

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde IV
(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

**Untersuchung der Auswirkung der postnatalen
Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks und eines
Fehlens des Transkriptionsfaktors hypoxia-inducible
factor 1 alpha (HIF-1 α) auf myeloide Suppressorzellen
(MDSC) beim Neugeborenen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Stephan, Kevin Luca

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. N. Köstlin-Gille

2. Berichterstatter: Professorin Dr. Anja Ulmer

Tag der Disputation: 08.01.2024

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Neugeboreneninfektionen und das neonatale Immunsystem	1
1.2 Myeloide Suppressorzellen (MDSC)	2
1.3 Die Rolle von MDSC im fetalen und neonatalen Immunsystem.....	3
1.4 HIF-1 α und MDSC.....	4
1.5 Ziel der Arbeit	5
2 Material.....	6
2.1 Patientenkollektiv.....	6
2.2 Gewinnung humaner Immunzellen.....	6
2.3 Mäuse.....	7
2.4 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	8
2.5 Substanzen biologischen Ursprungs.....	9
2.6 Substanzen nicht-biologischen Ursprungs	9
2.7 Humane Antikörper.....	10
2.8 Murine Antikörper	11
2.9 Gase	11
2.10 Materialien aus Glas, Plastik und Metall.....	12
2.11 Geräte.....	13
2.12 Software	14
3 Methoden	15
3.1 Allgemeine Anmerkungen zur Versuchsdurchführung bei der Untersuchung der Auswirkungen von Hypoxie auf Immunzellen.....	15
3.2 Funktionskontrolle der Hypoxie-Werkbank.....	15
3.3 Zellkultur in Normoxie und Hypoxie.....	16
3.4 Zellzahlbestimmung.....	16

3.5	<i>Durchflusszytometrie</i>	17
3.6	<i>Versuche mit humanen Zellen</i>	18
3.6.1	Arbeitsschritte der <i>in vitro</i> -Versuche	18
3.6.2	Isolation von CBMC aus NSB und PBMC und Blutplasma aus Erwachsenenblut	19
3.6.3	Isolation von GR-MDSC aus CBMC durch <i>magnetic activated cell separation</i> (MACS)	20
3.6.4	Immunphänotypisierung und Analyse co-inhibitorischer Oberflächenmoleküle	21
3.6.5	Analyse der Apoptoserate	21
3.6.6	Intrazellulärfärbung zur Analyse der Effektorenzyme von MDSC	23
3.6.7	Analyse der intrazellulären ROS-Produktion von GR-MDSC	24
3.6.8	Analyse der T-Zell-Proliferationshemmung von GR-MDSC	25
3.7	<i>Tierversuche</i>	27
3.7.1	Arbeitsschritte der <i>in vivo</i> -Versuche	27
3.7.2	Entnahme von murinen Organen	27
3.7.3	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzgewebe	28
3.7.4	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Darmgewebe	28
3.7.5	Extrazelluläre Färbung von murinen Zellen	29
3.8	<i>Statistische Analyse</i>	30
4	Ergebnisse	31
4.1	<i>In vitro Analyse des Effektes einer Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks auf GR-MDSC aus Nabelschnurblut</i>	31
4.1.1	Neonatale GR-MDSC sind nach 24 bis 48 Stunden Kultur in Normoxie und Hypoxie überwiegend vital	31
4.1.2	Expression von co-inhibitorischen Molekülen auf neonatalen GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie	33
4.1.3	Expression von Effektorenzymen durch neonatale GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie	35
4.1.4	In Normoxie kultivierte neonatale GR-MDSC produzieren nach Stimulation mit PMA weniger ROS als in Hypoxie kultivierte GR-MDSC	37
4.1.5	Die Proliferation von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zellen wird durch normoxisch und hypoxisch vorkultivierte neonatale GR-MDSC ähnlich stark gehemmt	38
4.1.6	Zusammenfassung der <i>in vitro</i> -Versuche	40
4.2	<i>Effekt eines Fehlens von HIF-1α in myeloiden Zellen auf die MDSC-Akkumulation und die intestinale Immunität bei neugeborenen Mäusen</i>	41
4.2.1	Bei neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen ist die MDSC-Akkumulation im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen vermindert	41
4.2.2	Im Darm von neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen akkumulieren weniger GR-MDSC als im Darm von neugeborenen WT-Mäusen	43
4.2.3	Veränderungen von weiteren intestinalen Immunzellen durch myHIF1 α -KO	45
4.2.4	Veränderungen in intestinalen lymphatischen Zellen durch myHIF1 α -KO	47

5	Diskussion	50
	5.1 <i>Limitationen</i>	60
	5.2 <i>Ausblick</i>	61
6	Zusammenfassung	63
	6.1 <i>Hintergrund und Hypothese</i>	63
	6.2 <i>Methoden</i>	63
	6.3 <i>Ergebnisse</i>	64
	6.4 <i>Schlussfolgerung</i>	64
7	Literaturverzeichnis	65
8	Veröffentlichung.....	71
9	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	72
10	Danksagung.....	73

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APC	Allophycocyanin
Arg-1	Arginase-1
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
BV421	Brilliant Violet 421
CB	<i>cord blood</i> (Nabelschnurblut)
CBMC	<i>cord blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLA4	<i>cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4</i>
DHR	Dihydrorhodamin 123
DSS	Dextran Sulfate Sodium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	Lat. <i>et alia</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
<i>g</i>	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GR-MDSC	<i>granulocytic myeloid derived suppressor cells</i> (granulozytäre myeloide Suppressorzellen)
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i> (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IE	Internationale Einheit
IFN γ	Interferon- γ (Interferon gamma)
IL-2	Interleukin-2

IL-4	Interleukin-4
iNOS	<i>inducible nitrogen oxide synthase</i> (induzierbare NO-Synthase)
KO	<i>Knockout</i> (gezielte Deaktivierung eines oder mehrerer Gene)
LPS	Lipopolysaccharid
LysM	Lysozym M
MACS	<i>magnetic activated cell separation</i> (magnetische Zellsortierung)
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i> (myeloide Suppressorzellen)
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MO-MDSC	<i>monocytic myeloid derived suppressor cells</i> (monozytäre myeloide Suppressorzellen)
myHIF1 α -KO	Konditioneller Knockout für HIF-1 α in der myeloiden Zellreihe
n	Probenanzahl
N ₂	Molekularer Stickstoff
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
ns	Nicht signifikant
NSB	Nabelschnurblut
O ₂	Molekularer Sauerstoff
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PD-L2	<i>programmed cell death ligand 2</i>

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PGE2	Prostaglandin E2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	<i>polymorphonuclear cells</i>
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
S100A9	<i>S100 calcium binding protein A9</i>
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
t	Lat. <i>tempus</i> (Zeit)
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
Tregs	Regulatorische T-Zellen
vs.	Lat. <i>versus</i> = gegen(übergestellt)
WT	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zellkulturmedien und Puffer	8
Tab. 2: Flüssigkeiten und Lösungen biologischen Ursprungs.....	9
Tab. 3: Flüssigkeiten und Lösungen nicht-biologischen Ursprungs	9
Tab. 4: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse humaner Zellen	10
Tab. 5: Antikörper zur Isolation von MDSC aus CBMC.....	10
Tab. 6: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse muriner Zellen	11
Tab. 7: Gase für den Betrieb der Hypoxie-Werkbank	11
Tab. 8: Allgemeiner Laborbedarf zur Durchführung der Versuche.....	12
Tab. 9: Geräte zur Durchführung der Versuche	13
Tab. 10: Software zur Auswertung der Versuche.....	14
Tab. 11: Interpretation der Apoptosefärbung mit Annexin V und 7-AAD.....	22
Tab. 12: Pipettierschema für die intrazelluläre Färbung von CBMC	23
Tab. 13: Zusammensetzung der Zellsuspension je Well einer Zellkultur-Platte	26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Flussdiagramm der Arbeitsschritte der <i>in vitro</i> -Versuche.	18
Abbildung 2:	Flussdiagramm der Arbeitsschritte der <i>in vivo</i> -Versuche.	27
Abbildung 3:	Die Apoptoserate von neonatalen GR-MDSC wird durch Kultur in Normoxie oder Hypoxie nicht beeinflusst.....	32
Abbildung 4:	Expression der co-inhibitorischen Moleküle CTLA-4, Ox-2R und PD-L2 auf neonatalen GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie.....	34
Abbildung 5:	Expression von Arginase-1 und iNOS durch GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie.	36
Abbildung 6:	Nach Kultur in Normoxie produzieren neonatale GR-MDSC weniger ROS als nach Kultur in Hypoxie.....	37
Abbildung 7:	Die Proliferation von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen wird durch Ko-Kultivierung mit normoxisch und hypoxisch vorkultivierten GR-MDSC ähnlich effektiv gehemmt.....	39
Abbildung 8:	Der prozentuale Anteil von MDSC ist in der Milz von neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen reduziert.	42
Abbildung 9:	Neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO weisen am ersten postnatalen Tag weniger GR-MDSC im Darm auf als neugeborene WT-Mäuse.....	44
Abbildung 10:	Neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO weisen am siebten postnatalen Tag im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen veränderte intestinale Immunzellpopulationen auf.	46
Abbildung 11:	Neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO zeigen im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen an P7 eine verstärkte Aktivierung der intestinalen T-Zellen.	48

1 Einleitung

1.1 Neugeboreneninfektionen und das neonatale Immunsystem

Infektionen zählen zu den häufigsten Erkrankungen von Neugeborenen und sind einer der wichtigsten Gründe für Sterblichkeit in der Neonatalperiode [1]. Die Inzidenz der Neugeboreneninfektion liegt in Deutschland bei ca. 1 % und steigt mit abnehmendem Geburtsgewicht auf 30 % an [2-4]. Neu- und Frühgeborene sind deutlich anfälliger für Infektionen als Erwachsene, was darauf zurückzuführen ist, dass das neonatale Immunsystem anders auf Infektionserreger reagiert als das adulte Immunsystem [5, 6].

Immunologisch sind intrauterin insbesondere Mechanismen wichtig, die zur Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz beitragen, um Abstoßungsreaktionen zwischen der Mutter und dem semiallogenen Organismus zu verhindern [6]. Effektive Abwehrmechanismen sind zu dieser Zeit nicht vorrangig erforderlich, da die intrauterine Umgebung in den meisten Fällen steril ist und der Fetus durch die mütterliche Immunität vor Infektionen geschützt wird [7, 8]. Postnatal kommt das Immunsystem des Neugeborenen erstmalig mit potentiell gefährlichen, aber auch ungefährlichen oder sogar nützlichen Mikroorganismen der extrauterinen Umgebung in Kontakt und muss sich rasch zu einem kompetenten Immunsystem entwickeln und lernen, die Balance zwischen Abwehr und Toleranz zu halten [8, 9]. In dieser Übergangszeit entwickelt sich auch das Mikrobiom – die Gesamtheit der Bakterien, die unseren Körper besiedeln [10]. Das Mikrobiom wiederum beeinflusst die Immunreifung und insbesondere die Entwicklung des Mukosa-assoziierten Immunsystems [11-13]. Überraschenderweise führt die plötzliche Besiedelung des Neugeborenen mit Milliarden von Mikroorganismen nicht zu einer überschießenden Entzündungsreaktion.

Die Mechanismen, die die Umstellung des Immunsystems vom intrauterinen zum extrauterinen Zustand regulieren und das Neugeborene bei der Etablierung des Mikrobioms vor einer Hyperinflammation schützen, sind bisher nur sehr unvollständig verstanden.

1.2 Myeloide Suppressorzellen (MDSC)

„Myeloide Suppressorzellen“ sind eine heterogene Gruppe von myeloiden Immunzellen des angeborenen Immunsystems, die durch die Eigenschaft gekennzeichnet sind, Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort in ihrer Funktion zu hemmen [14]. Unterschiedliche pathologische Situationen können zu einer Akkumulation von MDSC führen, wie z.B. Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, akute und chronische Inflammation oder Infektionen, Stress und Adipositas [15-17].

Anhand des Phänotyps werden MDSC in der aktuellen Literatur grob in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Granulozytäre MDSC (GR-MDSC), die phänotypisch neutrophilen Granulozyten ähneln und unter anderem den Oberflächenmarker CD66b exprimieren, und monozytäre MDSC (MO-MDSC), die Oberflächenmarker von Monozyten exprimieren [17, 18]. Trotz phänotypischer, morphologischer und biochemischer Unterschiede sind sowohl GR-MDSC als auch MO-MDSC in der Lage, T-Zellen zu hemmen und dadurch Immunantworten zu unterdrücken und zu modulieren [15, 19, 20]. Die Definition der verschiedenen Untergruppen von MDSC befindet sich im ständigen Wandel und wird in der Literatur auch aktuell noch häufig diskutiert [15, 21].

Es sind mehrere Mechanismen bekannt, über welche MDSC die Funktion von T-Zellen beeinträchtigen können [22, 23]. Die Expression des Enzyms Arginase-1 (Arg-1) führt zum Abbau von L-Arginin und die Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zum Abbau von Tryptophan, zwei für die T-Zell-Funktion essentielle Aminosäuren [24, 25]. Zusätzlich vermitteln MDSC ihre suppressive Wirkung über die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche über die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) direkt und durch den Abbau von L-Arginin indirekt an der Hemmung von T-Zell-Funktionen beteiligt ist [25-27]. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) nutzen MDSC, um oxidativen Stress auf T-Zellen in ihrer unmittelbaren Umgebung auszuüben und dadurch deren Funktion zu supprimieren [23, 28, 29].

Auch die Expression der inhibitorischen Rezeptoren CD200 (Ox-2) und CD200R (Ox-2R) sowie die Expression der Immuncheckpoint-Rezeptoren *programmed cell death protein 1* (PD-1) und *cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) und ihrer Liganden *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) und *programmed cell death ligand 2* (PD-L2) gehören zu den Effektormechanismen, die von MDSC zur Hemmung und Regulierung von Immunantworten genutzt werden [30-33].

1.3 Die Rolle von MDSC im fetalen und neonatalen Immunsystem

Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Arbeiten zeigen, dass MDSC nicht nur im Rahmen pathologischer Zustände akkumulieren, sondern auch in physiologischen Situationen vermehrt vorkommen können. So konnte z.B. eine Akkumulation von GR-MDSC im Blut von gesunden Schwangeren während der gesamten Schwangerschaft, aber auch im peripheren Blut von Neugeborenen während der Neonatalperiode nachgewiesen werden [34-36]. Die vermehrte Anzahl von GR-MDSC bei Neugeborenen zeigte sich unabhängig vom Gestationsalter und sank nach den ersten 28 Lebenstagen auf das Niveau von gesunden Erwachsenen [35].

GR-MDSC von Schwangeren und wahrscheinlich auch GR-MDSC von Feten tragen zu den komplexen Vorgängen der feto-maternalen und materno-fetalen Toleranz bei, weshalb sie eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und für das Überleben des Fetus haben [37-40]. Nach der Geburt scheinen GR-MDSC bei Infektionen und Inflammationsreaktionen einen regulierenden Einfluss zu nehmen und mitverantwortlich für die Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Immunreaktionen zu sein [9, 41, 42]. Ob GR-MDSC zur erhöhten Infektionsanfälligkeit von Neugeborenen beitragen oder das Neugeborene während der Etablierung des Mikrobioms vor einer Hyperinflammation schützen, ist bisher unklar.

1.4 HIF-1 α und MDSC

Hypoxie wird als ein Mangel an O₂ definiert und ist ein wichtiges Signal bei der Aktivierung von Immunzellen [43, 44]. Die zellulären Anpassungsvorgänge an ein hypoxisches Milieu werden hauptsächlich über den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (*hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1) vermittelt [45, 46]. HIF-1 ist ein Heterodimer mit einer alpha-Einheit (HIF-1 α), die über den Sauerstoffpartialdruck reguliert wird, und einer beta-Einheit (HIF-1 β), die konstitutiv exprimiert wird [47]. Während HIF-1 α in Normoxie kontinuierlich abgebaut wird, akkumuliert es in Hypoxie, heterodimerisiert mit HIF-1 β , bindet im Zellkern an sogenannte Hypoxie-responsive Elemente (HRE) und reguliert die Transkription verschiedener Gene [48].

Neben vielen weiteren Effekten hat HIF-1 α auch Einfluss auf die Akkumulation, Aktivierung und Differenzierung von MDSC [45, 49-51]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein Fehlen von HIF-1 α in myeloiden Zellen (myHIF1 α -KO) zu einer verringerten Akkumulation von MDSC während der Schwangerschaft führte und die suppressive Aktivität von MDSC beeinträchtigte [52].

Intrauterin lebt der Fetus in einer hypoxischen Umgebung mit einer physiologischen Sauerstoffsättigung von 40 – 65 % [53-55]. Postnatal adaptiert sich der Organismus in einer komplexen Anpassungsreaktion an das extrauterine Leben und unter physiologischen Umständen steigt der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) über 10 – 15 Minuten dynamisch an, bis sich die Sauerstoffsättigung auf dem Niveau eines gesunden Erwachsenen bei > 95 % stabilisiert [56-59]. Bisher ist unklar, welche Rolle der postnatal ansteigende pO₂ bei der immunologischen Umstellung des Neugeborenen spielt und inwiefern MDSC und HIF-1 α hierbei von Bedeutung sind.

1.5 Ziel der Arbeit

Da MO-MDSC weder im Nabelschnurblut von gesunden Früh- und Reifgeborenen noch im peripheren Blut von Neugeborenen akkumulierten [35, 60], stehen in dieser Arbeit die Wechselwirkungen zwischen GR-MDSC und Hypoxie im Fokus. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind GR-MDSC schon während der Fetalperiode vorhanden und scheinen bei der komplexen Adaptation des neonatalen Immunsystems eine wichtige Rolle zu spielen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte genauer untersucht werden, wie sich der postnatale Anstieg des pO_2 bei der Geburt auf die Funktionen von GR-MDSC auswirkt. Außerdem wurde im Mausmodell untersucht, welche Auswirkungen ein Fehlen von HIF-1 α in myeloiden Zellen (myHIF1 α -KO) auf die Akkumulation von MDSC und die Immunhomöostase im Darm des Neugeborenen hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hypothesen überprüft:

- 1) Neonatale GR-MDSC ändern durch die postnatale Erhöhung des pO_2 ihre Wirkmechanismen und verlieren zunehmend ihre Funktion.
- 2) Ein myHIF1 α -KO führt in neugeborenen Mäusen zu einer verminderten Akkumulation von MDSC.
- 3) Ein myHIF1 α -KO führt zu einer veränderten Immunhomöostase im Darm während der Etablierung des Mikrobioms.

2 Material

2.1 Patientenkollektiv

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt (178/2011BO1). Es wurde nur Nabelschnurblut (NSB) reifer Neugeborener ohne Anzeichen einer pränatal erworbenen Infektion verwendet, die per Sectio caesarea entbunden wurden. Die Blutentnahme erfolgte aus der abgetrennten Nabelschnur nach vorangegangener schriftlicher Einwilligung der Eltern. Die Nabelschnurblutspende erfolgte anonym. Es wurden weder Daten über das genaue Gestationsalter noch über das Geschlecht des Kindes erhoben. Adultes Blut wurde ausschließlich von freiwilligen, gesunden Spendern und Spenderinnen verwendet.

2.2 Gewinnung humaner Immunzellen

Direkt nach der Abnabelung eines reifen Neugeborenen wurde eine Nabelschnurarterie der abgeklemmten und noch mit der Plazenta verbundenen Nabelschnur steril punktiert und kindliches Blut entnommen. Die verwendete Spritze wurde vor der Punktion mit Heparin benetzt und entlüftet, um die Blutgerinnung zu verhindern und den Kontakt des fetalen Blutes mit Sauerstoff auf ein Minimum zu reduzieren. So wurden die pränatal vorherrschenden hypoxischen Bedingungen [55, 61] in der Blutprobe beibehalten. In der Hypoxie-Werkbank wurden anschließend unter hypoxischen Bedingungen unverzüglich mononukleäre Zellen (*cord blood mononuclear cells*, CBMC) isoliert. Je nach Versuchsanforderungen erfolgte die weitere Aufreinigung zur Gewinnung von granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GR-MDSC). Peripher-venöses Erwachsenenblut wurde bei freiwilligen Spendern und Spenderinnen durch perkutane Venenpunktion entnommen und anschließend mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) bei Raumluft isoliert. Die Aufreinigung der Blutproben erfolgte ebenfalls unmittelbar nach der Entnahme.

2.3 Mäuse

HIF-1 α ^{flox} (B6.129-Hif1a^{tm3Rsj0/J}) Mäuse und LysMcre (B6.129P2-Lyzs^{tm1(cre)lfo/J}) Mäuse wurden von *The Jackson Laboratory* (Bar Harbour, Maine, USA) bezogen, C57BL/6J (WT) Mäuse von *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Deutschland). HIF-1 α ^{flox} Mäuse wurden mit LysMcre Mäusen gepaart, um Mäuse mit einer gezielten Deletion von HIF-1 α in den myeloiden Zellen zu erhalten (HIF-1 α ^{flox}/LysMcre, myeloider HIF1 α -KO). Alle Tiere wurden bis Mai 2019 in der „Einrichtung für Tierhygiene“ und ab Juni 2019 in der „Tierhaltung HNO / Augenklinik“ der Eberhard Karls Universität Tübingen gehalten. Die Haltung erfolgte unter keimarmen Bedingungen und alle tierexperimentellen Verfahren wurden nach deutschen Bundes- und Landesvorschriften durchgeführt (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: K06/19M). Die Verpaarung, Züchtung und Tötung der Mäuse wurde von Dr. med. Julian Schwarz und Dr. rer. nat. Stefanie Dietz durchgeführt, die dazu befugt sind und unserer Arbeitsgruppe angehören. Meine Aufgaben im Rahmen der experimentellen Tierversuche umfassten die Präparation der toten Mäuse, die Entnahme und Verarbeitung der Organe und die Untersuchung der murinen Zellen.

2.4 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Tab. 1: Zellkulturmedien und Puffer

Substanz	Zusammensetzung
Annexin-Puffer	2,0 g NaN ₃ 81,81 g NaCl 3,68 g CaCl ₂ 23,82 g Hepes
EDTA-Puffer	22,5 ml PBS 2,5 ml FCS 250 µl EDTA [0,5 M]
FACS-Puffer	500 ml BD FACSTFlow™ 500 µl Natriumazid (NaN ₃)
Liberase-Puffer	4 ml RPMI-1640 Medium 500 µl FCS 500 µl Hepes [5 mM] 0,5 mg Liberase
40 % Percoll-Lösung	1,6 ml Percoll [100 %] 160 µl PBS [10x] 2,3 ml PBS [1x]
70 % Percoll-Lösung	3,5 ml Percoll [100 %] 350 µl PBS [10x] 1,2 ml RPMI-1640 Medium
Zellkulturmedium	500 ml RPMI-1640 Medium 50 ml FCS 5 ml Penicillin-Streptomycin 5 ml L-Glutamin

2.5 Substanzen biologischen Ursprungs

Tab. 2: Flüssigkeiten und Lösungen biologischen Ursprungs

Substanz	Hersteller
Anti-human CD3, LEAF purified (Clone: OKT-3)	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
L-Glutamin, Konzentration: 200 mM, 100 ml	Biochrom
Liberase™ Research Grade	Roche
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
Recombinant human IL-2 Protein (Interleukin-2)	R&D Systems

2.6 Substanzen nicht-biologischen Ursprungs

Tab. 3: Flüssigkeiten und Lösungen nicht-biologischen Ursprungs

Substanz	Hersteller
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi
autoMACS® Running Buffer („MACS-Puffer“)	Miltenyi Biotec
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences
BD FACSFlo™ Trägerflüssigkeit	BD Biosciences
BD Perm/Wash™ Buffer	BD Biosciences
Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	Thermo Fisher Scientific
Dihydrorhodamin 123 (DHR)	Thermo Fisher Scientific
Heparin-Natrium (5000 IE / 0,5 ml)	B. Braun
Natriumazid (NaN ₃), 20 %ig	AppliChem
PBS-Dulbecco	Biochrom
Percoll	Cytiva
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
RPMI-1640 Zellkulturmedium	Biochrom / Sigma-Aldrich
Trypanblau	Biochrom

2.7 Humane Antikörper

Bei den verwendeten Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse von humanen CBMC und PBMC handelte es sich mit Ausnahme von Annexin V und 7-AAD um „*Mouse Anti-Human*“- Antikörper (Tab. 4).

Tab. 4: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse humaner Zellen

Antikörper	Klon	Hersteller
7-Aminoactinomycin D PerCP (7-AAD)	-	BD Biosciences
Annexin V FITC	-	Miltenyi Biotec
CD152 PE (CTLA-4)	BNI3	BioLegend
CD200 PE (OX-2)	OX-104	BioLegend
CD200R APC (OX-2R)	OX-108	BioLegend
CD273 PE (PD-L2)	24F.10C12	BioLegend
CD274 APC (PD-L1)	29E.2A3	BioLegend
CD279 APC (PD-1)	NAT105	BioLegend
CD4 APC	RPA-T4	BD Biosciences
CD66b FITC	G10F5	BD Biosciences
CD66b APC	REA306	Miltenyi Biotec
CD66b FITC	REA306	Miltenyi Biotec
CD8 PE	SK1	BD Biosciences
Human-Arginase-1 PE	658922	R&D Systems
IDO PE	700838	R&D Systems
NOS2 AF647 (C-11)	Sc-7271	Santa Cruz Biotechnology
ZAP-70 PE	1E7.2	Thermo Fisher Scientific

Antikörper für die Isolation der MDSC

Tab. 5: Antikörper zur Isolation von MDSC aus CBMC

Antikörper	Hersteller
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec

2.8 Murine Antikörper

Zur durchflusszytometrischen Analyse von Immunzellen aus der Milz oder dem Darm von Mäusen wurden „*Rat Anti-Mouse*“-Antikörper verwendet (Tab. 6).

Tab. 6: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse muriner Zellen

Antikörper	Klon	Hersteller
CD11b (FITC)	M1/70	BD Biosciences
CD11c (BV421)	N418	BioLegend
CD19 (PE)	1D3	BioLegend
CD25 (APC)	PC61	BioLegend
CD3 (FITC)	145-2C11	BD Biosciences
CD4 (APC)	RM4-5	BD Biosciences
CD4 (APC-Cy7)	GK1.5	BioLegend
CD44 (BV421)	IM7	BioLegend
CD45 (PerCP)	30-F11	BD Biosciences
CD8a (APC-H7)	53-6.7	BD Biosciences
F4/80 (APC)	BM8	BioLegend
Gr-1 (PE-Cy7)	RB6-8C5	BioLegend
Ly-6C (PE-Cy7)	HK1.4	BioLegend
Ly-6G (APC)	1A8	BioLegend
NKp46 (PE-Cy7)	29A1.4	BioLegend

2.9 Gase

Tab. 7: Gase für den Betrieb der Hypoxie-Werkbank

Gas	Hersteller
Kohlenstoffdioxid (50 l)	Westfalen
Stickstoff 5.0 (50 l)	Westfalen

2.10 Materialien aus Glas, Plastik und Metall

Tab. 8: Allgemeiner Laborbedarf zur Durchführung der Versuche

Produkt	Hersteller
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes (“FACS-Röhrchen”)	BD Biosciences
6 Well Zellkultur-Platten, Flachboden	Greiner Bio-One
24 Well Zellkultur-Platten, Flachboden	Costar
96 Well Zellkultur-Mikroplatten, Rundboden	Greiner Bio-One
Deckgläser	VWR International
Einmalkanüle Sterican® (20 G)	B. Braun
Einmalspritze Omnifix® Luer 50 ml	B. Braun
Einmalspritzen Injekt® Luer Solo (10 ml)	B. Braun
Eppendorf <i>Safe-Lock Tubes</i> (1,5 ml)	Greiner Bio-One
Kombi-Verschlussstopfen blau	Fresenius Kabi
MACS® <i>LS Columns</i>	Miltenyi Biotec
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht Assistent®
Objekträger	R. Langenbrinck
Pipettenspitzen blau (500 – 1000 µl) und gelb (20 – 200 µl)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen farblos (10 µl)	Viozym Scientific
Safety-Multifly®-Kanüle (21 G)	Sarstedt
Serologische Pipetten Costar® Stripette® (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar
Untersuchungshandschuhe (Nitril, puderfrei)	Abena
Verschlussfolie „Parafilm®“	Pechiney Plastic Packaging
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR® (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Zellsieb EASYstrainer™ (40 µm, 100 µm)	Greiner Bio-One

2.11 Geräte

Tab. 9: Geräte zur Durchführung der Versuche

Produkt	Hersteller
Durchflusszytometer FACS Calibur™	BD Biosciences
Durchflusszytometer FACS Canto™ II	BD Biosciences
Flockeneisbereiter „AF 156“	Scotsman Ice Systems
Gas Mixer Q	Ruskinn Technology
Hämatologie-Analysesystem „SYSMEX XP-300“	Sysmex
Hypoxie-Werkbank „InVivO ₂ 400“	Ruskinn Technology
Inkubations-Schüttelschrank „CERTOMAT H“	B.Braun Biotech International
Inkubator „BB 5060“	Heraeus Instruments
Inkubator „Function Line“	Heraeus Instruments
Kühl- und Gefrierschrank „Bosch economic“	Bosch
Laborschüttler „CERTOMAT MO II“	B.Braun Biotech International
Lichtmikroskop	Olympus
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Abimed
Pipettierhilfe „pipetus®-akku“	Hirschmann Laborgeräte
Sicherheitswerkbank „HeraSafe HS 12“ und „HeraSafe HSP 18“	Heraeus Instruments
Vortexmischer	Bender & Hobein
Wasserbad „GFL 1013“	GFL
Zentrifuge „Rotanta 460 RS“ und „46 RS“	Hettich

2.12 Software

Tab. 10: Software zur Auswertung der Versuche

Software	Hersteller
CellQuest Pro	BD Biosciences
FlowJo™ 10	BD Biosciences
GraphPad Prism 8.1 und 9.1.2	GraphPad Software
Microsoft Office Excel 2010 / 2019	Microsoft Corporation
Microsoft Office PowerPoint 2010 / 2019	Microsoft Corporation
Microsoft Office Word 2010 / 2019	Microsoft Corporation

3 Methoden

3.1 Allgemeine Anmerkungen zur Versuchsdurchführung bei der Untersuchung der Auswirkungen von Hypoxie auf Immunzellen

Nach initialer Gewinnung des NSB unter hypoxischen Bedingungen (siehe 2.2) erfolgte die weitere Verarbeitung der Proben in einer Hypoxie-Werkbank bei einer Atmosphäre von 37 °C, 94 % N₂, 5 % CO₂ und 1 % O₂. Arbeitsschritte wie die Zentrifugation oder die Inkubation im Kühlschrank erforderten eine Ausschleusung der Proben aus der Hypoxie-Werkbank. Um hierbei den Kontakt mit Sauerstoff zu vermeiden, wurden die Proben mit Verschlussfolie (Parafilm®) abgedichtet oder mit einem Deckel luftdicht verschraubt und im Anschluss unverzüglich wieder in die Hypoxie-Werkbank eingeschleust. Normoxische Zellsuspensionen wurden in der Sicherheitswerkbank verarbeitet. Nach erfolgter Isolation von CBMC oder GR-MDSC wurden die Proben entweder unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen kultiviert. Die Kultur unter hypoxischen Bedingungen erfolgte in der Hypoxie-Werkbank, die normoxische Kultur der Proben erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂.

3.2 Funktionskontrolle der Hypoxie-Werkbank

Um sicherzustellen, dass die Hypoxie-Werkbank den pO₂ suffizient verringert und das gewünschte hypoxische Milieu stabil halten kann, wurde die zeitabhängige pO₂-Änderung in RPMI-1640 Zellkulturmedium mittels automatischer Blutgasanalyse (BGA) kontrolliert. Hierfür wurde eine 6-Well Zellkultur-Platte mit 5 ml und ein Zentrifugenröhrchen mit 50 ml RPMI-1640 Zellkulturmedium befüllt und in der Hypoxie-Werkbank bei 1 % O₂ platziert. Vor der Einschleusung wurde eine Probe mittels Kapillarröhrchen entnommen und am BGA-Gerät analysiert, um einen Ausgangswert zu bestimmen. Weitere Messungen folgten nach 1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden. Durch Kultur in der Hypoxie-Werkbank sank der pO₂ innerhalb von einer Stunde von 220 mmHg auf Werte um 60 mmHg und wurde auf diesem Niveau über die gesamte Untersuchungszeit gehalten (Daten nicht gezeigt).

3.3 Zellkultur in Normoxie und Hypoxie

Für die Kultur von Zellen für 24 bis 96 Stunden unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen wurden CBMC zuerst in hypoxischer Atmosphäre mit Zellkulturmedium je nach Versuchsaufbau auf eine Konzentration zwischen 1×10^6 Zellen/ml und 4×10^6 Zellen/ml eingestellt und anschließend auf zwei 24-Well Zellkultur-Platten zu je 2×10^6 Zellen pro Well aufgeteilt. Dann wurde eine Zellkultur-Platte ausgeschleust und im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ kultiviert, um die physiologische postnatale Adaptation des Neugeborenen zu simulieren. Die zweite Zellkultur-Platte wurde nicht ausgeschleust und innerhalb der Hypoxie-Werkbank bei 37 °C, 94 % N₂, 5 % CO₂ und 1 % O₂ kultiviert, um eine Persistenz der intrauterinen Sauerstoffbedingungen zu simulieren. Das verwendete Zellkulturmedium wurde aus 88 % RPMI-1640 Zellkulturmedium, 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % L-Glutamin hergestellt.

3.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden der jeweiligen humanen Zellsuspension 100 µl entnommen und mithilfe des automatischen Hämatologie-Analysesystems „Sysmex XP-300“ ausgezählt. Murinen Zellsuspensionen wurden 100 µl entnommen und diese mit Trypanblau gefärbt, um tote Zellen zu detektieren. Anschließend wurden die vitalen Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop manuell gezählt.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen hinsichtlich Größe, Granularität und Expression von intra- und extrazellulären Antigenen zu beurteilen [62-64]. Sie beruht auf dem Prinzip, dass einzelne Zellen von einem Laserstrahl getroffen werden und dadurch Streulicht erzeugen. Dieses Streulicht, das von den Eigenschaften der Zelle abhängt, wird von einem Detektor erfasst und grafisch als Streudiagramm dargestellt [62, 64]. Hierbei wird jede Zelle als einzelner Punkt entsprechend ihrer Eigenschaften in einem Koordinatensystem abgebildet. Um die Größe zu beurteilen, wird das zellvolumenabhängige Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) auf die x-Achse aufgetragen. Eine Aussage über die Granularität der Zelle gibt das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), welches auf der y-Achse abgebildet wird [64]. Zur genaueren Differenzierung der untersuchten Zellen können fluoreszierende Antikörper verwendet werden, welche gezielt an spezifischen Antigenen auf der Zelloberfläche binden. Abhängig von den exprimierten Oberflächenantigenen können die Zellen durch das Fluoreszenzsignal des Antikörpers anschließend identifiziert und einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden [65, 66].

Die durchflusszytometrischen Analysen von humanen CBMC wurden direkt nach der hypoxischen Isolation (d0), sowie nach 24-stündiger (d1) und 48-stündiger (d2) Kultur in Normoxie bzw. Hypoxie durchgeführt. Hierfür wurde das Durchflusszytometer „FACSCalibur™“ verwendet. Für die Analyse von murinen Zellen wurde das Durchflusszytometer „FACS Canto II“ verwendet. Mit den Softwares „CellQuest™ Pro“ und „FlowJo™ 10“ wurden die erfassten Daten verarbeitet und grafisch dargestellt.

3.6 Versuche mit humanen Zellen

3.6.1 Arbeitsschritte der *in vitro*-Versuche

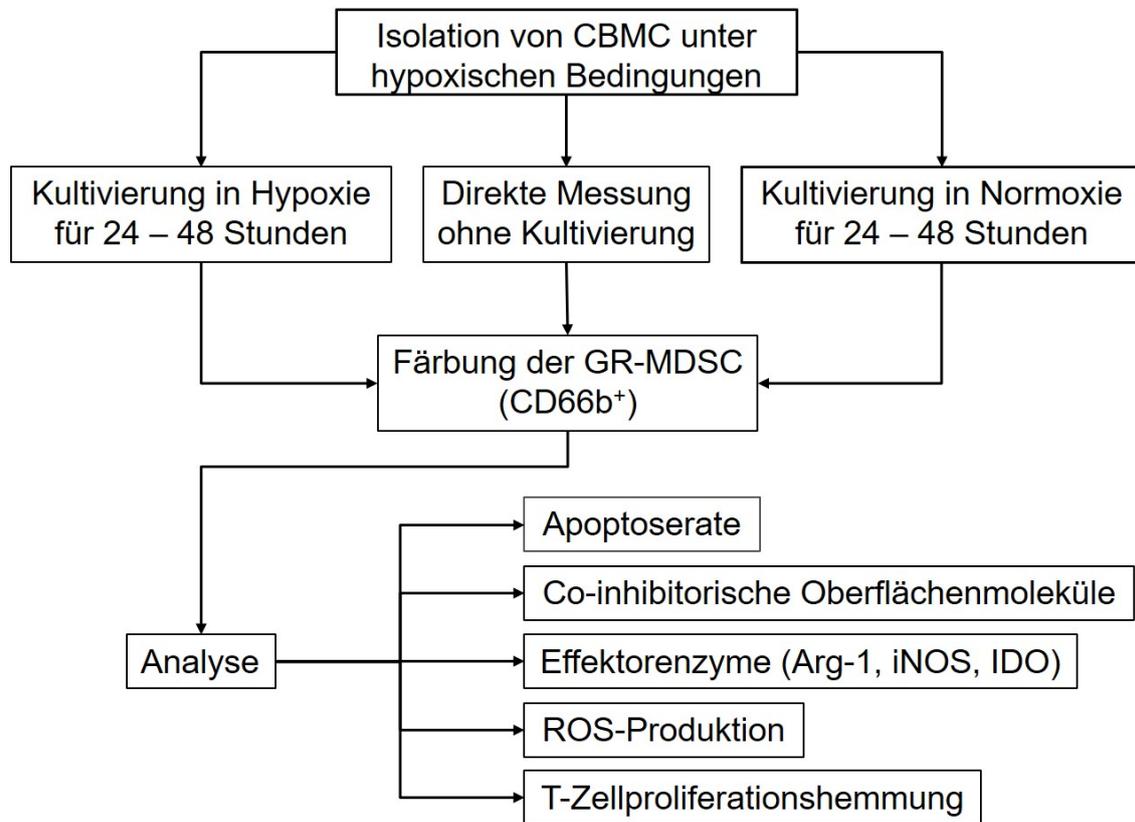


Abbildung 1: Flussdiagramm der Arbeitsschritte der *in vitro*-Versuche. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die physiologische postnatale Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes im Blut eines Neugeborenen mit *in vitro*-Versuchen simuliert und die Auswirkungen auf neonatale GR-MDSC analysiert. Hierzu wurden CBMC aus humanem NSB hypoxisch isoliert und in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Nach 24 oder 48 Stunden wurden normoxisch und hypoxisch kultivierte GR-MDSC hinsichtlich Apoptoserate, Expression co-inhibitorischer Oberflächenmoleküle, produzierter Effektorenzyme, Produktion von ROS und der Fähigkeit zur T-Zell-Proliferationshemmung untersucht und miteinander verglichen.

3.6.2 Isolation von CBMC aus NSB und PBMC und Blutplasma aus Erwachsenenblut

Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte angelehnt an die Methode von Boyum [67-69] mittels Dichtegradientenzentrifugation. CBMC wurden unter hypoxischen Bedingungen in der Hypoxie-Werkbank und PBMC unter normoxischen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank verarbeitet und isoliert. Nach der Entnahme (siehe 2.2) wurden 12 ml heparinisieretes NSB bzw. Erwachsenenblut mit 23 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Das verdünnte Blut wurde anschließend in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf 15 ml Biocoll Trennlösung geschichtet, ohne dass sich die beiden Phasen vermischten. Die anschließende Zentrifugation mit 400 g bei 20 °C für 25 Minuten ohne Bremse führte zu einer Auftrennung der Probe in vier Schichten. Das Blutplasma, das sich in der obersten Schicht des zentrifugierten Erwachsenenbluts sammelte, wurde zur Durchführung des T-Zell-Proliferationsversuchs in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die CBMC bzw. PBMC präsentierten sich als hellgrau-trübe Schicht zwischen dem Blutplasma und der Biocoll Trennlösung [70]. Diese Schicht wurde vorsichtig abgesaugt, in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach der Zentrifugation mit 500 g bei 10 °C für 10 Minuten wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 10 ml PBS resuspendiert. Es folgte die Zellzahlbestimmung mittels Sysmex XP-300 (siehe 3.4) und anschließend ein weiterer Waschschrift durch Zentrifugation mit 400 g bei 4 °C für 10 Minuten. Nach Entfernung des Überstands wurden die frisch isolierten CBMC bzw. PBMC resuspendiert und mit PBS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

3.6.3 Isolation von GR-MDSC aus CBMC durch *magnetic activated cell separation* (MACS)

Die Isolation von GR-MDSC aus CBMC erfolgte durch magnetische Zellseparation [71] unter hypoxischen Bedingungen in der Hypoxie-Werkbank. Die Methode orientierte sich am Versuchsprotokoll des Herstellers (Miltenyi Biotec) und wurde für die Anwendung in der Hypoxie-Werkbank modifiziert.

CBMC wurden zunächst in autoMACS[®] Running Buffer („MACS-Puffer“) aufgenommen. Dann wurden neonatale GR-MDSC mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD66b markiert (siehe 3.6.4). Durch Zugabe von Anti-FITC MicroBeads und 15-minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die zuvor FITC-markierten Zellen indirekt an magnetische Eisenpartikel gekoppelt. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgefüllt und durch Zentrifugation mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten von ungebundenen Anti-FITC MicroBeads befreit. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in insgesamt 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine Separationssäule pipettiert, die an einem magnetischen Separator befestigt war. Eisenbeladene Zellen wurden durch das starke Magnetfeld innerhalb der Säule fixiert, während alle anderen Zellen durch sie hindurch in einen Behälter tropften. Sobald die Separationssäule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, waren die GR-MDSC frei beweglich und konnten durch gründliches Durchspülen mit 5 ml MACS-Puffer gesammelt werden.

Nach einer erneuten Zentrifugation mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium (siehe 2.4) aufgenommen. In einer Stichprobe von 10 µl wurden vitale GR-MDSC mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Danach wurde die Zellsuspension mit der entsprechenden Menge Zellkulturmedium auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Der Anteil von GR-MDSC an den magnetisch isolierten Zellen wurde durchflusszytometrisch kontrolliert und lag bei über 95 % (Daten nicht gezeigt).

3.6.4 Immunphäotypisierung und Analyse co-inhibitorischer Oberflächenmoleküle

Innerhalb der CBMC-Fraktion wurden humane GR-MDSC anhand der Expression von CD66b identifiziert [16]. Zur Immunphäotypisierung und zur Analyse der Expression der co-inhibitorischen Oberflächenmoleküle CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD152 (CTLA-4), CD279 (PD-1), CD200 (Ox-2) und CD200R (Ox-2R) wurden CBMC extrazellulär gefärbt. Hierfür wurden jeweils zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Zellen mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die benötigten Mengen der Antikörper wurden in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe durch Titration ermittelt. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Zellsuspensionen nach der Inkubation mit 2 ml FACS-Puffer (siehe 2.4) verdünnt und mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrollgruppe und zum *gating* der Quadranten dienen ungefärbte CBMC.

3.6.5 Analyse der Apoptoserate

Zum Nachweis der Vitalität der untersuchten Zellen nach Kultur in Normoxie und Hypoxie wurde die Apoptoserate analysiert. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte durch Färbung mit Annexin V und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD). Die Zielstruktur von Annexin V ist das Membranphospholipid Phosphatidylserin, welches sich bei vitalen Zellen an der Innenseite der Zellmembran befindet. Durch eine Translokation des Phosphatidylserins nach extrazellulär zu Beginn der Apoptose kann es von Annexin V gebunden werden [72-74]. Die Zielstruktur von 7-AAD ist die DNA, welche sich im Zellkern befindet [75]. In der Spätphase der Apoptose ist die Zellmembran jedoch nicht mehr intakt und 7-AAD kann daran binden [76]. Durch eine Kombinationsfärbung mit Annexin V und 7-AAD können daher verschiedene Phasen der Apoptose unterschieden werden. Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen erlaubt das in Tab. 11 dargestellte Interpretationsschema nach Lecoeur et al. [77].

Tab. 11: Interpretation der Apoptosefärbung mit Annexin V und 7-AAD

	Annexin V	7-AAD	Interpretation
Immunfluoreszenz	Negativ	Negativ	Vitale Zellen
	Positiv	Negativ	Frühe Apoptosephase
	Positiv	Positiv	Späte Apoptosephase

Je 2×10^6 Zellen wurden für 0, 24 oder 48 Stunden in Normoxie oder in Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aus der Zellkultur-Platte entnommen und in ein FACS-Röhrchen pipettiert, mit 2 ml Annexinpuffer (2,0 g NaN_3 + 81,81 g NaCl + 3,68 g CaCl_2 + 23,82 g HEPES) verdünnt und mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 μl Annexinpuffer resuspendiert. 100 μl hiervon wurden in ein FACS-Röhrchen gegeben und als Negativkontrolle verwendet. Weitere 100 μl wurden in einem FACS-Röhrchen mit 1 μl anti-CD66b APC analog zur Immunphänotypisierung gefärbt (siehe 3.6.4). Die restlichen 100 μl wurden mit 1 μl anti-CD66b APC und 0,5 μl Annexin V FITC vermischt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Annexinpuffer und anschließender Zentrifugation mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten wurden die Zellen gewaschen. Nachdem der Überstand entfernt und das Zellpellet resuspendiert wurde erfolgte die Zugabe von 2,5 μl 7-AAD PerCP. Nach einer erneuten 10-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden alle drei Proben durchflusszytometrisch gemessen.

3.6.6 Intrazellulärfärbung zur Analyse der Effektorenzyme von MDSC

Zur Analyse der Expression der Effektorenzyme Arginase-1 (Arg-1), Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und induzierbare NO-Synthase (iNOS) durch GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie erfolgte eine Intrazellulärfärbung der Zellen. Zuerst wurden CBMC in PBS auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Hiervon wurden 1×10^6 CBMC als Negativkontrolle (Probe 1) entnommen und 4×10^6 CBMC durch Zentrifugation mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten gewaschen, resuspendiert und mit 2 µl anti-CD66b extrazellulär gefärbt (siehe 3.6.4). Nachdem überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt wurden, wurde den Proben 200 µl „BD Cytotfix/Cytoperm™“ hinzugefügt, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und die Zellen zu fixieren. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C in der Hypoxie-Werkbank bzw. im Inkubator. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit 4 ml „BD Perm/Wash™“ Puffer aufgefüllt. Nach Zentrifugation mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet resuspendiert und auf insgesamt 250 µl „BD Perm/Wash™“ Puffer aufgefüllt. Die Negativkontrolle (Probe 1) wurde analog unter Verwendung von 20 µl „BD Cytotfix/Cytoperm™“ und 1 ml „BD Perm/Wash™“ Puffer bearbeitet und zur Messung in 1 ml FACS-Puffer (siehe 2.4) gegeben. Dann wurden je 8×10^5 der vorliegenden CBMC in fünf Probenröhrchen (Probe 2 bis 6) gegeben und entsprechend des Pipettierschemas in Tab. 12 gefärbt. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche intrazelluläre Färbung wurde das in Lymphozyten intrazellulär vorkommende Protein ZAP-70 gefärbt (Probe 3) [78].

Tab. 12: Pipettierschema für die intrazelluläre Färbung von CBMC

	Probe					
	1	2	3	4	5	6
Intrazelluläre Antikörper	-	-	0,5 µl ZAP-70 (PE)	3 µl Arg-1 (PE)	5 µl IDO (PE)	2 µl iNOS (APC)
Extrazelluläre Antikörper	-	CD66b (FITC)	CD66b (FITC)	CD66b (FITC)	CD66b (FITC)	CD66b (FITC)

Nach Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C in der Hypoxie-Werkbank bzw. im Inkubator wurden die Proben mit je 2 ml FACS-Puffer (siehe 2.4) verdünnt und erneut mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Im letzten Arbeitsschritt wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet resuspendiert und die Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

3.6.7 Analyse der intrazellulären ROS-Produktion von GR-MDSC

Die Analyse der ROS-Produktion von GR-MDSC erfolgte mittels DHR-Färbung. DHR sammelt sich im intrazellulären Raum an und wird dort je nach Vorhandensein von ROS unterschiedlich stark zu fluoreszierendem Rhodamin 123 oxidiert, welches anschließend durchflusszytometrisch gemessen werden kann [79].

Es wurden pro Ansatz 5×10^5 CBMC in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit Zellkulturmedium auf 1 ml aufgefüllt. Zwei dieser Proben wurden je 10 µl einer 100 µM DHR-Lösung hinzugefügt, die dritte Probe diente als Negativkontrolle. Es folgte eine 5-minütige Inkubation im Wasserbad bei 35 °C. Anschließend wurden einer Probe 10 µl einer 1 µM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)-Lösung hinzugegeben und weitere 15 Minuten im Wasserbad inkubiert, um GR-MDSC zur ROS-Produktion zu stimulieren. Um die Stimulation danach unmittelbar zu beenden, wurden alle drei Proben sofort in einen Behälter mit Eiswasser gegeben und mit 1 ml eisgekühlten PBS verdünnt. Dann wurden die FACS-Röhrchen mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet resuspendiert. Um die Zellpopulationen der GR-MDSC zu identifizieren erfolgte vor der durchflusszytometrischen Analyse die Färbung des Oberflächenantigens CD66b wie unter 4.6.4 beschrieben.

3.6.8 Analyse der T-Zell-Proliferationshemmung von GR-MDSC

Um den Einfluss von Normoxie und Hypoxie auf die suppressive Aktivität von GR-MDSC zu untersuchen, wurden GR-MDSC mittels MACS aus CBMC isoliert, für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie vorinkubiert und anschließend in einem T-Zell-Proliferationsversuch eingesetzt. Für den Proliferationsversuch werden PBMC mit dem fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. Da bei jeder Zellteilung einer CFSE-markierten Ausgangszelle der Farbstoff zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wird, nimmt die Farbsintensität von Zellgeneration zu Zellgeneration ab. Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität werden bei der durchflusszytometrischen Analyse erkannt, was letztendlich Informationen über die Proliferationsaktivität liefert [80, 81].

Isolierte PBMC wurden in PBS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt (siehe 3.6.2). Für die Markierung mit CFSE wurden 1×10^7 PBMC sorgfältig mit 25 μ l CFSE der Konzentration 2,5 μ M/ml vermischt. Nach exakt 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 ml autologes Blutserum hinzugefügt, um freies CFSE an Proteine zu binden und die Färbung zu beenden [82]. Nach weiteren 60 Sekunden wurden 7 ml eines Zellkulturmediums hinzugefügt, das 5 % autologes Blutserum anstelle von FCS enthielt, und mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Zellpellet in 1 ml des Zellkulturmediums resuspendiert und die absolute Zellzahl bestimmt (siehe 3.4). Die CFSE-gefärbten PBMC wurden mit Zellkulturmedium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und hiervon 200 μ l als Negativkontrolle entnommen. Zur Stimulation der T-Zell-Proliferation wurden der restlichen Zellsuspension 2 ml entnommen und 4 μ l anti-CD3 Antikörper (OKT-3) in der Konzentration 0,01 μ g/ml und 40 μ l humanes Interleukin-2 (IL-2) in der Konzentration 10.000 U/ml hinzugefügt. Zuletzt wurden die seit 24 Stunden normoxisch bzw. hypoxisch vorkultivierten GR-MDSC in definierten Verhältnissen zu den stimulierten und CFSE-markierten PBMC in zwei 96-Well Zellkultur-Platten gegeben (siehe Tab. 13) und in Normoxie kultiviert. Jedes Mischverhältnis wurde doppelt angesetzt.

Tab. 13: Zusammensetzung der Zellsuspension je Well einer Zellkultur-Platte

	Well				
	1	2	3	4	5
Unstimulierte PBMC (1×10^6 Zellen/ml)	100 μ l	-	-	-	-
Stimulierte PBMC (1×10^6 Zellen/ml)	-	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
GR-MDSC (5×10^5 Zellen/ml)	-	-	100 μ l	50 μ l	25 μ l
Zellkulturmedium	100 μ l	100 μ l	-	50 μ l	75 μ l
Verhältnis PBMC:GR-MDSC	-	-	2:1	4:1	8:1

Nach Kultur in Normoxie für 96 Stunden im Inkubator erfolgte die durchflusszytometrische Messung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Proliferation. Hierzu wurde jede Probe analog zur Vorgehensweise bei der Immunphänotypisierung (siehe 3.6.4) mit 1 μ l anti-CD4 APC und 1 μ l anti-CD8 PE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

3.7 Tierversuche

3.7.1 Arbeitsschritte der *in vivo*-Versuche

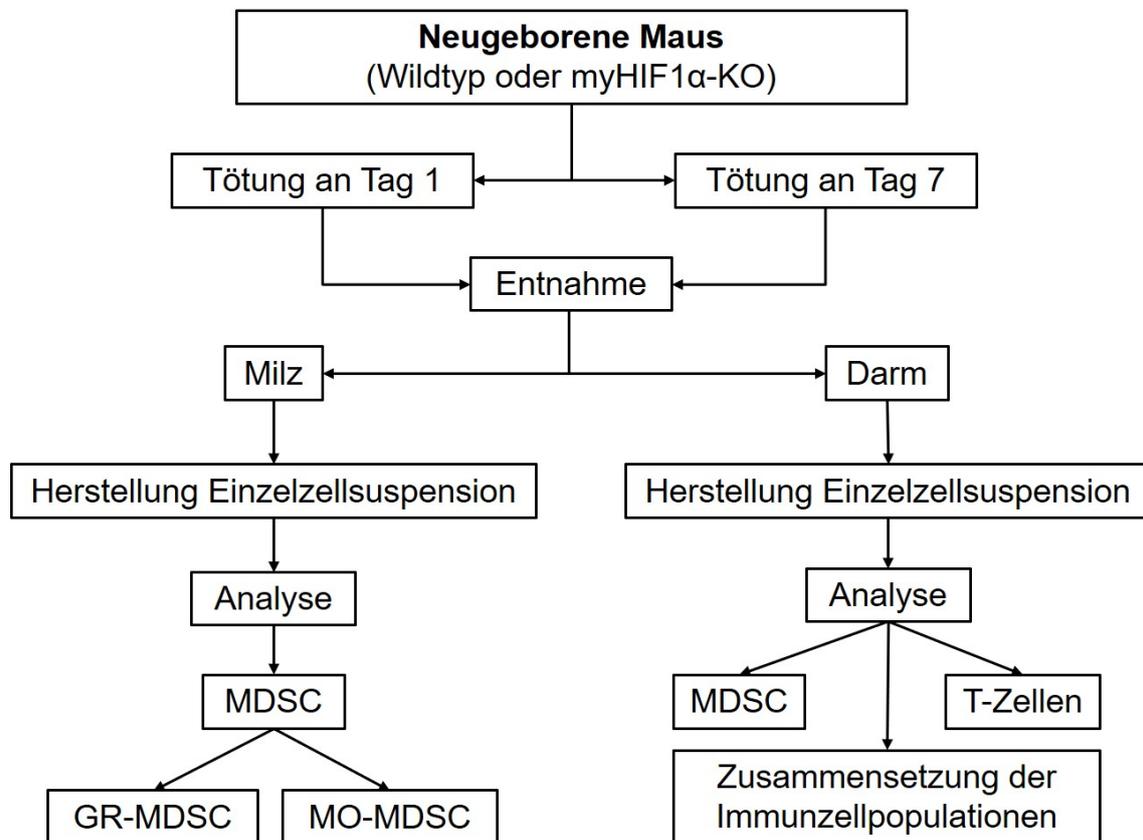


Abbildung 2: Flussdiagramm der Arbeitsschritte der *in vivo*-Versuche. Neugeborene Wildtyp (WT) Mäuse und neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO wurden am ersten postnatalen Tag (P1) und am siebten postnatalen Tag (P7) getötet. Anschließend wurden Milz und Darm entnommen und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Zuletzt erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der MDSC, T-Zellen und weiterer Immunzellen.

3.7.2 Entnahme von murinen Organen

Neugeborene Mäuse wurden im Alter von einem Tag (P1) und sieben Tagen (P7) getötet. Direkt nach Eintritt des Todes wurde das Abdomen chirurgisch eröffnet und sowohl die Milz als auch der Darm vom Duodenum bis Rektum entnommen.

3.7.3 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzgewebe

Das Milzgewebe wurde mit einem Spritzenstempel durch ein 40 µm-Zellsieb gedrückt und das Zellsieb mit 6 ml PBS gespült, wobei die Flüssigkeit und das Gewebe in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 500 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert und erneut mit 500 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet resuspendiert und in 300 µl Zellkulturmedium (siehe 2.4) aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellsuspension anschließend mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

3.7.4 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Darmgewebe

Zuerst wurde der entnommene Darm der Länge nach eröffnet und durch vorsichtiges Ausstreichen von Stuhl befreit. An P1 wurden aufgrund von sehr geringen Zellzahlen jeweils die Därme von zwei Mäusen gemeinsam zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Zuerst wurde das Darmgewebe mit 30 ml kaltem PBS in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, durch vorsichtiges Schütteln gewaschen und anschließend durch ein 100 µm-Zellsieb abgegossen. Dieser Schritt wurde drei bis vier Mal wiederholt, bis die Flüssigkeit klar und der Darm rosa erschien. Zur Entfernung von intestinalen Epithelzellen (IEC) wurde der Darm in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen in 5 mM EDTA-Puffer (siehe 2.4) gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubations-Schüttelschrank geschüttelt und inkubiert. Dann wurde der Inhalt des 50 ml-Zentrifugenröhrchens durch ein 100 µm-Zellsieb in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegossen. Der Durchlauf beinhaltete die IEC. Die nicht gelösten Anteile des Darms wurden vom Zellsieb aufgefangen und gründlich mit PBS gewaschen, um das EDTA zu entfernen. Anschließend wurde der Darm mit einer chirurgischen Schere in 1 bis 2 mm große Stücke zerkleinert und die Gewebstücke in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen in Liberase-Puffer (siehe 2.4) aufgenommen und für 60 Minuten bei 37 °C und 200 rpm in einem

Inkubations-Schüttelschrank geschüttelt und inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 4 ml einer 40 % Percoll-Lösung (siehe 2.4) resuspendiert und mit einer 70 % Percoll-Lösung (siehe 2.4) mithilfe einer Pasteur-Pipette vorsichtig unterschichtet. Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit 1000 g bei 20 °C für 20 Minuten ohne Beschleunigung und ohne Bremse. Die Leukozyten der *Lamina propria* sammelten sich hierdurch als Zellring an der Grenzfläche zwischen den beiden Percoll-Schichten, wo sie mit einer 5 ml-Pipette vorsichtig gesammelt und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben werden konnten. Zuletzt wurden 5 ml PBS hinzugefügt, mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellsuspension auf 1 bis 4×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt.

3.7.5 Extrazelluläre Färbung von murinen Zellen

Die Immunzellen der Mäuse wurden anhand folgender Oberflächenmoleküle in definierte Subpopulationen eingeteilt: CD3⁺ für T-Zellen, CD3⁺/CD4⁺ für T-Helferzellen, CD3⁺/CD8⁺ für cytotoxische T-Zellen, CD3⁻/CD19⁺ für B-Zellen, CD3⁻/NKp46⁺ für NK-Zellen, CD11b⁺/Gr-1⁺ für MDSC, CD11b⁺/Ly6C⁺/Ly6G⁻ für MO-MDSC, CD11b⁺/Ly6C^{low}/Ly6G⁺ für GR-MDSC, CD45⁺/CD11c⁺/F4/80⁺ für intestinale mononukleäre Zellen, CD45⁺/CD11c⁻/F4/80⁺ für Makrophagen und CD45⁺/CD11c⁺/F4/80^{low} für dendritische Zellen. Zur Identifikation mittels Durchflusszytometrie mussten die extrazellulären Oberflächenmarker der murinen Zellen gefärbt werden. Hierfür wurden der Zellsuspension jeweils 2 bis 5×10^5 Zellen entnommen und mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden 2 ml FACS-Puffer (siehe 2.4) hinzugefügt und mit 310 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

3.8 Statistische Analyse

Zur Erstellung von Grafiken und zur Durchführung von statistischen Tests wurden die Programme „FlowJo“ und „GraphPad Prism“ verwendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen wurde zuerst mithilfe des *D'Agostino-Pearson omnibus normality test* auf Normalverteilung getestet. Bei gepaarten und normalverteilten Werten wurde der *t-Test* angewendet, bei gepaarten und nicht normalverteilten Werten der *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*. Bei ungepaarten und nicht normalverteilten Werten wurde der *Mann-Whitney test* angewendet. Um mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen wurde bei ungepaarten und nicht normalverteilten Werten der *Kruskal-Wallis test* und der *Dunn's multiple comparison test* angewendet. Im Text sind, falls nicht anders beschrieben, die Einzelwerte und Mittelwerte \pm Standardabweichung genannt.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse und Abbildungen wurden bereits zum Teil in folgendem Artikel veröffentlicht: Schwarz, J., Rühle, J., Stephan, K., Dietz, S., Geißert, J., Schoppmeier, U., Frick, J.S., Hudalla, H., Lajqi, T., Poets, C.F., Gille, C. und Köstlin-Gille, N. (2023), HIF-1 α targeted deletion in myeloid cells decreases MDSC accumulation and alters microbiome in neonatal mice. Eur. J. Immunol., 53: 2250144 [83].

4.1 *In vitro* Analyse des Effektes einer Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks auf GR-MDSC aus Nabelschnurblut

4.1.1 Neonatale GR-MDSC sind nach 24 bis 48 Stunden Kultur in Normoxie und Hypoxie überwiegend vital

Zuerst sollte untersucht werden, ob eine Kultur von GR-MDSC für 24 bis 48 Stunden in Normoxie bzw. Hypoxie möglich ist oder ob die Zellen unter den Kulturbedingungen apoptotisch werden, wodurch eine funktionelle Analyse nicht möglich wäre. Hierzu erfolgte eine Färbung mit Annexin V als Marker für die frühe Phase der Apoptose und mit 7-AAD als Marker für die späte Phase der Apoptose. Abbildung 3 zeigt den prozentualen Anteil von GR-MDSC, die nach 0, 24 und 48 Stunden Kultur in Normoxie und Hypoxie als vital, früh- oder spätapoptotisch definiert wurden. Es zeigte sich, dass die Apoptoserate von GR-MDSC durch die Kultur in Normoxie und Hypoxie über 24 bis 48 Stunden kaum beeinflusst wurde. Nach 24 Stunden in Normoxie waren minimal weniger vitale GR-MDSC vorhanden (87,3 % \pm 4,5 % vs. 90,8 % \pm 3,4 %, n = 7, * p = 0,0313, Abbildung 3). Dies ging mit einem etwas erhöhten Anteil frühapoptotischer Zellen einher (9,6 % \pm 3,6 % vs. 6,9 % \pm 2,4 %, n = 7, * p = 0,0469, Abbildung 3). Nach 48 Stunden waren zwischen Kultur in Normoxie und Hypoxie keine Unterschiede mehr zu erkennen.

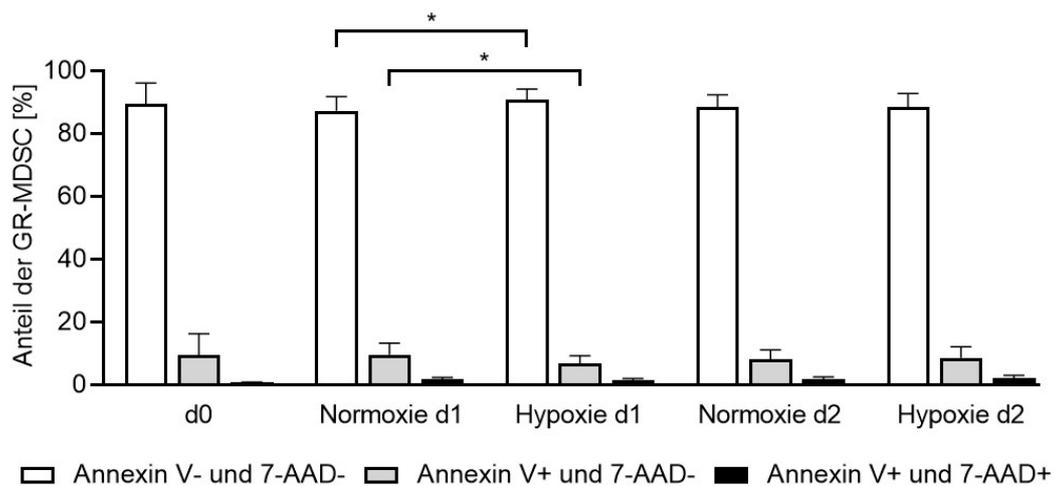


Abbildung 3: Die Apoptoserate von neonatalen GR-MDSC wird durch Kultur in Normoxie oder Hypoxie nicht beeinflusst. CBMC aus NSB wurden in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Nach 0 (d0), 24 (d1) und 48 Stunden (d2) wurde die Apoptoserate der CD66b⁺ GR-MDSC durch Färbung mit Annexin V und 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Das Balkendiagramm zeigt jeweils den prozentualen Anteil der Annexin V und 7-AAD negativen bzw. positiven CD66b⁺ GR-MDSC zu den Zeitpunkten d0, d1 und d2 bei Kultur in Normoxie und Hypoxie. Annexin V⁻ und 7-AAD⁻ Zellen (weiß) wurden als vital, Annexin V⁺ und 7-AAD⁻ Zellen (grau) als frühapoptotisch und Annexin V⁺ und 7-AAD⁺ Zellen (schwarz) als spätapoptotisch definiert. n = 7, * p < 0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

4.1.2 Expression von co-inhibitorischen Molekülen auf neonatalen GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie

Im nächsten Schritt wurde die Expression der co-inhibitorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4, Ox-2, Ox-2-Rezeptor (Ox-2R), PD-1, PD-L1 und PD-L2 auf neonatalen GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie untersucht. CTLA-4 wurde von neonatalen GR-MDSC nach 48 Stunden Kultur in Normoxie etwas stärker exprimiert als nach Kultur in Hypoxie (t = d2: $30,7 \% \pm 11,6 \%$ vs. $20,4 \% \pm 10,4 \%$, n = 8, ** p = 0,0078, Abbildung 4A und MFI $13,8 \pm 2,9$ vs. $10,7 \pm 1,6$, n = 8, ** p = 0,0049, Abbildung 4B). Unabhängig von der Kultur in Normoxie und Hypoxie exprimierten nahezu alle GR-MDSC Ox-2R (Abbildung 4C). Die Stärke der Ox-2R-Expression auf GR-MDSC, gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), war in Normoxie geringer als in Hypoxie (t = d1: MFI $34,5 \pm 11,6$ vs. $45,3 \pm 7,6$, n = 8, * p = 0,0413 und t = d2: MFI $34,3 \pm 11,5$ vs. $47,4 \pm 12,2$, n = 8, * p = 0,0151, Abbildung 4D). Nach 48 Stunden Kultur in Normoxie exprimierten mehr GR-MDSC PD-L2 als nach Kultur in Hypoxie (t = d2: $64,5 \% \pm 15,5 \%$ vs. $47,8 \% \pm 18,0 \%$, n = 8, ** p = 0,0078, Abbildung 4E). Die MFI für die Expression von PD-L2 unterschied sich nicht (Abbildung 4F).

Ox-2, PD-1 und PD-L1 wurden auf neonatalen GR-MDSC aus Nabelschnurblut kaum exprimiert und deren Expression durch Kultur in Normoxie und Hypoxie nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

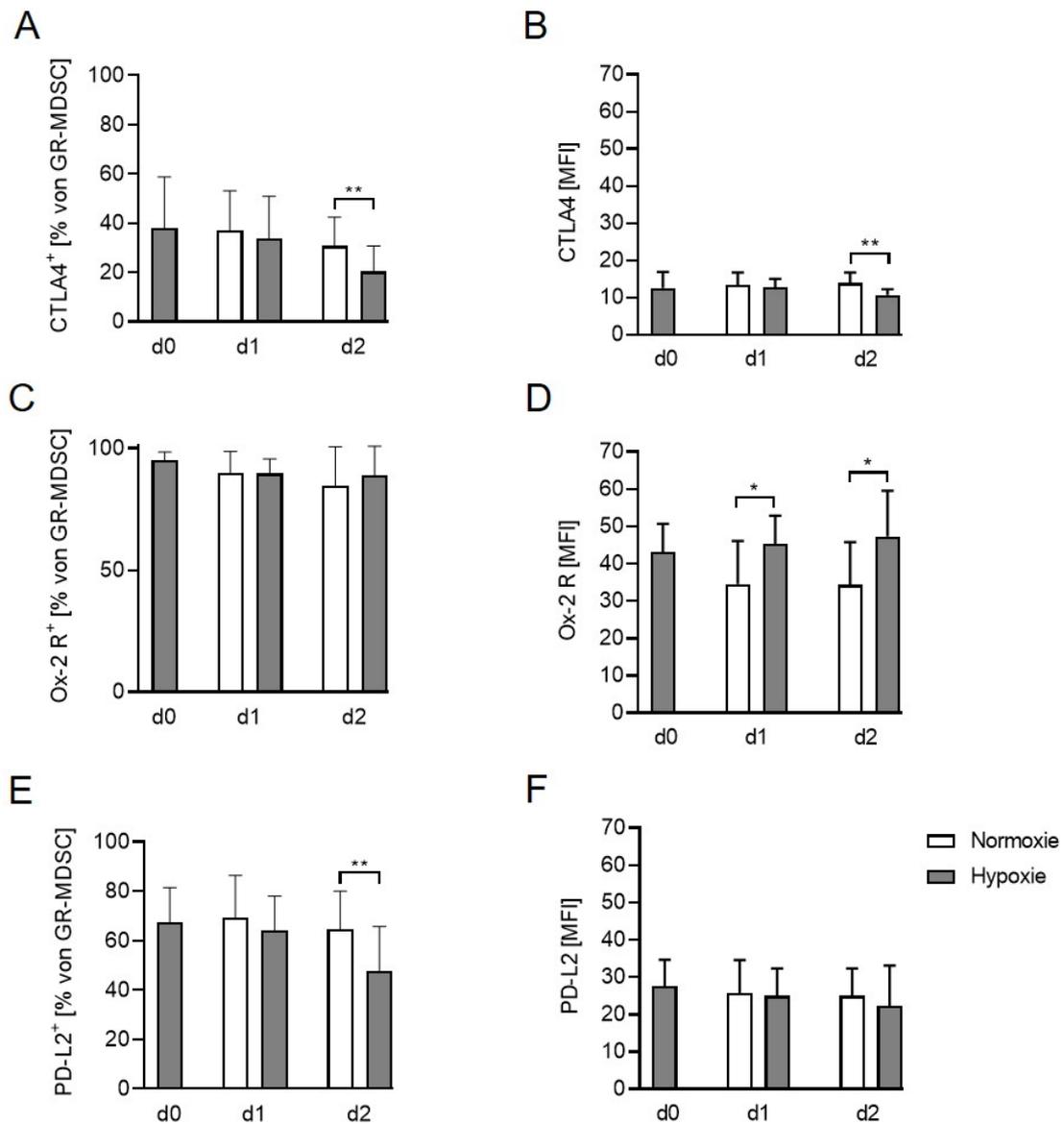


Abbildung 4: Expression der co-inhibitorischen Moleküle CTLA-4, Ox-2R und PD-L2 auf neonatalen GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie. CBMC aus NSB wurden in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Nach 0 (d0), 24 (d1) und 48 Stunden (d2) wurde die Expression von CTLA-4, Ox-2R und PD-L2 auf GR-MDSC durchflusszytometrisch untersucht. Die dargestellten Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil der GR-MDSC, die CTLA-4 (A), Ox-2R (C) und PD-L2 (E) exprimieren und die MFI von CTLA-4 (B), Ox-2R (D) und PD-L2 (F) auf GR-MDSC zu den Zeitpunkten d0, d1 und d2 nach Kultur in Normoxie (weiß) oder Hypoxie (grau). Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. n = 8, * p < 0,05, ** p < 0,01, Wilcoxon matched-pairs signed rank test (A, C, E, F) und t-Test (B, D).

4.1.3 Expression von Effektorenzymen durch neonatale GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie

Um die Expression der Effektorenzyme Arg-1, iNOS undIDO durch GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie zu bestimmen, erfolgte eine Intrazellulärfärbung der Zellen. Alle GR-MDSC exprimierten Arg-1 und iNOS. Die Expression von Arg-1 blieb unter Kultur in Normoxie konstant, während sie unter Kultur in Hypoxie nach 48 Stunden anstieg (t = d0: MFI 281 ± 75 ; t = d2: MFI 351 ± 48 vs. 479 ± 84 , n = 11, ** p = 0,0049, Abbildung 5A). Repräsentativ hierfür sind in Abbildung 5B *density plots* einer durchflusszytometrischen Messung von Arg-1 in GR-MDSC nach 48 Stunden Kultur in Normoxie (links) und Hypoxie (rechts) dargestellt. Die Expression von iNOS stieg unter Normoxie bereits nach 24 Stunden Kultur an, während sie unter Hypoxie konstant blieb (t = d1: MFI 584 ± 223 vs. 368 ± 133 , n = 13, * p = 0,0264; t = d2: MFI 674 ± 338 vs. 379 ± 203 , n = 13, * p = 0,0148, Abbildung 5C). Abbildung 5D zeigt repräsentative *density plots* einer Messung der iNOS-Expression durch GR-MDSC nach 48 Stunden Kultur in Normoxie (links) und Hypoxie (rechts). IDO wurde von GR-MDSC nur schwach exprimiert und zeigte keine Unterschiede nach Kultur in Normoxie und Hypoxie (Daten nicht gezeigt).

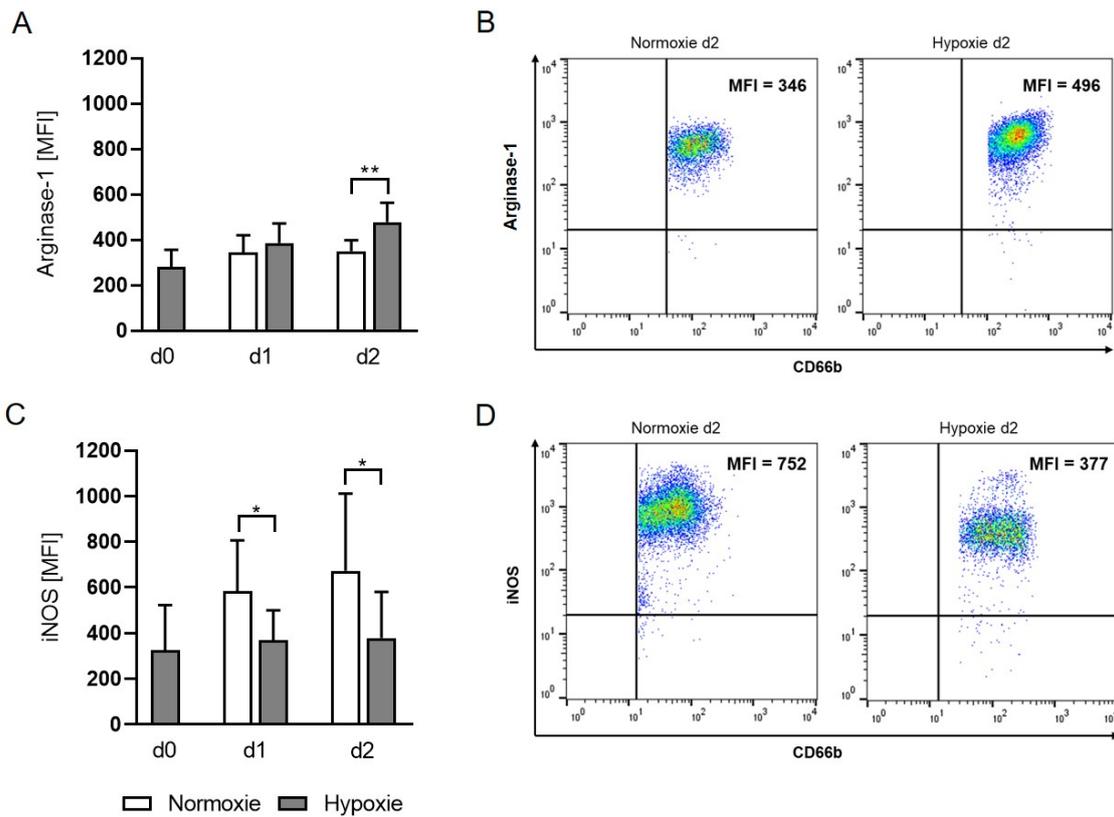


Abbildung 5: Expression von Arginase-1 und iNOS durch GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie. CBMC aus NSB wurden für 0 (d0), 24 (d1) und 48 Stunden (d2) in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Die Expression der Effektorenzyme Arg-1 und iNOS durch GR-MDSC wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der MFI mit Standardabweichungen von Arg-1 (A) und iNOS (C) in GR-MDSC an d0, d1 und d2 nach Kultur in Normoxie (weiß) und Hypoxie (grau). Die repräsentativen *density plots* zeigen durchflusszytometrische Messungen der intrazellulär exprimierten Enzyme Arg-1 (B) und iNOS (D) an d2 in Normoxie (links) und Hypoxie (rechts). n = 10-13, * p < 0,05, ** p < 0,01, Wilcoxon matched-pairs signed rank test (A) und t-Test (C).

4.1.4 In Normoxie kultivierte neonatale GR-MDSC produzieren nach Stimulation mit PMA weniger ROS als in Hypoxie kultivierte GR-MDSC

Zur Analyse der Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) wurden GR-MDSC mit dem Fluoreszenzfarbstoff DHR gefärbt. Nach Stimulation mit PMA produzierten normoxisch kultivierte GR-MDSC sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden weniger ROS als hypoxisch kultivierte GR-MDSC (t = d1: MFI 564 ± 356 vs. 787 ± 406, n = 11, ** p = 0,0049; t = d2: MFI 733 ± 438 vs. 1270 ± 539, n = 11, *** p = 0,001, Abbildung 6A). Abbildung 6B zeigt repräsentative *density plots* der normoxisch und hypoxisch kultivierten und stimulierten GR-MDSC an d1 und d2.

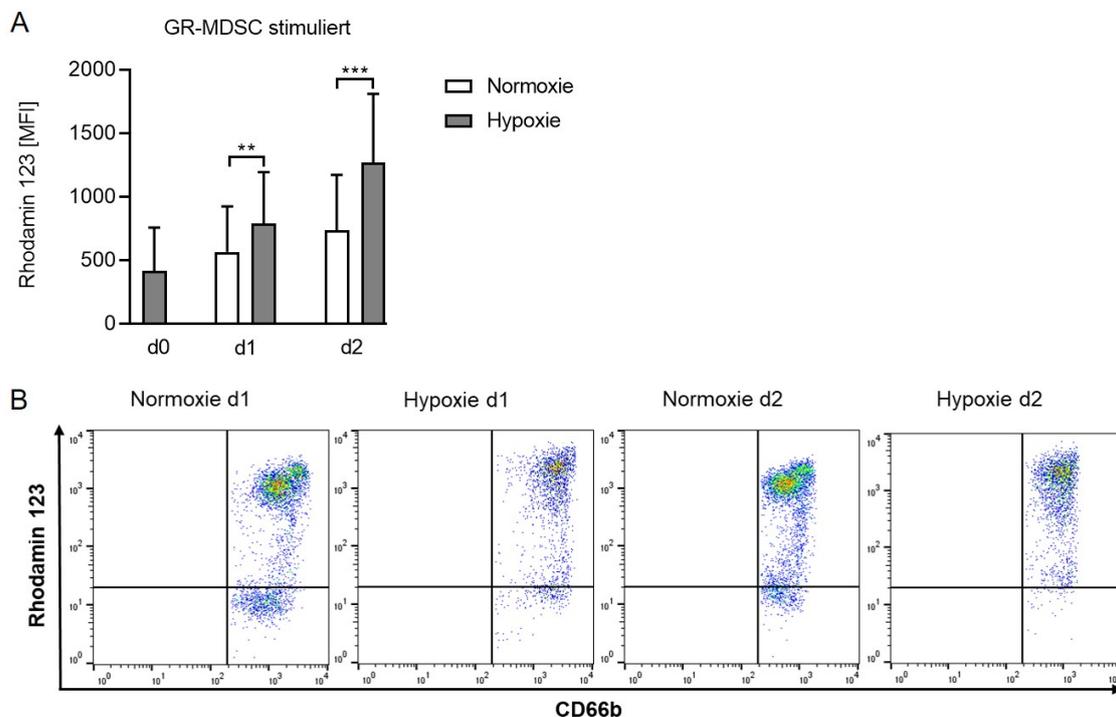


Abbildung 6: Nach Kultur in Normoxie produzieren neonatale GR-MDSC weniger ROS als nach Kultur in Hypoxie. CBMC aus NSB wurden für 0 (d0), 24 (d1) und 48 Stunden (d2) in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Nach Färbung mit DHR und Stimulation mit PMA wurde die ROS-Produktion von CD66b⁺ GR-MDSC durchflusszytometrisch gemessen. (A) Das Balkendiagramm zeigt die MFI von Rhodamin 123 in stimulierten GR-MDSC als Mittelwerte mit Standardabweichungen an d0, d1 und d2 bei Kultur in Normoxie (weiß) und Hypoxie (grau). (B) Repräsentative *density plots* der durchflusszytometrischen Messung von Rhodamin 123 in stimulierten GR-MDSC nach Kultur in Normoxie und Hypoxie für 24 (d1, links) und 48 Stunden (d2, rechts). n = 11, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Wilcoxon matched-pairs signed rank test (A).

4.1.5 Die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen wird durch normoxisch und hypoxisch vorkultivierte neonatale GR-MDSC ähnlich stark gehemmt

Die Fähigkeit von GR-MDSC, die T-Zell-Proliferation zu supprimieren, wurde nach Vorkultur der GR-MDSC in Normoxie oder Hypoxie im CFSE-Proliferationsassay getestet. Sowohl hypoxisch vorkultivierte GR-MDSC als auch normoxisch vorkultivierte GR-MDSC hemmten die T-Zell-Proliferation konzentrationsabhängig. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Proliferationshemmung zwischen normoxisch und hypoxisch vorkultivierten Zellen (Abbildung 7A). Abbildung 7B zeigt repräsentative Histogrammplots einer durchflusszytometrischen Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen, einer Negativkontrolle sowie einer Positivkontrolle. Auf die Darstellung der CD8⁺ T-Zellen wurde verzichtet.

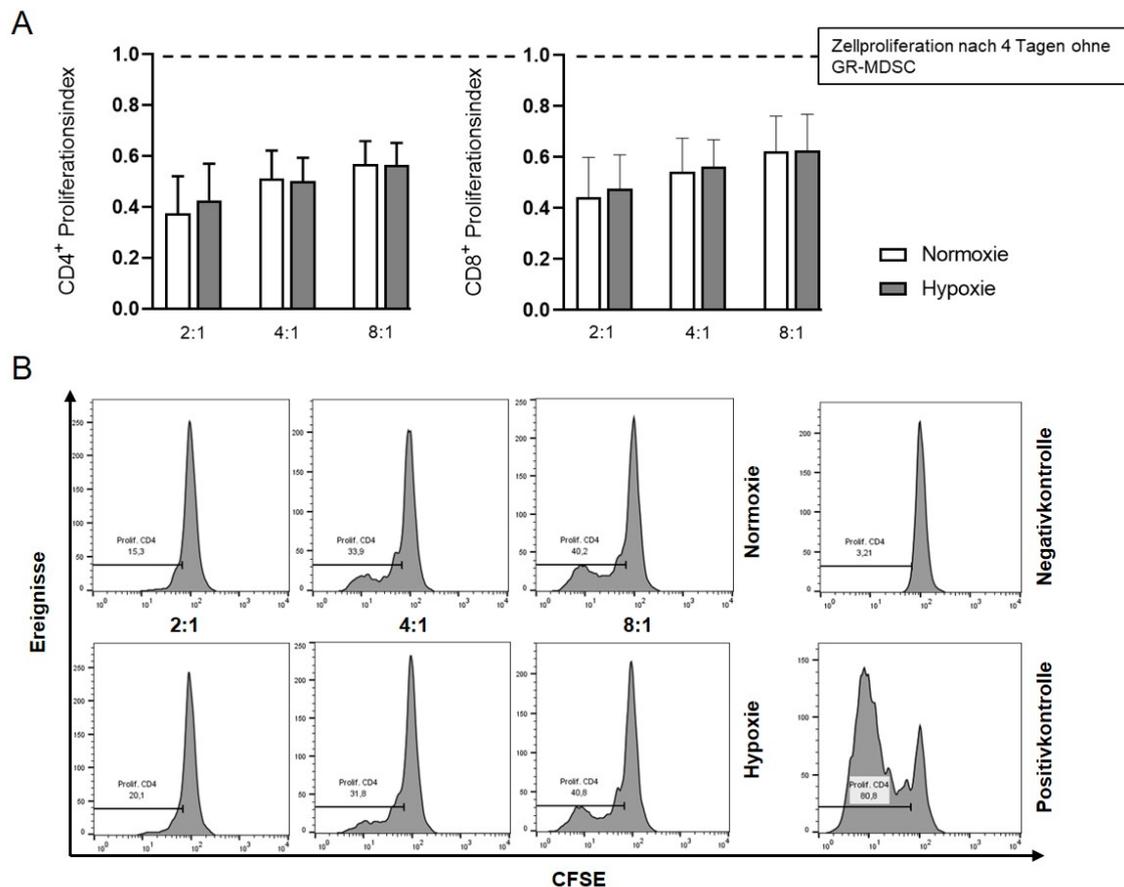


Abbildung 7: Die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wird durch Ko-Kultivierung mit normoxisch und hypoxisch vorkultivierten GR-MDSC ähnlich effektiv gehemmt. GR-MDSC wurden durch MACS aus CBMC isoliert und für 24 Stunden in Normoxie und Hypoxie vorkultiviert. Anschließend wurden CFSE-markierte und stimulierte PBMC im Verhältnis 2:1, 4:1 und 8:1 zu den vorkultivierten GR-MDSC gegeben und für vier Tage in Normoxie kultiviert. Zuletzt erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. (A) Das Balkendiagramm zeigt den Proliferationsindex von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bei Ko-Kultur mit normoxisch (weiß) und hypoxisch (grau) vorkultivierten GR-MDSC als Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Proliferationsrate der Positivkontrolle ist als gestrichelte Linie zu sehen und wurde auf 100 % festgesetzt. (B) Repräsentative Histogrammplots nach vier Tagen Kultur in Normoxie (oben) und Hypoxie (unten) mit unterschiedlichen Verhältnissen von PBMC:GR-MDSC (Mitte), sowie eine Negativkontrolle (rechts oben) und eine Positivkontrolle (rechts unten). Als Negativkontrolle wurden CFSE-markierte PBMC ohne GR-MDSC und ohne Stimulanzen für vier Tage kultiviert. Als Positivkontrolle wurden CFSE-markierte PBMC mit IL-2 und OKT-3 stimuliert und ebenfalls ohne GR-MDSC für vier Tage kultiviert. n = 6, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

4.1.6 Zusammenfassung der *in vitro*-Versuche

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate von neonatalen GR-MDSC durch die Kultur für 24 bzw. 48 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kaum beeinflusst wurde, womit eine funktionelle Untersuchung der Zellen möglich war. Neonatale GR-MDSC zeigten nach Kultur in Normoxie eine stärkere Expression von CTLA-4 und PD-L2, sowie eine geringere Expression von Ox-2R. Die Expression von Ox-2, PD-1 und PD-L1 wurde nicht beeinflusst. Zusätzlich exprimierten neonatale GR-MDSC nach Kultur in Normoxie weniger Arg-1 und mehr iNOS als nach Kultur in Hypoxie. Die Expression vonIDO wurde nicht beeinflusst. Außerdem produzierten stimulierte GR-MDSC nach Kultur in Normoxie weniger ROS und im T-Zell-Proliferationsversuch konnten sowohl normoxisch als auch hypoxisch vorkultivierte neonatale GR-MDSC die Proliferation von T-Zellen konzentrationsabhängig ähnlich stark hemmen.

4.2 Effekt eines Fehlens von HIF-1 α in myeloiden Zellen auf die MDSC-Akkumulation und die intestinale Immunität bei neugeborenen Mäusen

Die Untersuchungen *in vivo* sollten dabei helfen, die komplexen Zusammenhänge zwischen Hypoxie und neonatalen Immunzellen besser zu verstehen. Um den Einfluss des Fehlens von HIF-1 α auf die Akkumulation von MDSC bei neugeborenen Mäusen zu untersuchen, wurden Mäuse mit konditionellem Knockout für HIF-1 α in der myeloiden Zellreihe (myHIF1 α -KO) verwendet.

4.2.1 Bei neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen ist die MDSC-Akkumulation im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen vermindert

Zunächst wurden MDSC und MDSC-Subpopulationen in der Milz neugeborener myHIF1 α -KO-Mäuse und neugeborener WT-Mäuse durchflusszytometrisch quantifiziert. Abbildung 8A zeigt repräsentative *density plots* der durchflusszytometrischen Quantifizierung von MDSC in der Milz von neugeborenen WT- und myHIF1 α -KO-Mäusen am ersten Lebenstag (P1) und am siebten Lebenstag (P7). Der prozentuale Anteil von MDSC und GR-MDSC an allen Leukozyten aus der Milz war an P1 bei myHIF1 α -KO-Mäusen signifikant geringer als bei WT-Mäusen (MDSC: Median 71,0 % für WT vs. 33,0 % für myHIF1 α -KO, n = 9-11, ** p = 0,0037; GR-MDSC: Median 57,5 % für WT vs. 26,6 % für myHIF1 α -KO, n = 9-11, * p = 0,0183, Abbildung 8B + 8C), während die Werte an P7 angeglichen waren (MDSC: Median 12,5 % für WT vs. 10,3 % für myHIF1 α -KO, n = 11, p = 0,9880; GR-MDSC: Median 14,9 % für WT vs. 8,9 % für myHIF1 α -KO, n = 11, p = 0,3939, Abbildung 8B + 8C). Die Expression von MO-MDSC in der Milz neonataler myHIF1 α -KO-Mäuse und WT-Mäuse zeigte keine Unterschiede (Abbildung 8D) [83].

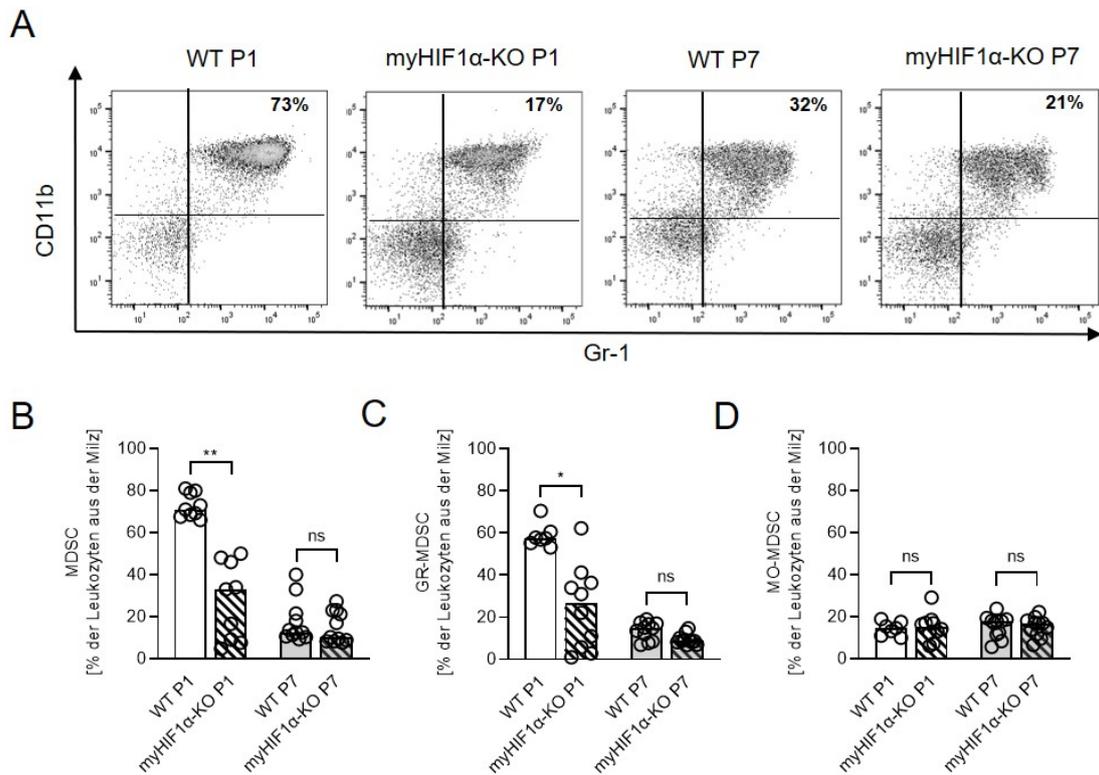


Abbildung 8: Der prozentuale Anteil von MDSC ist in der Milz von neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen reduziert. Neugeborene Wildtyp (WT) Mäuse und neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO wurden am ersten postnatalen Tag (P1) und am siebten postnatalen Tag (P7) getötet und die Milz entnommen. Das Milzgewebe wurde homogenisiert und gefiltert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Repräsentative *density plots* zeigen die Populationen von Gr-1⁺/CD11b⁺ MDSC aus der Milz von neugeborenen WT- und myHIF1 α -KO-Mäusen an P1 und P7. Zuvor erfolgte eine Vorauswahl von vitalen CD45⁺ Leukozyten. (B-D) Streu- und Balkendiagramme zeigen die prozentualen Anteile von allen MDSC (B), GR-MDSC (C) und MO-MDSC (D) an den CD45⁺ Leukozyten aus der Milz neugeborener WT-Mäuse (leere Balken) und neugeborener Mäuse mit myHIF1 α -KO (gestreifte Balken) an P1 (weiß) und P7 (grau). Jedes Symbol stellt eine einzelne Stichprobe dar. n = 9-11, * p < 0,05, ** p < 0,01, ns = nicht signifikant, Kruskal-Wallis test und Dunn's multiple comparison test. Modifiziert nach [83].

4.2.2 Im Darm von neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen akkumulieren weniger GR-MDSC als im Darm von neugeborenen WT-Mäusen

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob auch in der Darmschleimhaut von neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen eine verringerte Akkumulation von MDSC nachgewiesen werden konnte. Wir fokussierten uns hierbei auf GR-MDSC, da nur in dieser Subpopulation systemisch Unterschiede nachzuweisen waren (Abbildung 8C). Abbildung 9A zeigt repräsentative *density plots* von durchflusszytometrischen Quantifizierungen von GR-MDSC in der Darmschleimhaut neugeborener myHIF1 α -KO-Mäuse und neugeborener WT-Mäuse. Auch im Darm waren die prozentualen Anteile von GR-MDSC bei myHIF1 α -KO-Mäusen an P1 im Vergleich zu WT-Mäusen reduziert (Median 2,9 % für WT vs. 1,5 % für myHIF1 α -KO, n = 9-10, ** p = 0,0040, Abbildung 9B). An P7 waren die Unterschiede statistisch nicht mehr signifikant (Median 2,7 % für WT vs. 1,8 % für myHIF1 α -KO, n = 5, p = 0,1416, Abbildung 9B) [83].

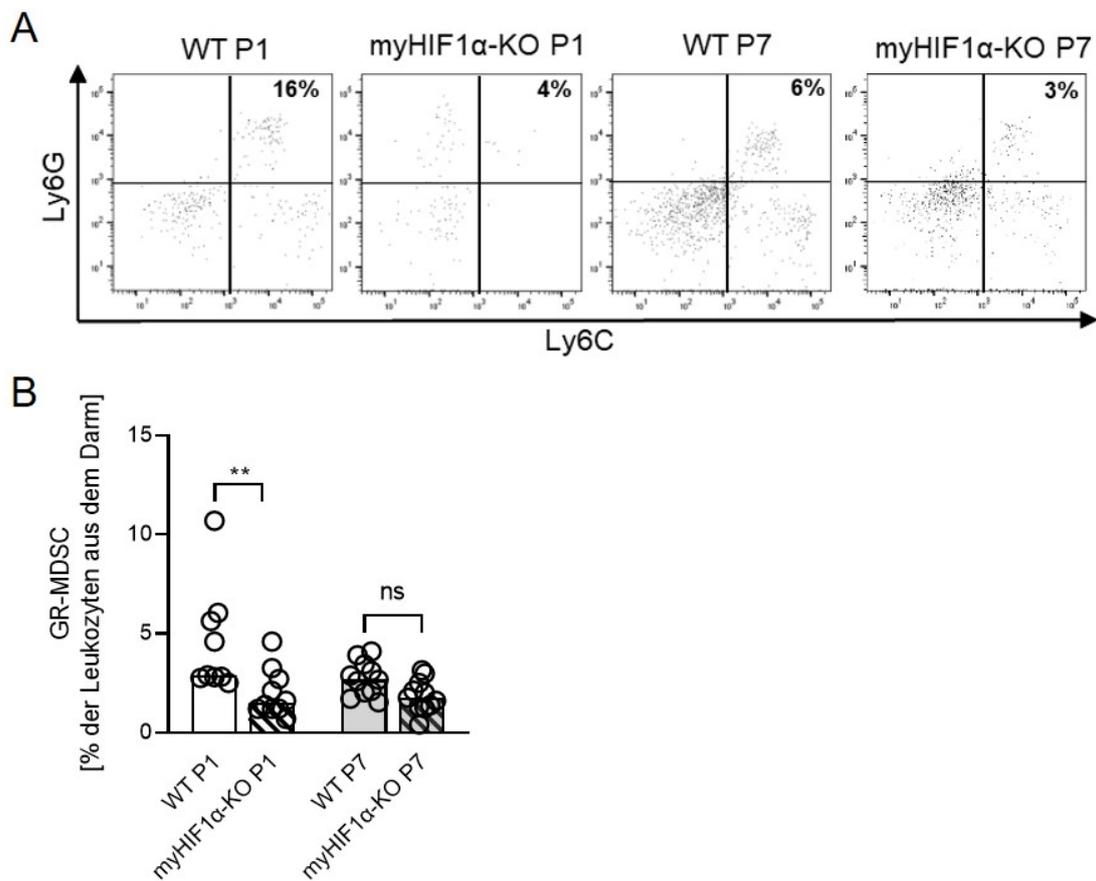


Abbildung 9: Neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO weisen am ersten postnatalen Tag weniger GR-MDSC im Darm auf als neugeborene WT-Mäuse. Neugeborene WT-Mäuse und Mäuse mit myHIF1 α -KO wurden am ersten postnatalen Tag (P1) und am siebten postnatalen Tag (P7) getötet. Postmortal wurde der Darm vom Duodenum bis zum Rektum entnommen, in EDTA und Liberase verdaut und filtriert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (A) Exemplarische *density plots* zeigen Ly6G⁺/Ly6C⁺ GR-MDSC aus dem Darm von neugeborenen WT-Mäusen und neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO an P1 und P7. Zuvor erfolgte eine Vorauswahl von vitalen CD45⁺ und CD11b⁺ Zellen. (B) Das Streu- und Balkendiagramm zeigt die prozentualen Anteile von GR-MDSC an allen CD45⁺ Leukozyten im Darm von neugeborenen WT-Mäusen (leere Balken) und neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO (gestreifte Balken) an P1 (weiß) und P7 (grau). Jedes Symbol stellt eine einzelne Stichprobe dar. n = 10-11, ** p < 0,01, ns = nicht signifikant, Kruskal-Wallis test und Dunn's multiple comparison test. Modifiziert nach [83].

4.2.3 Veränderungen von weiteren intestinalen Immunzellen durch myHIF1 α -KO

Zuletzt untersuchten wir, ob die verringerte Akkumulation von GR-MDSC zu Veränderungen des darmassoziierten Immunsystems im Rahmen der Etablierung des Mikrobioms von myHIF1 α -KO-Mäusen führen könnte. Hierzu wurden weitere Immunzellpopulationen im Darm der Tiere an P7 quantifiziert. Die Analyse der myeloiden Zellen im Darm ergab bei der Expression von intestinalen Makrophagen keine Unterschiede zwischen WT- und myHIF1 α -KO-Mäusen (Abbildung 10A). MyHIF1 α -KO-Mäuse zeigten jedoch eine erhöhte Anzahl dendritischer Zellen (Median 1,2 % für WT vs. 3,1 % für myHIF1 α -KO, n = 6, ** p = 0,0043, Abbildung 10B), mononukleärer Zellen (Median 6,6 % für WT vs. 12,4 % für myHIF1 α -KO, n = 6, ** p = 0,0076, Abbildung 10C) und NK-Zellen (Median 0,5 % für WT vs. 2,0 % für myHIF1 α -KO, n = 6, ** p = 0,0043, Abbildung 10F). Bei den lymphatischen Zellen waren im Darm von myHIF1 α -KO-Mäusen an P7 vermehrt T-Lymphozyten zu finden (Median 23,0 % für WT vs. 32,7 % für myHIF1 α -KO, n = 6, ** p = 0,0043, Abbildung 10D). Dagegen zeigten sich tendenziell weniger B-Lymphozyten. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Median 32,3 % für WT vs. 24,0 % für myHIF1 α -KO, n = 6, p = 0,1970, Abbildung 10E) [83].

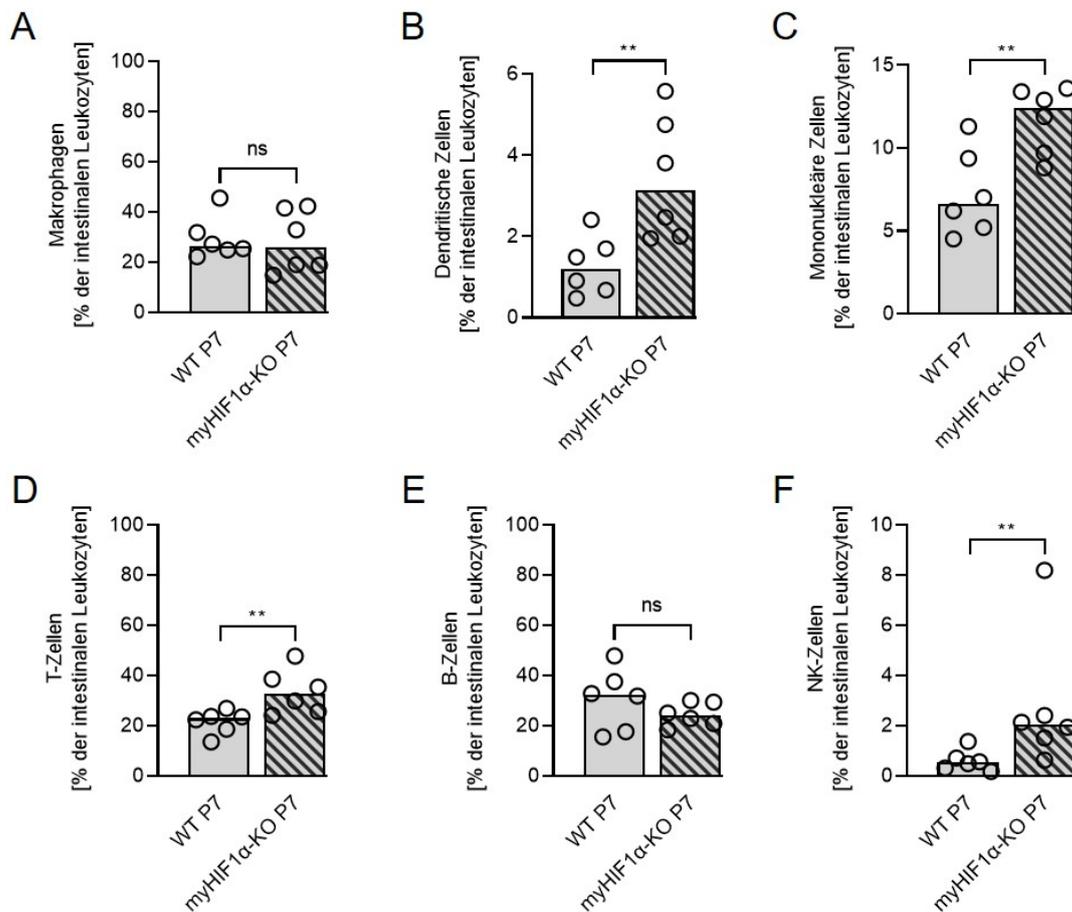


Abbildung 10: Neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO weisen am siebten postnatalen Tag im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen veränderte intestinale Immunzellpopulationen auf. Neugeborene WT-Mäuse und Mäuse mit myHIF1 α -KO wurden am siebten postnatalen Tag (P7) getötet. Postmortal wurde der Darm vom Duodenum bis zum Rektum entnommen, in EDTA und Liberase verdaut und filtriert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, welche durchflusszytometrisch analysiert wurden. (A-F) Streu- und Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von Makrophagen (A), dendritischen Zellen (B), mononukleären Zellen (C), T-Zellen (D), B-Zellen (E) und NK-Zellen (F) an CD45⁺ Leukozyten aus dem Darm neugeborener WT-Mäuse (leere Balken) und neugeborener Mäuse mit myHIF1 α -KO (gestreifte Balken) an P7. Jedes Symbol stellt eine einzelne Stichprobe dar. n = 6, ** p < 0,01, ns = nicht signifikant, Mann-Whitney test. Modifiziert nach [83].

4.2.4 Veränderungen in intestinalen lymphatischen Zellen durch myHIF1 α -KO

Da MDSC hauptsächlich T-Zell-Funktionen beeinflussen, untersuchten wir schließlich, ob es Unterschiede in der Verteilung von T-Zell-Subpopulationen und in der T-Zell-Aktivierung im Darm von neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen und neugeborenen WT-Mäusen gibt. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl von T-Helferzellen (Abbildung 11A) und cytotoxischen T-Zellen (Abbildung 11B). Jedoch waren im Darm neugeborener myHIF1 α -KO-Mäuse prozentual weniger CD4⁺/CD25⁺ regulatorische T-Zellen als im Darm von WT-Mäusen zu finden (Median 1,3 % für WT vs. 0,7 % für myHIF1 α -KO, n = 6, * p = 0,0422, Abbildung 11C). Zusätzlich zeigte sich eine verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD44 auf T-Zellen neugeborener myHIF1 α -KO-Mäuse im Vergleich zu T-Zellen von WT-Mäusen (MFI 566 \pm 94 für WT vs. 1182 \pm 335 für myHIF1 α -KO, n = 6, ** p = 0,0022, Abbildung 11D +11E) [83].

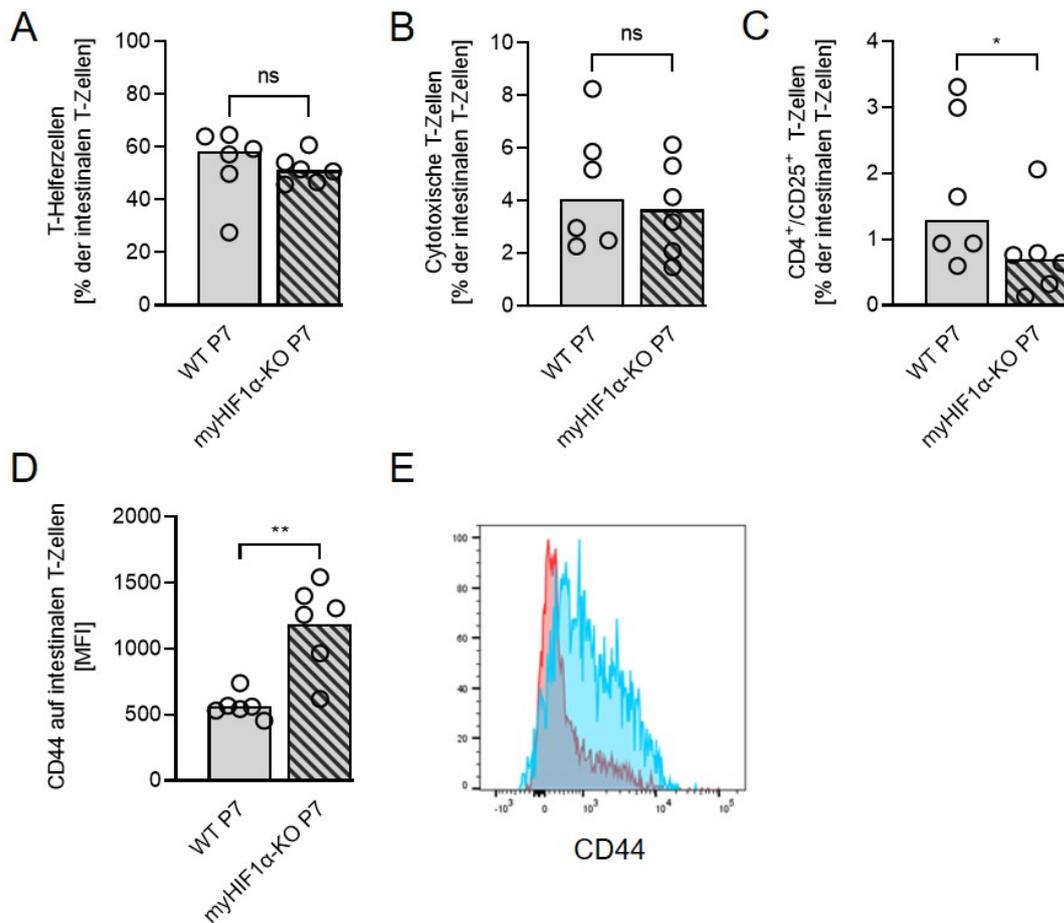


Abbildung 11: Neugeborene Mäuse mit myHIF1 α -KO zeigen im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen an P7 eine verstärkte Aktivierung der intestinalen T-Zellen. Neugeborene WT-Mäuse und Mäuse mit myHIF1 α -KO wurden am siebten postnatalen Tag (P7) getötet. Postmortal wurde der Darm vom Duodenum bis zum Rektum entnommen, in EDTA und Liberase verdaut und filtriert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, welche durchflusszytometrisch analysiert wurden. (A-C) Streu- und Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von T-Helferzellen (A), cytotoxischen T-Zellen (B) und CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (C) an allen CD3⁺ T-Zellen aus dem Darm neugeborener WT-Mäuse (leere Balken) und neugeborener Mäuse mit myHIF1 α -KO (gestreifte Balken) an P7. (D) Das Streu- und Balkendiagramm zeigt die MFI von CD44 auf intestinalen T-Zellen von neugeborenen WT-Mäusen (leerer Balken) und neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO (gestreifter Balken) an P7. Jedes Symbol stellt eine einzelne Stichprobe dar. (E) Ein repräsentativer Histogrammplot zeigt die Expression von CD44 auf intestinalen T-Zellen von neugeborenen WT-Mäusen (rot) und neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO (blau) an P7. n = 6, * p < 0,05, ** p < 0,01, ns = nicht signifikant, Mann-Whitney test. Modifiziert nach [83].

In der Zusammenschau zeigte sich sowohl systemisch als auch lokal im Darm der Jungtiere eine verminderte Akkumulation von MDSC bei Mäusen mit myHIF1 α -KO. Die verminderte MDSC-Akkumulation ging mit einer veränderten Immunzellkomposition im Darm der Jungtiere einher. Insbesondere zeigten sich Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung von T-Zellen bei myHIF1 α -KO-Mäusen [83].

5 Diskussion

Aus immunologischer Sicht ist die Neonatalperiode eine sehr besondere Lebensphase, denn das Immunsystem muss vom intrauterinen Zustand in den postnatalen Zustand übergehen, was komplexe und ausbalancierte Mechanismen erfordert. Während es die wichtigste Aufgabe des fetalen Immunsystems ist, den semi-allogenen Fetus vor einer Abstoßung durch mütterliche Immunzellen zu schützen, muss das Immunsystem des Neugeborenen nach der Geburt schnell lernen, Pathogene effektiv abzuwehren. Gleichzeitig muss das neonatale Immunsystem die Besiedelung der Körperoberfläche des Neugeborenen durch mehrere Milliarden Mikroorganismen tolerieren, zu der es im Rahmen der physiologischen Etablierung des Mikrobioms kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass der postnatal steigende Sauerstoffpartialdruck eine Rolle bei der Adaptation des fetalen Immunsystems an den neonatalen und später adulten Funktionszustand spielt. Der Fokus wurde dabei auf die Immunzellpopulation der MDSC gelegt.

Zunächst konnten wir *in vitro* zeigen, dass eine Kultur von Nabelschnurblutzellen in Normoxie im Vergleich zu Hypoxie (1) die Apoptoserate von humanen GR-MDSC aus Nabelschnurblut nicht veränderte, (2) zu Veränderungen der Expression von co-inhibitorischen Molekülen und Effektormechanismen auf bzw. in GR-MDSC aus Nabelschnurblut führte, aber (3) deren Fähigkeit zur Hemmung der T-Zell-Proliferation unverändert blieb.

Hinsichtlich der Apoptoseeigenschaften von MDSC existieren verschiedene Arbeiten in der Literatur. Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte beobachten, dass neonatale GR-MDSC weniger zu spontaner Apoptose neigten als Granulozyten und Hu et al. beobachteten bei MDSC in tumortragenden Mäusen geringere Spontanapoptoseraten als bei MDSC in gesunden Mäusen [41, 84]. Chornoguz et al. zeigten bei tumortragenden Mäusen eine verminderte Apoptose von MDSC im inflammatorischen Milieu [85] und auch Ostrand-Rosenberg et al. zeigten im Tierversuch, dass Inflammation MDSC vor Apoptose schützte [86]. Im Einklang

damit konnten Condamine et al. bei tumortragenden Mäusen eine verstärkte Apoptose von MDSC im nicht-inflammatorischen Milieu nachweisen [87]. Weitere Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α MDSC vor Apoptose schützte [52]. Interessanterweise zeigten Rodriguez et al., dass eine Aktivierung von MDSC, anders als eine Aktivierung von PMN (*polymorphonuclear cells*), nicht zur Apoptose führte [88]. All diese Arbeiten deuten darauf hin, dass MDSC sehr resistent gegenüber Apoptose sind. Dies erklärt die von uns beobachteten sehr geringen und von den verschiedenen Kulturbedingungen unabhängigen Apoptoseraten.

Damit Immunantworten ein adäquates Ausmaß erreichen, rechtzeitig beendet werden und überschießende Immunreaktionen verhindert werden, müssen Immunzellen präzise reguliert werden. Hierfür sind stimulatorische und inhibitorische Oberflächenrezeptoren, sogenannte Immuncheckpoint-Moleküle, von großer Bedeutung. Sie ermöglichen über stimulatorische bzw. inhibitorische Effekte einen koordinierten Ablauf von Immunantworten [89]. Das Fehlen von inhibitorischen Immuncheckpoint-Molekülen kann zur unkontrollierten Aktivierung von Immunzellen führen und damit Gewebeschäden oder Autoimmunität begünstigen, während eine erhöhte Expression dazu führen kann, dass Immunzellen nicht aktiviert und Immunantworten unterdrückt werden [33, 90, 91]. CTLA-4 ist ein Immuncheckpoint-Molekül, das die Aktivierung von T-Zellen einschränken kann, und PD-1 ist in der Lage T-Zell-Antworten zu unterdrücken und eine T-Zell-Erschöpfung auszulösen, wenn es mit PD-L1 oder PD-L2 interagiert [89, 92].

In dieser Arbeit beobachteten wir eine erhöhte Expression von CTLA-4 und PD-L2 auf GR-MDSC nach Kultur in Normoxie im Vergleich zur Kultur in Hypoxie. PD-1 und PD-L1 wurden von neonatalen GR-MDSC insgesamt kaum exprimiert und zeigten auch bei unterschiedlichen Kulturbedingungen keine Unterschiede.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten Noman et al. in verschiedenen Tumormodellen, dass Hypoxie die Expression von PD-L1 auf MDSC verstärkte, während die Expression von PD-L2, PD-1 und CTLA-4 nicht beeinflusst wurde

[31]. Ruan et al. zeigten, dass PD-L1 auf GR-MDSC im Rahmen einer Sepsis im Mausmodell ebenfalls induziert und dadurch die immunsuppressive Kapazität von GR-MDSC verstärkt wurde [30]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Aktivierung von MDSC die Expression von PD-L1 und damit deren suppressive Aktivität steigert. In den hier genannten Untersuchungen wurden jedoch Zellen verwendet, die aus normoxischen Bedingungen stammten und von dort in ein hypoxisches Milieu, wie z.B. Tumormilieu oder inflammatorisches Milieu, überführt wurden, sodass Hypoxie hierbei als Aktivierungssignal wirkte. In unseren Versuchen dagegen wurden MDSC aus Nabelschnurblut und damit bereits aus einem hypoxischen Milieu isoliert und dann entweder weiterhin in Hypoxie kultiviert oder in Normoxie verbracht. Wahrscheinlich führt die lange Zeit in Hypoxie zu einer Adaptation an einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck, was eine weitere Aktivierung verhindert. Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit unserer Gruppe zeigte, dass aus Nabelschnurblut isolierte Monozyten unter Hypoxie kein HIF-1 α exprimierten und auch funktionell wesentlich schlechter aktiviert werden konnten als Monozyten von Erwachsenen [93]. Dies könnte den fehlenden Anstieg bei der Expression von PD-L1 in unseren Versuchen erklären.

Ruhende Zellen exprimieren kaum PD-L2, doch auf Makrophagen oder dendritischen Zellen kann PD-L2 beispielsweise über die Zytokine IL-4 und IFN γ induziert werden [94, 95]. Loke et al. zeigten für Makrophagen, dass PD-L2 besonders stark durch das T_H2-assoziierte Zytokin IL-4 induziert wurde und PD-L1 vor allem durch das T_H1-assoziierte Zytokin IFN γ [96]. Auch Liang et al. zeigten, dass IL-4 zur Induktion von PD-L2 führte und beobachteten ferner, dass die Transkriptionsfaktoren STAT6 und NF- κ B für die Expression von PD-L2 auf dendritischen Zellen eine entscheidende Rolle spielen [97]. Da T-Zellen des Neugeborenen vorwiegend T_H2-Immunantworten generieren [98], könnte dieser Mechanismus eine weitere Erklärung dafür sein, dass in unseren Versuchen nur PD-L2, nicht jedoch PD-L1 auf MDSC reguliert wurde.

CTLA-4 befindet sich primär intrazellulär und wird bei der Aktivierung einer T-Zelle per Exozytose in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert und dort verstärkt exprimiert [99, 100]. Je stärker und andauernder das Signal eines

T-Zell-Rezeptors bei der Aktivierung einer T-Zelle ist, desto mehr CTLA-4 transloziert an die Zelloberfläche [99]. Unter anderem kann die Expression von CTLA-4 durch lysosomalen Abbau wieder verringert werden [100]. Über welche Mechanismen es zur gesteigerten Expression von CTLA-4 auf neonatalen GR-MDSC in Normoxie kam, bleibt hier unklar.

CD200R (Ox-2R) ist ein co-inhibitorischer Immunrezeptor, der hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert wird. Durch Bindung des Liganden CD200 (Ox-2) an myeloide Zellen wird die Reaktion auf proinflammatorische Stimuli gehemmt und die inhibitorische Aktivität verstärkt [101, 102]. Wir konnten zeigen, dass neonatale GR-MDSC Ox-2R in Hypoxie exprimierten und in Normoxie herabregulierten. Choueiry et al. zeigten, dass in der Mikroumgebung des duktales Pankreasadenokarzinoms vermehrt Ox-2 exprimiert wurde und GR-MDSC der Patienten verstärkt den zugehörigen Rezeptor Ox-2R exprimierten. Die Expression von Ox-2 führte *in vitro* zur Expansion von MDSC und verstärkte deren suppressive Aktivität [103]. Liu et al. zeigten, dass es in der Mikroumgebung von CD200⁺ Tumoren in Mäusen mit CD200R-Knockout zu einer gesteigerten Akkumulation und Aktivierung von MDSC kam [104]. Diese Daten lassen vermuten, dass die Ox-2/Ox-2R-Achse eine Rolle bei der funktionellen Aktivierung von MDSC spielt. Der postnatale pO₂-Anstieg könnte über eine Reduktion der Ox-2R-Expression die suppressive Aktivität von MDSC vermindern und damit dazu beitragen, dass das Immunsystem sich in Richtung einer zunehmenden Generierung proinflammatorischer Immunantworten umstellt.

Zusammenfassend zeigte sich hinsichtlich der Expression von co-inhibitorischen Molekülen auf neonatalen GR-MDSC in Normoxie und Hypoxie kein eindeutiges Muster. Insgesamt waren alle untersuchten Moleküle nur schwach exprimiert, was sich durch eine Adaptation an die Hypoxie erklären lassen könnte. Inwieweit die veränderte Expression der co-inhibitorischen Moleküle die Funktionalität von neonatalen MDSC beeinflusst bleibt unklar.

Ein Review von Shipp et al. zeigt, dass MDSC verschiedene Mechanismen nutzen, um ihre suppressive Aktivität auszuüben und dass diese Mechanismen

bei unterschiedlichen Bedingungen unterschiedlich stark zu tragen kommen [105]. In unseren Versuchen zeigte sich, dass neonatale GR-MDSC unter Normoxie weniger Arg-1 und deutlich weniger ROS produzierten als unter Hypoxie. Dies könnte ebenfalls für die Theorie sprechen, dass der postnatale pO_2 -Anstieg zu einer Hemmung der suppressiven Aktivität von neonatalen GR-MDSC führt und somit zur Umstellung des Immunsystems von eher hemmenden Mechanismen zu aktiver Immunabwehr beiträgt. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer vorangegangenen Arbeit zeigen, dass GR-MDSC aus dem Nabelschnurblut über Arg-1 und ROS T_H2 -Zellen induzierten [106]. Die schwächere Expression dieser Effektormechanismen in Normoxie im Vergleich zur Hypoxie könnte zur Abnahme des T_H2 -Biasing beim Neugeborenen beitragen. Interessanterweise kam es unter hypoxischen Kulturbedingungen zu einer Zunahme der Arg-1 und ROS-Expression über die Beobachtungszeit von 48 Stunden. Dies könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass durch die Isolation und *ex vivo*-Kultur der Zellen andere Faktoren wie z.B. Hormone und Wachstumsfaktoren wegfallen, die *in vivo* die Expression der beiden Effektormechanismen zusätzlich beeinflussen und regulieren.

Im Gegensatz zu Arg-1 und ROS wurde die Expression von iNOS unter Normoxie heraufreguliert. Verschiedene vorangegangene Studien zeigten, dass bei MDSC je nach Umgebungsbedingungen unterschiedliche Effektormechanismen überwiegen. Beispielsweise beobachteten Corzo et al., dass im Rahmen von Tumorerkrankungen MDSC aus peripheren lymphatischen Organen hauptsächlich über ROS wirkten, während in der Mikroumgebung des Tumors mehr iNOS und Arg-1 exprimiert wurden, was auf die Wirkung von Hypoxie bzw. HIF-1 α zurückgeführt wurde [49, 107]. Auch scheinen unterschiedliche MDSC-Subtypen unterschiedliche Effektormechanismen zu nutzen [9, 14].

Youn et al. untersuchten stimulierte MDSC aus der Milz von tumortragenden Mäusen und stellten fest, dass GR-MDSC vor allem ROS produzierten und MO-MDSC vor allem iNOS exprimierten. Interessanterweise hemmten GR-MDSC und MO-MDSC die Funktion antigenspezifischer T-Zellen trotz unterschiedlicher Effektormechanismen gleich stark [108]. Ähnlich wie von Corzo

et al. beobachtet, zeigen unsere Ergebnisse nun, dass das Gleichgewicht der exprimierten Effektormechanismen durch die Kultur in Normoxie oder Hypoxie verändert wurde, wenn auch mit etwas anderen als in der Literatur beschriebenen Effekten.

Entgegen unserer Hypothese zeigte sich in unseren Versuchen, dass in Normoxie und Hypoxie vorkultivierte neonatale GR-MDSC die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen *in vitro* konzentrationsabhängig gleich gut hemmten. Allerdings muss hier einschränkend erwähnt werden, dass der eigentliche Proliferationsassay unter normoxischen Bedingungen erfolgte, sodass die Effekte der Vorstimulation durch die deutlich längere Kulturzeit im Anschluss verdeckt werden könnten.

Andere Arbeiten, die die suppressive Wirkung von MDSC auf T-Zellen in Abhängigkeit des pO₂ untersuchten, führten den gesamten Versuch in Normoxie bzw. Hypoxie durch [31]. In eigenen unveröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe beobachteten wir unter diesen Bedingungen, dass Hypoxie alleine bereits die T-Zell-Proliferation hemmte, sodass der zusätzliche suppressive Effekt von MDSC nicht gut beurteilt werden konnte. Es muss also geschlussfolgert werden, dass der wirkliche Effekt des pO₂ auf die T-Zell-suppressive Aktivität von MDSC *in vitro* nur sehr schwer abgeschätzt werden kann. Die ebenfalls nicht einheitlichen Ergebnisse zur Regulation von co-inhibitorischen Molekülen und Effektormechanismen lassen aber vermuten, dass sich der pO₂ nicht wesentlich auf die Funktionalität von MDSC auswirkt.

Da die Anzahl der MDSC in den Tagen nach der Geburt abnimmt [35, 42] und der pO₂ ansteigt, erscheint ein Zusammenhang dieser beiden Kinetiken naheliegend. Kumar et al. beobachteten, dass MDSC im hypoxischen Tumormilieu vermehrt zu tumorassoziierten Makrophagen differenzierten [45] und auch Corzo et al. zeigten, dass MDSC in Hypoxie vor allem zu Makrophagen ausdifferenzierten, was über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α reguliert wurde [49]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der pO₂ die Akkumulation von MDSC beeinflussen kann, indem er deren weitere Reifung verändert.

Untersuchungen zur Weiterdifferenzierung von neonatalen MDSC unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen sollte Inhalt weiterer Studien sein.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem Effekt, den ein Fehlen von HIF-1 α in myeloiden Zellen auf die Akkumulation von MDSC und die intestinale Immunität bei neugeborenen Mäusen hat. In einem *in vivo*-Modell wurde gezeigt, dass ein gezielter Knockout des Transkriptionsfaktors HIF-1 α in myeloiden Zellen bei neonatalen Mäusen am ersten Lebenstag (1) sowohl systemisch als auch lokal im Darm zu einer verminderten Akkumulation von MDSC führte, wobei GR-MDSC davon besonders stark betroffen waren, und (2) dass es durch diesen Knockout zu einem veränderten Gleichgewicht und zu einer verstärkten Aktivierung intestinaler Immunzellen kam.

Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass MDSC bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen vermehrt vorkommen [35, 36, 60, 109]. Da MDSC bei Neugeborenen während den ersten vier bis sechs Lebenswochen unabhängig vom Gestationsalter erhöht sind und verschiedenste antiinflammatorische Effekte auf die Immunantwort des Neugeborenen *in vitro* zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass MDSC bei Neugeborenen einerseits zur erhöhten Anfälligkeit für Infektionen beitragen, andererseits aber auch Immunreaktionen während der Etablierung des Mikrobioms beeinflussen könnten [35, 36]. Diese Vermutung wird durch eine *in vivo*-Studie unterstützt, die zeigte, dass MDSC bei neugeborenen Mäusen dazu beigetragen haben, die Inflammation während einer nekrotisierenden Enterokolitis, einer schweren entzündlichen Darmerkrankung von Frühgeborenen, zu kontrollieren [42].

In dieser Arbeit konnten wir nun zeigen, dass neugeborene Mäuse mit einem Knockout für HIF-1 α in der myeloiden Zellreihe (myHIF1 α -KO) weniger GR-MDSC aufwiesen als WT-Mäuse. Passend dazu beobachteten Chiu et al., dass es unter Tumorbedingungen zu einer MDSC-Akkumulation kam, was auf eine fehlende Ausdifferenzierung infolge einer Aktivierung von HIF-1 α zurückzuführen war [110]. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass die Blockade von HIF-1 α zu einer verringerten Akkumulation von MDSC in der Tumor-Mikroumgebung führte. In Kombination mit einer anti-PD-L1-Therapie

bewirkte dies eine vollständige Tumor-Eradikation [111]. Darüber hinaus konnte unter Tumorbedingungen gezeigt werden, dass die Expression von HIF-1 α für die funktionelle Aktivierung von MDSC relevant war [31, 49, 51]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte kürzlich, dass ein gezielter myHIF1 α -KO zu einer verminderten Akkumulation von GR-MDSC in der Milz und im Uterus von trächtigen Mäusen führte und deren suppressive Kapazität signifikant beeinträchtigte, wodurch erstmals ein Einfluss von HIF-1 α auf die Akkumulation und Funktion von MDSC unter physiologischen perinatalen Bedingungen beschrieben wurde [52].

Der Fetus entwickelt sich intrauterin in einer hypoxischen Umgebung [55, 112] und HIF-1 α ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Regulierung der zellulären Antwort auf Hypoxie [113]. Es ist daher naheliegend, dass Immunzellen, deren Akkumulation und Funktion entscheidend durch HIF-1 α beeinflusst werden, bei neugeborenen Mäusen mit einem defekten HIF-1 α -Signalweg beeinträchtigt sind. Da der myHIF1 α -KO an Relevanz verliert, sobald Hypoxie physiologisch keine Rolle mehr spielt, ist es ebenfalls naheliegend, dass die Anzahl von MDSC bei myHIF1 α -KO- und WT-Mäusen nach der Geburt auf ein ähnlich niedriges Niveau abfällt. Wäre die Akkumulation von MDSC ausschließlich über HIF-1 α reguliert, dann müsste ein myHIF1 α -KO in neonatalen Mäusen zu einem vollständigen Fehlen von MDSC führen. Da dies nicht der Fall war, ist davon auszugehen, dass weitere Signalwege an der Akkumulation von MDSC im fetalen Organismus beteiligt sind, die unabhängig von HIF-1 α funktionieren.

Neugeborene myHIF1 α -KO-Mäuse hatten auch in der Darmschleimhaut signifikant weniger GR-MDSC als neugeborene WT-Mäuse. Der Darm ist im physiologischen Zustand nicht nur im Lumen, sondern auch an den Spitzen der Darmzotten durch Hypoxie gekennzeichnet [114] und kürzlich wurde gezeigt, dass HIF-1 α die Infiltration von myeloiden Zellen in die Darmschleimhaut reguliert [115, 116]. Im Einklang mit unserem Ergebnis, dass bei Mäusen mit myHIF1 α -KO intestinal weniger MDSC akkumulierten, fanden Kim et al. während einer DSS-induzierten Kolitis bei Mäusen mit myeloidem HIF-KO eine verringerte

Anzahl neutrophiler Zellen und bei Mäusen mit einer übermäßigen Expression von HIF-1 α in myeloiden Zellen eine erhöhte Anzahl neutrophiler Zellen [115]. Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass in der Darmschleimhaut absolut gesehen eine sehr niedrige Anzahl von GR-MDSC zu finden war, sodass mit diesen Zellen keine funktionellen Analysen möglich waren.

Schließlich fanden wir in der Darmschleimhaut von neugeborenen Mäusen mit myHIF1 α -KO am siebten Lebenstag eine veränderte Zusammensetzung der weiteren Immunzellpopulationen im Vergleich zu neugeborenen WT-Mäusen. MyHIF1 α -KO-Mäuse zeigten intestinal eine ähnliche Anzahl von Makrophagen, aber signifikant mehr dendritische Zellen und mononukleäre Zellen als neugeborene WT-Mäuse. Doedens et al. zeigten in einer *in vivo*-Studie, dass Tumor-assoziierte Makrophagen ihre suppressive Aktivität über HIF-1 α vermittelten [51]. Trotz einer ähnlichen Anzahl von intestinalen Makrophagen bei myHIF1 α -KO- und WT-Mäusen in unserer Studie, könnte der myHIF1 α -KO auch in unseren Mäusen die suppressive Aktivität von Makrophagen in der Darmschleimhaut beeinträchtigen, was kombiniert mit der verringerten Anzahl von MDSC zu einer weniger suppressiven Umgebung führen könnte.

In einem Tier-Modell der DSS-induzierten Kolitis wurde gezeigt, dass ein Knockout von HIF-1 α in dendritischen Zellen zu einer verminderten Induktion von protektiven Tregs führte, was eine stärkere Inflammation zur Folge hatte [43]. In unserem Modell war die gezielte Deletion von HIF-1 α an den Promotor LysM gekoppelt, der in allen myeloiden Zellen exprimiert wird. Die beobachteten Unterschiede der myeloiden Zellen sind daher wahrscheinlich direkt auf den myHIF1 α -KO und nicht auf die Veränderungen in der MDSC-Homöostase zurückzuführen.

Insgesamt deuten die beobachteten Veränderungen in Zellen der myeloiden Zellreihe von neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen auf eine erhöhte Entzündungsbereitschaft im Vergleich zu WT-Mäusen hin.

Die Analyse der nicht-myeloiden Zellen im Darm zeigte bei neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen signifikant mehr T-Zellen, mehr NK-Zellen und eine ähnliche Anzahl von B-Zellen im Vergleich zu WT-Mäusen.

Die differenziertere Betrachtung der T-Zell-Subpopulationen zeigte ein ähnliches Verhältnis von intestinalen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, aber weniger Tregs und eine verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD44 auf intestinalen T-Zellen von Mäusen mit myHIF1 α -KO. Da Lymphozyten in unserem Modell nicht von der HIF-1 α -Deletion betroffen waren, muss ihre unterschiedliche Zusammensetzung und die verstärkte Aktivierung indirekt durch die Veränderungen der myeloiden Zellen vermittelt werden. Tregs sind in der Lage, während der Etablierung des Mikrobioms die Homöostase der Immunzellen und die Inflammation in der Darmschleimhaut zu regulieren [117] und es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl von intestinalen Tregs das Risiko für entzündliche Erkrankungen wie Asthma oder Kolitis senken konnte, insbesondere wenn sie während der Neonatalperiode induziert wurden [118, 119]. Wir und andere konnten zudem zeigen, dass Tregs durch MDSC induziert werden [50, 106, 120]. Die Daten der vorliegenden Studie ermöglichen keine Aussage darüber, ob die verringerte Anzahl von Tregs in neugeborenen myHIF1 α -KO-Mäusen durch die verringerte Anzahl von MDSC oder durch andere Effekte verursacht wurde. Zusammen mit der erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD44 auf T-Zellen, deuten unsere Ergebnisse aber darauf hin, dass durch einen myHIF1 α -KO in neugeborenen Mäusen abgesehen von den Veränderungen der myeloiden Zellen auch das intestinale lymphatische Immunsystem in Richtung einer erhöhten proinflammatorischen Bereitschaft beeinflusst wird.

Zusätzlich analysierten wir in diesem Zusammenhang die Stuhlproben der neugeborenen Mäuse und fanden bei myHIF1 α -KO-Mäusen eine veränderte Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms im Sinne einer reduzierten Diversität und einem veränderten Gleichgewicht. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht Teil dieser Arbeit, weshalb sie nur erwähnt und nicht diskutiert werden.

Insgesamt deuten unsere *in vivo*-Daten darauf hin, dass die erhöhte Anzahl von MDSC bei Neugeborenen die Regulierung von Inflammationsreaktionen im Rahmen der Etablierung des Mikrobioms beeinflusst.

Ähnliche Beobachtungen wurden von Elahi et al. für CD71⁺ erythroide Zellen gemacht, die ebenfalls eine Zellpopulation mit suppressiven Eigenschaften darstellen und im Darm von neugeborenen Mäusen bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen im Rahmen der postnatalen Etablierung des Mikrobioms von Bedeutung zu sein scheinen [11]. Elahi et al. zeigten zusätzlich, dass das Vorhandensein von CD71⁺ Zellen in neugeborenen Mäusen zur erhöhten Anfälligkeit für Infektionen beigetragen hat [11]. Ob dies auch für MDSC gilt, ist noch nicht abschließend geklärt. Peyssonnaud et al. zeigten für adulte Mäuse, dass ein myeloider Knockout von HIF-1 α die Entzündungsreaktion bei einer Sepsis eindämmen konnte und das Überleben verbesserte [121], ohne hierbei jedoch explizit auf MDSC einzugehen. Die Rolle von MDSC für die Pathogenese der Neugeborenenensepsis sollte daher Bestandteil weiterer Studien sein.

5.1 Limitationen

Die wichtigste Limitation des *in vitro*-Teils dieser Arbeit ist, dass die Proben für die Versuche anonym gesammelt wurden. Obwohl ausschließlich Nabelschnurblut von reifen Neugeborenen nach primärem Kaiserschnitt verwendet wurde, kann ein Einfluss von Infektionen oder anderen relevanten klinischen Parametern auf die Ergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden. Außerdem kann es bei der Untersuchung von Patientenproben immer zu interindividuellen Unterschieden kommen. Diese Variabilität kann für Abweichungen bei der Auswertung der Ergebnisse sorgen.

Eine Limitation des *in vivo*-Teils ist, dass MDSC aus dem Darm der neugeborenen Mäuse aufgrund der geringen Anzahl nicht funktionell untersucht werden konnten. Auch andere Immunzellpopulationen, wie z.B. T-Zellen, wurden nicht funktionell analysiert. Eine weitere Limitation ist, dass der myHIF1 α -KO nicht spezifisch in MDSC vorlag, sondern alle myeloiden Zellen betraf.

Transfer-Experimente von MDSC in HIF1 α -KO-Mäuse könnten hierbei aufschlussreich sein. Weitere Versuche sind notwendig, um die Rolle von MDSC bei der Regulation der intestinalen Inflammation im Rahmen der Etablierung des Mikrobioms genauer zu beleuchten.

5.2 Ausblick

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über den Phänotyp und die Funktionsmechanismen neonataler GR-MDSC in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckes. Es erfordert jedoch weitere Forschungsarbeit, um die Bedeutung von MDSC für die neonatale Immunregulation zu verstehen und Einflüsse und Mechanismen zu definieren, die die Funktion und Akkumulation von MDSC bei Neugeborenen modulieren.

Bei den *in vitro*-Versuchen könnten Modifikationen im Versuchsaufbau vorgenommen werden, um die Effekte von Normoxie und Hypoxie auf MDSC genauer zu beschreiben. MDSC könnten beispielsweise voraktiviert werden und die Kulturdauer sowie die Vorstimulation im Proliferationsassay könnten verlängert werden. Um Hinweise darauf zu erhalten, inwiefern eine Infektion oder das Gestationsalter die Reaktion neonataler MDSC auf Normoxie oder Hypoxie beeinflusst, könnten MDSC von Neugeborenen mit Infektionen und von Frühgeborenen verwendet werden. Zusätzlich könnten weitere funktionelle Aspekte von MDSC in Abhängigkeit des pO₂ analysiert werden. Dies könnte beispielsweise die Induktion von Tregs und T_H2-Zellen sein oder Effektormechanismen wie Lactoferrin, S100A9 und PGE2 [9].

Bezüglich der Untersuchungen *in vivo* sollte in Folgeprojekten untersucht werden, ob ein adoptiver Transfer von MDSC die beobachteten Effekte auf die intestinalen Immunzellen und das Mikrobiom wieder aufheben kann. So könnten MDSC eindeutig für diese Effekte verantwortlich gemacht werden. Aktuell laufen in unserer Arbeitsgruppe parallele Versuche, die den Effekt von oralen MDSC auf die Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis analysieren. Die Entwicklung einer MDSC-basierten Zelltherapie für Kinder mit hohem Risiko für eine nekrotisierende Enterokolitis könnte ein Ziel in der Zukunft sein.

6 Zusammenfassung

6.1 Hintergrund und Hypothese

Das neonatale Immunsystem ist besonders anfällig für Infektionen. Vor der Geburt ist die wichtigste Anforderung an das Immunsystem des Fetus, sich vor einer Abstoßung durch mütterliche Immunzellen zu schützen. Postnatal werden Neugeborene mit unzähligen Mikroorganismen konfrontiert, von denen manche abgewehrt werden müssen, während andere die Körperoberfläche als Mikrobiom besiedeln. Wie die immunologische Umstellung vom intrauterinen zum extrauterinen Zustand reguliert wird, ist nur unvollständig verstanden. Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind Immunzellen, die andere Immunzellen inhibieren können. Neugeborene weisen im Vergleich zu gesunden Erwachsenen viel höhere Zahlen von MDSC auf und es konnte bereits gezeigt werden, dass MDSC des Neugeborenen Infektionen und Inflammationsreaktionen in der Neonatalperiode regulieren. Bei der Aktivierung von Immunzellen spielt Hypoxie bzw. der Transkriptionsfaktor HIF-1 α eine Rolle. Auch MDSC können durch Hypoxie bzw. HIF-1 α beeinflusst werden. Intrauterin leben Feten in einer hypoxischen Umgebung und postnatal adaptieren sie sich an einen höheren Sauerstoffpartialdruck (pO₂). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle die Interaktion von MDSC und Hypoxie bzw. HIF-1 α für die Immunadaptation des Neugeborenen spielt.

6.2 Methoden

Zur funktionellen Analyse von neonatalen MDSC unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen wurden *in vitro* Kulturversuche mit mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut von reifen Neugeborenen durchgeführt. Dabei wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, Effektormechanismen und die T-Zell-suppressive Kapazität von MDSC nach Kultur in Normoxie oder Hypoxie durchflusszytometrisch analysiert. Im zweiten Teil des Projektes wurde der Effekt eines Fehlens von HIF-1 α in myeloiden Zellen auf die Akkumulation von MDSC und die Immunzellkomposition im Darm während der Neonatalperiode in einem *in vivo*-Modell untersucht. Hierzu wurden

Immunzellen aus neugeborenen Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit konditionellem Knockout des Transkriptionsfaktors HIF1 α in der myeloiden Zellreihe (myHIF1 α -KO) isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

6.3 Ergebnisse

In den *in vitro*-Versuchen zeigte sich, dass die Apoptoseraten von GR-MDSC durch den pO₂ nicht beeinflusst wurden. Sowohl die Expression von co-inhibitorischen Oberflächenmolekülen als auch die Expression von Effektormechanismen wurde durch die verschiedenen Kulturmethode etwas verändert, während die T-Zell-suppressive Kapazität von GR-MDSC aus dem Nabelschnurblut unbeeinflusst blieb.

Die *in vivo*-Versuche zeigten, dass ein myHIF1 α -KO bei neugeborenen Mäusen am ersten Lebenstag sowohl systemisch als auch lokal im Darm zu einer verminderten Akkumulation von MDSC und insbesondere GR-MDSC führte. Mäuse mit myHIF1 α -KO zeigten am siebten Lebenstag eine veränderte intestinale Immunzellkomposition im Sinne einer erhöhten Anzahl dendritischer Zellen, mononukleärer Zellen, T-Zellen und NK-Zellen und zeigten Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung intestinaler T-Zellen.

6.4 Schlussfolgerung

MDSC aus Nabelschnurblut scheinen durch die lange Zeit in Hypoxie an einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck adaptiert zu sein. Aus den hier durchgeführten Versuchen lässt sich nicht ableiten, dass der pO₂, der sich postnatal verändert, einen relevanten Einfluss auf die Funktion von MDSC hat.

In den *in vivo*-Versuchen zeigte sich, dass die Akkumulation von MDSC durch einen defekten HIF-1 α -Signalweg beeinträchtigt wurde und dass dies mit einer veränderten Immunzellkomposition und insbesondere mit einer vermehrten Aktivierung von T-Zellen im Darm der Jungtiere einherging. Die *in vivo*-Daten deuten darauf hin, dass HIF-1 α eine Bedeutung für die Regulation der Funktionen von MDSC beim Neugeborenen hat und dass MDSC die Immunreaktion im Rahmen der Etablierung des Mikrobioms beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

1. Cuenca, A.G., et al., *Role of innate immunity in neonatal infection*. Am J Perinatol, 2013. **30**(2): p. 105-12.
2. Kostlin-Gille, N., et al., *Epidemiology of Early and Late Onset Neonatal Sepsis in Very Low Birthweight Infants: Data From the German Neonatal Network*. Pediatr Infect Dis J, 2021. **40**(3): p. 255-259.
3. Born, S., et al., *Epidemiology of Sepsis Among Children and Neonates in Germany: Results From an Observational Study Based on Nationwide Diagnosis-Related Groups Data Between 2010 and 2016*. Crit Care Med, 2021. **49**(7): p. 1049-1057.
4. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ). *Modul NEO-KISS, Referenzdaten 2021 (Berechnungszeitraum: Januar 2017 bis Dezember 2021)*. Version vom 13.05.2022 [cited 22. September 2022]; Available from: https://www.nrz-hygiene.de/files/Referenzdaten/NEO/201701_202112_NEORef.pdf.
5. Tsafaras, G.P., P. Ntontsi, and G. Xanthou, *Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System*. Front Pediatr, 2020. **8**: p. 5.
6. Zhang, X., D. Zhivaki, and R. Lo-Man, *Unique aspects of the perinatal immune system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(8): p. 495-507.
7. Crockett, M., *Physiology of the neonatal immune system*. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 1995. **24**(7): p. 627-34.
8. Viemann, D., *S100-Alarmins Are Essential Pilots of Postnatal Innate Immune Adaptation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 688.
9. Kostlin-Gille, N. and C. Gille, *Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 584712.
10. Gritz, E.C. and V. Bhandari, *The human neonatal gut microbiome: a brief review*. Front Pediatr, 2015. **3**: p. 17.
11. Elahi, S., et al., *Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection*. Nature, 2013. **504**(7478): p. 158-62.
12. Fulde, M. and M.W. Hornef, *Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the postnatal period*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 21-34.
13. Renz, H., P. Brandtzaeg, and M. Hornef, *The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **12**(1): p. 9-23.
14. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
15. Bronte, V., et al., *Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12150.
16. Damuzzo, V., et al., *Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells*. Cytometry B Clin Cytom, 2015. **88**(2): p. 77-91.
17. Veglia, F., M. Perego, and D. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells coming of age*. Nat Immunol, 2018. **19**(2): p. 108-119.
18. Mandruzzato, S., et al., *Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(2): p. 161-9.
19. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.

20. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
21. Schrijver, I.T., C. Theroude, and T. Roger, *Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 327.
22. Solito, S., L. Pinton, and S. Mandruzzato, *In Brief: Myeloid-derived suppressor cells in cancer*. J Pathol, 2017. **242**(1): p. 7-9.
23. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(3): p. 237-45.
24. Rodriguez, P.C., et al., *Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21123-9.
25. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
26. Raber, P.L., et al., *Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways*. Int J Cancer, 2014. **134**(12): p. 2853-64.
27. Jayaraman, P., et al., *Tumor-expressed inducible nitric oxide synthase controls induction of functional myeloid-derived suppressor cells through modulation of vascular endothelial growth factor release*. J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5365-76.
28. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 989-99.
29. Otsuji, M., et al., *Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13119-24.
30. Ruan, W.S., et al., *Early Activation of Myeloid-Derived Suppressor Cells Participate in Sepsis-Induced Immune Suppression via PD-L1/PD-1 Axis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1299.
31. Noman, M.Z., et al., *PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 781-90.
32. Huang, A., et al., *Myeloid-derived suppressor cells regulate immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection through PD-1-induced IL-10*. J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5461-9.
33. Walk, J., et al., *Inhibitory receptor expression on neonatal immune cells*. Clin Exp Immunol, 2012. **169**(2): p. 164-71.
34. Kostlin, N., et al., *Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2582-91.
35. Schwarz, J., et al., *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period*. Clin Exp Immunol, 2018. **191**(3): p. 328-337.
36. Gervassi, A., et al., *Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107816.
37. Kang, X., et al., *CXCR2-Mediated Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells' Functional Characterization and Their Role in Maternal Fetal Interface*. DNA Cell Biol, 2016. **35**(7): p. 358-65.
38. Kostlin, N., et al., *Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype*. J Immunol, 2016. **196**(3): p. 1132-45.

39. Kang, X., et al., *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain fetomaternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4+CD25-T cells by activation of the TGF-beta/beta-catenin pathway*. Mol Hum Reprod, 2016. **22**(7): p. 499-511.
40. Pan, T., et al., *Myeloid-derived suppressor cells are essential for maintaining fetomaternal immunotolerance via STAT3 signaling in mice*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(3): p. 499-511.
41. Leiber, A., et al., *Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with Escherichia coli*. Eur J Immunol, 2017. **47**(6): p. 1009-1021.
42. He, Y.M., et al., *Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation*. Nat Med, 2018. **24**(2): p. 224-231.
43. Fluck, K., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis*. Mucosal Immunol, 2016. **9**(2): p. 379-90.
44. Hu, J., et al., *Hypoxia, a key factor in the immune microenvironment*. Biomed Pharmacother, 2022. **151**: p. 113068.
45. Kumar, V. and D.I. Gabrilovich, *Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment*. Immunology, 2014. **143**(4): p. 512-9.
46. Noman, M.Z., et al., *Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **309**(9): p. C569-79.
47. Semenza, G.L., *Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(1): p. 47-53.
48. Hellwig-Burgel, T., et al., *Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(6): p. 297-310.
49. Corzo, C.A., et al., *HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2439-53.
50. Dietz, S., et al., *Human Leucocyte Antigen G and Murine Qa-2 Are Critical for Myeloid Derived Suppressor Cell Expansion and Activation and for Successful Pregnancy Outcome*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 787468.
51. Doedens, A.L., et al., *Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7465-75.
52. Kostlin-Gille, N., et al., *HIF-1alpha-Deficiency in Myeloid Cells Leads to a Disturbed Accumulation of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) During Pregnancy and to an Increased Abortion Rate in Mice*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 161.
53. Finnemore, A. and A. Groves, *Physiology of the fetal and transitional circulation*. Semin Fetal Neonatal Med, 2015. **20**(4): p. 210-6.
54. Murphy, P.J., *The fetal circulation*. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, 2005. **5**(4): p. 107-112.
55. Morton, S.U. and D. Brodsky, *Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life*. Clin Perinatol, 2016. **43**(3): p. 395-407.
56. Graves, B.W. and M.M. Haley, *Newborn transition*. J Midwifery Womens Health, 2013. **58**(6): p. 662-70.
57. Rabi, Y., et al., *Oxygen saturation trends immediately after birth*. J Pediatr, 2006. **148**(5): p. 590-4.
58. Mukai, M., et al., *Tissue oxygen saturation levels from fetus to neonate*. J Obstet Gynaecol Res, 2017. **43**(5): p. 855-859.
59. Mariani, G., et al., *Pre-ductal and post-ductal O2 saturation in healthy term neonates after birth*. J Pediatr, 2007. **150**(4): p. 418-21.

60. Rieber, N., et al., *Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses*. Clin Exp Immunol, 2013. **174**(1): p. 45-52.
61. Roemer, V.M., [Outcome measures in perinatal medicine--pO₂ and SO₂. With remarks on pulse oximetry]. Z Geburtshilfe Neonatol, 2005. **209**(5): p. 173-85.
62. Kubota, K. and M. Makino, [Application and usefulness of flowcytometry in the haematology laboratory]. Rinsho Byori, 1991. **39**(2): p. 167-72.
63. Holmes, K.L., G. Otten, and W.M. Yokoyama, *Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACS Calibur*. Curr Protoc Immunol, 2002. **Chapter 5**: p. Unit 5 4.
64. Givan, A.L., *Flow cytometry: an introduction*. Methods Mol Biol, 2011. **699**: p. 1-29.
65. Yu, Y.R., et al., *A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150606.
66. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5 1 1-5 1 11.
67. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
68. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
69. Boyum, A., *Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review*. Lymphology, 1977. **10**(2): p. 71-6.
70. Jaatinen, T. and J. Laine, *Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **Chapter 2**: p. Unit 2A 1.
71. Plouffe, B.D., S.K. Murthy, and L.H. Lewis, *Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review*. Rep Prog Phys, 2015. **78**(1): p. 016601.
72. Demchenko, A.P., *Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis*. Cytotechnology, 2013. **65**(2): p. 157-72.
73. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
74. Darzynkiewicz, Z., E. Bedner, and P. Smolewski, *Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis*. Semin Hematol, 2001. **38**(2): p. 179-93.
75. Zembruski, N.C., et al., *7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry*. Anal Biochem, 2012. **429**(1): p. 79-81.
76. Lecoeur, H., L.M. de Oliveira-Pinto, and M.L. Gougeon, *Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay*. J Immunol Methods, 2002. **265**(1-2): p. 81-96.
77. Lecoeur, H., et al., *Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods*. J Immunol Methods, 1997. **209**(2): p. 111-23.
78. Sloan-Lancaster, J., et al., *Regulation of ZAP-70 intracellular localization: visualization with the green fluorescent protein*. J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1713-24.
79. Crow, J.P., *Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species*. Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 145-57.
80. Fulcher, D. and S. Wong, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(6): p. 559-64.

81. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 147-54.
82. Lyons, A.B., S.J. Blake, and K.V. Doherty, *Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes*. Curr Protoc Cytom, 2013. **Chapter 9**: p. Unit9 11.
83. Schwarz, J., et al., *HIF-1alpha targeted deletion in myeloid cells decreases MDSC accumulation and alters microbiome in neonatal mice*. Eur J Immunol, 2023. **53**(7): p. e2250144.
84. Hu, X., et al., *Deregulation of apoptotic factors Bcl-xL and Bax confers apoptotic resistance to myeloid-derived suppressor cells and contributes to their persistence in cancer*. J Biol Chem, 2013. **288**(26): p. 19103-15.
85. Chornoguz, O., et al., *Proteomic pathway analysis reveals inflammation increases myeloid-derived suppressor cell resistance to apoptosis*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(3): p. M110 002980.
86. Ostrand-Rosenberg, S., et al., *Regulating the suppressors: apoptosis and inflammation govern the survival of tumor-induced myeloid-derived suppressor cells (MDSC)*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(8): p. 1319-25.
87. Condamine, T., et al., *ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2626-39.
88. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1553-60.
89. Zhang, Y. and J. Zheng, *Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1248**: p. 201-226.
90. Rijkers, E.S., et al., *The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 1126-35.
91. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
92. Dyck, L. and K.H.G. Mills, *Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases*. Eur J Immunol, 2017. **47**(5): p. 765-779.
93. Schlegel, C., et al., *Decreased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) in cord blood monocytes under anoxia*. Pediatr Res, 2022.
94. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. Int Immunol, 2007. **19**(7): p. 813-24.
95. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
96. Loke, P. and J.P. Allison, *PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5336-41.
97. Liang, S.C., et al., *Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2706-16.
98. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
99. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. Am J Clin Oncol, 2016. **39**(1): p. 98-106.
100. Egen, J.G., M.S. Kuhns, and J.P. Allison, *CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 611-8.
101. Wright, G.J., et al., *Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3034-46.
102. Holmannova, D., et al., *CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2012. **55**(1): p. 12-7.

103. Choueiry, F., et al., *CD200 promotes immunosuppression in the pancreatic tumor microenvironment*. J Immunother Cancer, 2020. **8**(1).
104. Liu, J.Q., et al., *A Critical Role for CD200R Signaling in Limiting the Growth and Metastasis of CD200+ Melanoma*. J Immunol, 2016. **197**(4): p. 1489-97.
105. Shipp, C., et al., *A clinical and biological perspective of human myeloid-derived suppressor cells in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(21): p. 4043-61.
106. Kostlin, N., et al., *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype*. Immunology, 2017. **152**(1): p. 89-101.
107. Corzo, C.A., et al., *Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5693-701.
108. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
109. Liu, Y., et al., *Lactoferrin-induced myeloid-derived suppressor cell therapy attenuates pathologic inflammatory conditions in newborn mice*. J Clin Invest, 2019. **129**(10): p. 4261-4275.
110. Chiu, D.K., et al., *Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 517.
111. Salman, S., et al., *HIF inhibitor 32-134D eradicates murine hepatocellular carcinoma in combination with anti-PD1 therapy*. J Clin Invest, 2022. **132**(9).
112. Webster, W.S. and D. Abela, *The effect of hypoxia in development*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2007. **81**(3): p. 215-28.
113. Greijer, A.E. and E. van der Wall, *The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis*. J Clin Pathol, 2004. **57**(10): p. 1009-14.
114. Zheng, L., C.J. Kelly, and S.P. Colgan, *Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **309**(6): p. C350-60.
115. Kim, Y.E., et al., *HIF-1alpha activation in myeloid cells accelerates dextran sodium sulfate-induced colitis progression in mice*. Dis Model Mech, 2018. **11**(7).
116. Lin, N., et al., *Myeloid Cell Hypoxia-Inducible Factors Promote Resolution of Inflammation in Experimental Colitis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2565.
117. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. Science, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
118. Atarashi, K., et al., *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*. Nature, 2013. **500**(7461): p. 232-6.
119. Russell, S.L., et al., *Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma*. EMBO Rep, 2012. **13**(5): p. 440-7.
120. Hoechst, B., et al., *A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 234-43.
121. Peyssonnaud, C., et al., *Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7516-9.

8 Veröffentlichung

Publizierter Artikel im Rahmen dieser Dissertation:

Schwarz, J., Rühle, J., Stephan, K., Dietz, S., Geißert, J., Schoppmeier, U., Frick, J.S., Hudalla, H., Lajqi, T., Poets, C.F., Gille, C. und Köstlin-Gille, N., HIF-1 α targeted deletion in myeloid cells decreases MDSC accumulation and alters microbiome in neonatal mice. Eur. J. Immunol., 2023.

9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Abteilung Kinderheilkunde IV (Neonatologie und neonatologische Intensivmedizin) der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin unter der Betreuung von PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille (Doktormutter) durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille, Prof. Dr. med. Christian Gille und Dr. med. Julian Schwarz (Betreuer).

Sämtliche *in vitro*-Versuche wurden nach der Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. rer. nat. Bärbel Spring, Dr. med. Julian Schwarz und Dr. rer. nat. Stefanie Dietz von mir eigenständig durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Die *in vivo*-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Julian Schwarz, Dr. rer. nat. Stefanie Dietz und Jessica Rühle durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung von Dr. med. Julian Schwarz und PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 05.01.2023

Kevin Luca Stephan
(Doktorand)

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille. Die hervorragende Betreuung, die ausgesprochen gute Kommunikation und die vertrauensvolle Zusammenarbeit weiß ich sehr zu schätzen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. med. Christian Gille, der mich durch seine Art und seine beeindruckende medizinische Kompetenz zu dieser wissenschaftlichen Arbeit ursprünglich motivierte.

Für die exzellente Betreuung möchte ich mich in besonderem Maße bei Dr. med. Julian Schwarz bedanken. Seine Unterstützung und Motivation erleichterte mir die Fertigstellung dieser Forschungsarbeit enorm.

Prof. Dr. med. Christian Poets danke ich für die Annahme als Doktorand.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die familiäre Arbeitsatmosphäre. Besonders Dr. rer. nat. Stefanie Dietz konnte mir jegliche Fragen kompetent beantworten und hatte auch sonst stets ein offenes Ohr. Dr. rer. nat. Bärbel Spring danke ich für die ausführliche und geduldige Einweisung in die Laborarbeit.

Dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) danke ich für die großzügige finanzielle Unterstützung des Forschungsprojektes.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der Mitarbeiterschaft der Neonatologie und der Geburtshilfe für die Bereitstellung von Nabelschnurblut sowie bei allen Eltern für die Teilnahme an unserer Studie, wodurch diese Arbeit erst ermöglicht wurde.

Von Herzen danke ich außerdem meiner Freundin Pauline Hinrichs, die mich durch sämtliche Höhen und Tiefen der letzten Jahre begleitet hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Margit Stephan und Karlheinz Spenny. Ich danke euch für das entgegengebrachte Vertrauen, den Zuspruch und die Unterstützung in jeglicher Hinsicht auf diesem langen Weg. Ihr habt mich zu dem gemacht, was ich heute bin.