

# **Nicht klassische HLA Klasse I Moleküle in der Schwangerschaft**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.**

**des Fachbereichs Biologie und Geografie  
an der**

**Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von  
Magdalena Switala**

**aus Tichau  
April 2009**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Immunologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Grosse-Wilde
2. Gutachter: PD Dr. Elke Dopp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Helmut Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2009

	Abkürzungsverzeichnis	6
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Die Schwangerschaft als immunologische Besonderheit	8
1.2	Immunzellen während der Schwangerschaft	8
1.3	Th1/Th2 Immunbalance	10
1.4	Progesteron als Immunregulator	10
1.5	Humane Leukozyten Antigene	11
1.5.1	HLA-G Moleküle	12
1.5.2	MICA Moleküle	15
1.6	Die Rolle der nicht klassischen Moleküle HLA-G und MICA in der Reproduktion	17
1.7	Zielsetzung	19
<b>2.</b>	<b>Material</b>	
2.1	Chemikalien und Reagenzien	20
2.2	Kulturmedien	20
2.3	Zellen	20
2.4	Antikörper	21
2.5	Puffer und Lösungen	22
2.6	Hormone	23
2.7	Verbrauchsmaterial	24
2.8	Geräte	24
2.9	Herstellernachweise	25
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	
3.1	Aufreinigung eines Standardreagenz für die Quantifizierung von sHLA-G Molekülen	27
3.2	Die Luminex-xMAP® Technologie	28
3.2.1	Aktivierung und Kopplung der Mikrosphären	29
3.2.2	Testentwicklung zur Bestimmung von sHLA-G aus Kulturüberständen	30
3.2.3	Optimierte Testdurchführung für die Bestimmung von sHLA-G mit der Luminex®-x-MAP® Technologie	32
3.3	Bestimmung von löslichen klassischen HLA-I und HLA-G Molekülen im ELISA	33
3.4	Bestimmung von sMICA Konzentrationen	34
3.4.1	Spezifität unterschiedlicher MICA Antikörper	34
3.4.2	Optimierte Testdurchführung für die Bestimmung von sMICA im ELISA	35
3.5	Untersuchungen zu Regulation und Funktionalität von MICA bzw. sMICA	35
3.5.1	Zelllinien und Zellkultur	35
3.5.2	Durchflusszytometrische Analyse	37

3.5.3	Reverse Transkriptase und Real Time PCR	38
3.5.4	Behandlung von Lymphozyten mit rekombinantem MICA	38
3.5.5	Bestimmung der IL-10 und IFN $\gamma$ Freisetzung nach MICA Behandlung	39
3.5.6	Lymphozyten Proliferationsassay nach MICA Behandlung	39
3.6	Untersuchungsmaterial	39
3.6.1	Untersuchungsmaterial zur Bestimmung von sHLA-G in Embryokulturen	39
3.6.2	Embryonen- und Patienten spezifisches Profil der Pilotstudie	41
3.6.3	Embryonen- und Patienten spezifisches Profil der multizentrischen Studie	42
3.6.4	Untersuchungsmaterial zur Bestimmung von sHLA Molekülen in Follikelpunktaten	44
3.6.5	Untersuchungsmaterial zur Bestimmung von sMICA Serumspiegel im Schwangerschaftsverlauf nach ART	44
3.7	Statistische Analyse	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	Nachweis von sHLA-G Molekülen in Embryokulturen und deren klinische Bedeutung für die Reproduktion	46
4.1.1	Technologische Voraussetzungen für die Messung von sHLA-G	46
4.1.2	Evaluierung von sHLA-G als prädiktiver Marker für eine Schwangerschaft nach ART: Pilotstudie	47
4.1.2.1	Der Einfluss von embryospezifischen Faktoren auf die Detektion von sHLA-G	47
4.1.2.2	Korrelation von sHLA-G Werten mit der Embryoqualität in Ein-Embryokulturen	49
4.1.2.3	Assoziation von sHLA-G mit dem Schwangerschaftsausgang nach ART	50
4.1.2.4	Assoziation von sHLA-G mit Aborten	52
4.1.3.	Evaluierung von sHLA-G als prädiktiver Marker für eine Schwangerschaft nach ART: Multizentrische Studie	54
4.1.3.1	Der Einfluss von embryospezifischen Faktoren auf die Detektion von sHLA-G	54
4.1.3.2	Korrelation von sHLA-G Werten mit der Embryoqualität in Ein-Embryokulturen	56
4.1.3.3	Der Einfluss von patientenspezifischen Faktoren auf die Detektion von sHLA-G	57
4.1.3.4	Assoziation von sHLA-G mit dem Schwangerschaftsausgang nach ART	60
4.2	Nachweis von sHLA-G in Follikelpunktaten	63
4.3	Nachweis von sMICA Molekülen in Körperflüssigkeiten und deren	64

	Bedeutung für die Reproduktion	
4.3.1	Technologische Voraussetzungen für die Messung von sMICA	64
4.3.2	Nachweis von sMICA Konzentrationen in Follikelpunktaten	66
4.3.3	Nachweis von sMICA Konzentrationen im Serum nach ART	66
4.4	Untersuchungen zur Progesteron-vermittelten Regulation und Funktionalität von MICA	70
4.4.1	Die Effekte von Progesteron auf die MICA mRNA Expression	70
4.4.2	Die Effekte von Progesteron auf die MICA und ERp5 Oberflächenexpression	71
4.4.3	Die Effekte von Progesteron auf die ERp5 mRNA Expression	74
4.4.4	Die Effekte von Progesteron auf die Freisetzung von MICA	74
4.4.5	Die Abhängigkeit der Progesteronkonzentrationen auf sMICA, MICA und ERp5	75
4.4.6	Funktionelle Konsequenzen der MICA Freisetzung auf die NK-Zellaktivität	76
4.4.7	Die Effekte von sMICA auf die Zytokinfreisetzung von Lymphozyten	78
4.4.8	Der Einfluss von sMICA auf die zelluläre in-vitro Funktion von PBLs im Lymphozytentransformationstest	79
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>93</b>
	Danksagung	107
	Lebenslauf	108

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha, bzw. anti
ANOVA	Varianzanalyse
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ART	assistierte Reproduktionstechnik
$\beta$ 2m	beta2-Mikroglobulin
BSA	Rinderserumalbumin
Cpm	Zählung pro Minute
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid HCl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Embryokultur(en)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSH	humanes follikelstimulierendes Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILT	Immunoglobulin-ähnliche Transkripte
IVF	in-vitro Fertilisation
KIR	Killerzell Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
mAK	monoklonaler Antikörper
MES	2-N-Morpholino-ethansulfonic acid
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIC	MHC class I related chain
mRNA	Botenribonukleinsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
PBL	periphere Blutlymphozyten

PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyll Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA-PE	Streptavidin konjugiertes Phycoerythrin
SEM	Durchschnittsfehler der Standardabweichung
sHLA	lösliches HLA
sMICA	lösliches MICA
TESE	testikuläre Spermextraktion
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Schwangerschaft als immunologische Besonderheit

Der Embryo erbt die genetischen Informationen von der Mutter und vom Vater. Aufgrund der paternalen Antigene kann der Embryo als Semiallograft interpretiert werden. Schon 1953 wurde der Embryo im Mutterleib als ein semiallogenes Transplantat beschrieben, das für die Zeit der Schwangerschaft toleriert wird (Medawar et al., 1953). Seither wird versucht die feto-maternale Toleranz immunologisch zu erklären. Im Folgenden werden die bisher bekannten relevanten Mechanismen beschrieben, mit denen die allogene Erkennung und Bekämpfung des Embryos durch mütterliche Immunantwort unterbunden wird.

## 1.2 Immunzellen während der Schwangerschaft

Vor Eintritt einer Schwangerschaft wird in der Gebärmutter eine spezielle Umgebung geschaffen, die die Implantation eines Embryos ermöglicht: Die dezidualen Lymphozytenpopulationen werden aus NK-Zellen (70%), Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet. Zusätzlich werden regulatorische T-Lymphozyten (CD4+/CD25+) und  $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen, während  $\alpha\beta$ T-Zellen und B-Zellen selten oder kaum auftreten (Mincheva-Nilsson et al., 1994, Szekeres-Bartho et al., 2001; Mincheva-Nilsson, 2003; Tab. 1).

NK-Zellen stellen den größten Anteil der maternalen Immunzellen in der Dezidua dar (Moffett-King, 2002). Uterine NK-Zellen (uNK) unterscheiden sich jedoch von den peripheren NK-Zellen (Tab. 1): Phänotypisch werden die uNK-Zellen durch die fehlende Expression des Fc-Rezeptors CD16 charakterisiert, während der Rezeptor CD56 sehr hoch exprimiert wird. Weiterhin unterscheiden sich die NK-Zellen morphologisch. Periphere NK-Zellen bilden die so genannten großen granulären Lymphozyten (LGL), während in der Dezidua überwiegend agranuläre kleine NK-Zellen auftreten. Funktionell unterscheiden sich uNK-Zellen von den peripheren NK-Zellen durch ihre niedrige lytische Aktivität. Ebenfalls produzieren uNK-Zellen vermehrt Zytokine und Lymphokine, im Gegensatz zu peripheren NK-Zellen (Cooper et al., 2001).



**Tabelle 1: Verteilung der T- und NK-Zellen in Dezidua und peripherem Blut.**

Verteilung von NK-Zellen und T-Zellen im peripheren Blut und in der Dezidua während der Schwangerschaft. CD = Cluster of Differentiation, IFN- $\gamma$  = Interferon-  $\gamma$ , GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor, MIP1 $\alpha$  = Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 $\alpha$ .

Quelle: Gil Mor., 2006, Immunology of pregnancy, Landes Bioscience

	Dezidua	Peripheres Blut
<b>NK-Zellen</b>		
<b>Phänotyp</b>		
CD16+	2%	10-15%
CD16-CD56+	60-70%	<1%
<b>Morphologie</b>	Große granuläre Lymphozyten (LGL)	Agranuläre kleine Lymphozyten und LGLs
<b>Aktivität</b>	niedrig	hoch
<b>Zytokine</b>		
IFN- $\gamma$	+/-	+
GM-CSF	++	-
MIP1 $\alpha$	++	-
TGF- $\beta$ 1	++	+/-
<b>T-Zellen</b>	10-15%	70%
CD4+	5-7%	40-45%
CD8+	7-10%	30-40%
<b><math>\gamma\delta</math>-T-Zellen</b>	60% aller T-Zellen	5-10% aller T-Zellen

Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind im Endometrium und der Dezidua aller Säugetiere präsent und ihre Anzahl steigt während der Schwangerschaft (Mincheva-Nilsson et al., 1994). Diese dezidualen T-Zellen tragen hauptsächlich T-Zell-Rezeptoren mit V $\delta$ 1-Ketten (Meeusen et al., 2001) und werden bei Schwangerschaften im Blut nachgewiesen. Das Auftreten dieser zirkulierender  $\gamma$ V $\delta$ 1-T-Zellen soll für eine erfolgreiche Schwangerschaft erforderlich sein (Szekeres-Bartho et al., 2001). Wie uNK-Zellen produzieren ebenfalls uterine  $\gamma\delta$ -T-Zellen vermehrt Zytokine (Barakonyi et al., 1999; Nagaeva et al., 2002) und sollen zu einer erfolgreichen Schwangerschaft beitragen (Szekeres-Bartho et al., 2001).

Wie periphere Blut Lymphozyten (PBLs) exprimieren deziduale Lymphozyten eine Vielzahl von Rezeptoren. Zu den inhibitorischen Rezeptoren gehören die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs), wie KIR2DL4 und die Immunglobulin-ähnlichen Transkripte (ILT), wie ILT-2 und ILT-4. Zu den aktivierenden Rezeptoren gehören die C-Typ II Lectin-ähnlichen Proteine, wie NKG2D (natural killer group 2 member D) (Rajagopalan und Long, 1999; Bauer et al., 1999). Deziduale  $\gamma\delta$ T-Zellen können ebenfalls den NKG2D Rezeptor exprimieren (Mincheva-Nilsson et al., 1997). Die einzelnen Funktionen und Liganden dieser Rezeptoren werden nachkommend näher beschrieben.

### **1.3 Th1/Th2 Immunbalance**

Durch die Verschiebung der Lymphozytenpopulationen während der Schwangerschaft wird eine Typ-1/Typ-2 Immunbalance geschaffen, die das Überleben eines semiallogenen Embryos unterstützt (Wegmann et al., 1993). Während der Schwangerschaft ist der Anteil der pro-inflammatorischen Typ-1 Zellen in der Dezidua und damit auch die Produktion entsprechender pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 gering. Uterine NK-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen produzieren dagegen vermehrt anti-inflammatorische Zytokine, wie TGF- $\beta$ 1, IL4, IL6 und IL10 (Wen et al., 1998).

### **1.4 Progesteron als Immunregulator**

Neben den Zytokinen und den Immunzellen spielen Hormone, die eine immunmodulierende Wirkung haben, in der Schwangerschaft eine große Rolle. Dazu gehört das Steroidhormon Progesteron, das als wichtigstes schwangerschaftserhaltendes Hormon gilt. Es wird diskutiert, dass Progesteron die zytotoxische T-Zell Aktivierung unterdrückt, die Lymphozytenproliferation inhibiert und die NK-Zell Aktivierung herabsetzt (Hansen et al., 1992; McKay et al., 1999).

Die immunmodulierende Funktion von Progesteron wird durch den intrazellulären Progesteronrezeptor vermittelt. Nach Bindung von Progesteron verändert sich die Konformation des Rezeptors, wodurch die Dissoziation von Heat Shock Proteinen,

ermöglicht wird. Diese Heat Shock Proteine wandern daraufhin zum Nukleus und regulieren über die Bindung an spezifische Genpromotersequenzen die Expression bestimmter Antigene (Giangrande and McDonnell, 1999).

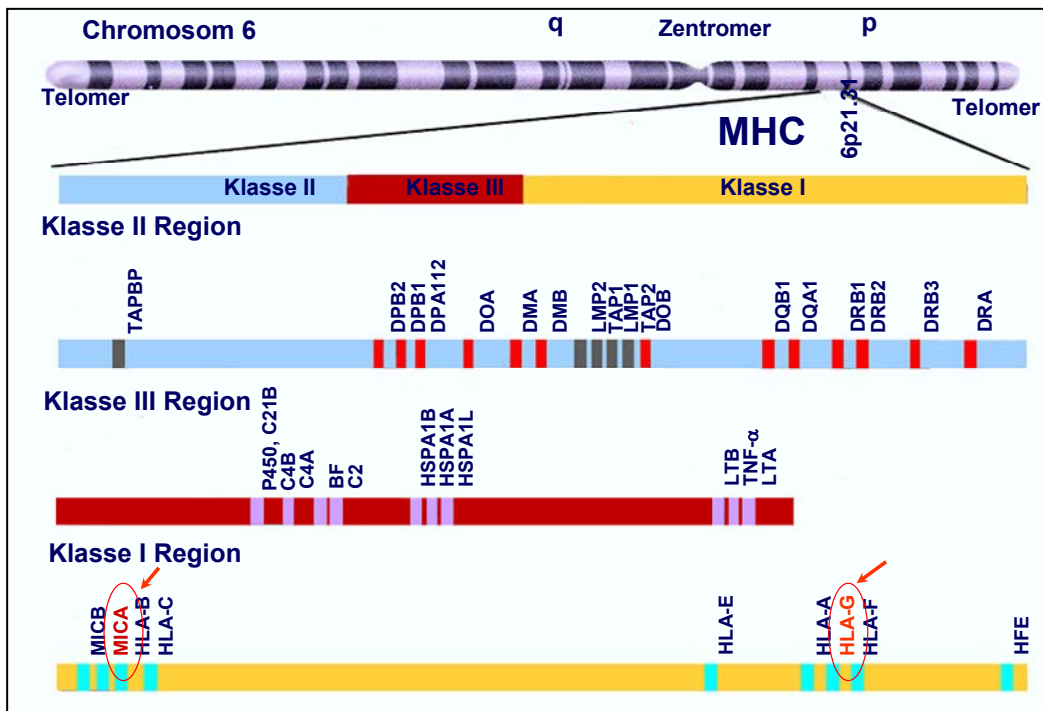
$\gamma\delta$ -T-Zellen synthetisieren in Gegenwart von Progesteron den Progesteron-induzierten Blockierfaktor (PIBF). PIBF inhibiert die NK-Zell Aktivität und modifiziert die Zytokinfreisetzung des anti-inflammatorischen Typs (Piccinni et al., 1995; Szekeres-Bartho et al., 1996; Szekeres-Bartho and Wegmann, 1996). Progesteron beeinflusst Autoimmun- und Infektionskrankheiten und ermöglicht Tumorzellen, der immunologischen Überwachung zu entkommen (Tumor Escape Mechanismus) (Srivastava und Anderson, 2007; Check et al., 2007 and 2009; Medina et al., 2007).

## 1.5 Humane Leukozyten Antigene

Humane Leukozyten Antigene (HLA) werden auch Transplantationsantigene genannt. Über diese Antigene wird die zelluläre und humorale Immunität eingeleitet. Die Antigene des HLA-Systems werden von Genorten auf dem kurzen Arm des 6. Chromosoms kodiert und sind polygen und polymorph (Abb. 1). Die Genprodukte werden in 2 Klassen unterteilt: Die HLA Klasse I Antigene sind mit einem zweiten nicht polymorphen Molekül, dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2m) komplexiert. Die Klasse II Antigene sind Heterodimere, die jeweils aus einer polymorphen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bestehen.

Funktionelle Untersuchungen zeigen, dass HLA Klasse I und II Antigene intrazelluläre bzw. extrazelluläre Antigene und Peptide binden und auf der Zelloberfläche präsentieren, die dann mit den T-Zellrezeptoren von CD8 bzw. CD4 positiven T-Zellen, bzw. mit KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen interagieren können (Klein und Sato, 2000).

Weiterhin können HLA Klasse I Antigene in klassische und nicht klassische Moleküle unterteilt werden. Die klassischen Moleküle sind hochpolymorph und werden, mit Ausnahme von fetalen Trophoblastzellen, ubiquitär von allen Somazellen exprimiert. Demgegenüber zeigt das nicht klassische Merkmal HLA-G und das HLA Klasse I Ketten-ähnliche Molekül-A (MHC class I-related chain-A) MICA ein restringiertes Expressionsprofil und sind nicht bzw. geringfügig polymorph.



**Abbildung 1: HLA Genorte auf dem Chromosom 6**

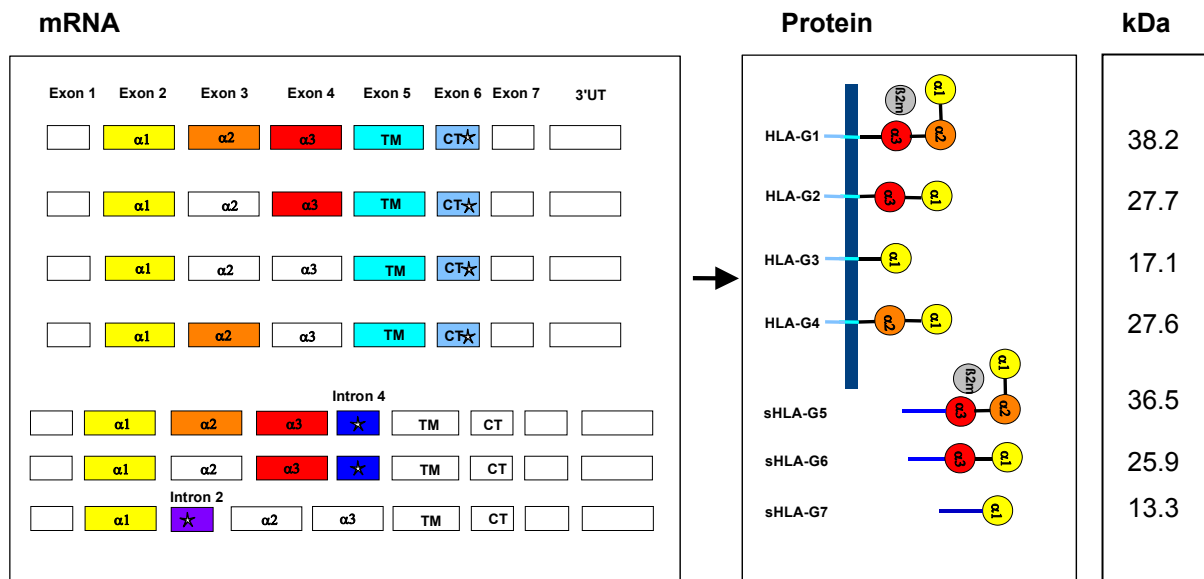
Quelle: aus Klein J, Sato A (2000).

### 1.5.1 HLA-G Moleküle

In Abbildung 2 sind die Transkripte und Proteine der 7 verschiedenen HLA-G Isoformen mit ihren wahrscheinlichen Molekulargewichten (kDa) dargestellt. Das primäre Transkript HLA-G1 und drei weitere Isoformen (HLA-G2, HLA-G3 und HLA-G4) sind membranverankert. Drei andere Isoformen (HLA-G5, HLA-G6, HLA-G7) können nur als lösliche Moleküle vorkommen (Ishitani and Geraghty, 1992; Fujii et al., 1994; Kirszenbaum et al., 1994; Paul et al., 2000).

HLA-G1 und HLA-G5 Moleküle sind extrazellulär identisch mit den klassischen HLA-Antigenen. Sie bestehen aus 3  $\alpha$ -Domänen und sind mit  $\beta$ 2m assoziiert. Die restlichen Isoformen sind entweder um eine oder zwei  $\alpha$ -Domänen verkürzt und können dadurch nicht mehr mit  $\beta$ 2m assoziieren.

Die löslichen HLA-G Isoformen entstehen durch Verlust der transmembranen und der zytoplasmatischen Domäne. Charakteristisch ist, dass die Intron-4 bzw. 2 Sequenz exprimiert wird (Fujii et al., 1994; Paul et al., 2000).



**Abbildung 2: Multiple HLA-G Isoformen.** Die multiplen Varianten der HLA-G Moleküle entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA. Es werden Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten translatiert.  $\alpha$  =  $\alpha$ -Domäne, TM = Transmembrandomäne, CT = Zytoplasmatische Domäne, ★ = Stoppkodon.  
Quelle: Nach Fujii et al., 1994; Kirszenbaum et al., 1994; Paul et al., 2000.

HLA-G Moleküle wurden erstmals auf Trophoblastzellen, die mit dem mütterlichen Gewebe in Kontakt treten nachgewiesen (Geraghty et al., 1987). Da Trophoblastzellen generell keine klassischen HLA-Moleküle, jedoch das nicht-klassische Molekül HLA-G exprimieren (Kovats et al., 1990; McMaster et al., 1995), wird diesem Antigen eine Schlüsselrolle für die Etablierung und Erhaltung einer Schwangerschaft zugeschrieben. HLA-G Moleküle wurden ebenfalls auf unbefruchteten Eizellen und Blastozysten (Jurisicova et al., 1996) gefunden.

Lösliche HLA-G Moleküle wurden in Medien von Embryonen, die vor der assistierten Reproduktion kultiviert werden (Menicucci et al., 1999; Fuzzi et al., 2002; Criscuoli et al., 2005; Noci et al., 2005; Rizzo et al., 2007; Sher et al., 2004, 2005 und 2007; Yie et al., 2005; Desai et al., 2006; Fisch et al., 2007) und im Fruchtwasser (Rebmann et al., 1999) nachgewiesen.

Eine marginale HLA-G Expression wird auf Immunzellen und Erythroblasten (Menier et al., 2004), der Kornea (Le Discorde et al., 2003) und im Thymus (Mallet et al.,

1999) gefunden. Lösliche HLA-G Isoformen wurden im peripheren Blut und anderen Körperflüssigkeiten, wie Pleuraexsudat detektiert (Rebmann et al., 1999; Singer et al. 2003). Eine vermehrte Expression von HLA-G wurde in pathologischen Situationen beobachtet: So wurde HLA-G in malignen Melanomen, Glioblastomen und anderen Karzinomen nachgewiesen (Ibrahim et al., 2001; Singer et al., 2003).

In Analogie zu den membranständigen HLA-G Molekülen wurden erhöhte Konzentrationen von sHLA-G in Plasmaproben von Tumorpatienten gezeigt (Rebmann et al., 2003). Dabei können lösliche HLA-G Moleküle sowohl von Tumorzellen als auch von peripheren Lymphozyten, wie Monozyten vermehrt freigesetzt werden (Singer et al., 2003; Rebmann et al., 2003).

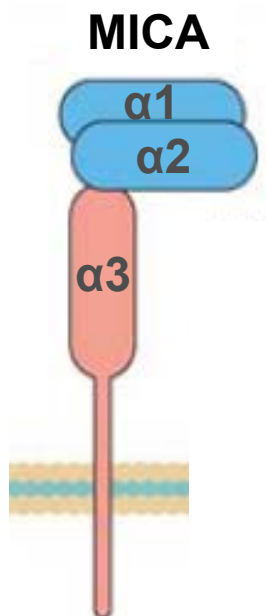
Im Gegensatz zu Tumorpatienten scheinen erniedrigte sHLA-G Plasmaspiegel ein Indikator für gestörte Schwangerschaften zu sein. So wurden niedrige sHLA-G Plasmaspiegel bei Frauen mit Plazentalösung, Präeklamsien oder Frühaborten nachgewiesen (Pfeiffer et al., 2000; Yie et al., 2005; Steinborn et al., 2007).

Die Wirkungsweise von HLA-G wird durch die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren, wie KIR2DL4 (Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren) oder ILT (Immunglobulin-ähnliche Transkripte)-2 und ILT-4, vermittelt (Navarro et al., 1999; Rajagopalan and Long, 1999; Menier et al., 2002). Während KIR2DL4 (NK-Zellen), ILT-4 (Makrophagen und dendritischen Zellen) und die T-Zell-Rezeptoren (T-Zellen) zellspezifisch ausgeprägt werden, ist ILT-2 auf allen Lymphozyten zu finden.

So kann HLA-G die Effektorfunktionen aller Immunzellen in mannigfaltiger Weise supprimieren: Durch HLA-G wird die T-Zell abhängige Immunantwort und die zytotoxische NK-Zell Aktivität inhibiert (Le Gal et al., 1999; Riteau et al., 2001a; Riteau et al., 2001b). HLA-G tragende Zellen können zusätzlich die Proliferation von CD4+ T-Zellen unterdrücken (LeMaoult et al., 2004; Bainbridge et al., 2000). Durch Bindung von HLA-G Molekülen an dendritische Zellen wird die HLA-Klasse II Antigenexpression vermindert und damit die Funktion als antigenpräsentierende Zelle reduziert (Ristich et al., 2005). Die dendritische Zelle wird auf diese Weise zur tolerogenen dendritischen Zelle, d.h. sie induziert regulatorische T-Zellen. Diese anti-inflammatorische Wirkung wird durch membranständige, wie auch lösliche HLA-G Moleküle ausgelöst. Letztere können die Funktion der membranständigen HLA-G Moleküle noch verstärken.

## 1.5.2 MICA Moleküle

Die kodierenden Gene für MICA liegen innerhalb des MHC auf Chromosom 6 (Abb. 1). Es wurden sieben verschiedene MIC-Gene (MICA-MICG) im Menschen identifiziert, aber nur MICA und MICB werden als Proteine exprimiert. MICA Moleküle sind hochpolymorph: sie können aus 60 verschiedenen Allelen entstehen (Bahram et al., 2005). Sie zeigen in ihrem Aufbau eine strukturelle Homologie zu den HLA-Klasse I Antigenen: Dabei weisen sie drei extrazelluläre Domänen ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3), eine transmembrane und eine zytoplasmatische Region auf. Anders als Moleküle der HLA Klasse I sind sie jedoch nicht mit  $\beta$ 2m assoziiert und präsentieren keine Peptide an der Zelloberfläche (Groh et al., 1996) (Abb. 3).



**Abbildung 3: Die drei  $\alpha$ -Domänen des MICA Moleküls.**

Quelle: Nach Lanier et al., 2005.

MICA Moleküle können membranständig und in löslichen Isoformen auftreten. Mitglieder der Familie der Matrixmetalloproteinasen und der Disintegrin- und metalloproteinasen ADAM sind bei der proteolytischen Spaltung von NKG2D Liganden, wie MICA beteiligt (Salih et al., 2002 und 2006; Waldhauer et al., 2006 und 2008). Die Freisetzung von MICA wird durch die Protein-Disulfid-Isomerase ERp5 vermittelt. Diese bindet an die  $\alpha$ 3-Domäne und induziert dadurch eine konformative

Änderung von MICA, die eine proteolytische Spaltung dieses Moleküls ermöglicht (Kaiser et al., 2007).

Die MICA Expression ist bei gesunden Menschen auf das gastrointestinale Epithel, Endothelzellen und Fibroblasten begrenzt (Groh et al., 1996; Stephens et al., 2001). Während der Schwangerschaft wird MICA von Trophoblastzellen der Plazenta exprimiert. Ferner konnten lösliche MICA Moleküle (sMICA) in Plasmaproben schwangerer Frauen (Porcu-Buisson et al., 2007) in allen drei Trimestern nachgewiesen werden (Mincheva-Nilsson et al., 2006).

Zusätzlich können MICA Moleküle unter pathologischen Bedingungen in hematopoetischen und epithelialen Tumoren, wie Karzinomen der Lunge, Brust, Niere, Ovar, Prostata und Kolon auftreten (Groh et al., 1999; Pende et al. 2002; Raffaghello et al., 2004; Carbone et al., 2005; Watson et al., 2006). Die Hochregulation von MICA Molekülen kann durch Stress, wie Hitzeschock und bakterielle und virale Infektionen induziert werden (Groh et al., 1999 und 2001). Die Expression von MICA wird über Hitzeschock-Protein-70 (HSP-70) reguliert (Groh et al., 1996).

Lösliches MICA wurde in Überständen einiger Tumorzelllinien, Plasmaproben von Patienten mit gastrointestinalen Malignomen (Salih et al., 2002), Prostatakrebs (Wu et al., 2004) und Pankreaskarzinomen (Märten et al., 2006) detektiert. Die Konzentration von sMICA in Plasmaproben korreliert mit dem Grad des Krankheitsfortschrittes bzw. der Überlebenschancen bei Prostata- und Pankreaskarzinomen und bei multiplen Myelomen (Wu et al., 2004; Märten et al., 2006; Rebmann et al., 2007).

MICA Moleküle sind Liganden der NKG2D Rezeptoren. Das aktivierende C-Typ II Lectin-ähnliche Protein NKG2D ist auf allen NK-Zellen, CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen präsent (Mincheva-Nilsson et al., 1997; Bauer et al., 1999). Die Bindung der  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ -Domänen (Li et al., 2001) der MICA Proteine an den NKG2D Rezeptor aktiviert NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die daraufhin ihre zytolytische Aktivität und Zytokinproduktion aktivieren. Zusätzlich können CD8 positive  $\alpha\beta$ -T-Zellen kostimuliert werden. Daher kann durch die Interaktion von NKG2D mit einer MICA exprimierenden Tumorzelle eine natürliche anti-Tumor NK-Zell- und antigenspezifische T-Zell-Antwort gesteigert werden. Auf diese Weise können körpereigene entartete Zellen beseitigt werden, da die Bindung von HLA Klasse I



Antigenen an inhibierende Rezeptoren der NK-Zelle durch das aktivierende NKG2D-vermittelten Signal dominiert werden (Bauer et al., 1999, Groh et al., 2001).

Im Gegensatz zur Bindung von membranständigem MICA an den NKG2D Rezeptor, wird durch die Bindung von sMICA die anti-Tumor-Reaktivität zytotoxischer NK- und T-Zellen beeinträchtigt. Durch Freisetzung von sMICA, stehen weniger Liganden für das aktivierende NKG2D an der Zielzelloberfläche zur Verfügung. Zusätzlich reguliert sMICA, in Gegenwart von TGF $\beta$ 1 (Clayton et al., 2008) die Expression der NKG2D Rezeptoren auf T- und NK-Zellen herunter und verringert damit die Zytotoxizität dieser Zellen in vitro und in vivo (Groh et al., 2002; Wiemann et al., 2005;).

Es wurde weiterhin gezeigt, dass die lytische Aktivität von NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Gegenwart von sMICA ebenfalls direkt, unabhängig von der Reduktion der NKG2D Rezeptoren, inhibiert werden kann (Märten et al., 2006). Die Anzahl von immunsupprimierenden CD4+ NKG2D+ T-Zellen wird durch sMICA gesteigert (Groh et al., 2006).

## **1.6 Die Rolle der nicht klassischen Moleküle HLA-G und MICA in der Reproduktion**

Die assistierte Reproduktionstechnik (ART) hat das Ziel, möglichst vielen Paaren den unerfüllten Kinderwunsch zu ermöglichen. Trotz der kontinuierlichen Verbesserungen in der ART liegt die Geburtenrate bei etwa 25% (DIR; [www.deutsches-ivf-register.de](http://www.deutsches-ivf-register.de)). Dabei bilden Mehrlingsschwangerschaften die wichtigste Komplikation nach ART, da sie zu neonatalen Störungen und ökonomischen und psychosozialen Problemen führen können (Scholz et al., 1999). Das Ziel der ART ist demnach der Eintritt einer Schwangerschaft mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit, bei einem geringen Mehrlingsrisiko.

Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die Verbesserung der Implantationsraten und der immunologische Erhalt der transferierten Embryonen. Für die Verbesserung der Voraussage einer erfolgreichen Schwangerschaft nach ART werden zuverlässige biochemische Marker als Qualitätskontrolle und, in Ländern ohne Embryoschutzgesetze, als Selektionsmarker, um Embryonen mit höchster Überlebenschance auszuwählen, benötigt.

In den letzten Jahren wurde sHLA-G in Embryokulturen als möglicher Marker für die Voraussage einer Schwangerschaft nach ART von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert. Bis jetzt analysierten 16 verschiedene Studien die Wichtigkeit von sHLA-G für die Implantation des kultivierten Embryos nach ART. Dabei beobachteten 5 verschiedene Arbeitsgruppen eine Assoziation der sHLA-G Expression in Embryokulturen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für einen Schwangerschaftserfolg nach ART-Behandlung (Menicucci et al., 1999; Fuzzi et al., 2002; Criscuoli et al., 2005; Noci et al., 2005; Rizzo et al., 2007; Sher et al., 2004, 2005 und 2007; Yie et al., 2005; Desai et al., 2006; Fisch et al., 2007). Andere Studien konnten kein sHLA-G in Embryokulturen detektieren (Van Lierop et al., 2002; Sageshima et al., 2004 und 2007; Shaikly et al., 2008).

Die kontroversen Ergebnisse könnten den unterschiedlichen Detektionsmethoden im ELISA Verfahren, wie Antikörperwahl, Substrate und entsprechende Kontrollen, zugeschrieben werden. Da die Kulturüberstände der einzelnen IVF-Zentren oft variieren und Volumina von 10µl bis zu 1000µl aufweisen, ist die bisherige ELISA Technik, die ein großes und konstantes Probenvolumen bedarf, ebenfalls für viele Zentren ungeeignet. Zusätzlich beträgt die Dauer eines solchen Assays etwa 6 Stunden. Ein Testsystem zur Detektion von sHLA-G in Embryokulturen, dass zeitlich in einen ART-Ablauf integriert werden kann, bedarf somit weiterer Entwicklung.

Wie HLA-G, werden auch MICA Moleküle während einer Schwangerschaft fast selektiv von Synzitiotrophoblastzellen der Plazenta exprimiert. Im peripheren Blut schwangerer Frauen konnten ebenfalls sMICA Moleküle detektiert werden (Porcu-Buisson et al., 2007; Mincheva-Nilsson et al., 2006). Entsprechend dazu, war die Expression von NKG2D Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Blutlymphozyten schwangerer Frauen verringert (Mincheva-Nilsson et al., 2006). Somit könnte MICA bzw. sMICA während einer Schwangerschaft als immunmodulatorisches Molekül agieren und die Herabsetzung der maternalen Immunantwort gegen den Embryo begünstigen.

## 1.7 Zielsetzung

Die Schwangerschaft ist die einzige Situation in der eine natürliche Immuntoleranz gegenüber einem Allograft, dem Fetus, geschaffen wird. Die Immuntoleranz wird u.a. durch die fehlende Expression klassischer HLA Klasse I und II Antigene bei gleichzeitiger Expression von nicht-klassischen HLA Klasse I Antigenen insbesondere HLA-G und MICA unterstützt. Diese nahezu selektive Expression an der feto-maternalen Grenzfläche, deutet auf einen möglichen prädiktiven Wert dieser Moleküle für Etablierung und Erhaltung einer Schwangerschaft an. Deswegen sollten sHLA-G und sMICA Moleküle in dieser Arbeit in Körperflüssigkeiten, wie Embryokulturen, Follikelflüssigkeiten und Serumproben schwangerer Frauen nachgewiesen werden.

Ausgehend von der funktionellen Bedeutung von sHLA-G sollte der diagnostische Wert dieses Moleküls als prognostischer Parameter für die Vorhersage einer Schwangerschaft nach Assistierter Reproduktions-Technik (ART) systematisch untersucht werden. Dafür sollte zur Bestimmung von sHLA-G in Kulturüberständen eine hochsensitive Technik entwickelt und etabliert werden, die in den Ablauf einer IVF-Behandlung integrierbar ist. Mit diesem Testsystem soll in einer bundesweiten multizentrischen Studie die Assoziation von sHLA-G und dem Schwangerschaftsausgang nach ART untersucht werden.

Ferner war Ziel dieser Arbeit die Expression und Funktion von sMICA/MICA in der Schwangerschaft zu untersuchen und zu klären, ob sMICA Moleküle als prädiktive Marker für eine Schwangerschaft geeignet sind.

Dafür wurden Follikelflüssigkeiten und seriell gewonnene Serumproben von Frauen mit normaler und tubarer Schwangerschaft sowie Frühaborten vor der Ovulation bis zur 8.Schwangerschaftswoche auf sMICA Moleküle untersucht. Des Weiteren sollten durch Zellkulturexperimente mit der MICA positiven Zelllinie HeLa (Zervixkarzinom) der Einfluss von schwangerschaftsrelevanten Hormonen auf die Expression von MICA/sMICA und die daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Ampuwa dH <sub>2</sub> O	Fresenius Kabi GmbH	SEV101
BCA Protein Assay Kit	Pierce	23235
BSA Fraktion V	AppliChem	A1391
EDC	Pierce	22980
FCS	Biochrom AG (Berlin)	S0115
Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Biosciences	17-1440-03
Mausserum	Dianova	015-000-120
MES-Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie	M-2933
Humanserum	Invitrogen	16050-130
NHS	Pierce	24510
Proteaseinhibitor-Cocktail	Calbiochem	539132
TMB Substrat Super Slow	Sigma-Aldrich Chemie	T5569

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

### 2.2 Kulturmedien

Medium	Firma	Bestellnummer
GM501 Kulturmedium	Gynemed GmbH & Co.KG	GM501H-050
Universal IVF-Medium	MediCult	10310125
RPMI 1640	Gibco	52400
X- VIVO 20	BioWhittaker	BE04-4482

### 2.3 Zellen

-HeLa (ATCC, LGC Standards GmbH)

-Insektenzellen SF9 (Gibco)

-NK-92 (DSMZ)

## 2.4 Antikörper

Verwendete Antikörper sind jeweils in Tabelle 2, S. 32 und Tabelle 3, S. 34 angegeben. Weitere Primär- bzw. Sekundärantikörper sind im Folgenden aufgelistet.

### Primärantikörper

Antikörper	Isotyp/Spezies	Spezifität	Firma
mAK $\alpha$ -HLA-G BSA frei MEM-G/9	IgG1 Maus	Humanes natives HLA-G mit $\beta$ 2m und Peptid	BmT
pAK $\alpha$ -human $\beta$ 2m	Kaninchen	humanes $\beta$ 2m	Dako
mAK AMOI	IgG1 Maus	humanes MICA	BAMOMAB
pAK $\alpha$ -MICA: BAF1300	IgG1 Ziege	humanes MICA	R&D
pAK $\alpha$ -PDIA6	IgG1 Kaninchen	humane Disulfid- Isomerase ERp5	USBiological
mAK $\alpha$ -Progesteron- Rezeptor	IgG1 Maus	humaner Progesteron- Rezeptor	Immunotech

### Sekundärantikörper

Antikörper	Subtyp	Konjugation	Firma
Ziege $\alpha$ Maus	F(ab)2 IgG(H+L)	R-PE	Immunotech
Ziege $\alpha$ Kaninchen	F(ab)2 IgG(H+L)	R-PE	Dianova
Streptavidin	-	HRP	R&D

## 2.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Rezept	
Säulenwaschpuffer	NaCl TRIS pH 8.0	0.5 M 0.5 M
NA-Acetatpuffer	NaCl Na-Acetat pH 3.5	0.5 M 0.1 M
Trispuffer I	NaCl TRIS pH 8.5	0.5 M 0.1 M
Phosphatpuffer	NaCl Na-Phosphat Na-Azid pH 7.2	0.15 M 0.05 M 0.01%
Trispuffer II	NaCl TRIS pH 7.6	0.15 M 0.05 M
Elutionspuffer	NaCl TRIS pH 11.5	0.15 M 0.01 M
Aktivierungspuffer (AP)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.2	0.1M
Kopplungspuffer (KP)	MES (2-N-Morpholino-ethansulfonic acid) pH 6.0	0.1M
Stopp-Lösung. ELISA	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O	3M
Waschpuffer ELISA	Tween 20 in PBS	0.05% (v/v)

<b>Puffer</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
BugBuster Extraktionsreagenz	Novagen	70921
Cell Dissoziation Buffer Enzyme-free PBS-based	Gibco	13151-014
Hüllenflüssigkeit (Sheath-Lsg.)	Qiagen	922905
PBS	Gibco	14190-136
Stabil Guard Choice	SurModics	SG02-1000

## 2.6 Hormone

<b>Hormon</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Humanes Choriongonadotropin (hCG)	ProSpecTany	HOR- 250
humanes follikelstimulierendes Hormon (FSH)	ProSpecTany	HOR- 253
Mifepristone (RU486)	Sigma-Aldrich Chemie	M8046
Progesteron, wasserlöslich	Sigma-Aldrich Chemie	P7556

## 2.7 Verbrauchsmaterial

Artikel	Firma	Bestellnummer
Facsröhrchen	Sarstedt	551579
96-Kavitäten Filterplatten	Millipore	MSBVN1210
96-Kavitäten Platte	Corning	2592
6-Kavitäten Platte	Becton Dickinson	353046
Neo Screw-Micro Tubes	Neolab	7-4714
Polypropylen-Röhrchen 15ml/ 50ml	Becton Dickinson/ Cellstar	352096/ 227261
Reaktionsgefäße 1.5ml/2ml	Eppendorf	
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson	353014
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson	353135

## 2.8 Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus
ELISA Reader Elx808 BIO	BIO TEK Instruments
FACS Calibur	Becton Dickinson
Luminex 100 IS <sup>TM</sup>	Luminex Corp.
Microplate Autowasher Elx405	BIO TEK Instruments
Mikrozentrifuge 200	Hettich
MultiScreen <sub>HTS</sub> Vacuum Manifold	Millipore
pH-Meter	MultiCal
Rotator REAX2	Heidolph
Schüttler	IKA-MTS
Zellzähler	Sysmex
Zentrifuge 3.0R	Heraeus



## 2.9 Herstellernachweise

Amersham pharmacia biotech	Freiburg, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
BAMOMAB,	München, Deutschland
BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Beckman Coulter Inc.	Krefeld, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Bio-Rad	München, Deutschland
BmT GmbH	Meerbusch, Deutschland
B.Braun	Melsungen, Deutschland
Cambrex	Verviers, Belgium
Chemicon	Hofheim, Deutschland
Costar GmbH	Bodenheim, Deutschland
DakoCytomation	Hamburg, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
Dynal Biotech	Oslo, Norway
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
GE Healthcare	München, Deutschland
GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH)	Burgwedel, Deutschland
Gibco (Invitrogen)	Karlsruhe, Deutschland
Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Gynemed GmbH & Co. KG	Lensahn, Germany
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hoffmann-LaRoche AG	Basel, Schweiz
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Jackson ImmunoResearch	Newmarket, Suffolk
J.T.Baker	Deventer, Niederlande
Luminex Corp.	Austin, Texas, USA
MBI Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
MediCult Inc.	Napa, USA
Merck	Haar, Deutschland
Millipore	Billerica, USA

Molecular Devices	München, Deutschland
Nunc	Wiesbaden, Deutschland
One Lambda Inc.	Canoga Park, USA
Pierce	Rockford, USA
ProSpecTany	Rehovot, Israel
Qiagen	Hilden, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis; USA
Roche	Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Seromed Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Serotec	Düsseldorf, Deutschland
Serva Feinbiochemica	Heidelberg, Deutschland
Surmodics Inc.	Thomasberg, Deutschland
Systemex	Norderstedt, Deutschland
The Baker Company	Stanford, USA
Tomtec	Hamden, CT, USA
USBiological	Swampscott, USA

### **3. Methoden**

#### **3.1 Aufreinigung eines Standardreagenz für die Quantifizierung von sHLA-G Molekülen**

Bei der Entwicklung eines Nachweissystems für sHLA-G in Embryokulturüberständen mussten folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- Etablierung eines Standardreagenz (3.1)
- Etablierung eines Testverfahrens auf Basis der Luminex®-x-MAP® Technologie (3.2)

Die Insektenzellen SF9, die mit humanen  $\beta$ 2m assoziierten sHLA-G5 Molekülen transfiziert worden sind, werden mit dem Lysepuffer BugBuster (1g Zellpellet/5ml BugBuster) und einem Proteaseninhibitor-Cocktail (Calbiochem) versetzt und homogenisiert. Die Suspension wird für 20 min bei RT rotiert und anschließend 20 min bei 4°C und 20.000g zentrifugiert. Etwa 10 ml vom Überstand der lysierten Zellen werden über die W6/32- Säule aufgereinigt.

Die NHS (N-Hydroxysuccinimid)-aktivierte Sepharose (GE Healthcare) wird 2x mit kalter 1mM HCl gewaschen. Der Antikörper W6/32 (Serotec), der eine monomorphe Determinante von Klasse I in Kombination mit  $\beta$ 2m erkennt (Parham et al., 1979) wird hier verwendet, um die sHLA-G5 Moleküle aus einem Zelllysat aufzureinigen. Dazu wird die Antikörperlösung auf den pH Wert 8.1 eingestellt und in einer Konzentration von 1mg/ml Säulenmaterial gebunden. Die Kopplung des Antikörpers erfolgt über Nacht bei 4°C.

Danach wird der nicht gebundene Antikörper abgenommen und die Säule mit Säulenwaschpuffer (siehe 2.5), pH 8.0 gewaschen, um noch freie NHS-Stellen zu inaktivieren.

Vor der ersten Benutzung wird die gekoppelte Säule äquilibriert: Dazu wird abwechselnd mit Na-Acetat- und Tris-puffer, pH 3.5 und pH 8.5 (siehe 2.5), gewaschen. Die W6/32-Säule wird in Phosphatpuffer pH 7.2 (siehe 2.5) neutralisiert und bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte unter Verwendung des Pharmacia Äkta Explorers und des dazugehörigen Programms Unicorn. Der Systemdruck, die

Leitfähigkeit und Proteinverläufe bei 220 bzw 280 nm wurden während des gesamten Laufes kontrolliert.

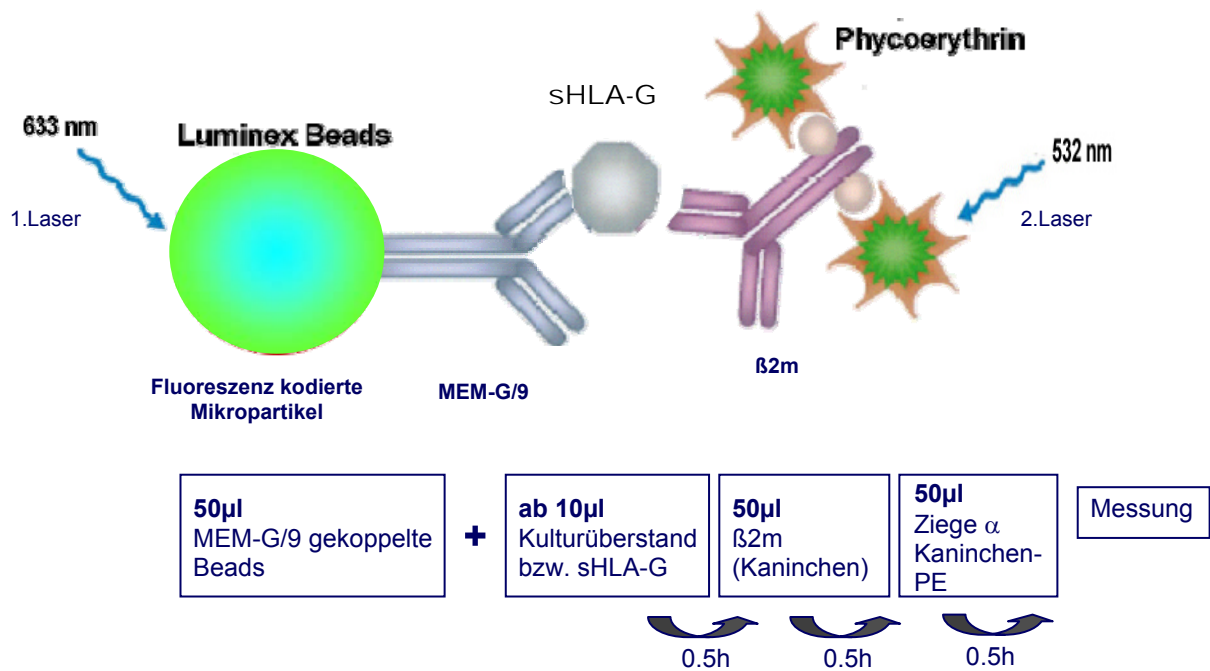
Vor Aufreinigung wird die W6/32-Säule mit Phosphatpuffer (siehe 2.5), pH 7.2 gespült. Das Zelllysat wird mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nicht gebundene Proteine werden mit Hilfe eines Trispuffers, pH 7.6 (siehe 2.5) heraus gewaschen und die gebundenen sHLA-G5 Moleküle mit dem Elutionspuffer (siehe 2.5), pH 11.5 eluiert. Nach der Elution werden Fraktionen bei denen ein optisches Signal >100 mAU (280 nm) auftrat, vereinigt und mit HCl neutralisiert.

Anschließend wird der Proteingehalt der sHLA-G Fraktionen mit einem kommerziell erhältlichen Protein Assay (BCA, Pierce) nach Angabe des Herstellers gemessen.

Die Reinheitsbestimmung der Proteine wurde nach Standardmethoden mittels Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) von PD Dr. Rebmann (Universitätsklinikum Essen, Institut für Transfusionsmedizin, AG Biochemie; Rebmann et al., 2005) geprüft.

### **3.2 Die Luminex-xMAP® Technologie**

Die Luminex-xMAP® Technologie ist eine Variante der Durchflusszytometrie mit zwei Lasern. Anstelle von Zellen werden jedoch fluoreszenzkodierte Polystyrenmikropartikel, so genannte Mikrosphären verwendet. Der Bestimmungslaser (635nm) identifiziert die Fluorochrome an den einzelnen Mikrokugeln, während der Reporterlaser (532nm) die gebundenen fluoreszierenden Moleküle des Detektionsreagenz an der Oberfläche der Mikrokugeln quantifiziert. Das Luminex 100 IS™ System zählt eine gleichbleibende Anzahl Mikrokugeln pro Probe und bestimmt die Fluoreszenzintensität der gebundenen Moleküle. Die gezählten Moleküle werden in medianer Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Die fluoreszenzkodierten Mikrosphären gibt es bisher in 100 verschiedenen Farbkodierungen. So können 100 verschiedene Analyte in einer Probe nach Art eines konventionellen Sandwich ELISA bestimmt werden (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der sHLA-G Bestimmung mit dem Luminex®-x-MAP®- System. MEM-G/9 gekoppelte Beads binden sHLA-G Moleküle, welche durch anti  $\beta$ 2m Antikörper und dem Phycoerithrin gekoppelten Zweitantikörper detektiert werden.

### 3.2.1 Aktivierung und Kopplung der Mikrosphären

Als Basis wurde das Kopplungsprotokoll des Herstellers (unter [www.luminexcorp.com](http://www.luminexcorp.com) oder [www.miraibio.com](http://www.miraibio.com)) mit folgenden Modifikationen verwendet:

Im Gegensatz zu dem Originalprotokoll wurden die Mikrobeads keiner Ultraschallbehandlung unterzogen, um zusätzliche schädliche Einflüsse auf die Mikrosphären zu verhindern. Stattdessen wurden die Mikrosphären jeweils 1 min gevortext. Um die Mikrosphären in einer optimalen Einzelpartikelsuspension zu halten, wurde mit StabilGuard Choice (SurModics Inc.) gewaschen, geblockt, gelagert und als Assaypuffer bei der Testdurchführung verwendet.

Die Stocklösung der karboxylierten Mikrosphären wurde durch Vortexen 1 min resuspendiert. Pro Kopplungsansatz werden eine Million Beads verwendet. Vor jeder Kopplung werden die Mikrosphären mit dest. Wasser gewaschen. Die pelletierten

Mikrosphären werden mit 80µl schwach saurem Aktivierungspuffer (AP) pH 6,2 (siehe 2.5) aufgenommen und nach vollständiger Resuspension mit 10µl Sulfo-NHS (50mg/ml) und 10 µl EDC (50 mg/ml) versetzt. Die Aktivierung der Beads erfolgt lichtgeschützt für 20 min auf dem Schüttler.

Nach der Aktivierung werden die überschüssigen Aktivierungsreagenzien durch waschen mit AP und Kopplungspuffer (KP) (siehe 2.5), pH 6 entfernt. Die Beads werden auf eine Konzentration von 10.000/µl in KP eingestellt und resuspendiert. Für die Kopplung wird der Antikörper in 400µl KP aufgenommen. 100µl der eingestellten Beadsuspension werden mit der Kopplungs-Antikörperlösung 2h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Nicht gebundene Antikörper werden durch waschen mit StabilGuard Choice entfernt. Schließlich werden die gekoppelten Beads in 1000µl StabilGuard Choice aufgenommen und im Cytometer gezählt (Sysmex) um die endgültige Anzahl der Beads zu bestimmen. Um die Kopplungseffizienz und die Menge des gebundenen mAK MEM-G/9 zu kontrollieren, werden 1250 der gekoppelten Beads mit 0.8 µg eines Ziege anti-Maus IgG PE-konjugiertem Antikörpers (Beckman Coulter Inc.) in 50 µl 30 min im Dunkeln inkubiert.

Die gekoppelten Beads wurden nur verwendet, wenn die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) über 15000 lag. Gekoppelte Beads können 3 Monate ohne Fluoreszenzverlust verwendet werden.

### **3.2.2 Testentwicklung zur Bestimmung von sHLA-G aus Kulturüberständen**

Für die Detektion und Quantifizierung von sHLA-G aus Embryonenkulturüberständen sollte das international validierte ELISA Format (Rebmann et al., 2005) an die Luminex ®-x-MAP® Technologie adaptiert werden. Kritische Testparameter wurden mit Hilfe des Standardreagenz in Konzentrationen von 0.1 bis 20 ng/ml und IVF-Medien (GM501, Gynemed GmbH & Co.KG; Universal IVF-Medium, MediCult) als negative Kontrollen ausgetestet.

In Pilotstudien wurden folgende kritische Parameter untersucht:

1. verschiedene Beschichtungsantikörper
2. Inkubationszeiten- und Temperaturen
3. Detektionsantikörper und
4. variierende Probenvolumina

Um eine effiziente Antikörperbindung, d.h. Fremdproteinkopplung zu verhindern, wurden nur BSA freie Antikörper verwendet. In Vorversuchen wurden zwei HLA-G spezifische Antikörper, MEM-G/9 (BmT GmbH) und MEM-G/11 (Exbio) und der pan HLA Klasse I Antikörper W6/32 (Serotec) als Positivkontrolle benutzt, um sHLA-G zu detektieren. Die Antikörper wurden in seriellen Untersuchungen in Kopplungskonzentrationen von 10-100µg getestet. Für die monoklonalen Antikörper MEM-G/9 wurde eine optimale Kopplungskonzentration von 30µg/1 Million Mikrosphären bestimmt.

Um das System in einen ART Ablauf zu integrieren, mussten im Vergleich zum konventionellen ELISA Assay die Inkubationszeiten erheblich gekürzt und weitere Parameter vereinfacht werden. In Voruntersuchungen wurde Raumtemperatur (Luminex) im Vergleich zu 37°C (Rebmann et al., 2005) und Inkubationszeiten von jeweils 30 min (Luminex) zu 1,5 h (Rebmann et al., 2005) miteinander verglichen.

Desweiteren wurde der unkonjugierte polyklonale Antikörper Kaninchen gegen humanes  $\beta$ 2m der Firma Dako zur Detektion von gebundenem sHLA-G eingesetzt. Für die Messung von sHLA-G aus Embryonenkulturen wird ein volumenunabhängiges System benötigt, da je nach IVF-Zentrum Embryokulturen in einem Volumen von 10µl bis 1000µl vorliegen können. Mit Hilfe der Beads-Technologie ist ein Testsystem entwickelt worden, mit dem sehr kleine (ab 10µl) wie auch größere Volumina untersucht werden können.

Ansätze in Volumen kleiner als 200µl wurden mit Hilfe einer Filterplatte, Ansätze größer als 200µl wurden in Eppendorfgefäßen gemessen. Nach Testablauf wurden die Testansätze aus den Eppendorfgefäßen in die Filterplatten zum Messen überführt.

Folgende Antikörperkombinationen wurden in Konzentrationen von 0.5 µg/ml bis 200 µg/ml für die Bestimmung von sHLA-G untersucht (Tab. 2).

Für das neue Luminex®-x-MAP® Testsystem wurde schließlich der pAK Kaninchen anti human  $\beta$ 2m und Ziege anti-Kaninchen F(ab)2 anti IgG PE verwendet.

**Tabelle 2: Auflistung der untersuchten Detektionsantikörper für die sHLA-G Bestimmung.** PE = Phycoerythrin,  $\beta$ 2m = beta2-Mikroglobulin, - = kein bzw. geringer Nachweis, ++ = deutlicher Nachweis von sHLA-G

Primärantikörper	Hersteller	Zweitantikörper	Hersteller	Ergebnis
mAK Kaninchen anti human $\beta$ 2m –Biotin	Acris	Streptavidin-PE	Molecular Probe	-
pAK Kaninchen anti human $\beta$ 2m –Biotin	Serotec	Streptavidin-PE	Molecular Probe	-
	Acris	Streptavidin- PE	Lincoplex	-
	Serotec	Streptavidin- PE	Lincoplex	-
	Acris	Alexa Fluor	Molecular Probe	-
	Serotec	Alexa Fluor	Molecular Probe	-
pAK Kaninchen anti human $\beta$ 2m	Dako	Ziege anti-Kaninchen F(ab)2 anti IgG PE	Southern Biotech	-
			Acris	++
		Abcam	++	
		Dianova	++	

### 3.2.3 Optimierte Testdurchführung für die Bestimmung von sHLA-G mit der Luminex®-x-MAP® Technologie

Zur Erleichterung der Testdurchführung, speziell bei späteren Messungen von vielen Proben gleichzeitig, wurden 96 Kavitäten-MultiScreen Filterplatten verwendet (Millipore). Die Filter dieser Platten lassen Flüssigkeiten, aber keine Mikrosphären durch. Ebenfalls bindet das Filtermaterial keine Proteine. Aufgrund dieser Platten wurden Waschvorgänge mit Hilfe einer Vakuumpumpe- und Kammer (MultiScreen HTS Vacuum Manifold; Millipore) durch Vakuumfiltration durchgeführt. Dabei wird die Filterplatte auf die Kammer gesetzt und die Waschlösung durch Anlegen eines Vakuums abgezogen. Hierbei sollte der Druck nicht größer als 25 mbar sein.

Alle Waschschritte werden mit 150 $\mu$ l Sheathlösung (Luminex Corp.) und alle Antikörperinkubationen werden in 50 $\mu$ l StabilGuard Choice und der Inkubationszeit



von 30 min durchgeführt. Es wurden Doppelansätze gemessen, wenn dies durch das Probenvolumen nicht begrenzt war.

Vor Testdurchführung werden die mit dem monoklonalem Antikörper (mAK) MEM-G/9 gekoppelten Mikrosphären auf eine Konzentration von 25 Beads/ $\mu$ l StabilGuard Choice eingestellt. Die Filterplatte wird für 10 min mit PBS äquilibriert. Nach Entfernung des PBS werden 50 $\mu$ l der eingestellten Mikrosphärensuspension (1250 Beads) pro Kavität dazugegeben. Danach werden die entsprechenden Kulturüberstände, die Standardreihe und die Negativkontrollen zu den Beads gefügt. Das Probenvolumen kann entsprechend des Kultivierungsvolumens der Embryonen zwischen 10 $\mu$ l und 200 $\mu$ l variieren. Die Inkubation erfolgt lichtgeschützt für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach einmaligem Waschen werden die Beads mit einer Antikörperlösung (96 $\mu$ g/ml polyklonal AK (pAK) Kaninchen anti human  $\beta$ 2m (Tab. 2) versetzt. Die nicht gebundenen Antikörper werden entfernt. Der gebundene Detektionsantikörper wird mit einem sekundärem Antikörper Ziege F(ab)<sub>2</sub> anti Kaninchen-IgG-PE (Tab. 2; 2 $\mu$ g/ml) detektiert. Nach erneutem waschen werden die Beads in 90 $\mu$ l Sheathfluid aufgenommen und im Luminex 100 IS<sup>TM</sup> System (Luminex Corp.) gemessen. Insgesamt werden 100 Mikrosphären jeder Probe analysiert. Die Ergebnisse werden in medianer Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt.

### **3.3 Bestimmung von löslichen klassischen HLA und HLA-G Molekülen im ELISA**

Lösliche Klasse I Moleküle und sHLA-G ELISA Techniken wurden exakt nach dem publizierten Protokoll (Rebmann et al., 2005) durchgeführt.

Diese ELISA Systeme wurden für die Untersuchung von Follikelflüssigkeiten, und der sHLA-G ELISA wurde für die vergleichende Untersuchung von Luminex zum Referenz ELISA verwendet.

### 3.4 Bestimmung von sMICA Konzentrationen

#### 3.4.1 Spezifität unterschiedlicher MICA Antikörper

Mit Hilfe des modifizierten LABScreen MICA Single Antigen Antibody Detection Assays (One Lambda Inc.) wurde die Bindungsfähigkeit von 9 MICA spezifischen Antikörpern getestet (Tab. 3).

**Tabelle 3: MICA spezifische Antikörper.** mAK = monoklonaler Antikörper, pAK = polyklonaler Antikörper.

Antikörper	Spezies	Subklasse	Firma	Konjugation
Ziege -anti-MICA: BAF1300	Ziege	pAK IgG	R&D	Biotin
AMOI	Maus	mAK IgG1	BAMOMAB	keine
BAMO3	Maus	mAK IgG2a	BAMOMAB	keine
BAMOI (MICA/MICB)	Maus	mAK IgG1	BAMOMAB	keine
6D4 (MICA/MICB)	Maus	mAK IgG1	Santa Cruz	keine
MICA Nr.841612	Maus	mAK	DuoSet ELISA KIT, R&D	keine
MICA 159227	Maus	mAK IgG2b	R&D	keine
MICA/B 159207 (JOB02)	Maus	mAK IgG2a	R&D	keine
MICA/B 159233	Maus	mAK IgG1	R&D	keine

Bei diesem Assay werden farbkodierte Mikrobeads, an die 10 verschiedene MICA Antigene (MICA\*001, \*002, \*004, \*007, \*009, \*012, \*017, \*018, \*019, \*027) gebunden sind, verwendet. Jeder von den MICA spezifischen Antikörpern wird mit diesem Gemisch der Mikrobeads in einer 96 Kavitäten Platte inkubiert. Die zu testenden Antikörper binden entsprechend ihrer Spezifität an die Beads. Die gebundenen Antikörper werden mit PE-konjugiertem anti-Ziege bzw. anti-Maus IgG detektiert. Die Fluoreszenzemission des PE von jeder einzelnen Mikrokugel wird im Luminex erfasst und mit der zugehörigen Software ausgewertet. Positive und negative Kontrollen sind in den entsprechenden Beadpopulationen für die Testvalidierung eingeschlossen.

### **3.4.2 Optimierte Testdurchführung für die Bestimmung von sMICA im ELISA**

Alle Proben- und Antikörperinkubationen wurden in einem Volumen von 100µl pro Vertiefung der Mikrotiterplatte (Costar GmbH), und alle Waschschrte werden in einem Volumen von 300µl pro Kavität durchgeführt.

Für die Detektion von sMICA wird die Mikrotiterplatte mit dem mAK AMO1 (BAMOMAB) in einer Konzentration von 5µg/ml über Nacht bei 4°C beschichtet. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Freie Bindungsstellen wurden mit einer 1%igen BSA-Lösung in PBS blockiert. Als Standard für die Quantifizierung von sMICA diente rekombinantes sMICA (R&D Systems) in Verdünnungen von 5 ng/ml bis 0.156 ng/ml. Die Kulturüberstände wurden pur, und Serum- bzw. Plasmaproben 1:3 mit 1% BSA/PBS verdünnt aufgetragen und für 2h bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Bindung von sMICA Molekülen an die Mikrotiterplatte, wurden diese mit dem pAK Biotin-konjugierten anti-human MICA Antikörper (400ng/ml; BAF1300, R&D Systems) bei 37°C, 2h detektiert. Visualisierung des Immunkomplexes erfolgte nach Inkubation mit Streptavidin-HRP (R&D Systems; 30min, RT) und dem Substrat TMB (Sigma Aldrich). Der Substratumsatz wurde bei 450 nm im ELISA Reader gemessen.

## **3.5 Untersuchungen zu Regulation und Funktionalität von MICA bzw. sMICA**

### **3.5.1 Zelllinien und Zellkultur**

Für die Untersuchung der Effekte verschiedener Hormone auf die Expression von MICA wurde die adhärent wachsende Zelllinie HeLa (ATCC, LGC Standards GmbH) verwendet. Diese Zellen wurden 1951 aus humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms isoliert. HeLa Zellen, als Tumorzellen des Reproduktionstrakts, exprimieren MICA Moleküle und sind für die Expression von Progesteronrezeptoren und LH/hCG (Luteinisierendes Hormon/humanes Chorion Gonadotropin)-Rezeptoren bekannt.

Zur Analyse der Effekte von MICA/sMICA auf die NK-Zell-Aktivität wurde neben Lymphozyten von Normalpersonen die NK92 Zelllinie, isoliert aus peripherem Blut eines Non-Hodgkin Lymphom Patienten (DSMZ) verwendet.

Die Zelllinien bzw. die isolierten Lymphozyten wurden im Brutschrank bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Dem Kultivierungsmedium RPMI 1640 (Gibco) wurde 10 % FCS, 200 U/ml Antibiotikum (Penicillin- Streptomycin, Invitrogen) und zusätzlich 200 µg/ml L-Glutamin (Invitrogen) zugefügt.

NK-92 Zellkulturen wurde zusätzlich 10 ng/ml IL-2 zugefügt.

Zur Passagierung der adhärenenten HeLa Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit Zelldissoziationspuffer (Gibco) 5 min bei 37°C inkubiert. Der Dissoziationspuffer wird durch Waschen der Zellen mit Medium entfernt.

Lymphozyten von gesunden Probanden wurden über die Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert und auf 1 Million/ml Kulturmedium eingestellt. Die Lymphozytensuspensionen wurden, wie auch die NK92 Zellen, jeweils 24h vor jedem Testansatz mit 20 ng/ml IL-2 stimuliert.

Für die Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zellen mit Trypanblaulösung (Gibco) gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Für die Stimulationsversuche wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit 5 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und Antibiotikum 24 h kultiviert. Danach wurde der Überstand abgenommen und 4 ml der entsprechenden Stimulationsmedien zugegeben: Die Zellen wurden mit humanem Chorion Gonadotropin (hCG, ProSpecTany), Follikelstimulierendem Hormon (FSH, ProSpecTany) und wasserlöslichem Progesteron (Sigma-Aldrich) mit oder ohne dem Progesteron-Antagonisten Mifepristone/RU486 (Sigma-Aldrich) behandelt. Die Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen reichten von 10 ng/ml bis 1000 ng/ml (bzw. U/ml) (Yie et al., 2006). Alle Experimente wurden in serumfreien Medium X-VIVO 20 (Cambrex) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente X-VIVO 20 Medium ohne Zusatz.

Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und im sMICA ELISA eingesetzt (siehe 3.4.2). Die behandelten Zellen wurden mit Hilfe des enzymfreien Dissoziationspuffers (Gibco) geerntet. Die Zellzahl der einzelnen Stimulationsansätze und die Viabilität der Zellen wurden bestimmt. Die stimulierten Zellen wurden auf MICA und ERp5 Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch untersucht (3.5.2) und/oder als Zielzelle bei der Aktivitätsmessung von NK-Zellen verwendet (3.5.2). Etwa  $1 \cdot 10^6$  behandelte HeLa Zellen wurden zusätzlich auf MICA bzw. ERp5 mRNA Gehalt analysiert (3.5.3).

### 3.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Mit dem FACS- (Fluorescence Activated Cell Sorter) Gerät können durchflusszytometrisch Oberflächenmoleküle von Zellen analysiert werden. Dazu werden Zellen mit fluorochromkonjugierten Antikörpern, die gegen das zu bestimmende Molekül gerichtet sind, gefärbt. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienen PE (Phycoerythrin), FITC (Fluoresceinisothiocyanat), APC (Allophycocyanin) und PerCP (Peridininchlorophyll Protein). Als Negativkontrollen werden Zellen mitgeführt, die mit Antikörpern des gleichen Isotyps inkubiert worden sind.

Vor der Antikörperbehandlung wurden mögliche Fc-Rezeptoren durch eine Lösung aus PBS und 10% Humanserum über 30 min geblockt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Pro Stimulation bzw. FACS-Färbung wurden die Zellen auf je 500.000 aufgeteilt. 500.000 Zellen wurden mit 1.5 µg des humanen MICA Antikörper AMO1 (BAMOMAB) und PE-konjugiertem F(ab)2 Ziege gegen Maus Antikörper (0.5µg; Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Die ERp5 Detektion erfolgte mit 1.5 µg des spezifischen pAK Kaninchen anti human ERp5 (USBiological) und PE-konjugiertem F(ab)2 Ziege anti Kaninchen Antikörper (0.5µg; Jackson Immunoresearch). Als Stimulationskontrollen dienten unstimulierte Zellen, die über den gleichen Zeitraum kultiviert worden sind. Alle Inkubationen der Antikörper wurden bei Raumtemperatur 30 min durchgeführt. Zwischen und nach allen Färbeschritten wurden die Zellen jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und in 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Für die Messung der Oberflächenmoleküle wurde der FACS Calibur (Becton Dickinson) und für Datenerfassung -und evaluation die CellQuest Software (Becton Dickinson) verwendet.

Für die Aktivitätsmessung wurden NK Zellen von vier Normalpersonen mit dem NK Cell Negative Isolation Kit (DynaL Biotech) isoliert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Zelllinie NK-92 (DSMZ) auf ihre Aktivität untersucht.

Als Zielzellen wurden Progesteron und/ oder Antagonisten und nicht stimulierte HeLa Zellen verwendet. Zur NK-Zell Aktivierung wurden NK-Zellen als Effektorzellen und HeLa als Zielzellen im Verhältnis von 5:1 über 3h bei 37°C in Gegenwart von 10 µl CD107a/LAMP-1-FITC (Lysosom Assoziiertes Membran Protein-1; BD Biosciences)

inkubiert. Zu jedem Reaktionsgemisch wurden 5 µl CD56-APC (BD Biosciences) zugegeben. Als Kontrolle dienten NK-Zellen ohne Zielzellen mit und ohne Isotypenkontrollen. Die NK-Zell Aktivität, die zu der CD107a Expression auf der Zelloberfläche korreliert, wird durchflusszytometrisch analysiert (Aktas et al., 2009).

### **3.5.3 Reverse Transkriptase und Real Time PCR**

Die mRNA Analysen von MICA und ERp5 nach Hormonstimulation wurden von Frau Prof. Hardt (Universitätsklinikum Essen, Institut für Immunologie, AG Immungenetik) durchgeführt. Dabei wurde die Gesamt RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen) inklusive dem RNase-free DNase Set isoliert. 1,5µg der RNA wurde per Reverse Transkriptase PCR in einem Gesamtvolumen von 50µl in einem Gen-Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) in mRNA umgeschrieben. Die Reaktionsparameter waren 25°C für 10 min und 37°C für 120 min. Die Mengen der mRNA für MICA, ERp5 und dem Vergleichsprotein β-Aktin wurden mit dem ABI 7000 Real-Time PCR System quantifiziert. Dabei wurde TAqMan Universal PCR Master MIX und der TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) verwendet. 25µl der Reaktionen mit jeweils 1µl der cDNA wurden in Doppelansätzen durchgeführt. ΔCt Werte für MICA und ERp5 wurden mit β-Aktin als Standardgen berechnet.

### **3.5.4 Behandlung von Lymphozyten mit rekombinantem MICA**

Die Lymphozyten aus EDTA-Blut von Normalpersonen wurde mittels Ficoll-Dichtezentrifugation (GE Healthcare) separiert. Die gewonnenen Lymphozyten wurden auf  $1 \cdot 10^6$  /ml in serumfreiem Medium X-VIVO 20 (Cambrex) eingestellt und jeweils 1 ml der Zellsuspension in eine 24 Kavitäten Platte gegeben. 5 ng/ml der rekombinanten MICA-Fc Chimera (R&D) wurde pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen hinzugefügt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Lymphozyten, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden sind. Die Platte wurde 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 48h wurden die Kulturüberstände auf Zytokinfreisetzung getestet. Die Lymphozyten wurden geerntet und auf ihre Proliferationskapazität unter Mitogenzugabe analysiert.

### **3.5.5 Bestimmung der IL-10 und IFN $\gamma$ Freisetzung nach MICA Behandlung**

Für die Zytokinmessungen aus Kulturüberständen wurden die ELISA Sets BD OptEIA Set Human IL10 bzw. IFN $\gamma$ , von BD Biosciences verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

### **3.5.6 Lymphozyten Proliferationsassay nach MICA Behandlung**

Zelluläre in vitro Antworten gegenüber den Mitogenen Phytohämagglutinin (PHA, 0.5 - 4  $\mu\text{g/ml}$ ), Concanavalin A, (ConA, 5 - 40  $\mu\text{g/ml}$ ), Pokeweed Mitogen (PWM, 0.6 - 5  $\mu\text{g/ml}$ ), und anti-CD3 (OKT3, 0.03 - 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden mit Hilfe des standardisierten Testformats (Ottinger et al., 1996) quantifiziert. Dabei wurden 50,000 Zellen mit den entsprechenden Mitogenen in 200  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium (RPMI mit 10% Humanenserum) pro Kavität einer Mikrotiterplatte (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Mitogenkulturen wurden im 4-fachen Ansatz für 3 Tage kultiviert. Die Kulturen wurden mit 1  $\mu\text{Ci}$  H<sup>3</sup> Thymidin (TRA.120, spezifische Aktivität 5 Ci/mmol; Amersham) pro Kavität für die letzten 16h markiert. Danach erfolgte das Übertragen der Zellen auf einen Glasfaserfilter (Wallac, Turku, Finland) mittels eines Zell-Ernte Gerätes (Harvester 96, Tomtec) und die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität durch Szintillationszählung (1450 Microbeta Trilux, Wallac). Für die Auswertung wurde der zweithöchste Wert der H<sup>3</sup> Thymidin Aufnahme der Mitogen- und Autologkulturen (unstimuliert) verwendet (Lindemann et al., 2003). Counts per minute (cpm) Werte entstanden aus der Mitogen- minus der Autologproliferation.

## **3.6 Untersuchungsmaterial**

### **3.6.1 Untersuchungsmaterial zur Bestimmung von sHLA-G**

Die ovarielle Hyperstimulation wurde nach Standardprotokoll mit rekombinanten oder urinären follikelstimulierenden Hormonen (FSH) durchgeführt. Hauptsächlich wurde das lange Protokoll mit GnRH Agonisten verwendet, welche die endogene Gonatropinproduktion vor der Applikation von FSH herunterregulieren (Ludwig et al., 2004). Bei Verwendung von rekombinantem FSH zur Stimulation der Oozytenproduktion wurde zusätzlich rekombinantes Luteinisierendes Hormon (LH)

gegeben. In etwa 30 % der Fälle wurde das kurze Protokoll mit GnRH Antagonisten in Kombination mit FSH für die Stimulation angewendet (Huirne et al., 2004). Die Oozyten wurden 4-6h nach Eizellentnahme befruchtet (Fisch et al., 2001).

Die fertilisierten Oozyten wurden in 50µl Universal IVF Kulturmedium (MediCult Inc.) oder GM501 Kulturmedium (Gynemed GmbH & Co. KG) für die Pilotstudie, bzw. nach Standardprotokoll der jeweiligen Zentren, unter Öl bei 37°C in 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 89% N<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Dabei wurden die Embryonen einzeln, in Zweiembryonenkulturen oder in Dreiembryonenkulturen herangezogen. Nach Transfer der Embryonen wurde der verbleibende Kulturüberstand (10µl -1000µl) bis zur sHLA-G Testung bei -30°C aufbewahrt.

Bei der Analyse der Proben dienten Kulturmedien, die unter den gleichen Bedingungen, wie Medium mit Embryonen kultiviert wurden, als Negativkontrollen. Jedes an der multizentrischen Studie teilnehmendes Zentrum stellte eine Kontrolle des jeweils verwendeten Kulturmediums bereit.

Vor dem Transfer wurden alle Embryonen mikroskopisch untersucht und ihre Qualität in Bezug auf Zellzahl und Zellteilung begutachtet (Ziebe et al., 1997). Die Embryonen wurden in vier Grade (A - D) klassifiziert. Dabei wurden gleichgroße symmetrische Embryonen ohne Fragmentierung der Stufe A, ungleichmäßig große Embryonen mit < 20% Fragmentierung der Stufe B, Embryonen mit 20-50% Fragmentierung der Stufe C und Embryonen mit über 50% Fragmentierung der Stufe D zugeschrieben.

Eine klinische Schwangerschaft nach Transfer wurde mit Hilfe der transvaginalen Ultraschalluntersuchungen und dem Auftreten von fetalen Herztönen definiert. Eine erfolgreiche Schwangerschaft wurde als eine Lebendgeburt definiert. Biochemische Schwangerschaften (positiver hCG-Test) wurden nicht in die Schwangerschaftsrate einbezogen. Die Bestimmung eines spontanen Abortes resultierte nach sonographischer Untersuchung des Uterus, die den Abgang der Embryonalhüllen bzw. Embryos bestätigte.

Die Gründe für die Infertilität der Patienten wurden nur als weibliche, männliche, beidseitige oder idiopathische Infertilität angegeben und nicht weiter spezifiziert.



### 3.6.2 Embryonen- und Patienten spezifisches Profil der Pilotstudie

Für die Pilotstudie wurden 588 Embryokulturüberstände im Kinderwunschzentrum Köln gesammelt. Die Kulturüberstände resultierten aus 313 Zyklen (teilnehmende Frauen), entsprechend aus 54 IVF und 259 ICSI-Behandlungen (Tab. 4). Unabhängig von ihrem Alter, der Anzahl bereits vorausgegangener ART-Behandlungen und den Ursachen, die zur Infertilität führten wurden alle Patientinnen in die Studie einbezogen. Bei 20,7 % (N = 25) wurden weibliche Faktoren, bei 65 % (N = 206) wurden männliche Faktoren und bei 8 % (N = 25) wurde die Infertilität durch beide Partner hervorgerufen. Idiopathische Infertilität wurde bei 5,4 % (N = 17) der Patienten beobachtet.

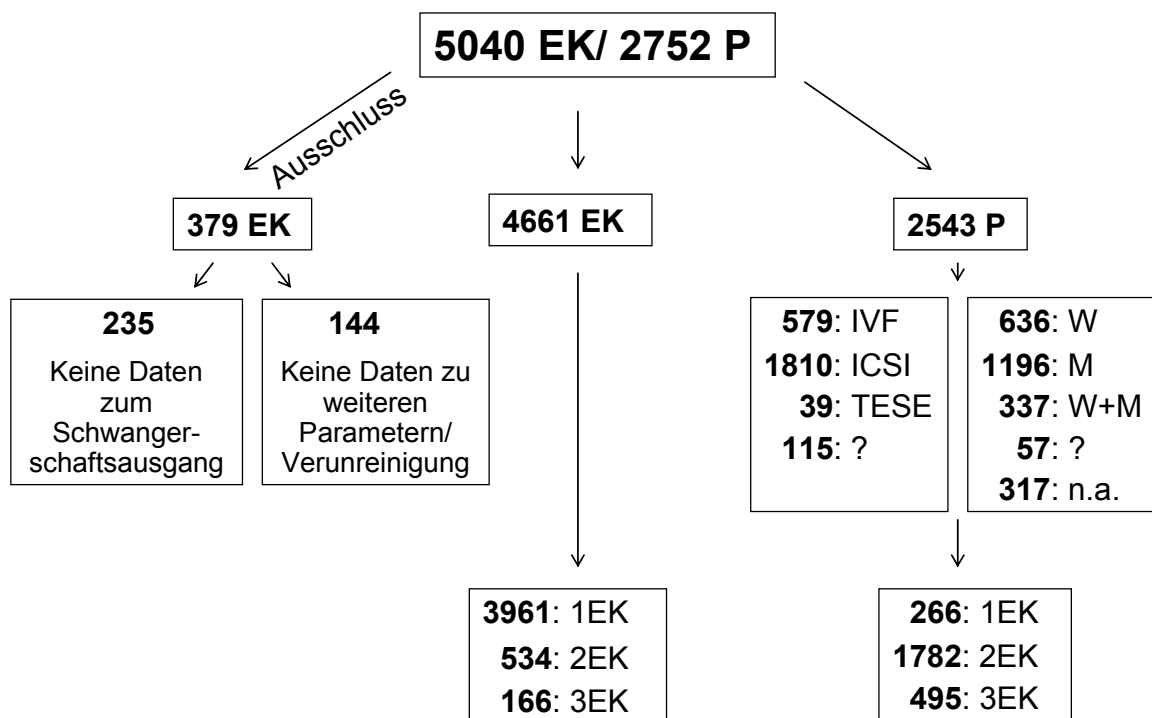
<b>Embryokulturen (EK)</b>				
	<b>1-EK</b>	<b>2-EK</b>	<b>3-EK</b>	<b>Σ</b>
<b>ART Technik</b>				
IVF	41	10	4	55
ICSI	303	20	7	330
ICSI TESE	9	1	0	10
Kryo IVF	36	1	2	39
Kryo ICSI	127	15	2	154
Σ	526	47	15	588
<b>Kulturdauer</b>				
48h	326	32	7	365
72h	198	13	8	219
96h	2	2	0	4
Σ	526	47	15	588

**Tabelle 4: Verteilung der sHLA-G analysierten Embryokulturen.** ART = assistierte Reproduktionstechniken, EK = Embryonenkulturen, IVF = in-vitro-Fertilization, ICSI = intrazytoplasmatische Spermieninjektion, TESE = testikuläre Spermiumextraktion, Kryo = Kryokonservierung.

526 Embryonen wurden einzeln, 47 in Zweiembryonenkulturen und 15 in Dreiembryonenkulturen kultiviert und post ICSI bzw. IVF nach 48h, 72h, oder 96h transferiert.

### 3.6.3 Embryonen- und Patienten spezifisches Profil der multizentrischen Studie

An der multizentrischen Studie nahmen 29 deutsche ART-Zentren teil. Es wurden insgesamt 5040 Embryonenkulturüberstände von 2752 Frauen gesammelt. Die Studie wurde durch das Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen bewilligt und alle Patientinnen gaben ihre Zustimmung. Die klinischen Daten wurden von den entsprechenden Zentren gesammelt und wurden uns übermittelt.



**Abbildung 5: Flussdiagramm aller gesammelter und einbezogener Embryokulturen.** EK = Embryokulturen, P = Patienten, IVF = in-vitro Fertilisation, ICSI = intrazytoplasmatische Spermieninjektion, TESE = testikuläre Spermienextraktion, W = weibliche Infertilität, M = männliche Infertilität, E = Embryo.

In die Studie einbezogen wurden 4661 Embryokulturen aus 2543 Zyklen. Die restlichen 379 Embryokulturen aus 209 Zyklen wurden ausgeschlossen, da die Daten zu Schwangerschaftsausgängen nicht vorhanden waren, das Volumen zu klein war oder die Überstände mit Öl verunreinigt waren (Abb. 5).

Infertilität der Paare war in 25.1 % (N = 636) durch weibliche Faktoren, in 47 % (N = 1196) durch männliche Faktoren und in 13.3 % (N = 337) durch beidseitige Faktoren verursacht. Idiopathische Infertilität kam bei 2.2 % (N = 57) der Paare vor und keine Informationen waren für 12.5 % der Zyklen (N = 317) verfügbar. Das mittlere Alter der Patientinnen betrug  $34.6 \pm 0.9$  (19-50 Jahre). Die mittlere Anzahl der vorhergegangenen ART-Versuche war  $1.32 \pm 0.03$  (0-22 Versuche). In 266 Zyklen wurde nur ein Embryo, in 1782 Zyklen zwei Embryonen und in 495 Zyklen drei Embryonen in den Uterus transferiert. Die mittlere Anzahl aller transferierten Embryonen beträgt in dieser Studie  $2.09 \pm 0.01$ .

Die Charakteristiken der Embryokulturen sind in Tabelle 8, S. 55 dargestellt. Da das Kulturvolumen von 10 $\mu$ l bis 1000 $\mu$ l variiert, wurden die Embryokulturüberstände in Gruppen zusammengefasst (10-100 $\mu$ l; 101-500 $\mu$ l; 501-1000 $\mu$ l). Insgesamt wurden 3961 Einzelembryokulturen, 534 Zweieimbryokulturen und 166 Dreieimbryokulturen in die Studie einbezogen. Die Entwicklungsgrade der jeweiligen Embryonen reichten von Zygote (N = 45), über 2-9 Zellstadium (N = 3861), 10-14 Zellstadium (N = 74), Morula (N = 43), bis zur Blastozyste (N = 438). In 191 (4.1%) der Fälle fehlte die Beschreibung des Entwicklungsgrades.

In 573 Zyklen wurden die Embryonen (N = 926) nach Kryokonservierung kultiviert.

Im Gegensatz zur Pilotstudie dauerte die Kultivierung der Embryonen 24h bis 96h. Dabei wurden die Embryonen entweder durchgehend kultiviert, oder aber während der Kultivierung in frisches Medium umgesetzt. Für 125 Zyklen wurden 255 Kulturüberstände nach Mediumwechsel gesammelt. Die restlichen Kulturüberstände wurden direkt nach Embryotransfer abgenommen. Für 304 Zyklen wurden ausschließlich Kulturüberstände (N = 481) von Tag 5 (120h) bzw. Tag 6 (144h) gesammelt.

Für die Assoziation von sHLA-G positiven Embryokulturen mit den Kulturbedingungen wurden alle Kulturüberstände in die Analyse einbezogen. Für die Assoziation mit den Patientenparametern wurden nur Kulturüberstände des letzten Kultivierungsschrittes, direkt vor dem Transfer, berücksichtigt.

In 1447 (31.3 %) der Fälle waren die morphologischen Einteilungen nicht verfügbar.

### **3.6.4 Untersuchungsmaterial zur Bestimmung von sHLA Molekülen in Follikelpunktaten**

Es wurden Follikelpunktate aus Ovarien von 11 Frauen durch Follikelpunktion gesammelt. Die ovarielle Hyperstimulation in der ART Behandlung wurde wie unter 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Nach Gewinnung der Follikelflüssigkeiten wurden diese zentrifugiert (500 g), aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Follikelpunktate wurden mittels ELISA Technik auf sHLA Klasse I, sHLA-G und sMICA untersucht.

### **3.6.5 Untersuchungsmaterial zur Bestimmung von sMICA Serumspiegel im Schwangerschaftsverlauf nach ART**

Serumproben von 62 Frauen, die sich einem ART Programm am Universitätsklinikum Bonn unterzogen, wurden seriell mit dem optimierten ELISA Format auf sMICA Werte untersucht.

Die Blutproben wurden während der Routineuntersuchungen gesammelt. Die erste Probe wurde während der hormonellen Stimulation vor der Ovulation entnommen. Weitere Proben wurden nach einem Schwangerschaftstest in der 4. Woche wöchentlich im Schwangerschaftsverlauf bis zur 8. Schwangerschaftswoche abgenommen. Die Blutproben wurden abzentrifugiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Insgesamt wurde bei 35 Frauen eine normale Schwangerschaft und bei 10 Frauen eine Eileiterschwangerschaft festgestellt. 17 Patientinnen erlitten einen Frühabort.

Um Normalwerte von sMICA im Blutplasma zu erhalten, wurden 22 Blutproben fertiler nicht schwangerer Frauen als präovulatorische Kontrolle untersucht.

## **3.7 Statistische Analyse**

Alle metrischen Ergebnisse werden in Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Nach Testung der Gaußschen Verteilung wurden Korrelationsanalysen nach Spearman, Pearson, Student t-Test oder dem Mann-Whitney U Test durchgeführt. Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mit der einfaktoriellen Analyse, Varianzanalyse (ANOVA) oder Kruskal-Wallis Test

untersucht. Kategorische Daten wurden mit dem  $\chi^2$  Test analysiert. Für die Definition von Embryonenkulturen als sHLA-G positiv wurde mit der Stoller's nichtparametrischen Diskriminanzanalyse ein Grenzwert festgesetzt, um optimale Sensitivitäts- und Spezifitätswerte für die Voraussage einer Schwangerschaft erhalten zu können. Der mittlere Grenzwert betrug  $14 \pm 1.2$  SEM % über den Negativkontrollen. Nur Kulturüberstände, die eine höhere MFI als der Grenzwert aufwiesen, wurden in die sHLA-G Quantifizierung einbezogen.

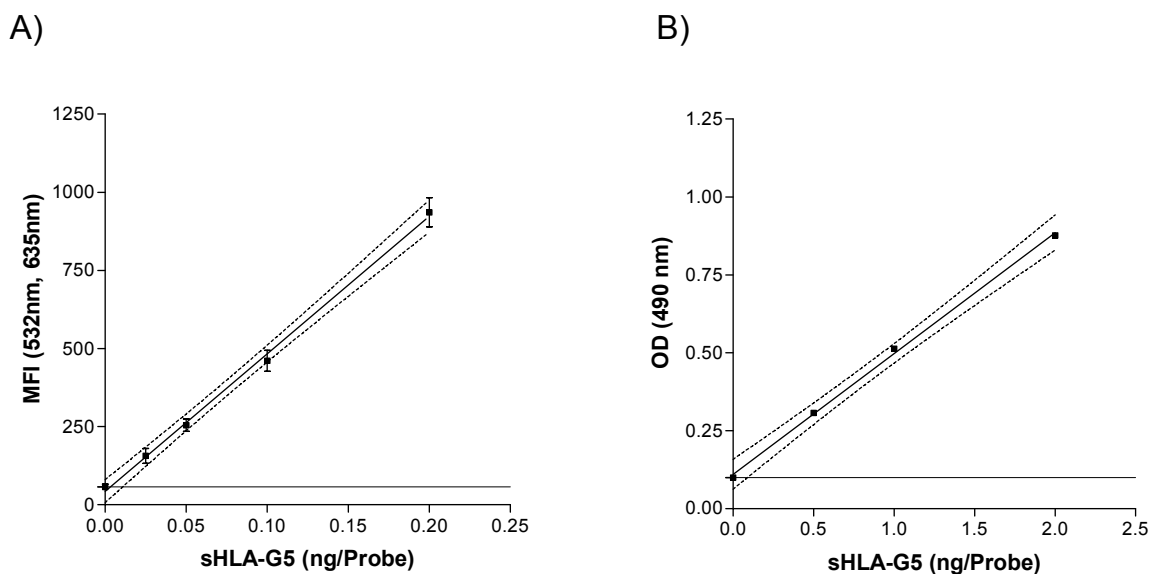
Die statistische Analyse erfolgte mit dem SPSS Programm für Windows (Version 15) oder BiAS für Windows (Version 8.3.6). Berechnungen analytischer Grenzwerte wurden mit dem Programm DINTTEST nach DIN32645 durchgeführt. Ein Unterschied mit einem p-Wert von 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von sHLA-G Molekülen in Embryokulturen und deren klinische Bedeutung für die Reproduktion

#### 4.1.1 Technologische Voraussetzungen für die Messung von sHLA-G

Um die Spezifität zwischen der Luminex® -Technologie und dem Referenz ELISA vergleichend zu analysieren, wurden Standardkurven im Konzentrationsbereich von 0 ng/ml bis 20 ng/ml erzeugt. Für den Luminex®-Assay wurde ein Standardreagenzvolumen von 10 µl, und für die Standardkurve des ELISA-Systems wurde ein Volumen von 100 µl verwendet. In Abbildung 6 sind beide Standardkurven dargestellt. Um den unterschiedlichen Volumina gerecht zu werden, ist die Konzentration in ng/Probe angegeben.



**Abbildung 6: sHLA-G-Standardkurven der Luminex®-x-MAP® und ELISA-Technologie.** Dargestellt sind Standardkurven der sHLA-G Bestimmung basierend auf dem Luminex®-x-MAP®-System (A) mit 10 µl Standardreagenz und dem Referenz ELISA Format (B) mit 100 µl Standardreagenz. Jeder Punkt repräsentiert die Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Messungen. Die fett gedruckte Linie zeigt die lineare Regression und die gestrichelte Linie den 95% Konfidenzintervall. Die horizontale gestrichelte Linie repräsentiert den Hintergrund. FI = Fluoreszenz Intensität, OD = optische Dichte.

Der DINTEST zur analytischen Grenzwertbestimmung zeigte, dass mit dem ELISA Format eine Nachweisgrenze von 0.327 ng/Probe erzielt werden kann. Mit der Luminex®-Technologie konnte die Nachweisgrenze mit einem Wert von 0.015 ng/Probe, mehr als 20-fach verringert werden. Diese Untersuchungen belegen eindeutig, dass der Luminex®-Assay im Vergleich zu dem ELISA sensitiver ist und kleinere sHLA-G Konzentrationen besser gemessen werden können.

#### **4.1.2 Evaluierung von sHLA-G als prädiktiver Marker für eine Schwangerschaft nach ART: Pilotstudie**

##### **4.1.2.1 Der Einfluss von embryospezifischen Faktoren auf die Detektion von sHLA-G**

In der Pilotstudie wurden insgesamt 588 Embryokulturüberstände auf den Gehalt von sHLA-G mit dem Luminex®-x-MAP®-System untersucht. In 117 von den 588 analysierten Überständen konnte ein positiver Nachweis für sHLA-G geführt werden. Dies entspricht einer Rate von 19.9%. Die sHLA-G Werte reichen von 0.76 pg/Probe bis zu 112.56 pg/Probe. Tabelle 5 zeigt die Verteilung der sHLA-G positiven EK in Absolutzahlen und Prozent. Die Embryonenkulturen (EK) wurden in Bezug zu der Anzahl der kultivierten Embryonen, der ART Behandlungen (IVF, ICSI oder ICSI-TESE), der Kryokonservierung von fertilisierten Eizellen und Kulturzeiten von 48 bis 96 h eingeteilt. Die prozentuale Verteilung zeigte keine signifikanten Unterschiede sowohl für die unterschiedlichen ART-Techniken, als auch für Kulturbedingungen und -zeiten (Tab. 5).

**Tabelle 5: Verteilung der sHLA-G positiven Embryonenkulturen.** ART = assistierte Reproduktionstechniken, EK = Embryonenkulturen, IVF = in-vitro-Fertilization, ICSI = intrazytoplasmatische Spermieninjektion, TESE = testikuläre Spermiumextraktion, Kryo = Kryokonservierung.

	sHLA-G positive Embryonenkulturen (EK)			Σ
	N (%)			
	1-EK	2-EK	3-EK	
<b>ART Technik</b>				
IVF	8 (19.5)	2 (20.0)	1 (25.0)	11 (20.0)
ICSI	57 (18.8)	5 (25.0)	2 (28.6)	64 (19.4)
ICSI TESE	3 (33.3)	0 (0)	0 (0)	3 (30.0)
Kryo IVF	12 (33.3)	0 (0)	0 (0)	12 (30.8)
Kryo ICSI	22 (16.0)	5 (33.3)	0 (0)	27 (17.5)
Σ	102 (19.4)	12 (25.5)	3 (20.0)	117 (19.9)
<b>Kulturdauer</b>				
48h	66 (20.2)	7 (21.9)	2 (28.6)	75 (20.0)
72h	36 (18.2)	5 (38.5)	1 (12.5)	42 (19.2)
96h	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Σ	102 (19.4)	12 (25.5)	3 (20.0)	117 (19.9)

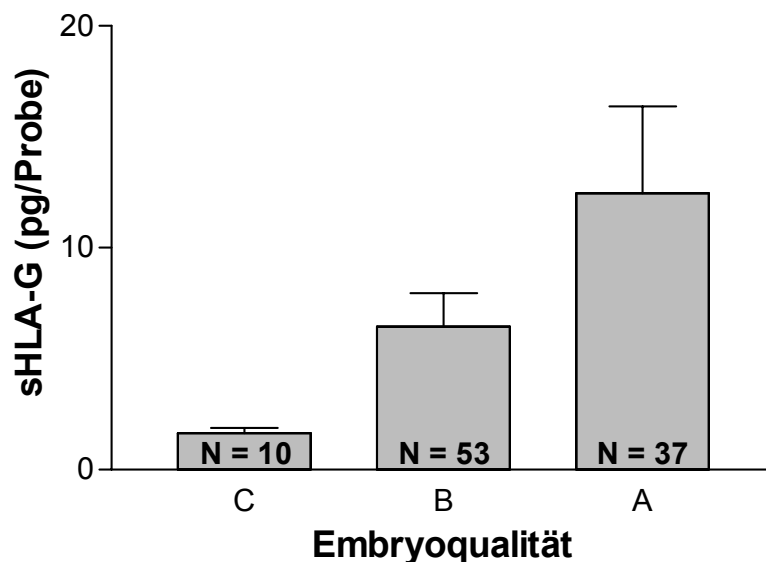


#### 4.1.2.2 Korrelation von sHLA-G Werten mit der Embryoqualität in Ein-Embryokulturen

Von den insgesamt 117 sHLA-G positiven Überständen wurden 102 in Ein-Embryokulturen kultiviert. Zwei der Ein-Embryokulturen weisen keine Qualitätsangabe auf und sind in diesem Zusammenhang nicht auswertbar. Für die Korrelation von sHLA-G in EK und der Embryoqualität wurden Zwei- und Dreiembyokulturen nicht berücksichtigt, da sie unterschiedliche Qualitäten in einer Kultur aufweisen können. Somit ist keine eindeutige Zuordnung zu der Klassifizierung möglich. Die Qualitätsbeurteilung wurde von dem ART-Zentrum nach entsprechenden Richtlinien vorgenommen.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen, liegt die durchschnittliche sHLA-G Konzentration in EK von Embryonen von sehr guter Qualität (A: keine Fragmentierung) bei  $12.4 \pm 4$  pg/Probe (N = 37). Im Gegensatz dazu fallen die durchschnittlichen sHLA-G Konzentrationen auf  $6.4 \pm 1.8$  pg/Probe (N = 53) bei Embryonen mit mittlerer Qualität (B: < 20% Fragmentierung) und auf  $1.6 \pm 0.2$  pg/Probe (N = 10) in Kulturen mit Embryonen schlechter Qualität (C: > 20% Fragmentierung) ab.

Die lineare Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten r von 0.200 und einen p-Wert von 0.048.



**Abbildung 7: sHLA-G Konzentrationen in EK und Embryonenqualität.** Score A, B und C repräsentieren sehr gute, gute oder schlechte Embryonenqualität. Die Berechnungen beziehen sich nur auf Ein-Embryokulturen.

#### **4.1.2.3 Assoziation von sHLA-G mit dem Schwangerschaftsausgang nach ART**

Von den insgesamt 313 teilnehmenden Frauen wiesen 79 Frauen eine klinische Schwangerschaft auf. Die Detektion von sHLA-G in Embryonenkulturen war signifikant ( $p = 0.001$ ) mit der klinischen Schwangerschaft nach ART assoziiert (Tab. 6): Dabei beträgt die positive prädiktive Wahrscheinlichkeit (PPW) hier 39.8 % und die negative prädiktive Wahrscheinlichkeit (NPW) 80.91 %. Somit haben Frauen, die einen sHLA-G positiven Embryo transferiert bekamen, eine 2.8fach höhere Chance schwanger zu werden, als Frauen, die einen sHLA-G negativen Embryo bekamen (Odds Ratio = 2.8).

Frauen, die sHLA-G positive Embryonen ( $N = 93$ ) und Frauen, die sHLA-G negative Embryonen erhalten haben ( $N = 220$ ), unterscheiden sich nicht in der Anzahl der vorausgegangenen ART Zyklen ( $1.61 \pm 0.05$  und  $1.61 \pm 0.03$ ), der Anzahl der transferierten Embryonen ( $2.20 \pm 0.06$  und  $2.11 \pm 0.04$ ) und auch nicht durch das Alter der Frauen ( $35 \pm 0.5$  Jahre und  $36 \pm 0.3$  Jahre).

Um zu überprüfen, ob die Assoziation von sHLA-G in EK mit dem Eintritt einer Schwangerschaft bei allen ART-Techniken erstellt werden kann, wurden die Frauen aufgrund der ART-Technik unterteilt. Dabei stellte sich heraus, dass der Nachweis von sHLA-G in EK stark mit dem Eintritt einer Schwangerschaft nach ICSI ( $p = 0.0001$ , PPW = 42.1 %, Odds Ratio = 3.31) korreliert war. Demgegenüber konnte keine positive Assoziation bei Frauen nach einer IVF-Behandlung ( $p = \text{n.s.}$ , PPW = 29.4 %, Odds Ratio = 1.3; Tab. 6) erstellt werden.

Da ICSI hauptsächlich bei Paaren mit männlichen und IVF bei Paaren mit weiblichen Infertilitätsstörungen angewendet werden, wurden diese geschlechtsspezifischen Infertilitätsfaktoren weiter untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass bei Paaren mit männlichem Infertilitätsfaktor die Schwangerschaftsrate der Frauen, die sHLA-G positive Embryonen, im Vergleich zu Frauen, die sHLA-G negative Embryonen erhielten, signifikant ( $p = 0.0001$ ; PPW = 42.1, Odds Ratio = 3.29) erhöht war (Tab. 6).

**Tabelle 6: Assoziation von sHLA-G in EK mit dem Schwangerschaftsausgang.** N = Anzahl der schwanger gewordenen Frauen, total N = Anzahl der Frauen, die in die Analyse einbezogen wurden; NPW = negativ prognostischer Wert, PPW = positiv prognostischer Wert, p = Signifikanz erhalten mit dem  $\chi^2$  Test; Sens. = Sensitivität; Spez. = Spezifität, n.s. = nicht signifikant

	Vor-Test-Wahrscheinlichkeit		Nach-Test-Wahrscheinlichkeit					
	%	(N /total N)	PPW (%)	NPW (%)	p	Odds Ratio	Sens.(%)	Spez.(%)
Schwangerschaft								
alle	25.2	79/313	39.8	80.9	<0.0001	2.8	46.8	76.1
ART								
IVF	35.7	5/14	29.4	75.7	n.s.	1.3	35.7	70.0
ICSI	49.2	32/65	42.1	82.0	<0.0001	3.31	49.2	77.3
Infertilität								
weiblich	41.2	7/17	36.8	78.3	n.s.	2.1	41.2	75.0
männlich	47.1	24/51	42.1	81.9	0.0001	3.29	47.0	78.7
beidseitig	28.6	2/7	33.3	73.7	n.s.	1.4	28.6	77.8
idiopathisch	30.8	4/13	36.4	75.7	n.s.	1.78	30.8	80.0

#### **4.1.2.4 Assoziation von sHLA-G mit Aborten**

Von den 79 klinisch schwangeren Frauen beendeten 60 Frauen ihre Schwangerschaft mit einer Lebendgeburt. Die anderen 19 Frauen erfuhren spontane Aborte im ersten Trimester der Schwangerschaft (24%).

Wie der Odds Ratio von 0.31 zeigt, war für die Patienten, die sHLA-G negative Embryonen transferiert bekamen, die Wahrscheinlichkeit einen Abort zu erleiden dreifach erhöht ( $p = 0.04$ ), im Vergleich zu Frauen, die sHLA-G positive Embryonen erhielten. Am deutlichsten war die Beziehung zwischen sHLA-G positiven Embryonen und dem Auftreten spontaner Aborte nach der Behandlungstechnik mit ICSI ( $p = 0.026$ , Odds Ratio = 0.25; Tab. 7).

**Tabelle 7: sHLA-G und Abort.** N = Anzahl der schwanger gewordenen Frauen, total N = Anzahl der Frauen, die in die Analyse einbezogen wurden; NPW = negativ prognostischer Wert, PPW = positiv prognostischer Wert, p = Signifikanz erhalten mit dem  $\chi^2$  Test; Sens. = Sensitivität; Spez. = Spezifität, n.s. = nicht signifikant

	Vor-Test-Wahrscheinlichkeit		Nach-Test-Wahrscheinlichkeit					
	%	(N /total N)	PPW (%)	NPW (%)	p	Odds Ratio	Sens.(%)	Spez.(%)
Schwangerschaft								
alle	26.3	5/19	13.5	66.0	0.041	0.31	26.3	46.7
ART								
IVF	33.3	1/3	20.0	77.8	n.s.	0.88	33.3	63.6
ICSI	25.0	4/16	12.5	63.6	0.027	0.25	25.0	42.9

### **4.1.3 Evaluierung von sHLA-G als prädiktiver Marker für eine Schwangerschaft nach ART: Multizentrische Studie**

Bei der multizentrischen Studie wurden insgesamt 4661 EK aus 2543 Zyklen und 461 entsprechende Negativkontrollen (9.9 %) auf sHLA-G untersucht. Insgesamt konnten in 1104 der 4661 analysierten EK sHLA-G detektiert werden. Dies entspricht einer Rate von 21.5%. Der Mittelwert der sHLA-G Konzentrationen der positiven EK beträgt  $206 \pm 11$  SEM pg/ml.

#### **4.1.3.1 Der Einfluss von embryospezifischen Faktoren auf die Detektion von sHLA-G**

In Tabelle 8 (S.55) sind alle embryospezifischen Einflussgrößen aufgeführt: Kryokonservierung der fertilisierten Oozyten nach IVF oder ICSI, Kulturdauer (24-96h), Entwicklungsstadium (Zygote, 2-9 Zellstadium und  $\geq 10$  Zellstadium), Kulturvolumen (10–100  $\mu$ l, 101–500  $\mu$ l, oder  $> 500$   $\mu$ l) und Anzahl der Embryonen in Kultur (1, 2 oder 3). Der Anteil von sHLA-G positiven EK steigt mit den Entwicklungsstadien von 6% in EK mit Zygoten (N = 3), auf 20% in EK mit 2-9 Zellstadien und bis hin zu 30% in EK mit  $\geq 10$  Zellstadien ( $p < 0.001$ ;  $\chi^2$  test). Dieselbe Tendenz wurde für die Mittelwerte der sHLA-G Konzentrationen ( $p = 0.02$ , ANOVA) beobachtet.

Systemimmanent war der Anteil sHLA-G positiven Embryonen bei den Multi-Embryokulturen ( $p = 0.006$ ;  $\chi^2$  test) und bei einem höheren Kulturvolumen ( $p = 0.001$ ;  $\chi^2$  test) erhöht. Die mittleren sHLA-G Konzentrationen nahmen aber mit steigendem Kulturvolumen ( $p < 0.001$ , ANOVA) und mit der Anzahl der Embryonen in Kultur ( $p = 0.016$ , ANOVA) ab.

Mit Hilfe der binomialen logistischen Regressionsanalyse wurde überprüft, ob die embryospezifischen Parameter einen Einfluss auf den Nachweis von sHLA-G in EK haben. Hierbei wurden als kontinuierliche Kovariate Probenvolumen, Verhältnis des Probenvolumens zum Kulturvolumen, Kulturvolumen, Kulturdauer und die Anzahl der Embryonen in Kultur verwendet. Teilungsstadien ( $< 10$  Zellen vs.  $\geq 10$  Zellen) und Kryokonservierung der fertilisierten Oozyten (Ja vs. Nein) wurden als kategorische Kovariaten einbezogen. Unter all diesen Faktoren erwies sich nur das

Entwicklungsstadium der Embryonen als unabhängiger Faktor für die Detektion von sHLA-G in EK ( $p < 0.001$ ; Tab. 9, S.56). Das Kulturvolumen, die Anzahl der Embryonen Kulturdauer und Kryokonservierung waren aber keine unabhängigen Faktoren.

**Tabelle 8: Detektion von sHLA-G positiven Embryokulturen in Assoziation zu den verschiedenen Kulturbedingungen.** N = Anzahl der sHLA-G positiven EK, n.s. = nicht signifikant, %<sup>1</sup> = Anteil der sHLA-G positiven EK an allen EK bezüglich der Kulturbedingungen, <sup>2</sup> sHLA-G Werte (Mittelwert  $\pm$  SEM) in pg/ml. Signifikante p-Werte sind entweder mit dem  $\chi^2$  test<sup>2</sup> oder ANOVA<sup>4</sup> ausgewertet worden. <sup>3</sup> sHLA-G Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Von den 1004 positiven EK gab es für 4 bzw. 34 EK keine Informationen über Kryokonservierung bzw. Furchungsstadien.

		N	% <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	sHLA-G <sup>3</sup>		p <sup>4</sup>
Kryokonservierung	Nein	776	21.2		201	13	
	Ja	224	22.5	n.s.	225	16	n.s.
Kulturdauer (h)	$\leq 24$	362	22.7		161	8	
	48	459	20.7		245	19	
	72	164	21.0		201	36	
	96	19	26.0	n.s.	145	22	n.s.
Furchungsstadium	$\geq 10$ Zellen	167	29.9		263	20	
	2 -9 Zellen	800	20.7		188	12	
	1 (Zygote)	3	6.4	<0.001	150	60	0.02
Volumen ( $\mu$ l)	10-100	680	20.3		269	15	
	101-500	267	24.0		73	4	
	501-1000	57	29.4	0.001	68	4	<0.001
Embryo in Kultur	1	823	20.8		218	12	
	2	143	26.8		171	30	
	3	38	22.9	0.006	73	8	0.016

**Tabelle 9 Binomial logistische Regressionsanalyse.** N = Anzahl der einbezogenen EK; p = Signifikanz erhalten mit der binomial logistischen Regressionsanalyse, 95% KI = 95% Konfidenzintervall, EXP(B) = logistischer Regressionskoeffizient.

	N	p	Exp(B)	95% KI des EXP(B)	
				unterer	oberer
Probenvolumen	4466	0.854	1.000	0.998	1.002
Proben- /Kulturvolumen	4466	0.755	0.999	0.994	1.004
Kulturvolumen	4466	0.206	1.000	1.000	1.001
Kulturdauer	4466	0.534	1.032	0.935	1.138
Anzahl der Embryonen in Kultur	4466	0.190	1.130	0.941	1.355
<b>Furchungsstadium &lt;10 Zellen</b>	<b>3907</b>				
		<b>0.000</b>	<b>1.782</b>	<b>1.448</b>	<b>2.192</b>
<b>≥10 Zellen</b>	<b>559</b>				
Kryokonservierung					
Nein	3536				
Ja	930	0.124	0.870	0.728	1.039

#### 4.1.3.2 Korrelation von sHLA-G Werten mit der Embryoqualität in Ein-Embryokulturen

In der multizentrischen Studie wurde sHLA-G in unterschiedlichen, zentrumspezifischen Kulturvolumina detektiert. Um die erhaltenen sHLA-G Konzentrationen zu analysieren, wurden die sHLA-G Werte in pg/Embryo umgerechnet. Für die Korrelation von sHLA-G mit der Embryonenqualität konnten daher nur Ein-Embryokulturen, mit Embryonen, die sich in dem Furchungsstadium von 2 bis zu 9 Zellen befanden, einbezogen werden. Embryonen mit schlechter Qualität C und D wurden zusammengeschlossen, um eine statistisch relevante Fallzahl zu erhalten.



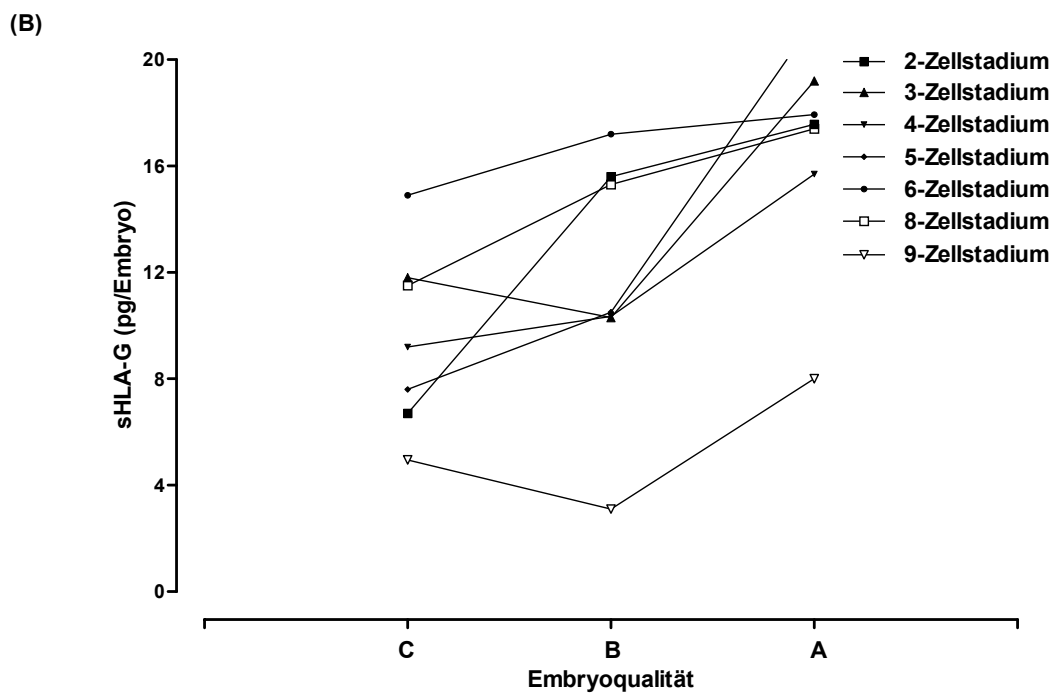
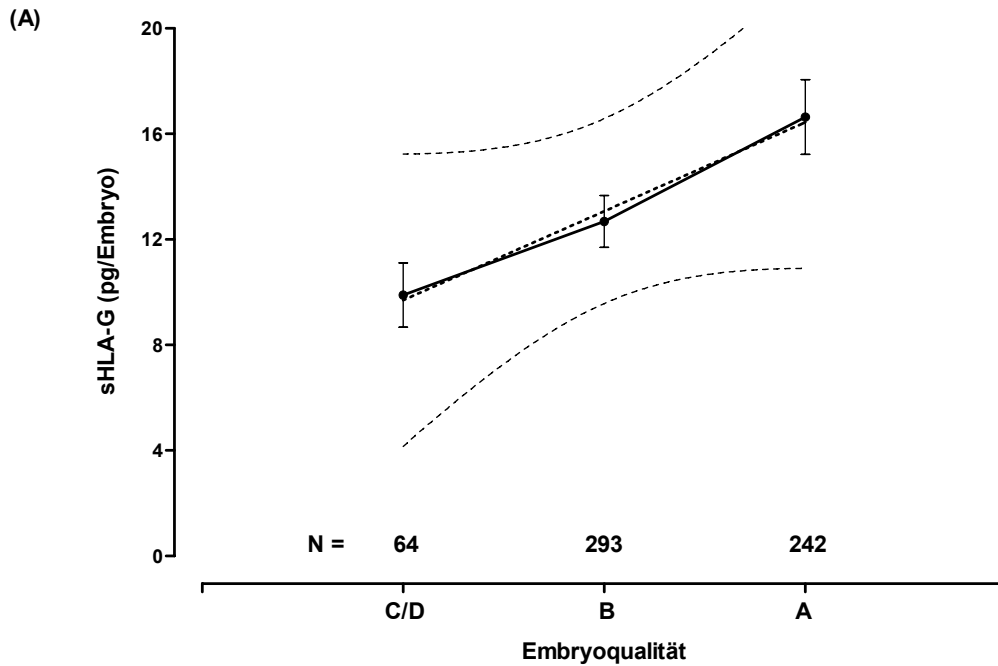
Abbildung 8 (S.58) zeigt die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der sHLA-G Konzentrationen in pg/Embryo der entsprechenden Qualitätseinteilung (Ziebe et al., 1997). Bei den sHLA-G positiven Ein-EK, zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen sHLA-G Werten und Embryoqualität ( $r = 0.110$ ,  $p = 0.007$ ). Mittlere sHLA-G Werte von Embryonen mit sehr guter Qualität (A) betragen  $16.64 \pm 1.4$  SEM pg/Embryo ( $N = 242$ ). In Kulturen der Embryonen mit der Qualitätseinteilung B und C/D sanken die mittleren sHLA-G Werte auf  $12.9 \pm 1.0$  SEM pg/Embryo ( $N = 293$ ) und  $9.9 \pm 1.4$  SEM pg/Embryo ( $N = 64$ ) (Abb. 8A). Die Unterteilung der einzelnen Zellstadien zeigte denselben Trend (Abb. 8B).

Basierend auf dieser Analyse scheint die Embryoqualität der bedeutendste Faktor für die Menge der freigesetzten sHLA-G Moleküle in EK zu sein. Jedoch war der Anteil der sHLA-G positiven EK in den unterschiedlichen Qualitätsgruppen fast identisch (Gruppe A: 19.1%, Gruppe B: 21.0%, und Gruppe C: 20.4%).

#### **4.1.3.3 Der Einfluss von patientenspezifischen Faktoren auf die Detektion von sHLA-G**

Von insgesamt 2543 bekamen 816 (32.1%) Frauen mindestens einen sHLA-G positiven Embryo transferiert. In Tabelle 10 (S.59) wird die Verteilung der Frauen mit transferierten sHLA-G positiven Embryonen im Kontext mit ihren klinischen Daten gezeigt. Systemimmanent erhöhte sich der prozentuelle Anteil der Frauen, die einen sHLA-G positiven Embryo bekamen mit der Anzahl der transferierten Embryonen ( $p < 0.001$ ). Die Ursache der Infertilität zeigte nur geringfügige Unterschiede: Bei Paaren mit idiopathischer Infertilität scheint der Anteil der Frauen, die einen sHLA-G positiven Embryo bekamen, leicht erhöht zu sein ( $p = 0.024$ ).

Es konnte keine Korrelation zwischen sHLA-G positiven Embryonen und der Anzahl vorhergegangener ART-Versuche, dem Alter der Frauen und der ART-Technik gezeigt werden.



**Abbildung 8: Korrelation von Embryoqualität mit sHLA-G Werten in Einzelembryokulturen.** In (A) wird der Mittelwert der sHLA-G Werte in pg/Embryo in Bezug auf die Qualität gezeigt. Die gestrichelten Linien stellen die lineare Regression des 95% Konfidenzintervalls dar. In (B) sind die sHLA-G Werte der entsprechenden Embryoqualitäten nach den Zellstadien aufgetrennt worden. A, B und C/D = Klassifikation der Embryoqualität, N = Anzahl einbezogener EK.

**Tabelle 10: Assoziation von sHLA-G positiven Embryonen und den klinischen Daten der Frauen.** N = Anzahl der sHLA-G positiven EK, n.s. = nicht signifikant, p = Signifikanz ( $\chi^2$  Test), ART = assistierte Reproduktionstechnik, IVF = in-vitro Fertilisation, ICSI = intrazytoplasmatische Spermieninjektion, TESE = testikuläre Spermienextraktion, Kryo = Kryokonservierung. Daten vorheriger ART-Versuche, Alter, ART-Technik und Gründe der Infertilität lagen für 39, 6, 38 bzw. 98 Frauen nicht vor.

		sHLA-G positive Patienten		
		N	%	p
Anzahl vorheriger ART Versuche	0	267	32.6	n.s.
	1	244	30.8	
	2	151	35.4	
	≥ 3	115	29.7	
Alter (Jahre)	< 35	450	32.0	n.s.
	> 35	360	32.2	
ART	IVF	145	29.7	n.s.
	ICSI	486	33.4	
	TESE	13	35.1	
	Kryo IVF	27	29.7	
	Kryo ICSI	106	29.6	
	Kryo TESE	1	50.0	
Infertilität	männlich	396	33.1	0.024
	weiblich	201	31.6	
	beide	94	27.9	
	idiopathisch	27	47.4	
Anzahl der transferierten Embryonen	1	58	21.8	< 0.001
	2	583	32.7	
	3	175	35.6	

#### **4.1.3.4. Assoziation von sHLA-G mit dem Schwangerschaftsausgang nach ART**

Bei dieser multizentrischen Studie lag die klinische Schwangerschaftsrate nach ART bei 30%. d.h. 763 von 2543 Frauen wurden nach dem Embryotransfer schwanger. Die Detektion von sHLA-G in EK war signifikant mit klinischer Schwangerschaft nach ART assoziiert [ $p < 0.001$ ; Odds Ratio: 2.0 (95% KI: 1.7 – 2.4)]. Hierzu wurde ein positiv prognostischer Wert von 40.1% berechnet. Eine weitere Aufteilung nach Anzahl der transferierten Embryonen zeigte analoge Ergebnisse. Durch die multizentrische Studie konnte eine Assoziation von sHLA-G in EK und Schwangerschaft nach Ein-Embryotransfer zum ersten Mal erstellt werden [ $p = 0.0012$ ; Odds Ratio: 3.3 (95% KI: 1.6 – 6.8)]. Hierbei lag die Schwangerschaftsrate für Ein-Embryotransfer bei 13.2% (35 von 266 Frauen), bei Zwei-Embryotransfer bei 33.2% (592 von 1782) und bei Drei- Embryotransfer bei 28.1% (136 von 495). Der sHLA-G Nachweis würde allerdings die Schwangerschaftsrate bei einem Ein-Embryotransfer auf 25.9% verdoppeln. Bei den Zwei- und Drei-Embryotransfer war der positiv prognostische Wert um ein Drittel erhöht. Die Assoziation der sHLA-G Detektion in EK mit den Lebendgeburten erzielte nahezu identische Ergebnisse. In allen Fällen waren Testsensitivität und Spezifität  $> 40\%$  bzw.  $\geq 70\%$  (Tab. 11).

Bis heute gilt das morphologische Qualitätsmerkmal der EK als einzig anerkannter Marker für die Vorhersage einer Schwangerschaft. Mit Hilfe der binomial logistischen Regressionsanalyse wurde überprüft, ob sHLA-G als ein zusätzlicher unabhängiger Marker für die Voraussage einer Schwangerschaft nach ART dienen kann. In diese Analyse wurden nur Frauen ( $N = 1027$ ) einbezogen, die entweder einen oder mehrere Embryonen identischer Qualität bekamen. Die Anzahl vorausgegangener ART-Versuche und die Anzahl der transferierten Embryonen wurden als kontinuierliche Kovariaten gewählt. Embryoqualität (A+B versus C+D), sHLA-G Status der transferierten Embryonen (Frauen mit sHLA-G positiven Embryonen vs. Frauen mit negativen Embryonen) und Alter der Frauen ( $<35$  vs.  $>35$  Jahre) wurden als kategoriale Kovariate integriert (Tab. 12, S. 62).

**Tabelle 11: Assoziation von sHLA-G in EK mit dem Schwangerschaftsausgang.** N = Anzahl der schwanger gewordenen Frauen, total N = Anzahl der Frauen, die in die Analyse einbezogen wurden; NPW = negativ prognostischer Wert, PPW = positiv prognostischer Wert, p = Signifikanz erhalten mit dem  $\chi^2$  Test; Sens. = Sensitivität; Spez. = Spezifität

			Diagnostische Relevanz von sHLA-G für den Schwangerschaftsausgang nach ART					
	Vor-Test-Wahrscheinlichkeit		Nach-Test-Wahrscheinlichkeit					
	%	(N /Total N)	PPW	NPW	p	Odds Ratio	Sens.(%)	Spez.(%)
Klinische Schwangerschaft								
alle	30.0	763/2543	40.1	74.8	<0.0001	2.0	42.9	72.5
1 Embryotransfer	13.2	35/266	25.9	90.3	0.0012	3.3	42.9	81.4
2 Embryotransfer	33.2	592/1782	42.0	71.1	<0.0001	1.8	41.4	71.6
3 Embryotransfer	28.1	136/495	38.3	78.4	<0.0001	2.3	49.3	69.9
Lebendgeburt								
overall	26.2	665/2543	35.5	78.1	<0.0001	1.9	43.2	71.9
1 Embryotransfer	10.3	31/266	22.4	91.3	0.004	3.0	41.9	80.9
2 Embryotransfer	29.2	520/1782	36.7	74.5	<0.0001	1.7	41.2	70.8
3 Embryotransfer	23.0	114/495	34.3	83.1	<0.0001	2.6	52.6	69.8

**Tabelle 12: Binomial logistische Regressionsanalyse.** N = Anzahl der einbezogenen Patienten; p = Signifikanz nach binomial logistischer Regressionsanalyse, 95% KI = 95% Konfidenzintervall, EXP(B) = logistischer Regressionskoeffizient.

	N	p	Exp(B)	95% KI des EXP(B)	
				unterer	oberer
Anzahl der transferierten Embryonen	1027	0.001	1.570	1.191	2.070
Vorherige ART-Versuche	1027	0.056	0.904	0.815	1.003
Alter (Jahre)	< 35	0.001	1.632	1.217	2.188
	≥ 35				
Embryontransfer	sHLA-G +	0.000	2.253	1.687	3.011
	sHLA-G –				
Embryoqualität	A oder B	0.000	4.283	2.085	8.796
	C oder D				

Alle Parameter, außer den vorausgegangenen ART-Versuchen wurden als unabhängige Parameter für die Voraussage einer klinischen Schwangerschaft (Tab. 12) ermittelt. Jedoch sind die morphologische Beurteilung der Embryonen [EXP(B): 4.283 (95% KI: 2.085 – 8.796); p < 0.001] und der sHLA-G Status der transferierten Embryonen [EXP(B): 2.253 (95% KI: 1.687 – 3.011); p < 0.001] der stärkste Parameter für die Vorhersage einer Schwangerschaft nach ART.

## 4.2 Nachweis von sHLA-G in Follikelpunktaten

Neben Embryokulturen wurden bereits sHLA-G Moleküle in Follikelpunktaten nachgewiesen, um sHLA-G als möglichen Marker für die besten Oozyten zu untersuchen (Rizzo et al, 2007). Aus diesem Grund wurde eine kleine Pilotstudie durchgeführt, in der sHLA-G und sHLA Klasse I Konzentrationen als Kontrolle in Follikelflüssigkeiten bestimmt wurden. Es konnten Standardnachweissysteme für sHLA-I und sHLA-G verwendet werden.

Neben sHLA-G und sHLA-I wurden zusätzlich sMICA Moleküle in den Follikelflüssigkeiten untersucht. Da für sMICA jedoch kein Standardsystem vorlag, wurde ein sMICA Nachweissystem entwickelt, welches in Kapitel 4.4.1 näher beschrieben wird.

Es konnten quantitative Analysen von sHLA-I, sHLA-G und sMICA bei 11 verschiedenen Follikelflüssigkeiten durchgeführt werden (Tab. 13). In allen 11 analysierten Proben konnten sHLA Klasse-I Moleküle mit einer mittleren Konzentration von  $805.9 \pm 50.9$  ng/ml nachgewiesen werden. Diese sHLA-I Konzentrationen entsprechen dem Bereich von Plasmaproben gesunder Probanden. In 9 von 11 (81.8%) Follikelflüssigkeiten konnte sHLA-G ( $0.981 \pm 0.387$  ng/ml Mittel  $\pm$  SEM) bestimmt werden. Dabei sind die sHLA-G Konzentrationen in den Follikelpunktaten im Vergleich zu Plasmaproben deutlich verringert ( $0.981$  ng/ml versus  $20.1$  ng/ml, Rebmann et al., 1999). Die niedrigen sHLA-G Werte und ihr Nachweis in 9 von 11 Follikelpunktaten deuten an, dass sHLA-G in Follikelflüssigkeiten als Marker für die Vorhersage für eine Schwangerschaft nicht genügt.

**Tabelle 13: Analyse löslicher Moleküle in Follikelflüssigkeiten.** HLA-I: HLA Klasse I Moleküle, MIC: MHC Klasse I verwandte Kette

Follikelflüssigkeit	HLA-I (ng/ml)	HLA-G (ng/ml)	MICA (ng/ml)
1	912.03	0.206	1.904
2	777.80	0	0.576
3	672.12	0.542	0.906
4	601.62	4.235	0.461
5	936.18	0.937	0
6	1008.01	2.490	0.295
7	876.97	0	0.618
8	732.32	0.353	0.853
9	532.63	0.305	0
10	749.67	0.877	0.283
11	1065.18	0.847	0.573

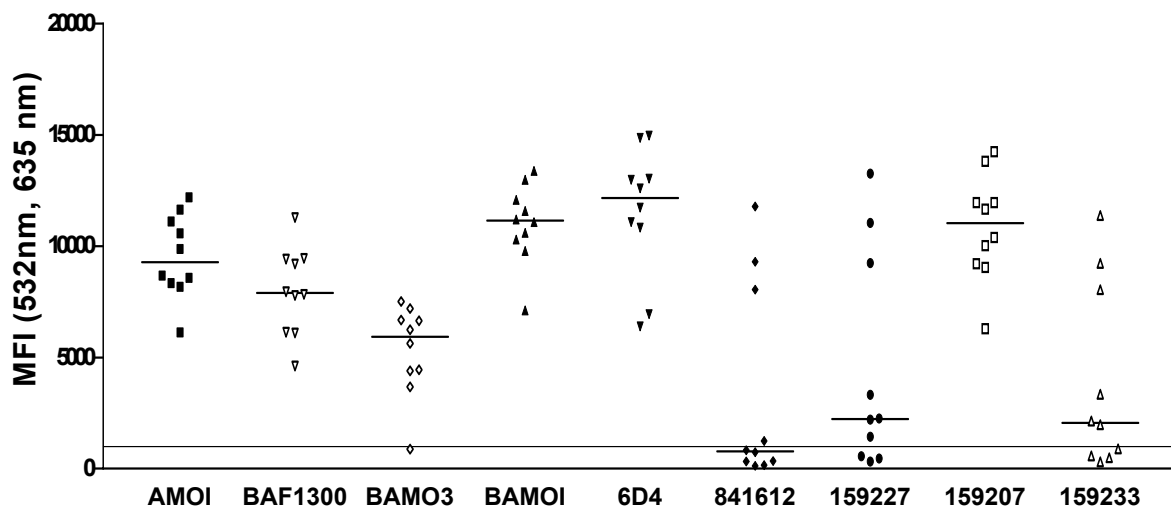
### 4.3 Nachweis von sMICA Molekülen in Körperflüssigkeiten und deren Bedeutung für die Reproduktion

#### 4.3.1 Technologische Voraussetzungen für die Messung von sMICA

MICA Moleküle sind hochpolymorph und können bis dato aus 60 Allelen dargestellt werden (Bahram et al., 2005). Um sicher zu gehen, dass bei der MICA Bestimmung alle Allele erfasst werden, wurden 9 monoklonale und polyklonale Antikörper (Tab. 3, S. 34) auf ihre Spezifität untersucht. Dazu wurde der modifizierte LABScreen MICA Single Antigen Antibody Detection Assay (One Lambda Inc.) und die Luminex®-xMap®-Technologie verwendet. Mit diesem Assay konnte die Bindungsfähigkeit von 9 MICA spezifischen Antikörpern zu folgenden 10 MICA Allelen: MICA\*001, \*002, \*004, \*007, \*009, \*012, \*017, \*018, \*019 und \*027 überprüft werden.



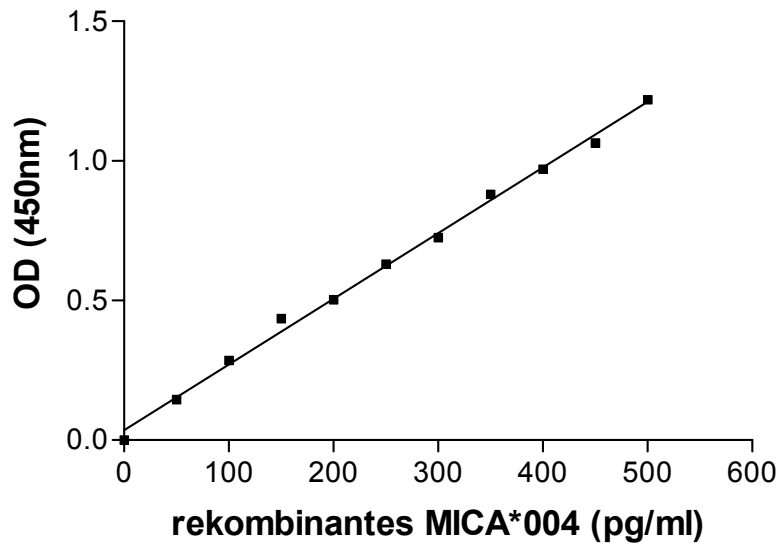
Wie aus der Grafik (Abb. 9) ersichtlich, erkennen die Antikörper 159233, 159227 und der MICA Fangantikörper aus dem käuflichen ELISA Set (Nr. 841612; R&D) 7 der 10 untersuchten MICA Allele sehr gering oder überhaupt nicht. Auch der Antikörper BAMO3 erkennt ein Allel nicht, und drei weitere nur gering. Aus diesen Gründen sind diese Antikörper nicht geeignet als Fänger- oder Detektionsantikörper zu dienen. Weiterhin zeigen die Antikörper BAMO1, 6D4 und 159207 sehr hohe Standardabweichungen.



**Abbildung 9: Bindungsfähigkeiten von MICA spezifischen Antikörpern.** Die entsprechenden Werte zeigen die gemessene Fluoreszenzemission. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze, ab welcher MICA Allele nicht mehr erkannt werden.

Nur zwei der Antikörper, die alle getesteten Allele gleichermaßen erkennen und geringe Standardabweichungen aufzeigen, können als Fänger- oder Detektionsantikörper verwendet werden.

Für die Bestimmung von sMICA wurde die Antikörperkombination mAK Maus anti human MICA (Klon: AMO1, Subklase: IgG1, BAMOMAB) für die Beschichtung und der pAK Biotin-konjugierte Ziege anti human MICA (BAF1300, R&D Systems) für die Detektion verwendet. Die in Abbildung 10 dargestellte Standardkurve wurde mit dem unter 3.4.2 beschriebenen sMICA ELISA Format und rekombinantem sMICA (R&D Systems) als Standardreagenz generiert. Mit diesem System konnte die Nachweisgrenze nach DIN32645 bei 20,4 pg/ml bestimmt werden.



**Abbildung 14: Standardkurve erstellt mit dem sMICA-ELISA**

#### **4.3.2 Nachweis von sMICA Konzentrationen in Follikelpunktaten**

In Tabelle 13 wurden bereits die sMICA Konzentrationen in 11 untersuchten Follikelpunktaten gezeigt. Wie für sHLA-G, wurde auch der Nachweis von sMICA in 9 von 11 (81.8%) Follikelflüssigkeiten ( $0.588 \pm 0.159$  ng/ml Mittel  $\pm$  SEM) geführt.

Es konnten signifikant erhöhte sMICA Konzentrationen im Vergleich zu sMICA Serumspiegeln nachgewiesen werden (Tab. 14, S. 67, Werte der Kontrollgruppe:  $263.1 \pm 22.9$  pg/ml Mittel  $\pm$  SEM). Da aber sMICA, wie auch sHLA-G Moleküle in 9 von 11 Proben zu finden sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich Untersuchungen von Follikelflüssigkeiten nur eingeschränkt als prädiktiver Marker für die Vorhersage einer Schwangerschaft eignen. Aufgrund der geringen Fallzahl lag ebenfalls keine Korrelation zwischen den einzelnen Proben und den einzelnen analysierten Molekülen vor.

#### **4.3.3 Nachweis von sMICA Konzentrationen im Serum nach ART**

Es ist bekannt, dass hohe sHLA-G Konzentrationen im peripheren Blut der Mutter den Eintritt und Erhalt einer Schwangerschaft positiv begünstigen (Pfeiffer et al., 2000). Ob ähnliche Effekte für sMICA auftreten, wurde an einem ART Patientenkollektiv untersucht. Plasmaproben von 62 Patientinnen wurden während

und nach einer ART Behandlung gesammelt. Die seriellen Proben wurden präovulatorisch während der hormonalen Stimulation und nach Schwangerschaftseintritt wöchentlich bis zur 8. Schwangerschaftswoche im Verlauf gemessen. Unter den 62 Patientinnen wiesen 35 einen intakten Schwangerschaftsverlauf auf, 17 erlitten einen Frühabort und 10 erfuhren Eileiterschwangerschaften.

Plasmaproben von 22 fertilen nicht schwangeren Frauen dienten als Kontrolle der präovulatorischen Messungen. Die mit dem ELISA Format gemessenen präovulatorischen sMICA Werte werden in pg/ml bzw. Mittelwert  $\pm$  SEM pg/ml angegeben. Die Proben der unstimulierten Kontrollgruppe zeigen sMICA Mittelwerte von  $263.1 \pm 22.9$  pg/ml. Die sMICA Mittelwerte der Frauen während der Hormonstimulation liegen bei den späteren intakten Schwangerschaften bei  $512.5 \pm 60.31$  pg/ml, bei den Frühaborten bei  $634.2 \pm 106.6$  pg/ml und bei den Eileiterschwangerschaften bei  $552.5 \pm 125.6$  pg/ml (Tab. 14).

Es konnte gezeigt werden, dass die Messwerte während der hormonellen Stimulation nach ART im Vergleich zu den unstimulierten Frauen signifikant ( $p = 0.0001$ ) erhöht waren. Jedoch unterschieden sich die sMICA Werte nicht bei Frauen mit normalen Schwangerschaften, Eileiterschwangerschaften oder Frühaborten (Tab. 14).

**Tabelle. 14: Präovulatorische sMICA Werte während der hormonellen Stimulation und gesunde Kontrollen**

Patienten	N	sMICA (pg/ml)*
Intakte Schwangerschaft	35	$512.5 \pm 60.3$
Schwangerschaft mit Frühabort	17	$634.2 \pm 106.6$
Tubare Schwangerschaft	10	$552.5 \pm 125.6$
Fertile Kontrollen	22	$263.1 \pm 22.9$

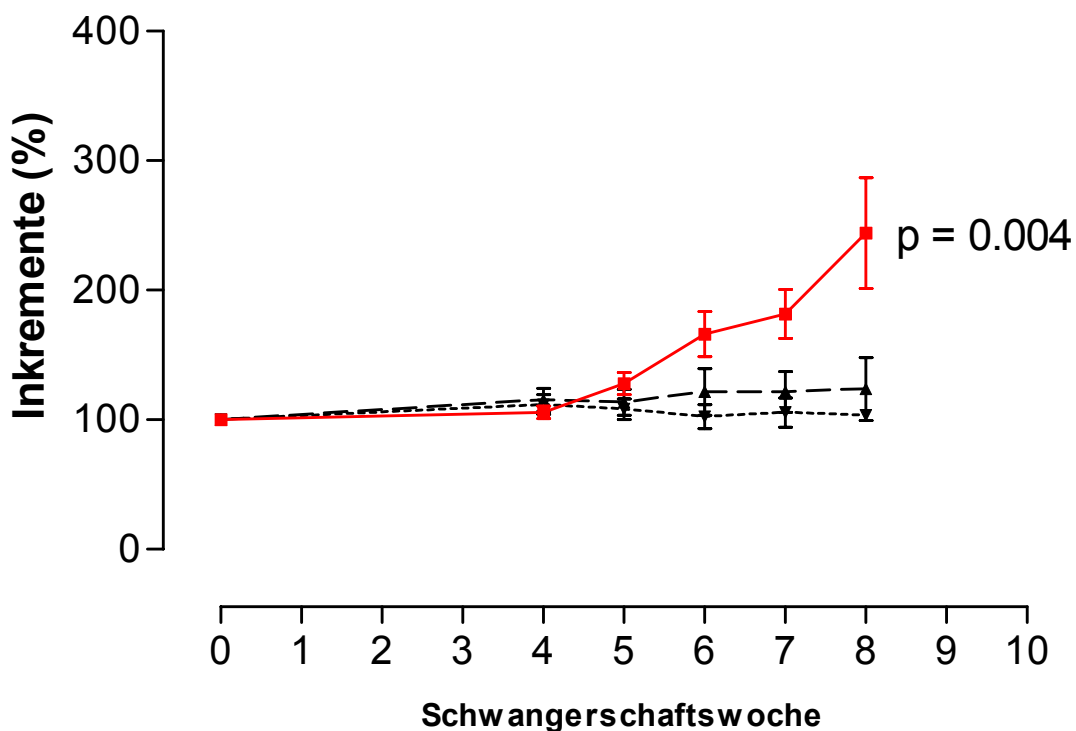
\*Mittelwert  $\pm$  SEM

Bei der seriellen Quantifizierung von sMICA in den ersten 8 Wochen der untersuchten Schwangerschaften wurden Unterschiede deutlich. So wurde ein kontinuierlicher Anstieg der sMICA Konzentrationen im Plasma von Patientinnen mit einer intakten Schwangerschaft festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die

Patientinnen mit Frühaborten oder Tubengravidität nur eine geringe Erhöhung der sMICA Werte (Abb. 11).

Da die sMICA Serumkonzentration bei den Patienten sehr unterschiedlich waren, wurde der präovulatorische sMICA Wert jeder Patientin als 100% (Ausgangswert) definiert und alle darauffolgenden Werte als Inkremente des Ausgangswertes angegeben. Bei einer intakten Schwangerschaft stiegen die sMICA Konzentrationen um 144% des präovulatorischen Wertes an. Schwangerschaften, die mit einem Frühabort endeten zeigten bis zur 8. Schwangerschaftswoche einen sMICA Anstieg von nur 23% des präovulatorischen Wertes. Bei den tubaren Schwangerschaften wurde nur ein sMICA Anstieg von 3% des präovulatorischen Wertes verzeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass die sMICA Werte im Verlauf einer intakten Schwangerschaften ansteigen ( $p = 0.004$ ; Abb. 11).



**Abbildung 11: Verlauf der sMICA Werte bis zur 8. Schwangerschaftswoche.** Signifikanter Anstieg der sMICA Werte in den ersten 8 Schwangerschaftswochen bei 35 Frauen mit intakter Schwangerschaft (—■—) ( $p = 0.004$ ), gegenüber 17 Frauen mit Frühabort (—▲—) und 10 Frauen mit tubarer Schwangerschaft (▼). Inkremente (%): aus Mittelwert  $\pm$  SEM errechneter prozentualer Anstieg der präovulatorischen sMICA Werte nach Schwangerschaftseintritt.

#### 4.4 Untersuchungen zur Progesteron-vermittelten Regulation und Funktionalität von MICA

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Anstieg während der intakten Schwangerschaft auf schwangerschafts-verwandte Hormone zurückzuführen ist, wie z.B das Steroidhormon Progesteron.

##### 4.4.1 Die Effekte von Progesteron auf die MICA mRNA Expression

Um den Effekt von Progesteron auf die MICA/sMICA Expression zu klären, wurde die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa ausgesucht, weil diese Zelllinie sowohl MICA als auch den Progesteronrezeptor konstitutuell auf der Zelloberfläche exprimiert (Daten hier nicht gezeigt). Dafür wurden nach einer 48 h Kultivierung der HeLa Zellen in Ab- und Anwesenheit von Progesteron (0 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml) die geernteten Zellen auf ihren MICA mRNA Gehalt durch RT-PCR analysiert.

Drei unabhängige Experimente zeigten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Progesteron und der MICA mRNA Expression besteht (Mean  $\pm$  SEM): die unbehandelten HeLa Zellen zeigten nur eine MICA mRNA Expression von  $0.044 \pm 0.007$  relativ zu Aktin- $\beta$ , während behandelte Zellen ihre MICA mRNA Produktion von  $0.064 \pm 0.004$  (100 ng/ml Progesteron) über  $0.127 \pm 0.027$  (500 ng/ml Progesteron) zu  $0.158 \pm 0.035$  (1000 ng/ml Progesteron) steigerten (Abb. 12). Auf diese Weise wurde gezeigt, dass die Expression von MICA mRNA durch Progesteron hochreguliert werden kann [ $p=0.0216$  (ANOVA)].

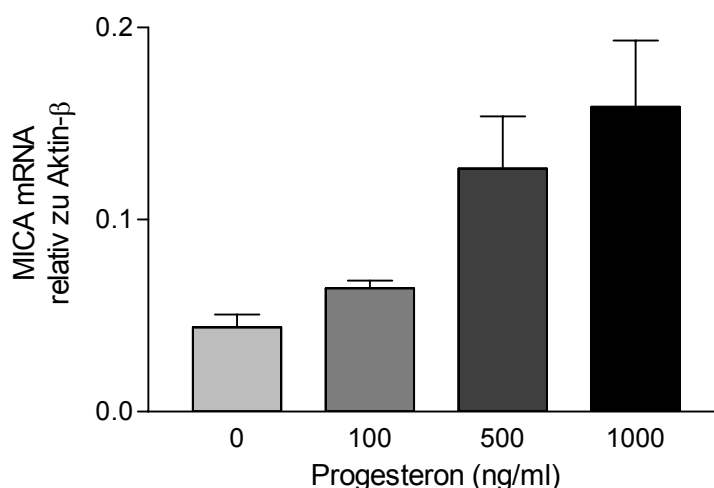


Abbildung. 12: MICA mRNA Expression nach Progesteronbehandlung

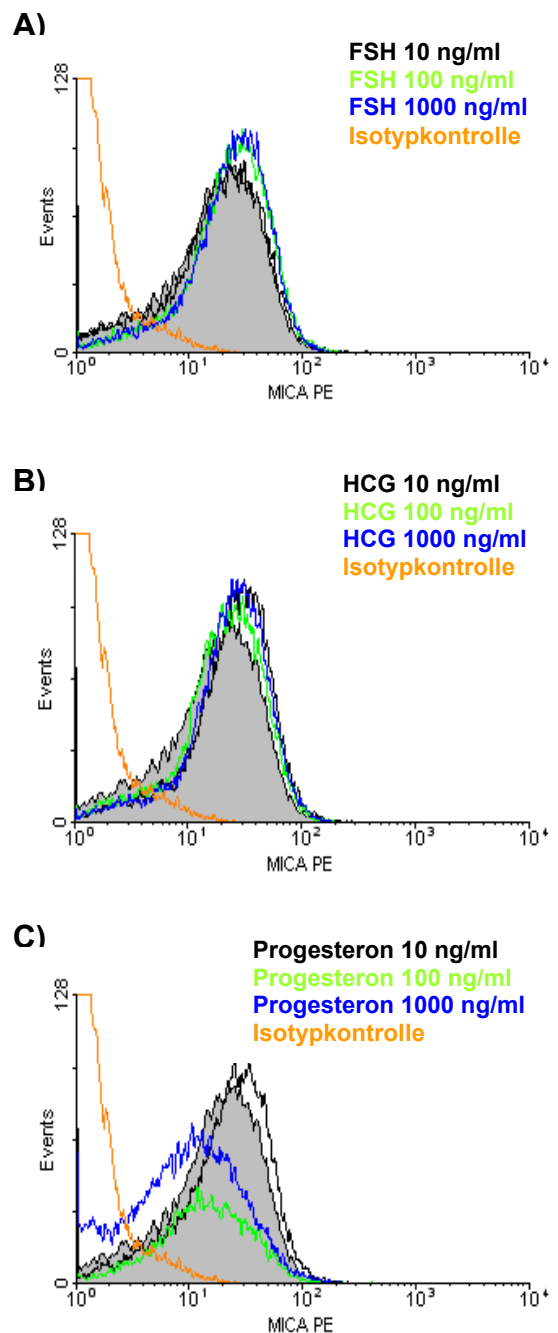
#### 4.4.2 Die Effekte von Progesteron auf die MICA und ERp5 Oberflächenexpression

Neben den mRNA Analysen wurde zusätzlich die Oberflächenexpression von MICA mit und ohne Progesteronbehandlung durchflusszytometrisch studiert. Im Vergleich zu Progesteron wurden die HeLa-Zellen mit zwei weiteren schwangerschaftsrelevanten Hormonen, FSH (Follikel stimulierendes Hormon) bzw. HCG (humanes Chorion Gonadotropin) in Konzentrationen von 0 ng/ml bis 1000 ng/ml behandelt.

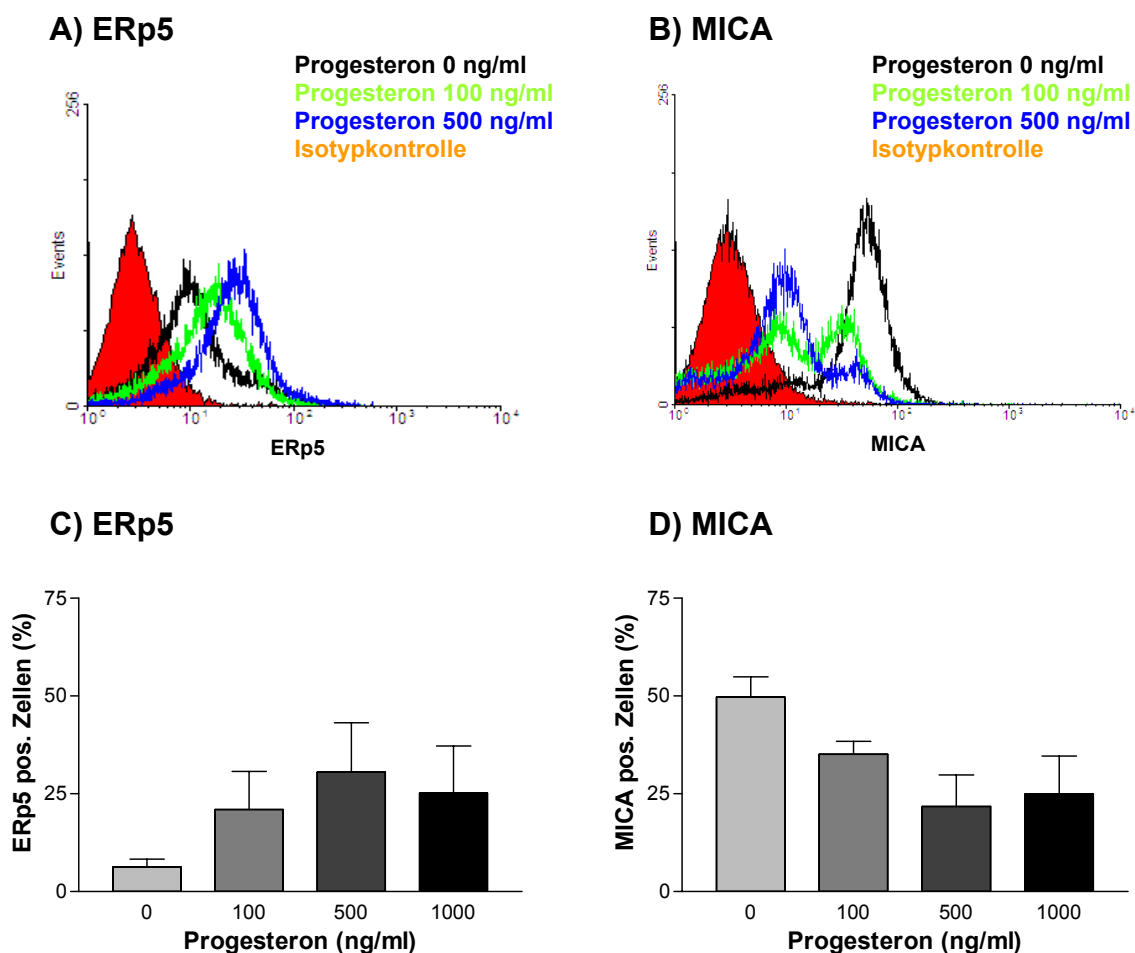
Für die Detektion von MICA wurde der spezifische Antikörper mAK AMO1 verwendet. Das Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse zeigt, dass die Behandlung der HeLa-Zellen mit FSH bzw. HCG keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von MICA hat (Abb. 13 A und B), während die Behandlung mit Progesteron zu einer Reduzierung von MICA auf der Zelloberfläche führt (Abb 13 C). Diese Reduzierung bei gleichzeitiger Steigerung der MICA mRNA gibt indirekte Hinweise auf eine progesteroninduzierte Freisetzung von MICA Molekülen.

#### Abbildung 13: MICA Oberflächenexpression in Abhängigkeit von schwangerschaftsrelevanten Hormonen.

HeLa Zellen wurden in Abhängigkeit von A) FSH = Follikel stimulierendes Hormon; B) HCG = humanes Chorion Gonadotropin und C) Progesteron auf MICA Expression untersucht.

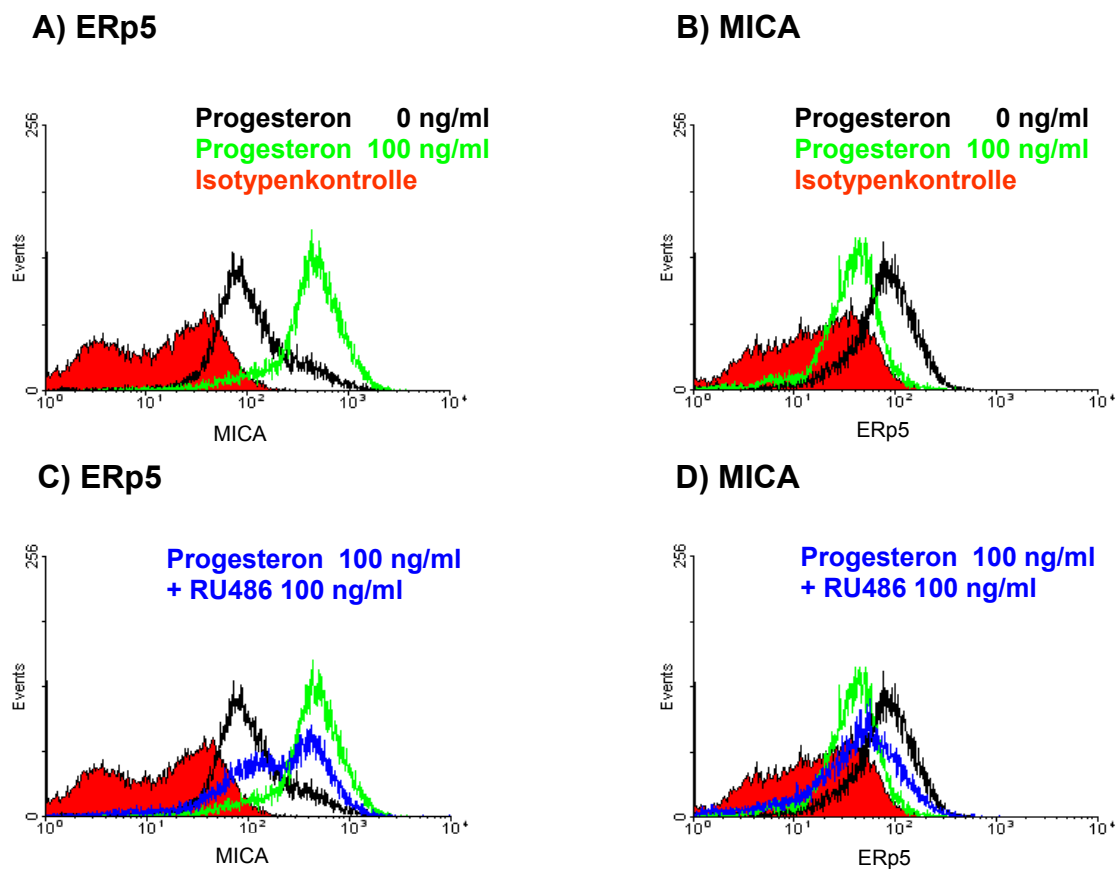


Da die Freisetzung von MICA von der Zelloberfläche durch das Enzym Disulfid-Isomerase (ERp5) vermittelt wird (Kaiser et al., 2007), wurde die Expression des Enzyms in Abhängigkeit von Progesteron untersucht. Dafür wurden die HeLa Zellen in Ab- und Anwesenheit von Progesteron (0 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml) 48 h kultiviert und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass ERp5 mit steigender Progesteronkonzentration eine steigende Oberflächenexpression aufweist (Abb. 14 A), während sich die Oberflächenexpression von MICA im Gegensatz zu ERp5 nahezu invers verringert (Abb. 14 B).



**Abbildung 14: MICA und ERp5 Zelloberflächen-Expression in Abhängigkeit der Progesteronkonzentration.** Darstellung der Expressionsänderung für ERP5 (A) und MICA (B) im Histogramm und in Prozent ERp5 (C) bzw. MICA (D) positiver Zellen. Diese Expressionsänderung von ERp5 und MICA auf der Zelloberfläche wurde in fünf unabhängigen Experimenten gesichert. In Abbildung 14 sind die mittleren prozentualen Anteile der ERp5 (Abb. 14 C) bzw. MICA (Abb. 14 D) positiven Zellen nach unterschiedlichen Progesteronkonzentrationen gezeigt.

Um zu prüfen, ob dieser Effekt durch Progesteron spezifisch ist, wurde der Progesteronantagonist RU486 verwendet. Die gleichzeitige Behandlung der HeLa Zellen mit Progesteron (100 ng/ml) in Ab- und Anwesenheit des Antagonisten RU486 in gleicher Konzentration zeigte eine Umkehrung des durch Progesteron induzierten Effekts: Durch RU486 wird die ERp5 Oberflächenexpression verringert (Abb. 15 C), und gleichzeitig die Herabregulierung der MICA Oberflächenexpression gehemmt (Abb. 15 D).

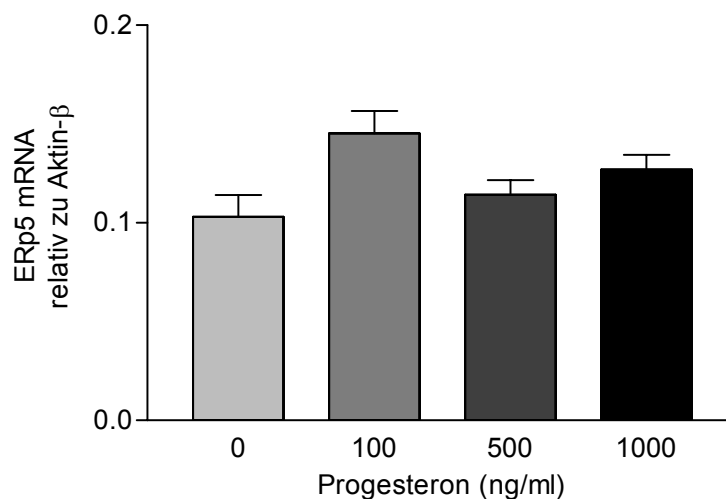


**Abbildung 15: Effekte von Progesteron und des Antagonisten RU486 auf die MICA und ERp5 Oberflächenexpression.** In A) und B) wird die Oberflächenexpression von ERp5 bzw. MICA in Abwesenheit von RU 486 gezeigt. In C) und D) stellt die blaue Linie die Hemmung des progesteroninduzierten Effekts dar.



#### 4.4.3 Die Effekte von Progesteron auf die ERp5 mRNA Expression

Um zu klären, ob Progesteron, wie bereits für MICA gezeigt wurde, auch einen Effekt auf die Expression von ERp5 spezifischer mRNA hat, wurden RT-PCR Analysen nach Progesteronstimulation der HeLa Zellen durchgeführt. In drei unabhängigen Versuchen wurden Progesteron behandelte und unbehandelte Zellen auf ihren ERp5 mRNA Gehalt analysiert. Dabei zeigen unbehandelte Zellen eine ERp5 mRNA Expression relativ zu Aktin- $\beta$  von  $0.1030 \pm 0.011$ , mit 100 ng/ml Progesteron behandelte Zellen  $0.145 \pm 0.011$ , mit 500 ng/ml Progesteron behandelte Zellen  $0.114 \pm 0.007$  und mit 1000 ng/ml Progesteron behandelte Zellen einen ERp5 mRNA Gehalt von  $0.127 \pm 0.007$  (Mean  $\pm$  SEM, Abb. 16). Diese Ergebnisse der ERp5 mRNA Analysen deuten an, dass Progesteron keinen signifikanten Einfluss auf die ERp5 mRNA Expression hat.



**Abbildung 16: ERp5 mRNA Expression nach Progesteronbehandlung**

#### 4.4.4 Die Effekte von Progesteron auf die Freisetzung von MICA

Nachdem sichergestellt worden ist, dass MICA sich auf der Zelloberfläche verringert und das Enzym, das die Freisetzung von MICA von der Zelloberfläche ermöglicht, in Gegenwart von Progesteron vermehrt exprimiert wird, wird im letzten Schritt die

Konzentrationen der löslichen MICA Moleküle in Ab- und Anwesenheit von Progesteron bestimmt.

In Tabelle 15 sind diese MICA Konzentrationen von sieben unabhängigen Versuchen in Abhängigkeit der Progesteronkonzentrationen (0 ng/ml bis 1000 ng/ml) dargestellt. In Abwesenheit von Progesteron wurde ein Basiswert von  $115.11 \pm 17.67 \text{ pg/ml} \cdot 10^6$  Zellen ermittelt. In Gegenwart von Progesteron stiegen die sMICA Konzentrationen über  $145.27 \pm 23.83 \text{ pg/ml} \cdot 10^6$  Zellen bei 100 ng/ml auf nahezu die doppelte Konzentration von  $214.29 \pm 62.12 \text{ pg/ml} \cdot 10^6$  Zellen. Ab 500 ng/ml Progesteron scheint der Anstieg der Konzentrationen ein Plateau zu erreichen ( $215.04 \pm 43.13 \text{ pg/ml} \cdot 10^6$  Zellen).

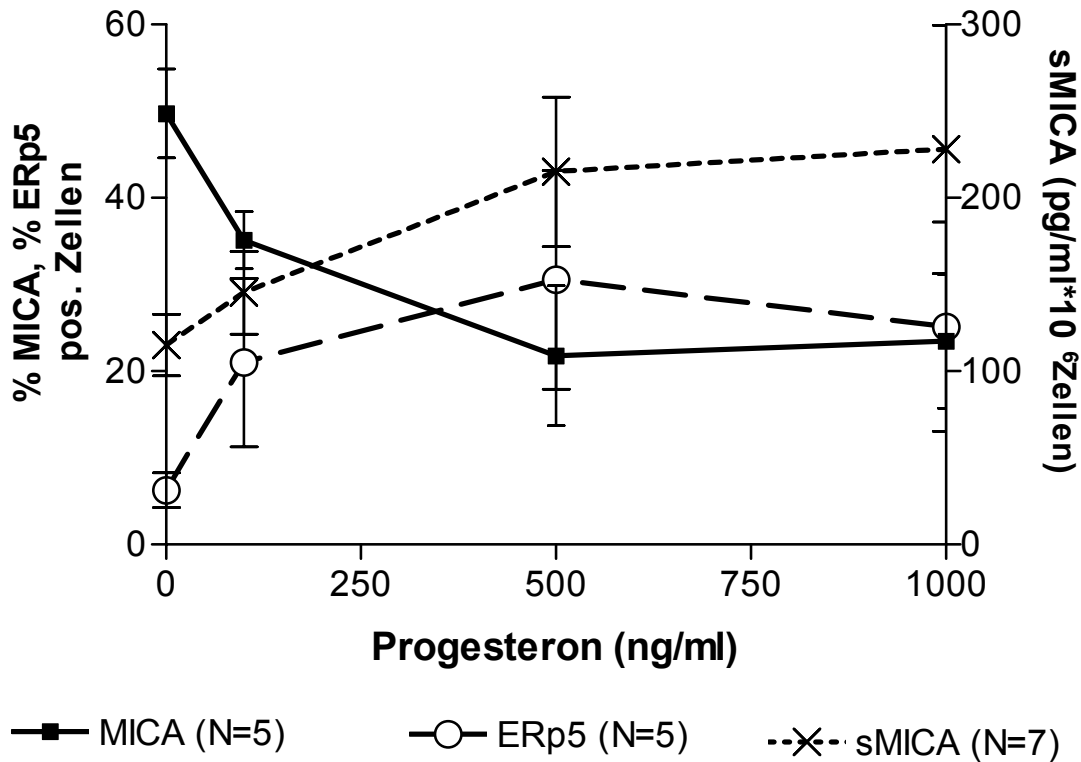
<b>Progesteron (ng/ml)</b>	<b>sMICA (pg/ml*10<sup>6</sup> cells ± SEM)</b>
0	115.11 ± 17.67
100	145.27 ± 23.83
500	215.04 ± 43.13
1000	214.29 ± 62.12

**Tabelle 15: Freisetzung von sMICA Molekülen in Abhängigkeit der Progesteronkonzentrationen.** In 7 unabhängigen Versuchen wurde sMICA in HeLa Kulturüberständen quantifiziert und auf pg/ml (Mittelwert ± SEM) pro  $10^6$  Zellen umgerechnet.

#### **4.4.5 Die Abhängigkeit der Progesteronkonzentrationen auf sMICA, MICA und ERp5**

Bei diesen 7 Experimenten wurden zusätzlich die anderen Parameter, die MICA und ERp5 Oberflächenexpression analysiert. Abbildung 17 fasst die drei gemessenen Parameter in einer Graphik zusammen. Die graphische Darstellung der sMICA Werte zeigt nahezu einen parallelen Verlauf zur ERp5 Oberflächenexpression und einen spiegelbildlichen Verlauf zur MICA Expression auf der Zelloberfläche.

Es ist daher naheliegend, dass mit der vermehrten Expression von MICA eine vermehrte Interaktion mit dem Enzym ERp5 stattfindet, die zur Expressionssteigerung von ERp5 an der Zelloberfläche führt und dadurch die MICA Moleküle von der Zelloberfläche proteolytisch freigesetzt werden können.



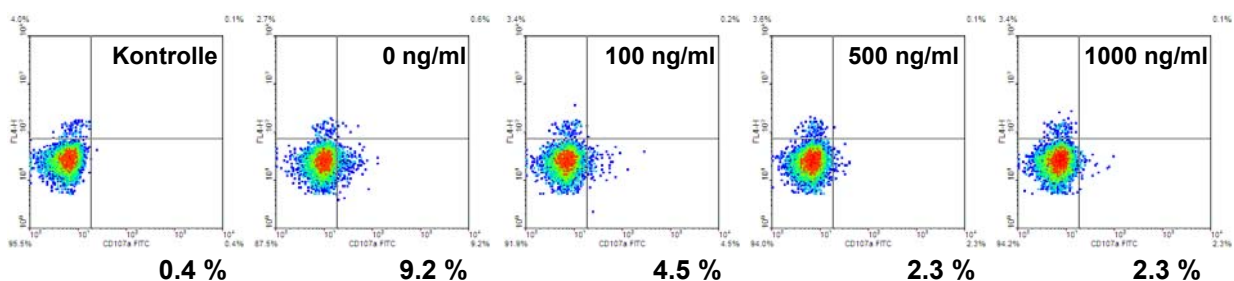
**Abbildung 17: Effekte verschiedener Progesteronkonzentrationen auf MICA, ERp5 und sMICA.**

#### **4.4.6 Funktionelle Konsequenzen der MICA Freisetzung auf die NK-Zellaktivität**

Da der spezifische Rezeptor von MICA ein aktivierender Rezeptor ist, wurden die funktionellen Konsequenzen der reduzierten MICA Oberflächenexpression mit Hilfe der NK-Zell Aktivitätsmessung untersucht. Bei diesen Testungen wurden isolierte NK-Zellen von Normalpersonen und die Zelllinie NK-92 als Effektorzellen verwendet. Die mit Progesteron behandelten HeLa Zellen (0 ng/ml bis 1000 ng/ml Progesteron) fungierten als Zielzellen. Die NK-Zellen wurden in einem Verhältnis von 5:1 (Aktas et

al., 2009) mit den jeweiligen Zielzellen für 2 h inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe des NK-Aktivitätsmarkers LAMP-1, der nur bei einer Aktivierung der NK-Zelle an der Zellmembran nachzuweisen ist.

In Abbildung 18 ist die durchflusszytometrische NK-Zell-Aktivitätsmessung einer Normalperson dargestellt. In Gegenwart von Progesteron unbehandelten HeLa Zellen wurde eine Aktivität bei 9.2% der NK-Zellen nachgewiesen. Bei Progesteron behandelten HeLa Zellen reduzierte sich die NK-Zell-Aktivität über 4.5% bis hin zu 2.3% der NK-Zellen. Wie bei der Oberflächenexpressionsmessung scheint die NK-Zell-Aktivität bei einer Progesteronkonzentration von 500 ng/ml ein Plateau zu erreichen.



**Abbildung 18: Die NK-Zell-Aktivitätsmessung.** NK-Zellen eines Probanden wurden mit Progesteron stimulierten HeLa Zellen inkubiert und nach CD56- und CD107a/LAMP-1 Expression aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten NK-Zellen ohne Zielzell-Exposition.

Die Reduktion der NK-Zell-Aktivität in Gegenwart von Progesteron behandelten HeLa Zellen wurde mit NK-Zellen von drei weiteren Probanden und mit der NK-Zelllinie NK-92 verifiziert. Tabelle 16 fasst die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von Progesteron behandelten HeLa Zellen zusammen. Bei der Zelllinie NK-92 war die NK-Zell-Aktivität im Vergleich zu den Probanden deutlich verringert. Trotzdem konnte auch hier eine Verringerung der NK-Zell-Aktivität ermittelt werden.

**Tabelle 16: Die NK-Zell-Aktivität in Abhängigkeit von Progesteronkonzentrationen.** Alle Messwerte sind in % der LAMP-1 positiven Zellen angegeben.

Progesteron (ng/ml)	NK-Zell-Aktivierung (Mittelwert ± SEM in %)	
	Probanden (N = 4)	NK-92
0	9.48 ± 2.51	2.7
100	6.13 ± 1.36	2.1
500	4.20 ± 0.99	1.7
1000	4.60 ± 1.14	1.8

#### 4.4.7 Die Effekte von sMICA auf die Zytokinfreisetzung von Lymphozyten

Die direkte Funktion der sMICA Moleküle auf periphere Blutlymphozyten wurde mit Hilfe des aufgereinigten humanen rekombinanten sMICA Protein (rsMICA; R&D) untersucht. Hierbei wurden PBLs (1 Mio Zellen/ml) von 10 Probanden in An- und Abwesenheit von 5 ng/ml rsMICA für 24 h inkubiert und die Zytokinfreisetzung der PBLs im Kulturüberstand bestimmt.

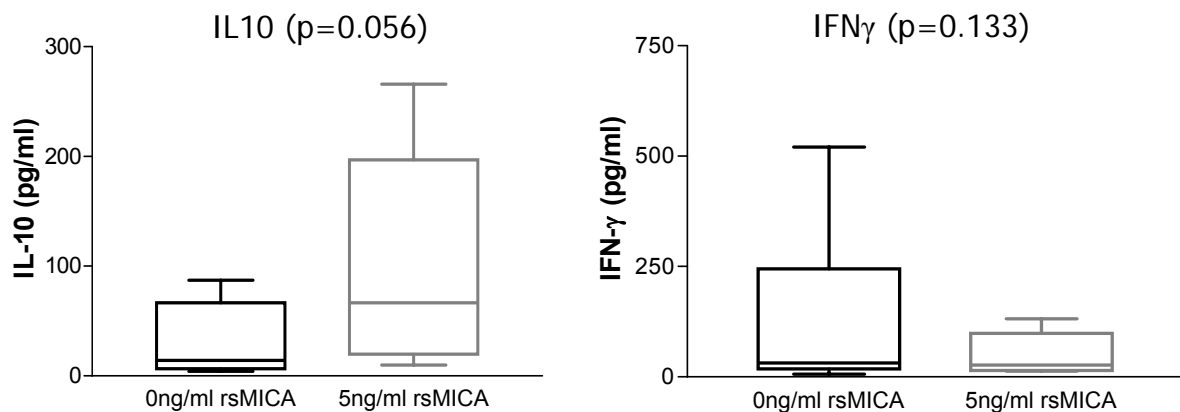
Ausgehend von der Publikation von Wegmann et al., die eine Zytokinverschiebung von Th1 zu Th2 während einer intakten Schwangerschaft beschrieben hat, wählten wir für diese Analyse das Th2 Zytokin IL10 und als Th1 Zytokin IFN $\gamma$  aus.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, wurde IL10 in Gegenwart von rsMICA deutlich vermehrt freigesetzt. Hier betrug die mittlere IL10 Konzentration der Kulturüberstände  $99.94 \pm 29.55$  pg/ml, im Gegensatz dazu konnte eine mittlere IL10 Konzentration von  $29.05 \pm 10.4$  pg/ml in Kulturüberständen der rsMICA unbehandelten Zellen gefunden werden.

Dieser Wert ist mit  $p = 0.056$  (gepaarter t-test) nur grenzwertig signifikant aufgrund der großen Streuung der Messwerte. Für das Th1 Zytokin IFN $\gamma$  wurde ein gegenläufiger Trend verzeichnet. In Gegenwart von rsMICA verringerte sich die IFN $\gamma$

Konzentration in den Kulturüberständen von  $124.0 \pm 54.15$  pg/ml auf  $50.0 \pm 14.19$  pg/ml. Diese Reduktion kann jedoch aufgrund der fehlenden Signifikanz ( $p = 0.133$ , gepaarter t-test) nur als Trend bewertet werden.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die Gegenwart von rsMICA die Freisetzung der Th1 und Th2 Zytokine IL10 und IFN $\gamma$  beeinflussen kann.

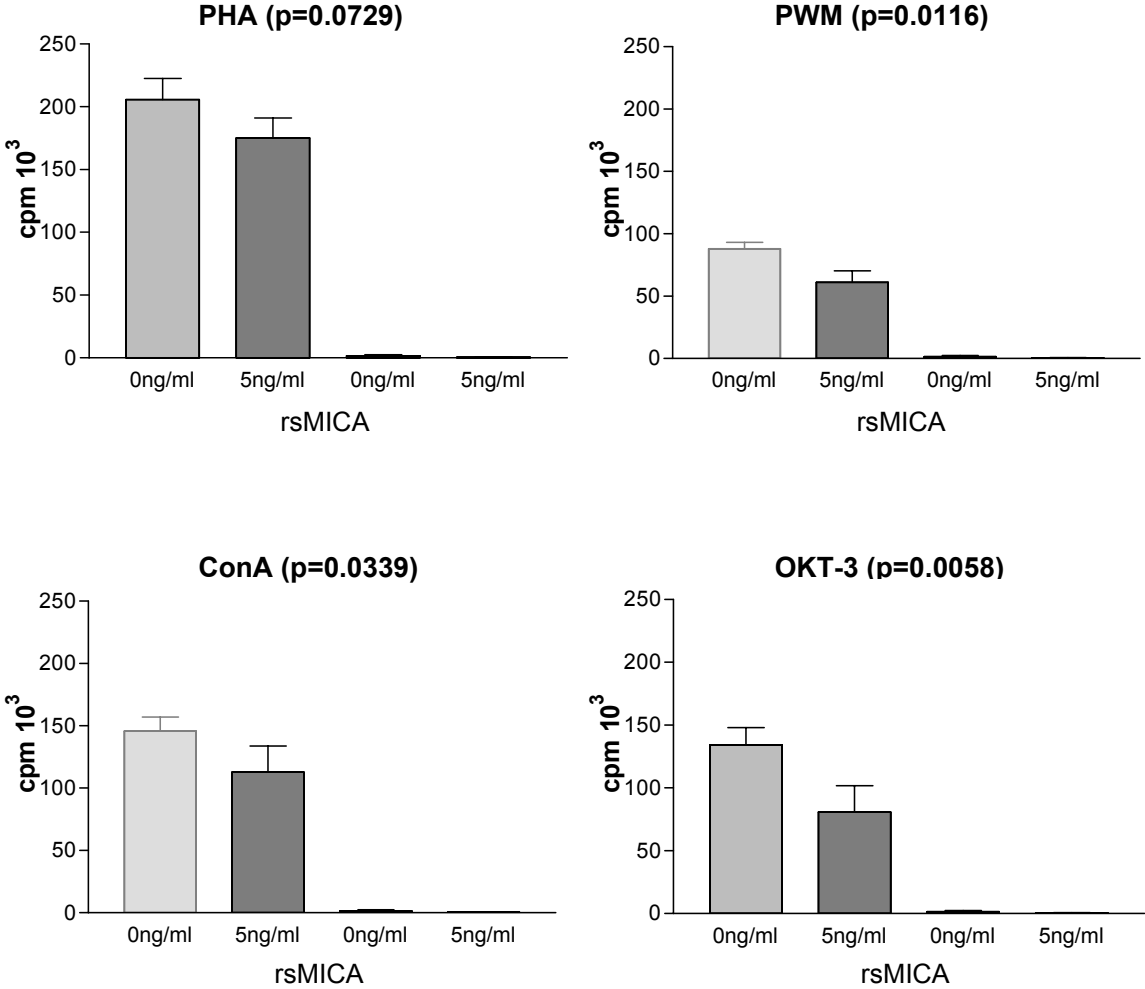


**Abbildung 19: Der Einfluss von rsMICA auf die Zytokinfreisetzung (N=10)**

#### **4.4.8 Der Einfluss von rsMICA auf die zelluläre in-vitro Funktion von PBLs im Lymphozytentransformationstest**

Die rsMICA behandelten und unbehandelten PBLs aus den Versuchen in Abschnitt 4.4.7 wurden auf ihre zelluläre in-vitro Funktion unter Mitogenstimulation untersucht. Als Mitogene dienten PHA, ConA, PWM und OKT-3. Die Proliferationsmessung erfolgte über  $H^3$  Thymidin Einbau, bei der die aufgenommene Radioaktivität durch Szintillationszählung (cpm= counts per minute/Zählung pro Minute) gemessen wurde. In Abbildung 20 ist die Proliferation der rsMICA behandelten und unbehandelten PBLs nach Mitogenstimulation mit den entsprechenden autologen Kontrollen dargestellt. Für PHA ( $p = 0.0729$ ), ConA ( $p = 0.0339$ ), PWM ( $p = 0.0116$ ) und OKT-3 ( $p = 0.0058$ ) waren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, die mit 5ng/ml rsMICA behandelten PBLs nach Mitogenstimulation in ihrer Kapazität zu proliferieren beträchtlich eingeschränkt. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass sMICA

Moleküle die zelluläre in-vitro Funktion und damit wahrscheinlich auch die in-vivo Funktion modulieren kann.



**Abbildung 20: Inhibition der mitogeninduzierten zellulären in-vitro Funktion von PBLs in Gegenwart von sMICA.** Cpm = counts per minute/Zählung pro Minute, rsMICA = rekombinantes sMICA.

## 5. Diskussion

Die Implantation eines Embryos ist ein sehr komplexer immunologischer Prozess. Unter den verschiedenen Molekülen, die eine Schwangerschaft positiv unterstützen, erscheinen die nicht-klassischen HLA-G und MICA Moleküle eine Schlüsselposition für die Implantation und die Etablierung einer Schwangerschaft einzunehmen. Funktionelle Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass diese Moleküle Immuntoleranz gegenüber dem Embryo induzieren können. Dabei können HLA-G und MICA das innate und adaptive Immunsystem durch diverse Mechanismen modulieren. Bisher wurde die Expression von HLA-G bzw. sHLA-G in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Serum, Fruchtwasser, Follikelpunktaten und Embryonenkulturen zahlreich beschrieben (Jurisicova et al., 1996; Rebmann et al., 1999; Pfeiffer et al., 2000; Yie et al., 2005; Steinborn et al., 2007; Rizzo et al., 2007), während für MICA bzw. sMICA nur wenige Untersuchungen der Expression und Funktion während der Schwangerschaft bekannt sind (Porcu-Buisson et al., 2007; Mincheva-Nilsson et al., 2006).

In dieser Arbeit ist die Rolle der nicht klassischen HLA-G und MICA Moleküle für Etablierung und Erhalt einer Schwangerschaft untersucht worden. Insbesondere wurde sMICA in Körperflüssigkeiten, die für sHLA-G bereits beschrieben worden sind, analysiert.

In vielfältigen Studien wird sHLA-G in Embryonenkulturen als prädiktiver Marker für einen Schwangerschaftseintritt nach assistierter Reproduktionstechnik (ART) diskutiert (Menicucci et al., 1999; Fuzzi et al., 2002; Van Lierop et al., 2002; Criscuoli et al., 2005; Noci et al., 2005; Yao et al., 2005; Yie et al., 2005; Desai et al., 2006; Rizzo et al., 2007; Sher et al., 2004, 2005 und 2007; Fisch et al., 2007; Sageshima et al., 2007 und Shaikly et al., 2008). Die einzelnen Studien weisen jedoch sehr heterogene Kultur- und Messmethoden, bzw. embryo- und patientenspezifische Parameter auf.

Für die Pilotstudie als auch die daran anschließende multizentrische Studie wurde der sHLA-G Referenz-ELISA (Rebmann et al., 2005) an die Luminex®-xMAP®-Technologie adaptiert, um eine schnellere und sensitivere Bestimmung von sHLA-G in Embryokulturen zu gewährleisten. Mit Hilfe dieser Luminex®-Methode wurde eine Nachweisgrenze von 0.015 ng/Probe erreicht, während der Referenz ELISA nur eine Nachweisgrenze von 0.327 ng/Probe zeigte. Im Vergleich zu Literaturdaten (Fuzzi et



al., 2002; Criscuoli et al., 2005; Noci et al., 2005; Yie et al., 2005; Sageshima et al., 2007) in denen die Nachweisgrenze von 1 ng/ml bis 10 ng/ml reicht, ist die Sensitivität der entwickelten Luminex®-Methode (0.3 ng/ml) drei bis 30fach erhöht. Andere Studien (Sher et al., 2004 und 2005; Desai et al., 2006; Fisch et al., 2007) geben weder eine Sensitivität noch eine genauere Bezeichnung des Standardreagenz an.

Ein weiterer Vorteil der Luminex®-xMAP®-Technologie ist, dass die Inkubationszeit der einzelnen Reaktionen auf jeweils 30 min gekürzt werden konnte, sodass eine Gesamtzeit von nur 1.5 h zur Testdurchführung benötigt wird. Damit lässt sich die Luminex-Technologie im Gegensatz zu den ELISA-Formaten, in einen ART Ablauf integrieren.

Zusätzlich erlaubt die Luminex®-xMAP®-Technologie das Probenvolumen an das Kulturvolumen zu adaptieren. Das beadsbasierte volumenunabhängige Luminex®-Detektionssystem ermöglichte, trotz der verschiedenen Kulturbedingungen bzw. Kulturvolumina der einzelnen ART-Zentren, eine multizentrische Studie durchzuführen.

Aufgrund der Möglichkeit bis zu 100 Parameter gleichzeitig aus einer Probe in einem Testansatz zu messen, bildet die Etablierung der sHLA-G Messung auf die Luminex Plattform den ersten Schritt für zukünftige multiplexe Testung biologisch relevanter Moleküle, die an der Implantation von Embryonen nach ART mitwirken.

In der Pilotstudie wurden mit der neuen Luminex®-x-MAP®-Technologie sHLA-G Moleküle, unabhängig von ART-Technik und Kulturbedingungen, in etwa 20% (117 von 588) der getesteten Embryokulturen detektiert. Der Anteil der sHLA-G positiven Embryokulturen war in der multizentrischen Studie (21.5%, 1104 von 4661) nahezu identisch. In der Pilotstudie wurden sHLA-G Konzentrationen von 0.038 ng/ml bis zu 5.628 ng/ml detektiert. Die sHLA-G Konzentrationen korrelierten positiv mit der Qualität der Embryonen: Embryonen guter Qualität zeigten  $12.4 \pm 4$  pg/Probe, während Embryonen schlechterer Qualität nur  $6.4 \pm 1.8$  pg/Probe bis zu  $1.6 \pm 0.2$  pg/Probe aufwiesen. In der multizentrischen Studie konnte die beobachtete Korrelation von sHLA-G zu der Embryoqualität validiert werden. Andere Studien konnten keine Korrelation der sHLA-G Messungen zu Embryoqualität bzw. –morphologie zeigen (Yie et al., 2005; Noci et al., 2005).

An der multizentrischen Studie nahmen insgesamt 29 ART-Zentren teil. Es wurden 4661 Embryokulturen aus 2543 Zyklen auf sHLA-G analysiert. Dabei war die Anzahl der 2543 teilnehmenden Frauen bei der multizentrischen Studie weitaus größer als die 1813 Patienten in der Meta-Analyse zur Genauigkeit bzw. Vorhersagekraft von sHLA-G für den Schwangerschaftseintritt nach ART (Vercammen et al., 2008). Die Ergebnisse der Meta-Analyse, die 11 Studien, einschließlich der Pilotstudie (Rebmann et al., 2007) einbezog zeigten, dass die unterschiedlichen Vorhersagewerte von sHLA-G an sehr heterogenen Nachweismethoden und Kultivierungsbedingungen lagen.

Mit der multizentrischen Studie konnte zum ersten Mal, der Einfluss von Kulturbedingungen und embryo- bzw. patientenspezifischen Parametern auf den Nachweis von sHLA-G untersucht werden. Für die Messung von sHLA-G wurde ein einheitliches Detektionssystem (Luminex®-xMAP®-Technologie) verwendet (Rebmann et al., 2007), während bei der Meta-Analyse vorwiegend ELISA Formate verwendet wurden.

Nicht zuletzt unterscheidet sich die multizentrische Studie zur Bestimmung von sHLA-G in Embryokulturen von den anderen Studien, indem sie neben 24h oder 48h Embryokulturen, auch 96h, 120h und/oder 144h (N = 556) Embryokulturen untersucht. Dies erlaubt, die Gegenwart von sHLA-G in Embryokulturen mit frühen und späteren Entwicklungsstadien der Embryonen zu assoziieren. Dabei zeigte sich, dass der Anteil sHLA-G positiver Kulturen mit dem Entwicklungsstadium der Embryonen steigt, während sHLA-G Konzentrationen nicht vom Furchungsstadium, sondern von der Embryoqualität abhängen (siehe oben).

Diese Ergebnisse stimmen mit zwei Studien überein, in denen die Expression von HLA-G mRNA Isoformen untersucht worden ist (Jurisicova et al., 1996; Yao et al., 2005). Beide Studien berichten, dass HLA-G mRNA während der Entwicklung des Embryos ansteigt. Interessanterweise wurden HLA-G1 spezifische mRNA Transkripte für 20% der Embryonen in 2-8 Zellstadien beschrieben (Yao et al., 2005). Die Ergebnisse sind mit denen der multizentrischen Studie sehr vergleichbar, in der 20.2% der 2-8 Zell Embryokulturen sHLA-G positiv waren. Im Gegensatz dazu waren nur 2% der Kulturen mit Zygoten sHLA-G positiv. Dieser geringe sHLA-G Nachweis kann auf Verunreinigungen während der Oozytenentnahme zurückzuführen sein.

Bei der multivariaten Analyse wurden Kulturdauer, Kulturvolumen, Anzahl der Embryonen in Kultur, Teilungsstadien ( $< 10$  Zellen vs.  $\geq 10$  Zellen) und Kryokonservierung der fertilisierten Oozyten (Ja vs. Nein), Probenvolumen und das Verhältnis des Probenvolumens zum Kulturvolumen einbezogen. Unter diesen Faktoren war der Entwicklungsstatus der Embryonen der einzige unabhängige Faktor für die Detektion von sHLA-G in Embryokulturen (Tab. 9).

Die Assoziation von sHLA-G in Embryokulturen zum Entwicklungsstatus der Embryonen impliziert, dass der Zeitpunkt der sHLA-G Messung ein kritischer Parameter für die Detektion von sHLA-G ist. Vercammen et al. empfiehlt sHLA-G in 120h und 144h Embryokulturen zu messen, wenn wahrscheinlich ist, dass die Blastozyste sHLA-G freisetzt. In der multizentrischen Studie konnte gezeigt werden, dass in diesem Entwicklungsstadium ein sehr hoher Anteil der Blastozysten sHLA-G produziert (29.9 %). Es stellt sich jedoch die Frage, ob sHLA-G an diesem Zeitpunkt noch als Selektionsmarker für den überlebensfähigsten Embryo dienen kann. Basierend auf der prospektiven Studie von Sher et al. (2005) soll die Schwangerschaftsrate nach 72h Kultivierung und anschließendem Embryotransfer steigen, wenn der sHLA-G Nachweis bereits nach 46h als Auswahlkriterium für die Selektion des Embryos eingesetzt wurde. Diese Daten werden indirekt durch die sequenzielle Analyse von 72h und 120-144h Embryonenkulturen unterstützt (Shaikly et al., 2008). Hier wurde gezeigt, dass ein signifikant höherer Anteil der Embryonen, die früh sHLA-G produzierten, sich zu Blastozysten weiterentwickelt. Die Autoren postulieren aufgrund dieser Tatsache, dass mit dem frühen Nachweis von sHLA-G, Schwangerschaftsraten erzielt werden können, die denen mit Blastozystentransfer gleichen. Die frühe Selektion der Embryonen hat den Vorteil die potentiellen Risiken einer Blastozysten Kultivierung, wie Verschiebung des Geschlechterverhältnisses (Ménézo et al., 1999) oder ein signifikant erhöhtes Geburtsgewicht (McEvoy et al., 2000), zu vermeiden.

Obwohl die univariate Analyse zeigte, dass der Anteil der sHLA-G positiven Embryokulturen mit dem Kultivierungsvolumen und mit der Anzahl der Embryonen in Kultur steigt, konnten diese Parameter nicht als unabhängige Einflussfaktoren für den Nachweis von sHLA-G in Embryokulturen identifiziert werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass diese Parameter systemimmanent sind: Die Wahrscheinlichkeit der sHLA-G Detektion steigt mit der Anzahl der kultivierten

Embryonen, und Multi-Embryokulturen werden, wie auch Blastozystenkulturen häufig in einem größeren Kulturvolumen (>100 µl) durchgeführt.

Schon die Pilotstudie zeigte eine Assoziation zwischen dem sHLA-G Nachweis in Embryonenkulturen mit dem Schwangerschaftseintritt nach Embryotransfer. Diese Assoziation wurde in der multizentrischen Studie reproduziert. Damit scheint sHLA-G als ein diagnostischer Parameter für die Vorhersage einer Schwangerschaft nach ART zu dienen. In beiden Studien konnte mit Hilfe des sHLA-G Nachweises als Auswahlkriterium eine Post-Test-Wahrscheinlichkeit der Schwangerschaften von nahezu 40% erzielt werden. Im Gegensatz dazu lagen die aktuellen Schwangerschaftsraten bei 25.2% (Pilotstudie) und 30% (multizentrische Studie).

Obwohl die Kulturbedingungen der Embryokulturen in der multizentrischen Studie äußerst heterogen sind, ist die Odds Ratio von 2.0 mit der Odds Ratio der Pilotstudie (2.8) vergleichbar. Allerdings werden weder in der multizentrischen Studie noch in der Pilotstudie Odds Ratios erreicht, wie sie in anderen Studien (Fuzzi et al., 2002; Criscuoli et al., 2005; Noci et al., 2005; Sher et al., 2004 und 2005) beschrieben wurden. Ein Grund dafür könnte die vorzugsweise verwendeten Kulturüberstände von Embryonen guter Qualität sein.

Zwei Ergebnisse der Pilotstudie konnten durch die multizentrische Studie der Pilotstudie nicht bestätigt werden: Es gab keine Hinweise, dass die Abortrate bei Frauen mit sHLA-G negativen Embryonen im Vergleich mit Frauen, die sHLA-G positive Embryonen bekamen, erhöht ist (Tab. 7). Weiterhin gab es keine Hinweise dafür, dass die prognostische Relevanz des sHLA-G Nachweises in Embryokulturen nur für Paare mit männlich begründeter Infertilität nach ICSI, aber nicht nach IVF oder für Paare mit weiblich begründeter Infertilität gilt (Tab. 6). Diese Unstimmigkeit kann durch die kleine Fallzahl in der Pilotstudie begründet werden.

Dies steht im Einklang mit den anderen Studien der Metaanalyse. Diese Studien zeigten jedoch unterschiedliche Odds Ratios im Rahmen von 0.92 bis 24.82. Die Gründe dafür sind neben den unterschiedlichen Nachweis- und Kultivierungsmethoden, die unterschiedlichen Patientenprofile und die unterschiedliche Anzahl der Embryonen, die transferiert worden sind. Der letzte Punkt ist besonders bedeutend. Bisher bevorzugen die meisten ART-Zentren einen Multi-Embryotransfer, um die Wahrscheinlichkeit einer Implantation zu erhöhen. Je

nach länderspezifischen Embryonenschutzgesetzen können, z.B. in Deutschland bis zu drei, in den USA bis zu vier und in Skandinavien nur ein Embryo transferiert werden. Bei einem Multi-Embryotransfer gibt es jedoch keinen Nachweis, ob der sHLA-G positive Embryo oder ein anderer implantiert ist. Bisher konnte keine Studie eine direkte Assoziation mit dem Schwangerschaftseintritt nach einem Ein-Embryotransfer zeigen.

Die multizentrische Studie ist die erste Studie, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem sHLA-G Nachweis in Embryokulturen und dem Schwangerschaftseintritt nach Ein-Embryotransfer erstellen konnte: Bei 266 Frauen fand ein Ein-Embryotransfer statt [ $p = 0.0012$ ; Odds Ratio: 3.3 (95 % KI: 1.6 - 6.8)]. 35 der 266 Frauen wurden nach einem Ein-Embryotransfer schwanger. Basierend auf den multizentrischen Daten würde die sHLA-G Bestimmung die Schwangerschaftsrate von 13% auf 26% (Positiver Prädiktiver Wert) verdoppeln (Tab. 11). Damit kann es als erwiesen angesehen werden, dass sHLA-G als zusätzlicher Selektionsmarker für die Abschätzung der Überlebensfähigkeit von Embryonen von Bedeutung ist. Die „geringe“ Post-Test-Wahrscheinlichkeit von 26% weist allerdings darauf hin, dass zusätzliche andere Faktoren für die Vorhersage einer Schwangerschaft einbezogen werden müssen.

Um zu überprüfen, ob sHLA-G ein unabhängiger Faktor für die Vorhersage einer Schwangerschaft ist, wurde die binomiale Regressionsanalyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde die Anzahl der vorhergegangenen ART-Versuche, die Anzahl der transferierten Embryonen, die Qualität der Embryonen, der sHLA-G Status der transferierten Embryonen und das Alter der Frauen als Parameter einbezogen. Unter all diesen Parametern war die morphologische Beurteilung und der sHLA-G Status der Embryonen die stärksten unabhängigen Faktoren für die Voraussage einer Schwangerschaft. Dennoch ist der logistische Regressionskoeffizient [EXP(B)] für die Embryoqualität fast verdoppelt im Vergleich zu dem des sHLA-G Status. Dies deutet an, dass die morphologische Beurteilung der Embryonen der stärkste Indikator für eine Schwangerschaft ist. Trotzdem ist es sinnvoll beide Parameter für die Embryoauswahl zu kombinieren, besonders wenn zwei oder drei Embryonen derselben Qualität verfügbar sind. Dies gilt natürlich nur für Länder, in denen das Embryonenschutzgesetz die Selektion von Embryonen nicht verbietet.

Aufgrund des deutschen Embryonenschutzgesetzes sind Embryonen bzw. -kulturen nur eingeschränkt als Untersuchungsmaterial für mögliche prädiktive Marker geeignet. Aus diesem Grund werden in aktuellen Publikationen Oozytenpunktate als Probenmaterial diskutiert (Rizzo et al., 2007; Ledee et al., 2007; Shaikly et al., 2008). Dabei können Änderungen in der Proteinzusammenstellung der Follikelpunktate die Oozytenentwicklung reflektieren und möglicherweise Hinweise auf einen angehenden Schwangerschaftseintritt geben.

In dieser Arbeit wurden deswegen sHLA-G Moleküle in 11 Follikelflüssigkeiten untersucht. Dabei konnte sHLA-G in 81.8% der Follikelpunktate bestimmt werden. Aufgrund dieser hohen Frequenz erscheint es nicht sinnvoll sHLA-G als Selektionsmarker zu verwenden. Dies steht im Gegensatz zur Erstuntersuchung von Rizzo et al. (2007), die sHLA-G Moleküle in nur 38% der untersuchten Follikelpunktate zeigen konnte. Die Studie von Shaikly et al. (2008) zeigte ähnliche Ergebnisse wie unsere Studie. Hier konnte in 74% der untersuchten Follikelflüssigkeiten sHLA-G nachgewiesen werden.

Die Konzentrationen der in den 11 Follikelflüssigkeiten detektierten sHLA-G Moleküle waren im Vergleich zu sHLA-G Plasmakonzentrationen erniedrigt (0.981 ng/ml versus 20.1 ng/ml). Diese Tendenz stimmt mit den Ergebnissen von Shaikly et al. überein: Follikelpunktate zeigten dort sHLA-G Konzentrationen von 3.5-8 U/ml im Gegensatz zu den Plasmakonzentrationen, die bei 4-60U/ml lagen.

Shaikly et al. und Rizzo et al. haben das sHLA-G Aufkommen in den Follikelflüssigkeiten mit dem sHLA-G Aufkommen in den entsprechenden Embryokulturen korreliert, erlangten aber kontroverse Ergebnisse. In dieser Arbeit konnte keine Beziehung zwischen Follikelflüssigkeiten und Embryokulturen festgestellt werden, da die entsprechenden Embryokulturen nicht zur Verfügung standen.

Neben HLA-G konnten in allen 11 untersuchten Follikelpunktaten sHLA-I Moleküle in hohen Konzentrationen ( $805.9 \pm 50.9$  ng/ml), die den Plasmakonzentrationen gesunder Probanden gleichen, nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen sHLA-I Konzentrationen, kann sHLA-G kein restringiertes Expressionsprofil zeigen, wie jedoch für Embryonenkulturen beschrieben (Menicucci et al., 1999) und verliert damit auch seinen möglichen prädiktiven Wert.

Kürzlich erschienene Publikationen zeigten, dass neben sHLA-G, MICA bzw. sMICA als möglicher Biomarker für die Vorhersage einer Schwangerschaft aus folgenden

Gründen dienen kann: (i) MICA wird auf der Plazenta exprimiert (Mincheva-Nilsson et al., 2006), (ii) kann als lösliches Molekül in Seren von Frauen in der Spätschwangerschaft gefunden werden (Mincheva-Nilsson et al., 2006, Porcu-Buisson et al., 2007) und (iii), wie schon erwähnt, funktionell das innate und adaptive Immunsystem modulieren (Bauer et al., 1999, Groh et al., 2001).

Aus diesen Gründen wurde ein spezifisches und sensitives Nachweissystem etabliert. Da MICA im Gegensatz zu HLA-G hochpolymorph ist, musste eine Antikörperkombination gefunden werden, die alle sMICA Allele erkennen kann. Die Untersuchung von 9 Antikörpern zeigte, dass 4 Antikörper nicht alle sMICA Allele erkennen und somit für einen quantitativen Nachweis von sMICA nicht geeignet sind. Mit der hier gewählten Antikörperkombination ist sichergestellt, dass alle sMICA Allele mit einer Nachweisgrenze von 20,4 ng/ml, erkannt werden. Im Gegensatz konnte ein Antikörper einer kommerziellen Antikörperkombination das Allel \*017 nicht erkennen. Somit wurde dieses kommerzielle System (BAMOMAB) als Nachweissystem ausgeschlossen.

Da von den Embryonenkulturen, die auf sHLA-G untersucht worden sind kein weiteres Probenmaterial mehr vorlag, konnte sMICA in den Embryonenkulturen nicht bestimmt werden. Jedoch wurden mit dem sMICA Nachweissystem sMICA Konzentrationen in Follikelflüssigkeiten gemessen. Lösliches MICA wurde in 81,8% der untersuchten Follikelpunktate detektiert. Hierbei zeigte sich eine Erhöhung der sMICA Werte im Vergleich zu Plasmakonzentrationen gesunder Normalpersonen ( $0.588 \pm 0.159$  ng/ml versus  $0.263 \pm 0.022$  ng/ml). Da es sich bei MICA um ein stressinduziertes Molekül handelt, könnte die starke Expression in den Follikelpunktaten auf vermehrten Stress, z.B. während der Eizellentnahme oder bei der hormonellen Behandlung der Frauen, zurückzuführen sein. Da sMICA, wie auch sHLA-G Moleküle in 9 von 11 Follikelpunktaten nachzuweisen waren, sind diese Moleküle nur bedingt als prädiktiver Marker zur Auswahl einer Oozyte geeignet.

Da sMICA/MICA während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet wird und sMICA in der späteren Schwangerschaft im Serum nachgewiesen werden kann (Mincheva-Nilsson et al., 2006, Porcu-Buisson et al., 2007), wurden Plasmakonzentrationen von sMICA in Analogie zu Untersuchungen von sHLA-G (Pfeiffer et al., 2000) vor und während der Schwangerschaft nach ART und in fertilen Kontrollen untersucht.

Die präovulatorische sMICA Konzentration war in den ART Patientinnen im Gegensatz zu den fertilen nicht schwangeren Frauen signifikant erhöht ( $p = 0.0001$ ). Dies führt zu der Vermutung, dass die hormonale Behandlung der Frauen in einem ART Programm einen Effekt auf die Freisetzung von sMICA hat. Die präovulatorischen sMICA Werte unterscheiden sich jedoch nicht zwischen intakten Schwangerschaften, Frühaborten und Eileiterschwangerschaften, im Gegensatz zu der Studie von Porcu-Buisson et al. (2007). In dieser Studie wird beschrieben, dass präovulatorische sMICA Werte von Frauen, die einen Abort erleiden erhöht waren, im Vergleich zu Frauen mit intakter Schwangerschaft. Allerdings lag die Anzahl der Frauen mit Aborten bei 8 von insgesamt 170 Studienteilnehmerinnen. Weiterhin weist diese Studie auf eine Korrelation von erhöhten präovulatorischen sMICA Serumwerten und der Vorhersage von Implantationsstörungen oder Fehlgeburten nach ART hin. Allerdings wurde in der Studie von Porcu-Buisson et al. nur ein selbst hergestelltes Nachweissystem verwendet. Die Antikörper wurden durch Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem MICA eines Allels (\*008) hergestellt. Es ist somit fraglich, ob diese Antikörper andere MICA Allele erkennen. Zudem lag die Bestimmungsgrenze bei 100 pg/ml (Porcu-Buisson et al., 2007), im Vergleich zu 20.4 pg/ml bei dem optimierten sMICA ELISA. Daher ist es nicht überraschend, dass die Bestimmung von sMICA in der Studie von Porcu-Buisson et al. mit dem sMICA ELISA nicht verifiziert werden konnte.

In den ersten 8 Schwangerschaftswochen nach ART zeigten die sMICA Werte einen signifikanten Anstieg in Frauen mit intakten Schwangerschaften, während Frauen mit Frühaborten oder Eileiterschwangerschaften nur einen geringen sMICA Anstieg aufwiesen ( $p = 0.004$ ).

Ähnliche Untersuchungen wurden bereits für sHLA-G publiziert (Pfeiffer et al., 2000). Jedoch zeigten diese, dass präovulatorische sHLA-G Werte nur in intakten Schwangerschaften erhöht waren und ein Anstieg von sHLA-G nur bei Frauen mit Mehrlingsschwangerschaften verzeichnet wurde. Dagegen stiegen die sMICA Werte in intakten Schwangerschaften kontinuierlich ab dem Schwangerschaftseintritt an.

Dies lässt vermuten, dass schwangerschafts-verwandte Hormone für die Freisetzung von sMICA verantwortlich sein können. Da in Analogie zu den sMICA Verläufen bei intakten Schwangerschaften auch die Progesteronspiegel kontinuierlich steigen (Arck et al., 2004 und 2008), während niedrige Progesteronwerte bei Eileiterschwangerschaften und Aborten gefunden werden (El Bishry and Ganta,



2008; Ugurlu et al., 2008), wurde untersucht, ob die Freisetzung von sMICA durch Progesteron reguliert werden könnte. Für HLA-G wurde bereits eine Regulation der Expression über ein sogenanntes „Progesteron-Response-Element“ in der Genpromoterregion von HLA-G, in der HLA-G positiven Chorionkarzinomzelle JEG-3 (Yie et al., 2006) bzw. in Endothel- und glatten Muskelzellen (Sheshgiri et al., 2008) beschrieben.

Um den möglichen Effekt der hormoninduzierten Regulation der MICA Expression zu zeigen, wurden Experimente mit der Zervixkarzinom Zelllinie HeLa durchgeführt, weil diese, analog zu JEG-3 und HLA-G, MICA konstitutiv exprimiert. Die Zellen wurden mit schwangerschafts-verwandten Hormonen (hCG und FSH) und Progesteron in Konzentrationen von 0 ng/ml bis 1000 ng/ml behandelt und auf MICA mRNA und Zelloberflächenexpression analysiert.

Die mRNA Analyse zeigte einen Anstieg von MICA Expression in Abhängigkeit zur Progesteronkonzentration. Gleichzeitig führte Progesteron zu einer Abnahme von MICA auf der Zelloberfläche auf HeLa Zellen. Andere Hormone zeigten keine Expressionsänderungen. Nach Behandlung mit Progesteron und seinem Antagonisten RU486 wird dieser Effekt inhibiert. Damit ist bewiesen, dass die beobachteten Effekte durch Progesteron induziert worden sind.

Neben der MICA Expression wurde die Expression der Disulfid-Isomerase ERp5, die bei der proteolytischen Spaltung von MICA involviert ist (Kaiser et al., 2007), analysiert. Bislang gibt es für Erp5 nur Hinweise, dass die Aktivität von ERp5 hormonabhängig ist und wurde bisher nur für Östrogen beschrieben (Tsibris et al., 1989). Die ERp5 mRNA Analyse zeigte nach Behandlung mit Progesteron keine Veränderungen der ERp5 spezifischen mRNA Expression. Steigende Progesteronkonzentrationen führten aber zu einem Anstieg von ERp5 auf der Zelloberfläche. Das höhere Aufkommen von ERp5 auf der Zelloberfläche bei gleichzeitiger Reduktion der MICA Oberflächenexpression lässt vermuten, dass die MICA Moleküle über ERp5 freigesetzt und im Kulturmedium detektierbar werden.

Mechanistisch wird die Freisetzung durch Bindung von ERp5 an die  $\alpha$ 3-Domäne von MICA und einer folgenden Konformationsänderung hervorgerufen. Durch diese Strukturänderung kann MICA von anderen Proteasen, wie Matrix-Metalloproteasen und ADAM (Salih et al., 2002 und 2006; Waldhauer et al., 2006 und 2008) von der Zelloberfläche abgespalten werden.

Mit dem spezifischen ELISA Format wurden diese freigesetzten sMICA Moleküle im entsprechenden Zellkulturmedium nachgewiesen. Dabei waren die detektierten sMICA Konzentrationen mit den steigenden Konzentrationen von Progesteron ebenfalls erhöht. Es ist damit offensichtlich, dass die Disulfid-Isomerase ERp5 bei der Freisetzung von MICA beteiligt ist (Kaiser et al., 2007), und dass die MICA/sMICA Expression durch das Steroidhormon Progesteron via ERp5 reguliert wird.

Da der aktivierende MICA spezifische Rezeptor NKG2D auf NK-Zellen exprimiert wird, werden die funktionellen Konsequenzen der sMICA Freisetzung durch Messung der NK-Zellaktivität analysiert. Die Untersuchung der NK-Zellaktivität gegenüber den behandelten HeLa Zellen zeigte, wie erwartet, dass die progesteroninduzierte Reduktion von MICA auf der Zelloberfläche zu einer verringerten Aktivität der NK-Zellen führte. Durch den Verlust des NKG2D-Liganden kann der Rezeptor nicht binden, so dass die MICA defiziente Zelle nicht mehr als Zielzelle erkannt werden kann, d.h. somit einer Immunantwort von NK-Zellen entkommen kann (Immune Escape Mechanismus).

Dieser Immune Escape Mechanismus könnte noch verstärkt werden, indem die freigesetzten Moleküle die NK-Zell-Aktivität zusätzlich herunterregulieren. Neueste Arbeiten konnten zeigen, dass sMICA in Gegenwart von TGF $\beta$ 1 die Internalisierung des NKG2D Rezeptors herbeiführen kann (Clayton et al., 2008).

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Aborte häufig als immunologische Abstoßungsreaktion angesehen werden (Arck et al., 2008). Unsere Beobachtungen der niedrigen sMICA Spiegel bei Frauen mit Frühaborten verführt zu der Spekulation, dass aufgrund der geringen Progesteronkonzentrationen MICA nur ungenügend von der Zelloberfläche des Fetus freigesetzt wird. Somit ist dieser einer NK-Zellantwort ausgeliefert, wobei die NK-Zellen auch nicht durch sMICA Moleküle inhibiert werden können, wie bei intakten Schwangerschaften.

Weitere funktionelle Untersuchungen zeigten, dass durch die Behandlung von PBLs mit rekombinantem sMICA, die Freisetzung des Th2 Zytokins IL10 begünstigt, während die Expression des Th1 Zytokins IFN $\gamma$  reduziert wird. Diese Beobachtung ist im Einklang mit Groh et al. (2002) und zeigt, dass sMICA bei der Zytokinverschiebung, die häufig während der Schwangerschaft beobachtet werden kann (Wiemann et al., 2005; Märten et al., 2006), einen Beitrag leisten kann.

Neben den Zytokinänderungen, verringerten die mit rsMICA behandelten PBLs ihre zelluläre in-vitro Funktion unter Mitogenstimulation: Ihre Kapazität zu proliferieren war in Gegenwart von Mitogenen (PHA, ConA, PWM oder OKT-3) gestört. Während einer Schwangerschaft könnte diese Verringerung der Proliferation von PBLs, insbesondere von zytotoxischen Zellen, einen weiteren Mechanismus für die Regulation der feto-maternalen Toleranz darstellen.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Progesteron über das NKG2D-Ligandensystem das Immunsystem modulieren kann, sodass die Etablierung und der Erhalt einer Schwangerschaft begünstigt werden.

## 6. Zusammenfassung

Die nicht klassische Klasse I bzw. die HLA-ähnlichen Moleküle HLA-G und MICA, sowie deren löslichen Formen, werden als Mediatoren für die feto-maternale Immuntoleranz in der Schwangerschaft diskutiert. Ziel dieser Promotion war, diese Moleküle als nicht-invasive Biomarker für die Vorhersage einer Schwangerschaft nach assistierter Reproduktionstechnik (ART) zu etablieren.

Um sHLA-G in Embryokulturen (EK) nachzuweisen, wurde ein Luminex®-Technologie basierendes Nachweissystem, das in den Ablauf einer ART integrierbar ist, entwickelt. Eine Pilotstudie (588 EK, 313 Frauen) und eine Multizenterstudie (29 Zentren, 4661 EK, 2543 Frauen) zeigten, dass der sHLA-G Nachweis in EK vom Entwicklungsstatus des Embryos, während die sHLA-G Konzentration von der Qualität des Embryos abhängig ist. In der Multizenterstudie konnte erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen dem sHLA-G Nachweis und einer Schwangerschaft durch Ein-Embryotransfer erstellt werden. Hier könnte durch sHLA-G Testung die Schwangerschaftsrate von 13% auf 26% verdoppelt werden. Die multivariate Analyse aller embryo- und patientenspezifischen Parameter zeigte, dass sHLA-G in EK neben der morphologischen Evaluation der Embryoqualität als relevanter prognostischer Faktor für die Vorhersage einer Schwangerschaft gilt.

In Follikelpunktaten jedoch scheint sHLA-G aufgrund der hohen Inzidenzrate nicht relevant zu sein, um die Oozytenqualität bzw. eine Schwangerschaft vorherzusagen. Die Analyse dieser Follikelpunktate mit dem neu etablierten sMICA ELISA zeigte ebenfalls für sMICA keine Relevanz. In Serumproben dagegen scheint ein Konzentrationsanstieg von sMICA ein Hinweis für intakte Schwangerschaften nach ART zu sein, da diese sMICA Steigerung bei Tubengraviditäten oder Aborten nicht vorlag. Untersuchungen zur Regulation von MICA zeigten eine durch Progesteron induzierte Reduktion von MICA auf der HeLa-Zelloberfläche (Zervixkarzinom), bei gleichzeitiger Steigerung des sMICA Aufkommens im Kulturmedium. Diese durch das Enzym ERp5 vermittelte Freisetzung von sMICA führt zu einer Verringerung der NK-Zell-Aktivität. Die funktionellen Konsequenzen des erhöhten sMICA Aufkommens zeigten sich als Beeinflussung der zellulären in-vitro Funktion von PBLs und einer erhöhten Freisetzung des Th2 Zytokins IL-10 bei gleichzeitiger Reduktion von IFN- $\gamma$ . Aufgrund dieser immunmodulierenden Konsequenzen scheint MICA/sMICA ein interessantes Kandidatenmolekül für die Etablierung und Erhaltung einer Schwangerschaft zu sein.

## 7. Referenzen

Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.* 254(2):149-54, 2009.

Apps R, Gardner L, Traherne J, Male V, Moffett A. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Hum Reprod.* Nov;23(11):2535-48, 2008.

Arck P. Stress and embryo implantation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod,* Feb;33 (1Pt2):40-2, 2004.

Arck P, Rucke M, Rose M, Arck PC, Rucke M, Rose M, Szekeres-Bartho J, Douglas AJ, Pritsch M, Blois SM, Pincus MK, Bärenstrauch N, Dudenhausen JW, Nakamura K, Sheps S, Klapp BF. Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant woman. *Jul;17(1):101-13,* 2008.

Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol.* Aug;48(1):17-26, 2000.

Barakonyi A, Polgar B, Szekeres-Bartho J. The role of gamma/delta T-cell receptor-positive cells in pregnancy: part II. *Am J Reprod Immunol.* Aug;42(2):83-7, 1999.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, and Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stressinducible MICA. *Science* 285: 727–729, 1999.

Bulmer JN, Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunol.* Feb;42(4):511-21, 2005.

Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta SHLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood.* Jan 1;105(1):251-8, 2005.

Check JH, Sansoucie L, Chern J, Amadi N, Srivastava M, Larece K. Evidence that progesterone receptor antagonists may help in the treatment of a variety of cancers by locally suppressing natural killer cell activity. *Clin Exp Obstet Gynecol.*;34(4):207-11, 2007.

Check JH, Dix E, Sansoucie L. Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein. *Med Hypotheses.* Jan;72(1):87-90, 2009.

Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol*, Jun 1;180(11):7249-58, 2008.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subset. *Trends Immunol.* Nov;22(11):633-40, 2001.

Criscuoli L, Rizzo R, Fuzzi B, Melchiorri L, Menicucci A, Cozzi C, Dabizzi S, Branconi F, Evangelisti P, Baricordi OR, Noci I. Lack of Histocompatibility Leukocyte Antigen-G expression in early embryos is not related to germinal defects or impairment of interleukin-10 production by embryos. *Gynecol Endocrinol*, 20(5): p. 264-9, 2005.

Desai, N., J. Filipovits, and J. Goldfarb, Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and implantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit. *Reprod Biomed Online*, 13(2): p. 272-7, 2006.

El Bishry G, Ganta S. The role of single serum progesterone measurement in conjunction with beta hCG in the management of suspected ectopic pregnancy. *J Obstet Gynaecol* May; 28(4):413-7, 2008.

Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G and Sher G: The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 9:1970, 2001.

Fisch JD, Keskinetepe L, Ginsburg M, Adamowicz M, Sher G. Graduated Embryo Score and soluble human leukocyte antigen-G expression improve assisted

reproductive technology outcomes and suggest a basis for elective single-embryo transfer. *Fertil Steril* 87(4): p. 757-63, 2007.

Fujii T, Ishitani A and Geraghty DE: A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 153:5516, 1994.

Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A and Baricordi OR: HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 32:311, 2002.

Geraghty DE, Koller BH, and Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24): p. 9145-9, 1987.

Giangrande PH, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res.* 54:291-314, 1999.

Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* Oct 29;93(22):12445-50, 1996.

Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jun 8;96(12):6879-84, 1999.

Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddel SR, Spies T. Costimulation of CD8- T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.* 2: 255–260, 2001.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734–738, 2002.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key

developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med.* Sep;12(9):1065-74, 2006.

Hansen KA, Opsahl MS, Nieman LK, Baker JR, Klein TA. Natural killer cell activity from pregnant subjects is modulated by RU 486. *Am J Obstet Gynecol.* Jan; 166(1 Pt 1):87-90, 1992.

Huirne JAF, Schats R. The use of GnRH agonists. *Textbook of Assisted reproductive Techniques*, ed. Gardner DK, Weissmann A, Howles CM, Shoham Z, London: Taylor and Francis, 2004.

Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, Paul P. *Cancer Research*, Sep 15;61(18):6838-45, 2001.

Ishitani A and Geraghty DE: Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3947, 1992.

Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB and Librach CL: HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:161, 1996.

Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* May 24;447(7143):482-6, 2007.

Kirszenbaum, M., Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10): p. 4209-13, 1994.

Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* Sep 7;343(10):702-9, 2000.



Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ and DeMars R: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248(4952): 220-3, 1990.

Lanier LL. Turning on Natural Killer Cells. *J Exp Med.* April 17; 191(8): 1259–1262, 2000.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol* 23:225-274, 2005.

Laskarin G, Tokmadzić VS, Strbo N, Bogović T, Szekeres-Bartho J, Randić L, Podack ER, Rukavina D. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol.* Oct;48(4):201-9, 2002.

Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol.* Nov;64(11):1039-44, 2003.

Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, Frankenne F, Foidart JM, Maggi E, Romagnani S, Ville Y, Piccinni MP. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod.* Sep;23(9):2001-9., 2008.

Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* Aug;11(8):1351-6, 1999.

LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 4;101(18):7064-9, 2004.

Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol.* May;2(5):443-51, 2001.

Lindemann M, Böhmer J, Zabel M, Grosse-Wilde H. ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy*; 33: 992-998, 2003.

Ludwig M: GnRH antagonists in Gardner DK, Weissmann A, Howles CM, Shoham Z (eds): *Textbook of Assisted reproductive Techniques*. London, Taylor and Francis, 2004.

Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A, Loke YW, Dohr G, Le Bouteiller P. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol*. Jun;11(6):889-98, 1999.

Märten A, von Lilienfeld-Toal M, Büchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int J Cancer*. Nov 15;119(10):2359-65, 2006.

McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*. Aug;20(4):435-59. 1999.

McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)*. 3(4):238-246, 2000.

McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol*. Apr 15;154(8):3771-8, 1995.

Meeusen EN, Bischof RJ, Lee CS. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am J Reprod Immunol*. Aug;46(2):169-79, 2001.

Medawar, PB: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Bio* 44:320-338, 1953.

Medina D, Kittrell FS, Tsimelzon A, Fuqua SA. Inhibition of mammary tumorigenesis by estrogen and progesterone in genetically engineered mice. *Ernst Schering Found Symp Proc.* (1):109-26, 2007.

Ménézo YJ, Chouteau J, Torelló J, Girard A, Veiga A. Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *Fertil Steril.* Aug;72(2):221-4, 1999.

Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L, Scarselli G, Baricordi O, Mattiuz PL. Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol*, 60(11): p. 1054-7, 1999.

Menier C, Riteau B, Carosella EC and Rouas-Freiss N: MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int J Cancer* 100:63, 2002.

Menier C, Rabreau M, Challier JC, Le Discorde M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood* Nov 15;104(10):3153-60, 2004.

Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Yeung MM, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J Immunol.* Feb 15;152(4):2020-32, 1994.

Mincheva-Nilsson L, Kling M, Hammarström S, Nagaeva O, Sundqvist KG, Hammarström ML, Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol.* Oct 1;159(7):3266-77, 1997.

Mincheva-Nilsson L. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol.* Dec 2;1:120. Review, 2003.

Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, Hernestål J, Baranov V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells

during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol.* Mar 15;176(6):3585-92, 2006.

Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* Sep;2(9):656-63, 2002.

Mor G, *Immunology of pregnancy*, Landes Bioscience, p. 41, 2006.

Nagaeva O, Jonsson L, Mincheva-Nilsson L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol.* Jul;48(1):9-17, 2002.

Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE and Lopez-Botet M: The ILT2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules coexpressed on target cells. *Eur J Immunol* 29:277, 1999.

Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A and Baricordi OR: Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 20:138, 2005.

Ottinger H, Beelen, DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*; 7: 2775-2779, 1996.

Parham P, Barnstable CJ, Bodmer WF. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J Immunol.* Jul;123(1):342-9, 1979.

Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J, Carosella ED: Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 61: 1138, 2000.

Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different

histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* Nov 1;62(21):6178-86, 2002.

Pfeiffer KA, Rebmann V, Pässler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D, Grosse-Wilde H. Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol.* Jun;61(6):559-64, 2000.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. 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. *J Immunol.* Jul 1;155(1):128-33, 1995.

Porcu-Buisson G, Lambert M, Lyonnet L, Loundou A, Gamberre M, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Caillat-Zucman S, Paul P. Soluble MHC Class I chain-related molecule serum levels are predictive markers of implantation failure and successful term pregnancies following IVF. *Hum Reprod.* Aug;22(8):2261-6, 2007.

Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia.* Sep-Oct;6(5):558-68, 2004.

Rajagopalan S and Long EO: A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189:1093, 1999.

Rebmann V, Pfeiffer K, Passler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E and Grosse-Wilde H: Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* 53:14, 1999.

Rebmann V, Regel J, Stolke D, Grosse-Wilde H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cancer Biol.* Oct 13(5):371-7, 2003.

Rebmann V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H. Detection of HLA-G5 secreting cells. *Hum Immunol.* Nov;64(11):1017-24, 2003.

Rebmann V, LeMaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED and Grosse-Wilde H: Report of the Wet Workshop for quantification of soluble HLA-G in Essen. *Hum Immunol* 66:853, 2005.

Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. *Hum Immunol*, 68(4): p. 251-8, 2007.

Rebmann V, Schütt P, Brandhorst D, Opalka B, Moritz T, Nowrousian MR, Grosse-Wilde H. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol. Apr;123(1):114-20, 2007.*

Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A: Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 35:1133, 2005.

Ristich V, Zhang W, Liang S, Horuzsko A. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. *Hum Immunol. Apr;68(4):264-71, 2007.*

Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Martinozzi S, Pla M, Dausset J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol. 2001 Feb;13(2):193-201.*

Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol. 2001 Apr 15;166(8):5018-26.*

Rizzo R, Fuzzi B, Stignani M, Criscuoli L, Melchiorri L, Dabizzi S, Campioni D, Lanza F, Marzola A, Branconi F, Noci I, Baricordi OR. Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF? *J Reprod Immunol*, 74(1-2): p. 133-42, 2007.

Sageshima N, Shobu T, Awai K, Hashimoto H, Yamashita M, Takeda N, Odawara Y, Nakanishi M, Hatake K, Ishitani A. Soluble HLA-G is absent from human embryo

cultures: a reassessment of sHLA-G detection methods. *J Reprod Immunol*, 75(1): p. 11-22, 2007.

Sageshima, N., H. Hashimoto, et al., Are in vitro fertilized eggs able to secrete soluble HLA-G? *American Journal of Reproductive Immunology*, 52 (Suppl. 1): p. P-8, 2004.

Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169: 4098–4102, 2002.

Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol.*;67:188-195, 2006.

Scholz T, Bartholomäus S, Grimmer I, Kentenich H, Obladen M. Problems of multiple births after ART: medical, psychological, social and financial aspects. *Hum Reprod.* Dec;14(12):2932-7, 1999.

Sentman CL, Wira CR, Eriksson M. NK cell function in the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.* Feb;57(2):108-15, 2007.

Shaikly VR, Morrison IE, Taranissi M, Noble CV, Withey AD, Cherry RJ, Blois SM, Fernández N. Analysis of HLA-G in Maternal Plasma, Follicular Fluid, and Preimplantation Embryos Reveal an Asymmetric Pattern of Expression. *J Immunol*, 180(6): p. 4330-7, 2008.

Sher G, Keskinetepe L, Nouriani M, Roussev R, Batzofin J. Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome. *Reprod Biomed Online*9(1): p. 74-8, 2004.

Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, Ahlering P, Batzofin J, Ginsburg M. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril*, 83(5): p. 1410-3, 2005.

Sher G, Keskinetepe L, Batzofin J, Fisch J, Acacio B, Ahlering P and Ginsburg M: Influence of early ICSI-derived embryo sHLA-G expression on pregnancy and implantation rates: a prospective study. *Hum Reprod* 20:1359, 2005.

Sher, G, L. Keskinetepe, and M. Ginsburg, sHLA-G expression: is it really worth measuring? *Reprod Biomed Online* 14(1): p. 9-10, 2007.

Sheshgiri R, Rao V, Tumiaty LC, Xiao R, Prodder JL, Badiwala M, Librach C, Delgado D. Progesterone induces Human Leukocyte Antigen-G Expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation*. 118(suppl 1):58-64, 2008.

Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, McMaster MT, Pfeiffer K, Chan DW, Wardelmann E, Grosse-Wilde H, Cheng CC, Kurman RJ, Shih IeM. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res*. Oct 1;9(12):4460-4,2003.

Srivastava MD and Anderson DJ. Progesterone receptor expression by human leukocyte cell lines: molecular mechanisms of cytokine suppression. *Clin Exp Obstet Gynecol.*;34(1):14-24, 2007.

Steinborn A, Varkonyi T, Scharf A, Bahlmann F, Klee A, Sohn C. Early detection of decreased soluble HLA-G levels in the maternal circulation predicts the occurrence of preeclampsia and intrauterine growth retardation during further course of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* Apr;57(4):277-86, 2007.

Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol*. Jul;22(7):378-85. Review, 2001.

Szekeres-Bartho J, Faust Z, Varga P, Szeready L, Kelemen K. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol*. Apr;35(4):348-51, 1996.

Szekeres-Bartho J and Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol*. Aug;31(1-2):81-95, 1996.



Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol.* Jun;1(6):1037-48, 2001.

Tsibris JC, Hunt LT, Ballejo G, Barker WC, Toney LJ, Spellacy WN. Selective inhibition of protein disulfide isomerase by estrogens. *J Biol Chem.* Aug 25;264(24):13967-70, 1989.

Ugurlu EN, Ozaksit G, Karaer A, Zulfikaroglu E, Atalay A, Ugur M. The value of vascular endothelial growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A, and progesterone for early differentiation of ectopic pregnancies, normal intrauterine pregnancies, and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril.* Apr 8. [Epub ahead of print]. 2008

Van Lierop MJ, Wijnands F, Loke YW, Emmer PM, Lukassen HG, Braat DD, van der Meer A, Mosselman S, Joosten I. Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod.* Aug;8(8):776-84, 2002.

Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, Haentjens P. Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis. *Hum Reprod Update*14(3): 209-18, 2008.

Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.*;66:2520-2526, 2006.

Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic A, Rammensee HG and Steinle A. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res.*;68:6368-6376, 2008.

Watson NF, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* Mar 15;118(6):1445-52, 2006.

Wen L, Barber DF, Pao W, Wong FS, Owen MJ, Hayday A. Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J Immunol.* Feb 15;160(4):1965-74. 1998.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* Jul;14(7):353-6, 1993.

Wiemann K, Mittrücker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, Rammensee HG, Steinle A. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol.* Jul 15;175(2):720-9, 2005.

Wu J, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest.* August 16; 114(4): 560–568, 2004.

Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL: Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J Immunol* 175:8379, 2005.

Yie SM, Balakier H, Motamedi G and Librach CL: Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate. *Fertil Steril* 83:30, 2005.

Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod.* Jan;21(1):46-51, 2006.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12(7): p. 1545-9, 1997.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Grosse-Wilde für die Überlassung der interessanten Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung.

Der größte Dank gilt Frau PD Dr. Vera Rebmann, für die überragende Betreuung, wissenschaftliche Unterstützung und grenzenlosen Einsatz im Verlauf dieser Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, speziell dem Labor für Biochemie, Sabine Schramm und Monika Collenburg für die jederzeit bereitwillige Hilfe im Labor, viele anregende Gespräche und lustige Stunden.

Vielen Dank an meine Familie, die nicht nur durch Bekleben von Etiketten auf über 6000 Reaktionsgefäße zu dieser Arbeit beigetragen hat, sondern durch Vertrauen und liebevolle Unterstützung.

## Lebenslauf

**Name** Magdalena Alice Switala  
**Geburtsdatum** 29.11.1979  
**Geburtsort** Tichau

### Schulischer Werdegang

**1990 - 1997** Schiller Gymnasium Bochum  
**1997 - 1999** Albert-Einstein-Gymnasium, Bochum,  
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

### Studium

**1999 - 2004:** Studium der Biologie  
Ruhr-Universität Bochum

**2003 - 2004:** Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Neurobiologie  
und Zellmorphologie  
Ruhr-Universität Bochum  
(Prof. Dr. A. Faissner)  
„Das Expressionsmuster von Phosphacan/ RPTP $\beta$   
Isoformen während der Entwicklung des olfaktorischen  
Systems der Maus“

**ab 03/ 2005:** Promotionsarbeit am Institut für Immunologie  
Universitätsklinikum Essen  
(Prof. Dr. H. Grosse-Wilde)  
„Nicht-klassische HLA-Klasse I Moleküle in der  
Schwangerschaft“

## **Wissenschaftliche Arbeiten**

### **Publikationen:**

Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in-vitro fertilized embryos. Hum. Immunol. 68: 251-258, 2007.

Nüchel H, Switala M, Collins CH, Sellmann L, Grosse-Wilde H, Dührsen U, Rebmann V. High CD49d protein and mRNA expression predicts poor outcome in chronic lymphocytic leukemia. Clin. Immunol. Mar 23, 2009 (Epub ahead of print).

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Nicht klassische HLA Klasse I Moleküle in der Schwangerschaft“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Magdalena Switala befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds  
der Universität Duisburg-Essen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift des/r Doktoranden/in

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktoranden