Mutter und Fetus bieten könnte wurde in vorherigen Abschnitten ausführlich diskutiert.

Schlussfolgernd erlauben diese Ergebnisse die Annahme, dass potenzielle Gedächtnis-Tregs die funktionelle Kapazität besitzen, den fetalen Ausgang einer ersten Trächtigkeit in der Tendenz auf das einer zweiten Trächtigkeit anzuheben und die mütterliche immunologische Adaptation verbessern können. Im Gegensatz dazu zeigen naive Tregs kein verbesserndes Potenzial.

In der Analyse der Plazenta zeigten sich bei gleicher Fläche des Labyrinths in allen Gruppen variable Flächenverteilungen der Junktionalzone und der gesamten Plazentafläche. Mäuse in der ersten Trächtigkeit und Mäuse die naive Tregs injiziert bekamen zeigten zwar absolut eine größere Plazenta, diese jedoch zu Gunsten der überwiegend aus Spongiotrophoblasten (Panja and Paria, 2021) bestehenden Junktionalzone. Deutlich wurde auch, dass Mäuse während ihrer zweiten Trächtigkeit und Mäuse, die Gedächtnis-Tregs erhielten ein im Verhältnis zur Junktionalzone deutlich größeres Labyrinth hatten. Dies bietet vor allem den Feten dieser Gruppen einen Vorteil, da das Labyrinth der Ort des Gas- und Nährstoffaustausches ist (Woods, Perez-Garcia and Hemberger, 2018). Resultierend und passend hierzu wurde in ebenjenen Gruppen ein etwas höheres fetales Gewicht beobachtet.

Zusammen lassen diese Ergebnisse die Beantwortung der Frage nach dem Unterschied in der verbessernden Kapazität zwischen Fetal-Antigen-spezifische Tregs und Fetal-Antigen-spezifischen Gedächtnis-Tregs teilweise zu. Das Potenzial von Fetal-Antigen-spezifischen Gedächtnis-Tregs ist im Hinblick auf den fetalen Ausgang der Trächtigkeit größer als das von „normalen“ Fetal-Antigen-spezifischen Tregs, die während der ersten Trächtigkeit entstehen. Dies wird deutlich, da das Gewicht und die

Fläche des Labyrinths der Feten von Mäusen, die Gedächtnis-Tregs injiziert bekamen in der Tendenz etwas höher war als das von Mäusen während ihrer ersten Trächtigkeit. Klinisch resultiert eine zu kleine Gas- und Nährstoffaustauschfläche häufig in einer Plazentainsuffizienz, welche zu fetaler Wachstumsrestriktion führen kann (Schwartz *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017). Obwohl der primäre Grund für eine Plazentainsuffizienz vaskulärer Genese ist, ruht die Ursache häufig im Beginn der Schwangerschaft und ist durch inadäquate vaskuläre Funktion während dieser gekennzeichnet (Wardinger and Ambati, 2022). Nichtsdestotrotz sind insbesondere Immunzellen an der Invasion und Etablierung der Gefäßanschlüsse der plazentaren Gefäße an die mütterlichen Spiralarterien beteiligt. Die injizierten Gedächtnis-Tregs zeigten damit durch ihre mutmaßliche verbessernde Kapazität durch Re-Expansion im Vergleich zu injizierten naiven Tregs eine Möglichkeit für den Schutz vor fetaler Wachstumsrestriktion, da sie eine adäquate plazentare Versorgung des Fetus durch sichere Etablierung der Gefäßversorgung garantieren.

## 6 Resümee und Ausblick

Die experimentelle Forschung zu Gedächtnis-Tregs ist bisher nicht weit fortgeschritten. Es gibt sehr wenige publizierte Belege und bisher konnte kein Marker zur alleinigen Identifikation dieser Zellen gefunden werden. Die bisherigen experimentellen Belege der Gedächtnis-Tregs wurden in artifiziellen Tiermodellen (Rowe *et al.*, 2012; Chen, Darrasse-Jèze, Bergot, Courau, Churlaud, *et al.*, 2013) erbracht, die sich durch die Überexpression eines bestimmten Antigens auszeichnen, wodurch verhältnismäßig starke Effekte dargestellt werden können.

Die Mausexperimente für diese Arbeit wurden in annähernd natürlichen, mit dem Menschen vergleichbaren, experimentellen Verpaarungskonstellationen durchgeführt. Erklärbar sind dadurch die im Vergleich zu den Experimenten von Rowe *et al.* und Chen *et al.* eher kleinen Unterschiede zwischen Gruppen, sowie die niedrigere Frequenz der Fetal-Antigen-spezifischen Zellen. Insbesondere im Experiment zum adoptiven Zelltransfer von Tregs sind die Unterschiede, vor allem beim fetalen Gewicht sehr klein. Die Ergebnisse der Literaturrecherche zu den humanen Daten zeigen ähnliche Ergebnisse: Das Geburtsgewicht zeigte sich im Mittel um ca. 4% höher in der zweiten Schwangerschaft. Dieser Unterschied ist nicht groß, dennoch ist er darstellbar. Insgesamt zeigen sich die Kernfaktoren in diesen, sowie in anderen Experimenten der Arbeitsgruppe stabil: die Abortrate ist in der zweiten Trächtigkeit niedriger und das fetale Gewicht höher als in der ersten Trächtigkeit. Insbesondere im Hinblick auf diese Ergebnisse können Immungedächtniszellen als Erklärung herangezogen werden. Diese sind die in der Lage kleine Unterschiede zwischen Gruppen zu erzeugen. Im klinischen Kontext können diese kleinen Unterschiede aber vielleicht in der Lage sein, den fetalen Ausgang der Schwangerschaft zu verbessern oder eine Schwangerschaftskomplikation zu verhindern.

Durch weitere Wiederholung der Experimente könnte die Gruppengrößen der Mäuse erweitert werden, welches zur Steigerung des Signifikanzniveaus führen und den Standardfehler minimieren könnte. Zu bedenken bleibt aber, dass weiterhin im Sinne des 3-R- (*refine, replace, reduce*; verbessern, ersetzen, reduzieren) Prinzipes im experimentellen Umgang mit Versuchstieren gearbeitet werden sollte. Eine Erhöhung der Gruppengröße widerspricht diesem. Daher bedarf es guter Abwägung weiterer Experimente.

Um noch weitere Aspekte zu untersuchen, könnte in weiteren adoptiven Zelltransfer-Experimenten der Unterschied zwischen naiven Tregs, Gedächtnis-Tregs und beispielsweise Tregs aus Mäusen, die an Präeklampsie leiden untersucht werden. Ziel wäre es, zum einen herauszufinden, ob Tregs auch durch eine Schwangerschaftskomplikation im negativen Sinne geprägt werden können und dadurch aufzuklären, ob Mäuse, die präeklampsisch-geprägte Tregs injiziert bekommen ebenfalls an einer Präeklampsie erkranken.

Zusätzlich sollten zukünftig hormonelle Einflüsse untersucht werden, da zum einen die Ovulation dadurch bedingt wird und zum anderen insbesondere Tregs unter dem Einfluss des Hormons Östrogen expandieren können (Chen *et al.*, 2003; Tai *et al.*, 2008). Zusätzlich stellt sich in diesem Zusammenhang auch die Frage nach der Rolle des Progesterons. Experimentell konnte unter anderem gezeigt werden, dass das Fehlen des Progesteron-Rezeptors auf CD11c<sup>+</sup> Antigen-präsentierenden-Zellen zu einer reduzierten Anzahl uteriner Tregs und gleichzeitig zu intrauteriner Wachstumsrestriktion in Mäusen führt (Thiele, Hierweger, *et al.*, 2019). Klinisch zeigte sich in einer randomisierten, doppelblinden Studie, in der untersucht wurde, ob Progesteron die Rate der Fehlgeburten senken kann, kein Unterschied zwischen Frauen, die bis zum Ende der 16. Schwangerschaftswoche Progesteron erhielten und Frauen die ein Placebo erhielten (Coomarasamy *et al.*, 2019). Interessanterweise zeigte die Subgruppenanalyse dieser Studie jedoch, dass Frauen mit drei oder mehr Aborten in der Vergangenheit einen signifikanten Vorteil durch die Behandlung mit Progesteron im Vergleich zu einer Behandlung mit einem Placebo hatten. Folglich scheinen Frauen mit repetitiven Aborten durch die Behandlung mit Progesteron einen Vorteil zu haben. Ob dieser unter anderem auch immunologischer Genese ist, muss in weiteren Studien und Experimenten erforscht werden.

In der klinischen Übertragbarkeit all dieser Überlegungen könnte ein Transfer von Tregs oder die Möglichkeit der spezifischen Treg-Aktivierung in der Schwangerschaftsplanung und präkonzeptionellen Betreuung eine Therapiemöglichkeit der Zukunft bedeuten (Robertson *et al.*, 2019). Auf diesem Wege könnte Frauen geholfen werden, die beispielsweise durch einen Mangel an Tregs oder deren inadäquater Aktivierung von ungewollter Kinderlosigkeit oder repetitiven Fehlgeburten betroffen sind. Um neben der zuvor beschriebenen hormonellen Therapie mit Progesteron letztendlich eine solche Immuntherapie in Betracht zu

ziehen, sind noch viele Schritte notwendig. Es bedarf der Erforschung einer adäquaten Methode zur Identifikation insuffizienter Treg-Populationen, sowie der Klärung der Frage nach dem optimalen Zeitpunkt für diese Therapien. Hierfür trägt diese Arbeit zur weiteren Aufklärung der Vorteile und Bedeutung von Gedächtnis-Tregs in der Schwangerschaft bei und unterstützt damit die Weiterentwicklung von Therapiemöglichkeiten zur Sicherstellung eines physiologischen Schwangerschaftsverlaufes.

Bei allen hier bereitgestellten Informationen und Belegen für Gedächtnis-Tregs gilt es zu bedenken, dass diese Zellpopulation nicht als Einzige für das gute Gelingen oder eine komplikationsreiche Schwangerschaft und Folgeschwangerschaft verantwortlich ist. Bei vielen andere Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems wie beispielsweise CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird ebenso über die Gedächtniszellbildung während der Schwangerschaft diskutiert (Kinder *et al.*, 2020). Ebenso sollte bedacht werden, dass nicht nur die immunologische, sondern auch die metabolische und kardiale Schwangerschaftsadaptation, sowie deren gegenseitige Beeinflussung, gesamtheitlich noch nicht hinreichend untersucht und verstanden ist. So ist nicht jede Schwangerschaftskomplikation über einen Mangel oder Überschuss an Immunzellen oder die inadäquate kardiale oder metabolische Anpassung zu erklären. Dennoch ist das adäquate Zusammenspiel und die Erforschung dessen für eine gesunde Schwangerschaft von enormer Bedeutung.

Neben der Erforschung des adaptiven Immunsystems in der Schwangerschaft legen andere Arbeitsgruppen ihren Fokus auf das angeborene Immunsystem: So zeigten Gamliel *et al.*, dass NK-Zellen ebenfalls in der Lage sind, Gedächtniszellen zu bilden, die mit einer verbesserten Vaskularisierung der Plazenta in der Folgeschwangerschaft assoziiert sind (Gamliel *et al.*, 2018). Dieses neue Feld der sogenannten „trainierten Immunität“ (engl. *trained immunity*) bietet neben dem bereits bekannten Immun-Gedächtnis ebenfalls großes Potenzial, eine Rolle in der Verbesserung von zweiten Schwangerschaften zu spielen.

## 7 Appendix

**Tabelle 15: Herkunft und Größe der Studienpopulation der analysierten Studien in der Literaturrecherche.**

Referenz	Herkunft der Studienpopulation	Studienpopulation (n)
(Ananth <i>et al.</i> , 2007)	Missouri, USA	154.810
(Bhattacharya <i>et al.</i> , 2008)	Aberdeen, Großbritannien	24.520
(Blankson <i>et al.</i> , 1993)	Alabama, USA	737
(Boghossian <i>et al.</i> , 2014a)	Utah, USA	62.013
(Boghossian <i>et al.</i> , 2015)	Utah, USA	26.787
(Boghossian <i>et al.</i> , 2014b)	Utah, USA	26.963
(Chiba <i>et al.</i> , 2013)	Japan	560
(Cnattingius <i>et al.</i> , 1999)	Schweden	243,858
(Ehrlich <i>et al.</i> , 2011)	Nordkalifornien, USA	22.351
(England <i>et al.</i> , 2015)	Massachusetts, USA	141.233
(Getahun, Fassett and Jacobsen, 2010)	Südkalifornien, USA	65.132
(Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2013)	Iran	858
(Grantz <i>et al.</i> , 2015)	Utah, USA	25.820
(Hathout, H., Kasrawi, R., Moussa, M. A. A., & Saleh, 1982)	Kuwait, Vereinigte Arabische Emirate	573
(Hernández-Díaz, Toh and Cnattingius, 2009)	Schweden	763.795
(Hickey CA, Cliver SP, Goldenberg RL, 1992)	Alabama, USA	152
(Hinkle <i>et al.</i> , 2014)	Utah, USA	25.241
(Hutcheon and Platt, 2008)	Montreal, Kanada	1.220
(Joshi <i>et al.</i> , 2005)	Maharashtra, Indien	770

(Khambalia <i>et al.</i> , 2013)	New South Wales, Australien	142.843
(Lain, Krohn and Roberts, 2005)	Pennsylvania, USA	6.148
(Lykke, Paidas and Langhoff-Roos, 2009)	Dänemark	536.419
(Michael J. Mahande <i>et al.</i> , 2013)	Tansania	3.909
(Michael J Mahande <i>et al.</i> , 2013)	Tansania	3.359
(Majoko F, Nyström L, Munjanja SP, Mason E, 2014)	Simbabwe	10.569
(Makkonen, Heinonen and Kirkinen, 2000)	Finnland	8.842
(Manzanares <i>et al.</i> , 2017)	Spanien	7.896
(Merlino <i>et al.</i> , 2006)	Ohio, USA	1.241
(Mostello <i>et al.</i> , 2008)	Missouri, USA	103.860
(Ouh <i>et al.</i> , 2018)	Korea	121.569
(Paterson and Saunders, 1991)	Großbritannien	75.974
(Räisänen <i>et al.</i> , 2013)	Finnland	686.114
(Skjærven, Wilcox and Lie, 2002)	Norwegen	551.478
(Van Oostwaard <i>et al.</i> , 2014)	Niederlande	503
(Voskamp <i>et al.</i> , 2013)	Niederlande	259.481
(Wallace <i>et al.</i> , 2016)	Aberdeen, Großbritannien	24.520
(Mark A Wilcox, Chang and Johnson, 1996)	Großbritannien	3.457

## 8 Zusammenfassung

Für einen positiven fetalen Ausgang der Schwangerschaft und einen gesunden Schwangerschaftsverlauf ist die adäquate Anpassung des mütterlichen Organismus an die Schwangerschaft auf mehreren Ebenen notwendig. Im Vordergrund stehen dabei neben der kardialen und metabolischen vor allem die immunologische Adaptation an diese besondere Situation. Dabei unabdingbar sind die regulatorischen T-Zellen (Tregs), die zusammen mit anderen Zellen eine große Rolle in der Induktion immunologischer Toleranz gegenüber dem Fetus spielen.

In der durchgeführten Literaturrecherche konnte gezeigt werden, dass immunologisch assoziierte Schwangerschaftskomplikationen (Präeklampsie, FGR, Frühgeburtlichkeit und spontaner Abort) nach Auftreten in der ersten Schwangerschaft in der zweiten Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko zeigten, erneut aufzutreten. Frauen mit unkomplizierter erster Schwangerschaft zeigten in der zweiten Schwangerschaft ein erniedrigtes Risiko. Das lässt die Vermutung eines immunologischen Schwangerschaftsgedächtnisses zu. Verantwortlich sind hierfür unter anderem vermutlich Gedächtnis-Tregs.

Die Experimente im Mausmodell zeigten, dass die Anzahl Fetal-Antigen-spezifischer Tregs in der zweiten Trächtigkeit höher war. Außerdem konnte der Ausgang der Trächtigkeit bei Mäusen in ihrer ersten Trächtigkeit nach Transfer von trächtigkeitsgeprägten Tregs auf den Ausgang einer zweiten Trächtigkeit angehoben werden.

Die Experimente unterstützen daher die These der Existenz von Treg-Gedächtniszellen, die durch die Schwangerschaft entstehen. Insbesondere in Hinblick auf Therapiemöglichkeiten, die im Rahmen der reproduktiven Immunologie möglich sein könnten, sind weitere Experimente notwendig.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2019 unter folgendem Titel im *Journal of Reproductive Immunology* 134-135, 11-20 veröffentlicht:

**Thiele K, Ahrendt LS, Hecher K, Arck PC: The mnemonic code of pregnancy: Comparative analyses of pregnancy success and complication risk in first and second human pregnancies**

## 9 Summary

In order to achieve a healthy pregnancy and a good fetal outcome the maternal organism has to adapt adequately to the pregnancy on different levels. Besides the cardiac and metabolic adaptation, the focus lies on the immunological adaptation to this special situation. Here regulatory T cells (Tregs) are indispensable. Together with other cells, they play a pivotal role in the induction of tolerance towards the fetus.

The literature research carried out showed that immunologically associated pregnancy complications (pre-eclampsia, FGR, premature birth and spontaneous abortion) showed an increased risk of reoccurring in the second pregnancy after the occurrence in the first pregnancy. Women with an uncomplicated first pregnancy showed a reduced risk in the second pregnancy. This allows the assumption of an immunological pregnancy memory. Aside other aspects, memory Tregs are probably responsible for this.

The experiments in the mouse model showed that the number of fetal-antigen-specific Tregs was higher in the second pregnancy. In addition, the pregnancy outcome was better in mice in their first pregnancy after transfer of pregnancy-imprinted Tregs.

The experiments therefore support the thesis of the existence of memory Tregs that are formed during pregnancy. Especially with regard to possible therapeutic options in the context of reproductive immunology, further experiments are necessary.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AT	Adoptiver Zelltransfer
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
BV	Brilliant Violet
CD	Cluster of differentiation (dt. Hauptmerkmalsträger)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanine
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DEREG	DEpletion of REGulatory T-cells
DNA	Desoxyribonucleinacid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNK	Deziduale Natürliche Killerzelle
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DT	Diphtherietoxin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (dt. Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal calf serum (dt. Fetales Kalbsserum)
FGR	Fetal growth restriction (dt. fetale Wachstumsrestriktion)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	Fluorescent minus one
FoxP3	Forkhead box P3
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
Gd	Gestation day (dt. Trächtigkeitstag)
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GFP	Green Fluoreszierendes Protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanen-Leukozyten-Antigene
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

IL	Interleukin
IUGR	Intrauterine growth restriction (dt. Intrauterine Wachstumsrestriktion)
IVF	In-vitro Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mTreg	Memory regulatory T-cell (dt. regulatorische Gedächtnis-T-Zelle)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OVA	Ovalbumin
PCR	Polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PE	R-phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll Prprotein
PBIF	Progesteron-induzierter Blockierfaktor
PFA	Paraformaldehyde
RBC	Red blood cell (dt. Rote Blutzelle)
SEM	Standardfehler
SIH	Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie
SGA	Small for Gestational Age
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Buffer
tDC	Tolerogene Dendritische Zelle
TGF β	Transforming growth factor β
Th1	Typ 1 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
Th2	Typ 2 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
Tregs	Regulatorische T-Zellen
nTreg	naive (ungepaarte) regulatorische T-Zelle
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (dt. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

## 11 Literaturverzeichnis

- Adams, K. and Nelson, J. L. (2006) *Bi-directional cell trafficking during pregnancy. In: Gil Mor (Hg.): Immunology of Pregnancy. New York, NY: Eureka.com and Springer Science+Business Media Inc (Medical Intelligence Unit).*
- Albers, R. E. *et al.* (2019) 'Trophoblast-Specific Expression of Hif-1 $\alpha$  Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction.', *Scientific reports*. England, 9(1), p. 2742. doi: 10.1038/s41598-019-39426-5.
- Allan, S. E. *et al.* (2008) 'CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases.', *Immunological reviews*. England, 223, pp. 391–421. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00634.x.
- Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M. and Betz, A. G. (2004) 'Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus', *Nature Immunology*, 5(3), pp. 266–271. doi: 10.1038/ni1037.
- Ananth, C. V. *et al.* (2007) 'Recurrence of ischemic placental disease', *Obstetrics and Gynecology*, 110(1), pp. 128–133. doi: 10.1097/01.AOG.0000266983.77458.71.
- Andraweera, P. *et al.* (2018) 'The duration of sexual relationship and its effects on adverse pregnancy outcomes', *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier, 128(April), pp. 16–22. doi: 10.1016/j.jri.2018.05.007.
- Arck, P. *et al.* (2007) 'Progesterone during pregnancy: Endocrine-immune cross talk in Mammalian Species and the role of stress', *American Journal of Reproductive Immunology*, pp. 268–279. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00512.x.
- Arck, P. C. (2019) 'When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction', *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier, 132(February), pp. 54–59. doi: 10.1016/j.jri.2019.03.004.
- Arck, P. C. and Hecher, K. (2013) 'Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 19(5), pp. 548–556. doi: 10.1038/nm.3160.
- Arruvito, L. *et al.* (2009) 'IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure.', *Journal of reproductive immunology*. Ireland, 82(2), pp. 158–165. doi: 10.1016/j.jri.2009.04.010.
- Atègbo, J.-M. *et al.* (2006) 'Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. United States, 91(10), pp. 4137–4143. doi: 10.1210/jc.2006-0980.
- Bader, R. A. *et al.* (1955) 'Hemodynamics at rest and during exercise in normal pregnancy as studies by cardiac catheterization.', *The Journal of clinical investigation*. United States, 34(10), pp. 1524–1536. doi: 10.1172/JCI103205.
- Balandya, E. *et al.* (2012) 'Human seminal plasma fosters CD4(+) regulatory T-cell phenotype and transforming growth factor- $\beta$ 1 expression.', *American journal of reproductive immunology (New York, N. Y. : 1989)*, 68(4), pp. 322–330. doi:

10.1111/j.1600-0897.2012.01176.x.

Barnden, M. J. *et al.* (1998) 'Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements.', *Immunology and cell biology*. United States, 76(1), pp. 34–40. doi: 10.1046/j.1440-1711.1998.00709.x.

Bennett, C. L. *et al.* (2005) 'Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity.', *The Journal of cell biology*, 169(4), pp. 569–576. doi: 10.1083/jcb.200501071.

Beta, J. *et al.* (2019) 'Maternal and neonatal complications of fetal macrosomia: systematic review and meta-analysis', *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 54(3), pp. 308–318. doi: 10.1002/uog.20279.

Bhattacharya, S. *et al.* (2008) 'Does miscarriage in an initial pregnancy lead to adverse obstetric and perinatal outcomes in the next continuing pregnancy?', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 115(13), pp. 1623–1629. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.01943.x.

Blankson, M. L. *et al.* (1993) 'Health Behavior and Outcomes in Sequential Pregnancies of Black and White Adolescents', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 269(11), pp. 1401–1403. doi: 10.1001/jama.1993.03500110069037.

Blois, S. *et al.* (2005) 'Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the feto-maternal interface in murine pregnancies.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 174(4), pp. 1820–1829. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.1820.

Blois, S. M. *et al.* (2007) 'A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance', *Nature Medicine*, 13(12), pp. 1450–1457. doi: 10.1038/nm1680.

von Boehmer, H. (2005) 'Mechanisms of suppression by suppressor T cells.', *Nature immunology*. United States, 6(4), pp. 338–344. doi: 10.1038/ni1180.

Boghossian, Nansi S. *et al.* (2014) 'Changes in diabetes status between pregnancies and impact on subsequent newborn outcomes', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby, Inc, 210(5), pp. 431.e1-431.e14. doi: 10.1016/j.ajog.2013.12.026.

Boghossian, Nansi S *et al.* (2014) 'Risk factors differ between recurrent and incident preeclampsia: a hospital-based cohort study', *Annals of Epidemiology*, 24(12), pp. 871-877.e3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2014.10.003>.

Boghossian, N. S. *et al.* (2015) 'Delivery Blood Pressure and Other First Pregnancy Risk Factors in Relation to Hypertensive Disorders in Second Pregnancies', *American Journal of Hypertension*, 28(9), pp. 1172–1179. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/ajh/hpv001>.

- Brincks, E. L. *et al.* (2013) 'Antigen-Specific Memory Regulatory CD4 + Foxp3 + T Cells Control Memory Responses to Influenza Virus Infection', *The Journal of Immunology*, 190(7), pp. 3438–3446. doi: 10.4049/jimmunol.1203140.
- Cappelletti, M. *et al.* (2016a) 'Inflammation and preterm birth', *Journal of Leukocyte Biology*, 99(1), pp. 67–78. doi: 10.1189/jlb.3mr0615-272rr.
- Cappelletti, M. *et al.* (2016b) 'Inflammation and preterm birth', *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 99(1), pp. 67–78. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0615-272RR>.
- Cardenas, G. M. and I. (1989) 'The immune system in pregnancy', *Am J Reprod Immunol*, 63(6), pp. 425–433. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x.The.
- Cederbom, L., Hall, H. and Ivars, F. (2000) 'CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells.', *European journal of immunology*. Germany, 30(6), pp. 1538–1543. doi: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1538::AID-IMMU1538>3.0.CO;2-X.
- Chen, T., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Courau, T. and Churlaud, G. (2013) 'Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Chen, T., Darrasse-Jèze, G., Bergot, A.-S., Courau, T., Churlaud, G., *et al.* (2013) 'Self-Specific Memory Regulatory T Cells Protect Embryos at Implantation in Mice', *The Journal of Immunology*, 191(5), pp. 2273–2281. doi: 10.4049/jimmunol.1202413.
- Chen, W. *et al.* (2003) 'Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.', *The Journal of experimental medicine*, 198(12), pp. 1875–1886. doi: 10.1084/jem.20030152.
- Cheung, K. L. and Lafayette, R. A. (2013) 'Renal physiology of pregnancy.', *Advances in chronic kidney disease*, 20(3), pp. 209–214. doi: 10.1053/j.ackd.2013.01.012.
- Chiba, T., Ebina, S. and Kashiwakura, I. (2013) 'Influence of maternal body mass index on gestational weight gain and birth weight: A comparison of parity', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(2), pp. 293–298. doi: 10.3892/etm.2013.1167.
- Clapp, J. F. and Capeless, E. (1997) 'Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies.', *The American journal of cardiology*. United States, 80(11), pp. 1469–1473. doi: 10.1016/s0002-9149(97)00738-8.
- Clark, D. A. (2008) 'Immunological factors in pregnancy wastage: Fact or fiction', *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(4), pp. 277–300. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00580.x.
- Clark, D. A. (2016) 'Mouse is the new woman? Translational research in reproductive immunology', *Seminars in Immunopathology*. *Seminars in Immunopathology*, 38(6),

pp. 651–668. doi: 10.1007/s00281-015-0553-x.

Clark, D. A., Fernandes, J. and Banwatt, D. (2008) 'Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells.', *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. Denmark, 59(6), pp. 525–534. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00582.x.

Cnattingius S, Granath F, Petersson G, H. B. (1999) 'The Influence of Gestational Age and Smoking Habits on the Risk of Subsequent Preterm Deliveries', *New England Journal of Medicine*, 341 (13), pp. 943–948.

Cobbold, S. P. *et al.* (2003) 'Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms.', *Immunological reviews*. England, 196, pp. 109–124. doi: 10.1046/j.1600-065x.2003.00078.x.

Confavreux, C. *et al.* (1998) 'Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group.', *The New England journal of medicine*. United States, 339(5), pp. 285–291. doi: 10.1056/NEJM199807303390501.

Coomarasamy, A. *et al.* (2019) 'A Randomized Trial of Progesterone in Women with Bleeding in Early Pregnancy.', *The New England journal of medicine*. United States, 380(19), pp. 1815–1824. doi: 10.1056/NEJMoa1813730.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A. (2001) 'The biology of human natural killer-cell subsets.', *Trends in immunology*. England, 22(11), pp. 633–640. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9.

Cotechini, T., Komisarenko, M., Sperou, A., Macdonald-Goodfellow, S., Adams, Michael A., *et al.* (2014) 'Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia', *Journal of Experimental Medicine*, 211(1), pp. 165–179. doi: 10.1084/jem.20130295.

Cotechini, T., Komisarenko, M., Sperou, A., Macdonald-Goodfellow, S., Adams, Michael A., *et al.* (2014) 'Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia', *Journal of Experimental Medicine*, 211(1), pp. 165–179. doi: 10.1084/jem.20130295.

Crotty, S. and Ahmed, R. (2004) 'Immunological memory in humans', *Seminars in Immunology*, 16(3), pp. 197–203. doi: 10.1016/j.smim.2004.02.008.

Darmochwal-Kolarz, D. *et al.* (2012) 'The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia', *Journal of Reproductive Immunology*, 93(2), pp. 75–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.01.006>.

Das, S. *et al.* (2009) 'Neonatal outcomes of macrosomic births in diabetic and non-diabetic women', *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, 94(6), pp. 419–422. doi: 10.1136/adc.2008.156026.

van Drongelen, J. *et al.* (2012) 'Adaptive changes of mesenteric arteries in

pregnancy: a meta-analysis.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. United States, 303(6), pp. H639-57. doi: 10.1152/ajpheart.00617.2011.

Eghbal-Fard, S. *et al.* (2019) 'The imbalance of Th17/Treg axis involved in the pathogenesis of preeclampsia', *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 234(4), pp. 5106–5116. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.27315>.

Ehrlich, S. F. *et al.* (2011) 'Change in body mass index between pregnancies and the risk of gestational diabetes in a second pregnancy', *Obstetrics and Gynecology*, 117(6), pp. 1323–1330. doi: 10.1097/AOG.0b013e31821aa358.

Ehst, B. D., Ingulli, E. and Jenkins, M. K. (2003) 'Development of a Novel Transgenic Mouse for the Study of Interactions Between CD4 and CD8 T Cells During Graft Rejection', *American Journal of Transplantation*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 3(11), pp. 1355–1362. doi: 10.1046/j.1600-6135.2003.00246.x.

Einarsson, J. I., Sangi-Haghpeykar, H. and Gardner, M. O. (2003) 'Sperm exposure and development of preeclampsia', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 188(5), pp. 1241–1243. doi: 10.1067/mob.2003.401.

Enders, A. C. and Carter, A. M. (2012) 'Review: The evolving placenta: Different developmental paths to a hemochorial relationship', *Placenta*. Elsevier Ltd, 33(SUPPL.), pp. S92–S98. doi: 10.1016/j.placenta.2011.10.009.

England, L. *et al.* (2015) 'Estimating the Recurrence Rate of Gestational Diabetes Mellitus (GDM) in Massachusetts 1998–2007: Methods and Findings', *Maternal and Child Health Journal*. Springer US, 19(10), pp. 2303–2313. doi: 10.1007/s10995-015-1750-x.

Erlebacher, A. *et al.* (2007) 'Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus', *The Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 117(5), pp. 1399–1411. doi: 10.1172/JCI28214.

Esakoff, T. F. *et al.* (2009) 'The association between birthweight 4000 g or greater and perinatal outcomes in patients with and without gestational diabetes mellitus', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby, Inc., 200(6), pp. 672.e1-672.e4. doi: 10.1016/j.ajog.2009.02.035.

Faust, Z. *et al.* (1999) 'Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells', *American Journal of Reproductive Immunology*. Wiley Online Library, 42(2), pp. 71–75.

Galazka, K. *et al.* (2009) 'Changes in the subpopulation of CD25+ CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in decidua with respect to the progression of labor at term and the lack of analogical changes in the subpopulation of suppressive B7-H4+ macrophages - A preliminary report', *American Journal of Reproductive Immunology*, 61(2), pp. 136–146. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00674.x.

Gamliel, M. *et al.* (2018) 'Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies', *Immunity*. Elsevier Inc., 48(5), pp. 951-

962.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.030.

Gerretsen, G., Huisjes, H. J. and Elema, J. D. (1981) 'Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation.', *British journal of obstetrics and gynaecology*. England, 88(9), pp. 876–881. doi: 10.1111/j.1471-0528.1981.tb02222.x.

Getahun, D., Fassett, M. J. and Jacobsen, S. J. (2010) 'Gestational diabetes: Risk of recurrence in subsequent pregnancies', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc., 203(5), pp. 467.e1-467.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2010.05.032.

Geusens, N. *et al.* (2010) 'Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodelling at term in a transgenic preeclamptic rat model.', *Placenta*. Netherlands, 31(4), pp. 320–326. doi: 10.1016/j.placenta.2010.01.011.

Ghaemmaghami, S. J. *et al.* (2013) 'Socio-demographic determinants of Low Birth Weight in newborn', *Saudi MED J*, 34(9), pp. 949–953.

Gomez-Lopez, N. *et al.* (2020) 'Regulatory T Cells Play a Role in a Subset of Idiopathic Preterm Labor/Birth and Adverse Neonatal Outcomes', *Cell Reports*, 32(1). doi: 10.1016/j.celrep.2020.107874.

Granger, J. P. *et al.* (2001) 'Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction.', *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 38(3 Pt 2), pp. 718–722. doi: 10.1161/01.hyp.38.3.718.

Grantz, K. L. *et al.* (2015) 'Differences in Risk Factors for Recurrent Versus Incident Preterm Delivery', *American Journal of Epidemiology*, 182(2), pp. 157–167. doi: 10.1093/aje/kwv032.

Green, S. *et al.* (2021) 'Regulatory T Cells in Pregnancy Adverse Outcomes : A Systematic Review and Meta-Analysis', 12(October), pp. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2021.737862.

Guerin, L. R. *et al.* (2011) 'Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment.', *Biology of reproduction*. United States, 85(2), pp. 397–408. doi: 10.1095/biolreprod.110.088591.

Guerin, L. R., Prins, J. R. and Robertson, S. A. (2009) 'Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: A new target for infertility treatment?', *Human Reproduction Update*, 15(5), pp. 517–535. doi: 10.1093/humupd/dmp004.

Hackmon, R. *et al.* (2017) 'Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition', *American Journal of Reproductive Immunology*, 77(6), pp. 1–11. doi: 10.1111/aji.12643.

Haddad, R. *et al.* (2006) 'Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression

signature', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(2). doi: 10.1016/j.ajog.2005.08.057.

Hanley, G. E. *et al.* (2017) 'Interpregnancy Interval and Adverse Pregnancy Outcomes: An Analysis of Successive Pregnancies.', *Obstetrics and gynecology*. United States, 129(3), pp. 408–415. doi: 10.1097/AOG.0000000000001891.

Hanna, J. *et al.* (2006) 'Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface', *Nature Medicine*, 12(9), pp. 1065–1074. doi: 10.1038/nm1452.

Hara, M. *et al.* (2001) 'IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 166(6), pp. 3789–3796. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3789.

Hathout, H., Kasrawi, R., Moussa, M. A. A., & Saleh, A. K. (1982) 'Influence of pregnancy outcome on subsequent pregnancy', *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 20(2), pp. 145–147.

Heikkinen, J. *et al.* (2004) 'Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua.', *Clinical and experimental immunology*, 136(2), pp. 373–378. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02441.x.

Helmo, F. R. *et al.* (2018) 'Intrauterine infection, immune system and premature birth', *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. Informa UK Ltd., 31(9), pp. 1227–1233. doi: 10.1080/14767058.2017.1311318.

Hernández-Díaz, S., Toh, S. and Cnattingius, S. (2009) 'Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study', *BMJ*, 338, p. b2255. doi: 10.1136/bmj.b2255.

Hickey CA, Cliver SP, Goldenberg RL, B. M. (1992) 'Maternal Weight Status and Term Birth Weight in First and Second Adolescent Pregnancies', *Journal of Adolescent Health*, 13, pp. 561–569.

Hinkle, S. N. *et al.* (2014) 'Differences in risk factors for incident and recurrent small-for-gestational-age birthweight: A hospital-based cohort study', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 121(9), pp. 1080–1088. doi: 10.1111/1471-0528.12628.

Hsu, P. *et al.* (2012) 'Altered decidual DC-SIGN+ antigen-presenting cells and impaired regulatory T-cell induction in preeclampsia.', *The American journal of pathology*. United States, 181(6), pp. 2149–2160. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.032.

Hunt, J. S., Andrews, G. K. and Wood, G. W. (1987) 'Normal trophoblasts resist induction of class I HLA.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 138(8), pp. 2481–2487.

Hutcheon, J. A. and Platt, R. W. (2008) 'The impact of past pregnancy experience on subsequent perinatal outcomes', *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 22(4), pp. 400–407. doi: 10.1111/j.1365-3016.2008.00937.x.

Ivetic, A., Hoskins Green, H. L. and Hart, S. J. (2019) 'L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling.', *Frontiers in immunology*. Switzerland, 10, p. 1068. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068.

Jafri, S. and Ormiston, M. L. (2017) 'Immune regulation of systemic hypertension, pulmonary arterial hypertension, and preeclampsia: Shared disease mechanisms and translational opportunities', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 313(6), pp. R693–R705. doi: 10.1152/ajpregu.00259.2017.

Jasper, M. J., Tremellen, K. P. and Robertson, S. A. (2006) 'Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue.', *Molecular human reproduction*. England, 12(5), pp. 301–308. doi: 10.1093/molehr/gal032.

Jeyabalan, A. and Lain, K. Y. (2007) 'Anatomic and functional changes of the upper urinary tract during pregnancy.', *The Urologic clinics of North America*. United States, 34(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.ucl.2006.10.008.

Joshi, N. P. *et al.* (2005) 'Increasing maternal parity predicts neonatal adiposity: Pune Maternal Nutrition Study', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(3), pp. 783–789. doi: 10.1016/j.ajog.2005.01.020.

Jovanovic, L. and Pettitt, D. J. (2001) 'Gestational diabetes mellitus.', *JAMA*. United States, 286(20), pp. 2516–2518. doi: 10.1001/jama.286.20.2516.

Kahn, D. A. and Baltimore, D. (2010) 'Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp. 9299–9304. doi: 10.1073/pnas.1003909107.

Kamanaka, M. *et al.* (2006) 'Expression of Interleukin-10 in Intestinal Lymphocytes Detected by an Interleukin-10 Reporter Knockin tiger Mouse', *Immunity*, 25(6), pp. 941–952. doi: 10.1016/j.immuni.2006.09.013.

Kämmerer, U. *et al.* (2003) 'Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy.', *The American journal of pathology*. United States, 162(3), pp. 887–896. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63884-9.

Kaufmann, S. H. E., Meinke, A. L. and Von Gabain, A. (2009) 'Neue Impfstoffkonzepte auf Basis moderner Erkenntnisse der Immunologie', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 52(11), pp. 1069–1082. doi: 10.1007/s00103-009-0951-0.

Kayisli, U. A. *et al.* (2003) 'Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 171(5), pp. 2305–2313. doi: 10.4049/jimmunol.171.5.2305.

- Kehl, S. *et al.* (2017) 'Intrauterine Growth Restriction. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/080, October 2016).', *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. Germany, 77(11), pp. 1157–1173. doi: 10.1055/s-0043-118908.
- Khambalia, A. Z. *et al.* (2013) 'Occurrence and recurrence of diabetes in pregnancy', *Diabetic Medicine*, 30(4), pp. 452–456. doi: 10.1111/dme.12124.
- Khan, N. A. *et al.* (2001) 'Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor', *Human Immunology*, 62(12), pp. 1315–1323. doi: 10.1016/S0198-8859(01)00368-8.
- Kim, J., Bagchi, I. C. and Bagchi, M. K. (2009) 'Control of ovulation in mice by progesterone receptor-regulated gene networks.', *Molecular human reproduction*. England, 15(12), pp. 821–828. doi: 10.1093/molehr/gap082.
- Kinder, J. M. *et al.* (2020) 'CD8+ T Cell Functional Exhaustion Overrides Pregnancy-Induced Fetal Antigen Alloimmunization', *Cell Reports*. Elsevier Company., 31(12), p. 107784. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107784.
- Kinder, J. M. *et al.* (2017) 'Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism', *Physiology & behavior*, 176(12), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- King, A. *et al.* (1997) 'Uterine NK Cells and Trophoblast HLA Class I Molecules', *American Journal of Reproductive Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 37(6), pp. 459–462. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1997.tb00260.x>.
- Kintiraki, E. *et al.* (2015) 'Pregnancy-Induced hypertension.', *Hormones (Athens, Greece)*. Switzerland, 14(2), pp. 211–223. doi: 10.14310/horm.2002.1582.
- Kiserud, T. *et al.* (2017) *The World Health Organization Fetal Growth Charts: A Multinational Longitudinal Study of Ultrasound Biometric Measurements and Estimated Fetal Weight*, *PLoS Medicine*. doi: 10.1371/journal.pmed.1002220.
- Koopman, L. A. *et al.* (2003) 'Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential.', *The Journal of experimental medicine*. United States, 198(8), pp. 1201–1212. doi: 10.1084/jem.20030305.
- Kopcow, H. D. *et al.* (2005) 'Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), pp. 15563–15568. doi: 10.1073/pnas.0507835102.
- Kozłowski A; Stressig, R, P. K. (2008) 'Individual Risk of Fetal Loss Following Routine Second Trimester Amniocentesis: A Controlled Study of 20 460 Cases TT - Individuelles Risiko für Schwangerschaftsverlust nach Routineamniozentese im 2. Trimenon: Eine kontrollierte Studie von 20 460 Fällen', *Ultraschall Med*. 2007/06/29, 29(02), pp. 165–172. doi: 10.1055/s-2007-963217.
- Krummel, M. F., Bartumeus, F. and Gérard, A. (2016) 'T cell migration, search

strategies and mechanisms.', *Nature reviews. Immunology*. England, pp. 193–201. doi: 10.1038/nri.2015.16.

Kvalvik, L. G. *et al.* (2020) 'Term complications and subsequent risk of preterm birth: Registry based study', *The BMJ*, 369. doi: 10.1136/bmj.m1007.

Lahl, K. *et al.* (2007) 'Selective depletion of Foxp3 + regulatory T cells induces a scurfy-like disease', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(1), pp. 57–63. doi: 10.1084/jem.20061852.

Lain, K. Y., Krohn, M. A. and Roberts, J. M. (2005) 'Second pregnancy outcomes following preeclampsia in a first pregnancy', *Hypertension in Pregnancy*, 24(2), pp. 159–169. doi: 10.1081/PRG-200059869.

Lancet, T. (2019) 'Gestational diabetes in England: cause for concern', *Lancet (London, England)*, p. 1262.

Landais, E. *et al.* (2009) 'New design of MHC class II tetramers to accommodate fundamental principles of antigen presentation.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(12), pp. 7949–7957. doi: 10.4049/jimmunol.0902493.

Laškarin, G. *et al.* (1999) 'Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells', *American journal of reproductive immunology*. Wiley Online Library, 42(5), pp. 312–320.

Leber, A., Teles, A. and Zenclussen, A. C. (2010) 'Regulatory T Cells and Their Role in Pregnancy', *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), pp. 445–459. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00821.x.

Lee, J. H. *et al.* (2011) 'Progesterone Promotes Differentiation of Human Cord Blood Fetal T Cells into T Regulatory Cells but Suppresses Their Differentiation into Th17 Cells', *The Journal of Immunology*, 187(4), pp. 1778–1787. doi: 10.4049/jimmunol.1003919.

Lim, H. W. *et al.* (2005) 'Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4 + CD25 + Regulatory T Cells', *The Journal of Immunology*, 175(7), pp. 4180–4183. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4180.

Liu, C., Wang, X.-Z. and Sun, X.-B. (2013) 'Assessment of sperm antigen specific T regulatory cells in women with recurrent miscarriage.', *Early human development*. Ireland, 89(2), pp. 95–100. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2012.08.003.

LoMauro, A. and Aliverti, A. (2015) 'Respiratory physiology of pregnancy: Physiology masterclass.', *Breathe (Sheffield, England)*. England, 11(4), pp. 297–301. doi: 10.1183/20734735.008615.

Lunghi, L. *et al.* (2007) 'Control of human trophoblast function', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(1), p. 6. doi: 10.1186/1477-7827-5-6.

Lykke, J. A., Paidas, M. J. and Langhoff-Roos, J. (2009) 'Recurring complications in second pregnancy', *Obstetrics and Gynecology*, 113(6), pp. 1217–1224. doi:

10.1097/AOG.0b013e3181a66f2d.

Mahande, Michael J *et al.* (2013) 'Recurrence of perinatal death in Northern Tanzania: a registry based cohort study.', *BMC pregnancy and childbirth*, 13, p. 166. doi: 10.1186/1471-2393-13-166.

Mahande, Michael J. *et al.* (2013) 'Recurrence of preterm birth and perinatal mortality in northern Tanzania: Registry-based cohort study', *Tropical Medicine and International Health*, 18(8), pp. 962–967. doi: 10.1111/tmi.12111.

Majoko F, Nyström L, Munjanja SP, Mason E, L. G. (2014) 'Relation of parity to pregnancy outcome in a rural community in Zimbabwe', *African Journal of Reproductive Health*, 8(3), pp. 198–206.

Makkonen, N., Heinonen, S. and Kirkinen, P. (2000) 'Obstetric prognosis in second pregnancy after preeclampsia in first pregnancy', *Hypertension in Pregnancy*, 19(2), pp. 173–181. doi: 10.1081/PRG-100100133.

Manzanares, S. *et al.* (2017) 'Risk of recurrence of small-for-gestational-age foetus after first pregnancy', *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 37(6), pp. 723–726. doi: 10.1080/01443615.2017.1290057.

McIntire, D. D. *et al.* (1999) 'Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants', *The New England journal of medicine*.

Meah, V. L. *et al.* (2016) 'Cardiac output and related haemodynamics during pregnancy: a series of meta-analyses.', *Heart (British Cardiac Society)*. England, 102(7), pp. 518–526. doi: 10.1136/heartjnl-2015-308476.

Medawar, P. B. (1953) 'Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates', in.

Melchiorre, K., Sharma, R. and Thilaganathan, B. (2012) 'Cardiac structure and function in normal pregnancy.', *Current opinion in obstetrics & gynecology*. England, 24(6), pp. 413–421. doi: 10.1097/GCO.0b013e328359826f.

Merlino, A. *et al.* (2006) 'Impact of weight loss between pregnancies on recurrent preterm birth', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(3), pp. 818–821. doi: 10.1016/j.ajog.2006.06.043.

Misra, N. *et al.* (2004) 'Cutting Edge: Human CD4 + CD25 + T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 172(8), pp. 4676–4680. doi: 10.4049/jimmunol.172.8.4676.

Miwa, N. *et al.* (2005) 'IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion.', *Molecular human reproduction*. England, 11(12), pp. 865–870. doi: 10.1093/molehr/gah246.

Miyagawa, F. *et al.* (2010) 'The use of mouse models to better understand

mechanisms of autoimmunity and tolerance', *Journal of Autoimmunity*. Academic Press, 35(3), pp. 192–198. doi: 10.1016/J.JAUT.2010.06.007.

Miyake, Y. *et al.* (2007) 'Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II Cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 178(8), pp. 5001–5009. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5001.

Miyara, M. and Sakaguchi, S. (2007) 'Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression.', *Trends in molecular medicine*. England, 13(3), pp. 108–116. doi: 10.1016/j.molmed.2007.01.003.

Mjösberg, J. *et al.* (2009) 'Systemic Reduction of Functionally Suppressive Tregs in Human Second Trimester Pregnancy Is Induced by Progesterone and 17 $\beta$ -Estradiol', *The Journal of Immunology*, 183(1), pp. 759 LP – 769. doi: 10.4049/jimmunol.0803654.

Moffett-King, A. (2002) 'Natural killer cells and pregnancy', *Nature Reviews Immunology*, 2(9), pp. 656–663. doi: 10.1038/nri886.

Moffett, A. and Colucci, F. (2014) 'Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface.', *The Journal of clinical investigation*. United States, 124(5), pp. 1872–1879. doi: 10.1172/JCI68107.

Moher, D. *et al.* (2015) 'Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols ( PRISMA-P ) 2015 statement', pp. 1–9.

Moldenhauer, L. M. *et al.* (2009) 'Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy', *The Journal of Immunology*, 182(12), pp. 8080–8093. doi: 10.4049/jimmunol.0804018.

Moon, J. J. *et al.* (2007) 'Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude.', *Immunity*, 27(2), pp. 203–213. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.007.

Moore *et al.* (2013) *Embryologie. 6. Auflage Elsevier*.

Morikawa, H. and Sakaguchi, S. (2014) 'Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells.', *Immunological reviews*. England, 259(1), pp. 192–205. doi: 10.1111/imr.12174.

Morris, E. A. *et al.* (2015) 'Pregnancy induces persistent changes in vascular compliance in primiparous women.', *American journal of obstetrics and gynecology*. United States, 212(5), pp. 633.e1–6. doi: 10.1016/j.ajog.2015.01.005.

Mosmann, T. R. *et al.* (1986) 'Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.', *The Journal of Immunology*, 136(7), pp. 2348 LP – 2357. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/136/7/2348.abstract>.

Mostello, D. *et al.* (2008) 'Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.ajog.2007.11.058.

Munoz-Suano, A., Hamilton, A. B. and Betz, A. G. (2011) 'Gimme shelter: The immune system during pregnancy', *Immunological Reviews*, 241(1), pp. 20–38. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x.

Ness, R. B. *et al.* (2004) 'Barrier methods, length of preconception intercourse, and preeclampsia', *Hypertension in Pregnancy*, 23(3), pp. 227–235. doi: 10.1081/PRG-200030293.

Van Oostwaard, M. F. *et al.* (2014) 'Prediction of recurrence of hypertensive disorders of pregnancy in the term period, a retrospective cohort study', *Pregnancy Hypertension*. International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy, 4(3), pp. 194–202. doi: 10.1016/j.preghy.2014.04.001.

Ouh, Y. T. *et al.* (2018) 'Recurrent risk of preterm birth in the third pregnancy in Korea', *Journal of Korean Medical Science*, 33(24), pp. 1–9. doi: 10.3346/jkms.2018.33.e170.

Ouzounian, J. G. and Elkayam, U. (2012) 'Physiologic changes during normal pregnancy and delivery.', *Cardiology clinics*. Netherlands, 30(3), pp. 317–329. doi: 10.1016/j.ccl.2012.05.004.

Panja, S. and Paria, B. C. (2021) 'Development of the Mouse Placenta.', *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 234, pp. 205–221. doi: 10.1007/978-3-030-77360-1\_10.

Parrettini, S., Caroli, A. and Torlone, E. (2020) 'Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes.', *Frontiers in endocrinology*. Switzerland, 11, p. 611929. doi: 10.3389/fendo.2020.611929.

Paterson, C. M. and Saunders, N. S. G. (1991) 'The fetal maturity and mode of delivery of a woman's first baby influences the characteristics of her next labour', *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 42(3), pp. 187–193. doi: 10.1016/0028-2243(91)90218-A.

Pearson, H. (2002) 'Reproductive immunology: Immunity's pregnant pause.', *Nature*. England, pp. 265–266. doi: 10.1038/420265a.

Piccinni, M. P. *et al.* (1995) 'Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(1), pp. 128–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541410>.

Plitas, G. and Rudensky, A. Y. (2016) 'Regulatory T cells: Differentiation and function', *Cancer Immunology Research*, 4(9), pp. 721–725. doi: 10.1158/2326-

6066.CIR-16-0193.

Plows, J. F. *et al.* (2018) 'The pathophysiology of gestational diabetes mellitus', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), pp. 1–21. doi: 10.3390/ijms19113342.

Qiao, L. *et al.* (2022) 'The Essential Role of Pancreatic  $\alpha$ -Cells in Maternal Metabolic Adaptation to Pregnancy.', *Diabetes*. United States, 71(5), pp. 978–988. doi: 10.2337/db21-0923.

Quinn, K. H. *et al.* (2011) 'The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells', *Journal of Reproductive Immunology*, 91(1), pp. 76–82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.05.006>.

Quinn, K. H. and Parast, M. M. (2013) 'Decidual regulatory T cells in placental pathology and pregnancy complications.', *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. Denmark, 69(6), pp. 533–538. doi: 10.1111/aji.12077.

Rahimzadeh, M. *et al.* (2016) 'Regulatory T-cells and preeclampsia: An overview of literature', *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(2), pp. 209–227. doi: 10.1586/1744666X.2016.1105740.

Räisänen, S. *et al.* (2013) 'Social disparity affects the incidence of placental abruption among multiparous but not nulliparous women: A register-based analysis of 1,162,126 singleton births', *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 171(2), pp. 246–251. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.09.009.

Regan, L., Braude, P. R. and Trembath, P. L. (1989) 'Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6698), pp. 541–5. doi: 10.1136/bmj.299.6698.541.

Risnes, K. R. *et al.* (2011) 'Birthweight and mortality in adulthood: A systematic review and meta-analysis', *International Journal of Epidemiology*, 40(3), pp. 647–661. doi: 10.1093/ije/dyq267.

Roberts, L. (2019) 'Small, furry and powerful: are mouse lemurs the next big thing in genetics?', *Nature*, 570(7760), pp. 151–154. doi: 10.1038/d41586-019-01789-0.

Robertson, S. A. *et al.* (2009) 'Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice.', *Biology of reproduction*, 80(5), pp. 1036–1045. doi: 10.1095/biolreprod.108.074658.

Robertson, S. A. *et al.* (2019) 'Therapeutic potential of regulatory T cells in preeclampsia-opportunities and challenges', *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), pp. 1–18. doi: 10.3389/fimmu.2019.00478.

Robertson, S. A., Bromfield, J. J. and Tremellen, K. P. (2003) 'Seminal "priming" for protection from pre-eclampsia - A unifying hypothesis', *Journal of Reproductive Immunology*, 59(2), pp. 253–265. doi: 10.1016/S0165-0378(03)00052-4.

Robillard, P. Y. *et al.* (1994) 'Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception', *The Lancet*, 344(8928), pp. 973–975. doi: 10.1016/S0140-6736(94)91638-1.

Robillard, P. Y. *et al.* (2021) 'Primipaternities and human birthweights', *Journal of Reproductive Immunology*, 147(July). doi: 10.1016/j.jri.2021.103365.

La Rocca, C. *et al.* (2014) 'The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus', *Immunology Letters*. Elsevier B.V., 162(1), pp. 41–48. doi: 10.1016/j.imlet.2014.06.013.

Rodger, M. *et al.* (2015) 'Haematological problems in obstetrics.', *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. Netherlands, 29(5), pp. 671–684. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.02.004.

Rosenblum, M. D., Sing Way, S. and Abbas, A. K. (2016) 'Regulatory T cell memory', *Nat Rev Immunol*, 16(2), pp. 90–101. doi: 10.1038/nri.2015.1.

Rosenblum, M. D., Way, S. S. and Abbas, A. K. (2016) 'Regulatory T cell memory', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(2), pp. 90–101. doi: 10.1038/nri.2015.1.

Rouas-Freiss, N. *et al.* (1997) 'Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 94(21), pp. 11520–11525. doi: 10.1073/pnas.94.21.11520.

Rowe, J. H. *et al.* (2012) 'Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen', *Nature*. Nature Publishing Group, 490(7418), pp. 102–106. doi: 10.1038/nature11462.

Saftlas, A. F. *et al.* (1990) 'Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986.', *American journal of obstetrics and gynecology*. United States, 163(2), pp. 460–465. doi: 10.1016/0002-9378(90)91176-d.

Saftlas, A. F. *et al.* (2014) 'Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia', *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier Ireland Ltd, 101–102(1), pp. 104–110. doi: 10.1016/j.jri.2013.07.006.

Saito, S. *et al.* (2007) 'Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia', *Journal of Reproductive Immunology*, 76(1), pp. 30–39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.08.002>.

Sanchez, A. M. (2010) *The Development and Function of Memory Regulatory T Cells*. doi: 10.4049/jimmunol.1200645.

Sanchez, A. M. *et al.* (2012) 'The Development and Function of Memory Regulatory T Cells after Acute Viral Infections', *The Journal of Immunology*, 189(6), pp. 2805–2814. doi: 10.4049/jimmunol.1200645.

Sanghavi, M. and Rutherford, J. D. (2014) 'Cardiovascular physiology of pregnancy', *Circulation*, 130(12), pp. 1003–1008. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009029.

Sanghavi, M., Rutherford, J. D. and Chb, M. B. (2014) 'Cardiovascular Management in Pregnancy Cardiovascular Physiology of Pregnancy', pp. 1003–1008. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009029.

Sasaki, Y. *et al.* (2004) 'Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases.', *Molecular human reproduction*. England, 10(5), pp. 347–353. doi: 10.1093/molehr/gah044.

Sasaki, Y. *et al.* (2007) 'Proportion of peripheral blood and decidual CD4+CD25brightregulatory T cells in pre-eclampsia', *Clinical and Experimental Immunology*, 149(1), pp. 139–145. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x.

Schober, L. *et al.* (2014) 'The role of regulatory T cell (Treg) subsets in gestational diabetes mellitus', *Clinical and Experimental Immunology*, 177(1), pp. 76–85. doi: 10.1111/cei.12300.

Schwartz, N. *et al.* (2014) 'First-trimester placental ultrasound and maternal serum markers as predictors of small-for-gestational-age infants', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(3), pp. 253.e1-253.e8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.02.033>.

Selck, C. and Dominguez-villar, M. (2021) 'Antigen-Specific Regulatory T Cell Therapy in Autoimmune Diseases and Transplantation', 12(May), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2021.661875.

Sferruzzi-Perri, A. N. *et al.* (2009) 'Csf2 null mutation alters placental gene expression and trophoblast glycogen cell and giant cell abundance in mice.', *Biology of reproduction*. Oxford University Press, 81(1), pp. 207–21. doi: 10.1095/biolreprod.108.073312.

Shima, T. *et al.* (2010a) 'Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice.', *Journal of reproductive immunology*. Ireland, 85(2), pp. 121–129. doi: 10.1016/j.jri.2010.02.006.

Shima, T. *et al.* (2010b) 'Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice', *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier Ireland Ltd, 85(2), pp. 121–129. doi: 10.1016/j.jri.2010.02.006.

Shima, T. *et al.* (2015) 'Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy', *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier Ireland Ltd, 108, pp. 72–82. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.005.

Shindo, M. *et al.* (2022) 'Efficient Superovulation and Egg Collection from Mice', *Bio-protocol*. Bio-protocol LLC., 12(11), p. e4439. doi: 10.21769/BioProtoc.4439.

Skjærven, R., Wilcox, A. J. and Lie, R. T. (2002) 'The Interval between Pregnancies and the Risk of Preeclampsia', *New England Journal of Medicine*, 346(1), pp. 33–38. doi: 10.1056/NEJMoa011379.

Somerset, D. A. *et al.* (2004) 'Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset.', *Immunology*, 112(1), pp. 38–43. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x.

Steinborn, A. *et al.* (2012) 'Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs', *Clinical and Experimental Immunology*, 167(1), pp. 84–98. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04493.x.

Stelzer, I. A. *et al.* (2021) 'Integrated trajectories of the maternal metabolome, proteome, and immunome predict labor onset.', *Science translational medicine*. United States, 13(592). doi: 10.1126/scitranslmed.abd9898.

Swain, N. *et al.* (2020) 'SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis.', *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. India, 24(2), pp. 368–373. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_22\_20.

Sykes, L. *et al.* (2012) 'The Th1:Th2 Dichotomy of Pregnancy and Preterm Labour', *Mediators of Inflammation*. Edited by N. Uchida. Hindawi Publishing Corporation, 2012, p. 967629. doi: 10.1155/2012/967629.

Taams, L. S. *et al.* (2005) 'Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells', *Human Immunology*, 66(3), pp. 222–230. doi: 10.1016/j.humimm.2004.12.006.

Tai, P. *et al.* (2008) 'Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen.', *Journal of cellular physiology*. United States, 214(2), pp. 456–464. doi: 10.1002/jcp.21221.

Tang, L. *et al.* (2017) 'Progress in the understanding of the etiology and predictability of fetal growth restriction', *Reproduction*, 153(6), pp. R227–R240. doi: 10.1530/REP-16-0287.

Teles, A. *et al.* (2013) 'Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation.', *Frontiers in immunology*, 4, p. 158. doi: 10.3389/fimmu.2013.00158.

Thiele, K., Hierweger, A. M., *et al.* (2019) 'Impaired progesterone-responsiveness of CD11c+ dendritic cells affects the generation of CD4+ regulatory T cells and is associated with intrauterine growth restriction in mice', *Frontiers in Endocrinology*, 10(FEB), pp. 1–12. doi: 10.3389/fendo.2019.00096.

Thiele, K., Ahrendt, L. S., *et al.* (2019) 'The mnemonic code of pregnancy: Comparative analyses of pregnancy success and complication risk in first and second human pregnancies', *Journal of Reproductive Immunology*. Elsevier, 134–135(February), pp. 11–20. doi: 10.1016/j.jri.2019.06.003.

Thorburn, J., Frankel, A. E. and Thorburn, A. (2003) 'Apoptosis by leukemia cell-targeted diphtheria toxin occurs via receptor-independent activation of Fas-associated death domain protein.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. United States, 9(2), pp. 861–865.

Tsuda, S. *et al.* (2019) 'New paradigm in the role of regulatory T cells during pregnancy', *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2019.00573.

Tubbergen, P. *et al.* (1999) 'Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women?', *Journal of reproductive immunology*. Ireland, 45(1), pp. 81–88. doi: 10.1016/s0165-0378(99)00040-6.

Tuffnell, D. J. *et al.* (2005) 'Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003.', *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. England, 112(7), pp. 875–880. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00565.x.

Turco, M. Y. *et al.* (2018) 'Trophoblast organoids as a model for maternal–fetal interactions during human placentation', *Nature*. Springer US, 564(7735), pp. 263–281. doi: 10.1038/s41586-018-0753-3.

Ulfig (2005) *Kurzlehrbuch Embryologie. 1. Auflage Thieme*.

Valdes, G. *et al.* (2009) 'Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy.', *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 7, p. 79. doi: 10.1186/1477-7827-7-79.

Vatten, L. J. and Skjaerven, R. (2003) 'Effects on pregnancy outcome of changing partner between first two births: prospective population study.', *BMJ (Clinical research ed.)*. England, 327(7424), p. 1138. doi: 10.1136/bmj.327.7424.1138.

Verbsky, J. W. (2007) 'Therapeutic use of T regulatory cells.', *Current opinion in rheumatology*. United States, 19(3), pp. 252–258. doi: 10.1097/BOR.0b013e3280ad46bb.

Voskamp, B. J. *et al.* (2013) 'Recurrence of small-for-gestational-age pregnancy: Analysis of first and subsequent singleton pregnancies in the Netherlands', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc., 208(5), pp. 374.e1-374.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2013.01.045.

Wagenmaker, E. R. and Moenter, S. M. (2017) 'Exposure to Acute Psychosocial Stress Disrupts the Luteinizing Hormone Surge Independent of Estrous Cycle Alterations in Female Mice.', *Endocrinology*. United States, 158(8), pp. 2593–2602. doi: 10.1210/en.2017-00341.

Wahl, S. M. *et al.* (2004) 'TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells.', *Journal of leukocyte biology*. United States, 76(1), pp. 15–24. doi: 10.1189/jlb.1103539.

Waker, C. A., Kaufman, M. R. and Brown, T. L. (2021) 'Current State of

Preeclampsia Mouse Models: Approaches, Relevance, and Standardization', *Frontiers in Physiology*, 12(July). doi: 10.3389/fphys.2021.681632.

Wakkach, A. *et al.* (2003) 'Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo.', *Immunity*. United States, 18(5), pp. 605–617. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00113-4.

Wallace, J. M. *et al.* (2016) 'Inter-Pregnancy Weight Change and the Risk of Recurrent Pregnancy Complications', *PLOS ONE*. Public Library of Science, 11(5), p. e0154812. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154812>.

Wan, Yisong Y and Flavell, R. A. (2005) 'Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(14), pp. 5126–31. doi: 10.1073/pnas.0501701102.

Wan, Y. Y. and Flavell, R. A. (2005) 'Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), pp. 5126–5131. doi: 10.1073/pnas.0501701102.

Wang, W. J. *et al.* (2014) 'Adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ regulatory T cells reverses the increase in abortion rate caused by interleukin 17 in the CBA/J×BALB/c mouse model', *Human Reproduction*, 29(5), pp. 946–952. doi: 10.1093/humrep/deu014.

Wang, Y. X. *et al.* (2022) 'Birth weight and long-term risk of mortality among US men and women: Results from three prospective cohort studies', *The Lancet Regional Health - Americas*. Elsevier Ltd, 15, p. 100344. doi: 10.1016/j.lana.2022.100344.

Wardinger, J. E. and Ambati, S. (2022) 'Placental Insufficiency.', in: *Treasure Island (FL)*.

Wegmann, T. G. *et al.* (1993) 'Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?', *Immunology Today*, 14(7), pp. 353–356. doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D.

Weissler, K. A. and Caton, A. J. (2014) 'The role of T-cell receptor recognition of peptide:MHC complexes in the formation and activity of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells.', *Immunological reviews*. NIH Public Access, 259(1), pp. 11–22. doi: 10.1111/imr.12177.

Wherry, E. J. and Kurachi, M. (2015) 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.', *Nature reviews. Immunology*. England, 15(8), pp. 486–499. doi: 10.1038/nri3862.

WHO, United Nations Population Fund UNICEF and The World Bank (2017) *Managing complications in pregnancy and childbirth*. doi: 10.1111/gwat.12367.

Wilcox, Mark A., Chang, A. M. Z. and Johnson, I. R. (1996) 'The effects of parity on birthweight using successive pregnancies', *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 75(5), pp. 459–463. doi: 10.3109/00016349609033354.

Wilcox, Mark A, Chang, A. M. Z. and Johnson, I. R. (1996) 'The effects of parity on birthweight using successive pregnancies', *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. John Wiley & Sons, Ltd, 75(5), pp. 459–463. doi: 10.3109/00016349609033354.

Woods, L., Perez-Garcia, V. and Hemberger, M. (2018) 'Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models', *Frontiers in Endocrinology*, 9(September), pp. 1–18. doi: 10.3389/fendo.2018.00570.

World Health Organization (10AD) 'Sex, gender and influenza'. Available at: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44401/9789241500111\\_eng.pdf;jsessionid=F](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44401/9789241500111_eng.pdf;jsessionid=F).

Yang, K. M. *et al.* (2010a) 'Women with multiple implantation failures and recurrent pregnancy losses have increased peripheral blood T cell activation', *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(5), pp. 370–378. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00811.x.

Yang, K. M. *et al.* (2010b) 'Women with Multiple Implantation Failures and Recurrent Pregnancy Losses have Increased Peripheral Blood T Cell Activation', *American Journal of Reproductive Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 63(5), pp. 370–378. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00811.x>.

Zazara, D. E. *et al.* (2018) 'Prenatal stress challenge impairs fetal lung development and asthma severity sex-specifically in mice', *Journal of Reproductive Immunology*, 125, pp. 100–105. doi: 10.1016/j.jri.2017.07.001.

Zenclussen, A. C. *et al.* (2005) 'Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: Adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model', *American Journal of Pathology*, 166(3), pp. 811–822. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62302-4.

Zhao, J., Zeng, Y. and Liu, Y. (2007) 'Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell pool during pregnancy', *Journal of Reproductive Immunology*, 75(2), pp. 71–81. doi: 10.1016/j.jri.2007.06.052.

Zhu, L. *et al.* (2017) 'Treg / Th17 Cell Imbalance and IL-6 Profile in Patients With Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion', 24(6), pp. 882–890. doi: 10.1177/1933719116670517.

Ziegler, S. F. (2007) 'FOXP3: not just for regulatory T cells anymore.', *European journal of immunology*. Germany, 37(1), pp. 21–23. doi: 10.1002/eji.200636929.

## 12 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Petra Arck für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Teilnahme am Graduiertenkolleg „iPRIME“. Hierdurch war es mir möglich das wissenschaftliche, experimentelle Arbeiten zu lernen und meine Fähigkeiten stetig zu erweitern.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Kristin Thiele für die Einarbeitung in das Thema, die kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit während und weit über die Zeit im Labor hinaus. Mit Deinem stetigen Feedback konnte diese Arbeit in ihrer Qualität deutlich wachsen.

Ein ebenso herzlicher Dank gilt Agnes, Christopher und Steven für Hilfe in technischen und inhaltlichen Fragen, mit Euch war es nie langweilig im Labor. Danke an Thomas für die Aufarbeitung und Färbung der Plazenten. Vielen Dank an Prof. Judith Eckers, für Deine Arbeit zu unseren Embryonen, die uns einen weiteren Parameter in der Beurteilung der fetalen Entwicklung ermöglicht haben.

Ein großer Dank gilt der Else Kröner-Fresenius Stiftung, die meine Teilnahme im „iPRIME“ Graduiertenkolleg durch ein Stipendium unterstützt hat.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für ihren unermüdlichen Zuspruch und die Unterstützung in jeglicher Weise. Um meinen Vater zu zitieren: „Das D in Doktor steht für Durchhalten.“

Danke an Dich, Thormen, für mehrfaches Korrekturlesen und Deine unendliche Unterstützung auf diesem Weg. Jetzt kann geheiratet werden.

### **13 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

#### **14 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....