

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde  
und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde IV  
Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin**

**Der postpartal steigende Sauerstoffpartialdruck hemmt  
myeloide Supressorzellen (MDSC) und reguliert die  
Immunadaptation des Neugeborenen**

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

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

**vorgelegt von**

**Spieles, Helen**

**2018**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Gille

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Henes

Tag der Disputation: 14.11.2018

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Das fetale Immunsystem und postpartale Adaptation .....	6
1.2	MDSC und ihre Funktion .....	8
1.3	Hypoxie als beeinflussender Faktor.....	9
1.4	Hypoxia inducible transcription factor – 1 .....	10
1.5	Effektorenzyme der Gr-MDSC und ihre Signalwege .....	12
1.5.1	Signalweg der iNOS.....	12
1.6	Ziel der Arbeit.....	12
2	Material.....	13
2.1	Zellen.....	13
2.2	Materialien biologischen Ursprungs.....	14
2.3	Materialien nicht biologischen Ursprungs .....	14
2.4	Antikörper für die Durchflusszytometrie und MACS.....	15
2.5	Glas- und Plastikmaterialien.....	16
2.6	Geräte .....	16
3	Methoden .....	17
3.1	Gewinnung mononukleärer Zellen.....	17
3.2	Zellzahlbestimmung.....	18
3.3	Gr-MDSC-Separation durch magnetic cell sorting (MACS).....	18
3.4	Quantifizierung der Gr-MDSC.....	19
3.5	Zellkultur.....	19
3.5.1	Zellkultur zur Bestimmung der Enzymproduktion.....	19
3.5.2	Zellkultur mit Desferrioxamin.....	20
3.5.3	Zellkultur zur Bestimmung der T-Zell-Proliferationsrate .....	20
3.6	Durchflusszytometrie .....	22
3.7	Phänotypisierung der Zellen .....	22
3.8	Bestimmung der Effektorenzyme Arginase-1 und iNOS.....	23
3.9	Datenaufbereitung und statistische Auswertung .....	23
4	Ergebnisse .....	24
4.1	Quantitative und Phänotypische Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Gr-MDSC.....	24
4.2	Vermehrte Expression der Effektorenzyme Arginase-1 und iNOS unter hypoxischen Bedingungen .....	27
4.3	Effekt von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation.....	31
5	Diskussion .....	38
5.1	Quantitative und Phänotypische Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Gr-MDSC.....	38
5.2	Vermehrte Expression der Effektorenzyme Arginase-1 und iNOS unter hypoxischen Bedingungen .....	40
5.3	Effekt von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation.....	41
5.4	Einfluss von Hypoxie auf die T-Zell-Hemmung.....	43

5.5	Diskussion der Methoden .....	44
5.6	Schlussfolgerung .....	45
6	Zusammenfassung .....	47
7	Literaturverzeichnis .....	49
8	Anhang .....	61
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	61
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	63
8.3	Tabellenverzeichnis .....	64
8.4	Danksagung .....	65
8.5	Lebenslauf .....	66
9	Erklärung zum Eigenanteil.....	68
10	Veröffentlichungen.....	69

# 1 Einleitung

## 1.1 *Das fetale Immunsystem und postpartale Adaptation*

Neonatale bakterielle Infektionen sind eine der Hauptursachen für neonatale Morbidität und Mortalität. Sie verlaufen meist systemisch in Form einer Sepsis. Während des Aufenthalts auf der neonatologischen Intensivstation entwickelt fast jedes dritte Frühgeborene eine Sepsis. Frühgeborene sind damit deutlich häufiger betroffen als Reifgeborene. Während bei früher und adäquater Therapie die Infekt-assoziierte Sterblichkeit bei Neugeborenen deutlich gesenkt werden konnte, stellen inflammatorische Folgeerkrankungen, wie die Periventrikuläre Leukomalazie (PVL) und die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) eine der Hauptrisikofaktoren für perinatale Morbidität dar. (Bose 2011, Leviton 2005, Stoll 2004, Vignesswaran 2000, Watterberg 1996)

Die fetale Inflamationsreaktion intrauterin unterscheidet sich von der des Neugeborenen postpartal. Zu Gunsten des Schwangerschaftserhaltes sind proinflammatorische Prozesse abgeschwächt.

Die geringere proinflammatorische Potenz des fetalen Immunsystems und dadurch bedingte Infektanfälligkeit des Feten wird im Wesentlichen auf den intrauterin veränderten Funktionszustand des Immunsystems zurückgeführt (Murthy et al. 2007, Gotsch et al. 2007, Schulz et al. 2004, Hunt et al. 1994) und als „physiologische Unreife“ des Immunsystems zum Schutz vor einer Abstoßungsreaktion gegenüber dem semiallogenen mütterlichen Organismus gesehen (Levy O, 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die diese „Dämpfung“ des fetalen Immunsystems bedingen, sind jedoch weitestgehend unklar, ebenso sind die Mechanismen, welche eine fetomaternal Toleranz ermöglichen noch nicht vollständig verstanden (Chaouat et al. 2010).

Auch unklar ist, welche Rolle der intrauterin physiologisch sehr niedrige Sauerstoffpartialdruck bei der Modulation des fetalen Immunsystems spielt und wie sich die peripartale Adaptation von hypoxischen an normoxische Bedingungen auf die Entwicklung der adulten Immunfunktion auswirkt.

Am Besten untersucht, wurde die Funktion von T-Zellen in Zusammenhang mit der fetomaternalen Toleranz. Hier fanden insbesondere die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen Beachtung (Raghupathy et al. 2001, Saito et al. 2010). In vielen vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass es im Rahmen einer Schwangerschaft zu einer Verschiebung, des Zytokin-Profiles der T-Zellen, zu Gunsten der Th2 Zellen kommt. Dies wird als wesentlicher Mechanismus für die fetomaternale Toleranz angesehen (Liu et al. 2011, Piao et al. 2012, Raghupathy et al. 2001, Saito et al. 2010). Auch beim Neugeborenen wurde dieser Shift zu Gunsten der Th2 Zellen beschrieben (Adkins et al. 2000, Chen/Field 1995, Forsthuber et al. 1996, Min et al. 2000) Jin et al. zeigten 2011, dass eine Verschiebung zu Gunsten der TH1 Zellen zu einer erhöhten Fehlgeburtsrate führte.

## **1.2 MDSC und ihre Funktion**

Myeloid derived suppressor cells, (MDSC), sind eine heterogene Gruppe aus dem Knochenmark stammender Zellen, (unreife Makrophagen, unreife Granulozyten und unreife dendritische Zellen), welche sich durch Hemmung der Funktion anderer Immunzellen, besonders von T-Zellen auszeichnen (Gabrilovic, Nagaraj 2009). Bisher konnten zwei Subtypen von MDSC beschrieben werden, granulozytäre und monozytäre MDSC. Granulozytäre MDSC (Gr-MDSC) werden durch die Expression von CD 66b, CD11b und CD15 charakterisiert, monozytäre MDSC (Mo-MDSC) durch die Expression von CD14. In beiden Populationen zeigte sich eine geringe Expression des humanen Leukozytenantigens (HLA-DR) (Brandau et al. 2011, Duffy et al. 2013, Greten et al. 2011, Rodriguez et al. 2009). Für die experimentelle Arbeit ist entscheidend, dass granulozytäre MDSC eine geringere Dichte aufweisen als reife Granulozyten, da beide Zelltypen CD66b exprimieren und bisher phänotypisch nicht unterschieden werden können. Graulozytäre MDSC sind in einer Dichtegradientenzentrifugation daher in der Fraktion der mononukleären Zellen zu finden und damit von reifen Granulozyten zu trennen (Brandau et al. 2011, Rieber/Gille et al. 2013).

Erstmals wurden Gr-MDSC bei Tumorpatienten entdeckt. Hier scheinen sie die Tumorprogression zu begünstigen, in dem sie die Immunantwort gegen das Tumorgewebe hemmen (Brandau et al. 2011, Gabitass et al. 2011, Lechner et al. 2011). Nachfolgend wurde auch bei anderen pathologischen Bedingungen wie Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Trauma eine Vermehrung von Gr-MDSC beschrieben. Auch nach Einbringen eines allogenen Transplantats wurde eine Akkumulation von Gr-MDSC beschrieben, welche zu einer geringer ausgeprägten Graft-versus-Host-Reaktion führten (Dugast et al. 2008, Highfill et al. 2010, Zhang et al. 2008). In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass granulozytäre MDSC auch im peripheren Blut gesunder Schwangerer vermehrt nachweisbar sind und Funktionen der T-Zellen und von natürlichen Killerzellen beeinflussen (Köstlin et al. 2014, Rieber/Gille et al. 2013). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Gr-MDSC neben ihrem Einfluss in pathologischen Prozessen, eine Rolle beim Erhalt der fetomaternalen Toleranz spielen könnten.

Inzwischen sind mehrere Mechanismen untersucht, durch die Gr-MDSC das Immunsystem supprimieren können. Über den Metabolismus der Aminosäuren Arginin und Cystein, die Expression von Oberflächenmolekülen sowie einer Hochregulation von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) (Bronte/Zanovello 2005, Corzo et al. 2009, Gabrilovic/Nagaraj 2009, Kusmartsev et al. 2004, Nagaraj et al. 2011). In der Tumorumgebung sind die Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Es wird angenommen, dass die tumorassoziierte Hypoxie die Funktionalität der Gr-MDSC beeinflusst. Die intrauterine Hypoxie des Feten, die mit einem nabelarteriellen pO<sub>2</sub> von 10-35 mmHG den typischen Verhältnissen in entzündetem Gewebe entspricht, könnte ebenfalls eine erhöhte Aktivität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gr-MDSC bedingen und so zur physiologischen Hemmung des Immunsystems in der Schwangerschaft zu Gunsten der fetomaternalen Toleranz beitragen. Ausgehend von dieser Hypothese könnte der postpartal steigende Sauerstoffpartialdruck das entscheidende Signal zur Adaptation des fetalen zum neonatalen Immunsystem darstellen, indem er zu einer funktionellen Hemmung, sowie zu einer verminderten Akkumulation der Gr-MDSC im kindlichen Organismus führt.

### ***1.3 Hypoxie als beeinflussender Faktor***

Der Funktionszustand des Immunsystems hängt wesentlich von den Gegebenheiten in den Geweben ab (Matzinger 2001, 2002). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Verhältnissen in utero und postnatal ist der intrauterin geringere Sauerstoffpartialdruck (Roemer 2007, Webster 2007), der während der perinatalen Adaptation schnell ansteigt.

Der normale Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) in Geweben des Erwachsenen beträgt ca. 80-95 mmHg. Der nabelarterielle pO<sub>2</sub> des Feten hingegen beträgt nur ca. 10-35 mmHg (Roemer 2007, Webster 2007) und entspricht damit Verhältnissen, wie sie typisch für entzündete Gewebe sind, in denen eine schlechte Perfusion und ein erhöhter Sauerstoffverbrauch herrschen (Peyssonnaud et al. 2004). Die Hypoxie stellt dabei für Immunzellen des Erwachsenen ein Aktivierungssignal dar.

Die einzigen bisher verfügbaren Daten zum Einfluss von Hypoxie auf fetale Immunzellen zeigten, dass sich fetale neutrophile Granulozyten in vitro durch ein

hypoxisches Milieu im Vergleich zu Zellen von Erwachsenen weniger stimulieren lassen, gemessen an der Herabregulation von L-Selektin. Hyperoxie dagegen führte zu einer starken Aktivierung fetaler neutrophiler Granulozyten (Hoehn et al. 2001). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Immunzellen des Feten und Neugeborenen an das intrauterin physiologisch hypoxische Milieu adaptiert sind und postpartal möglicherweise eine von Immunzellen des Erwachsenen unterschiedliche Reaktion zeigen.

#### **1.4 Hypoxia inducible transcription factor – 1**

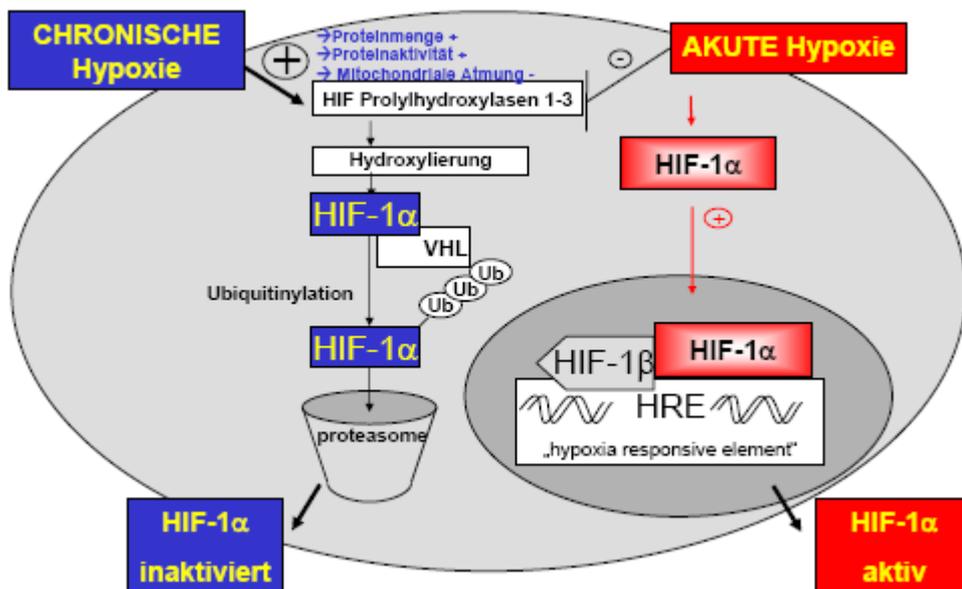
Die Reaktion von Immunzellen auf Hypoxie wird vor Allem durch die Induktion des hypoxia inducible transcription factor-1 (HIF-1) vermittelt (Semenza 2001, Peyssonnaud et al. 2007, Zarembek et al. 2005), der auch in Immunzellen wie Monozyten exprimiert wird (Burke et al. 2002). Es handelt sich um ein Heterodimer aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit (HIF-1 $\beta$ ) und einer Sauerstoffsensitiven  $\alpha$ -Untereinheit (HIF-1 $\alpha$ ) (Walmsley 2007). HIF-1 $\alpha$  wird zwar ständig exprimiert, unter normoxischen Bedingungen jedoch kontinuierlich abgebaut.

HIF-1 $\alpha$  wird hierbei durch Prolylhydroxylasen 1-3 (PHD), v.a. PHD2, in einer sauerstoffabhängigen Reaktion hydroxyliert. Dadurch kann sich der von Hippel-Lindau Faktor (VHL) anlagern, der nach Interaktion mit mindestens zwei weiteren Faktoren (Elongin C und E3 ubiquitin-protein ligase) zum Abbau von HIF-1 $\alpha$  im 26S Proteasom führt.

HIF-1 $\alpha$  kann aber auch durch factor inhibiting HIF 1 (FIH-1), eine Asparaginyhydroxylase hydroxyliert werden. Dies führt dazu, dass verschiedene Kofaktoren (p300, CBP) nicht mehr interagieren können und HIF-1 nicht als Transkriptionsfaktor funktionieren kann (Semenza 2007).

Unter hypoxischen Bedingungen ist die Aktivität der PHD und von FIH-1 vermindert. HIF-1 $\alpha$  kumuliert, kann mit der  $\beta$ -Untereinheit dimerisieren und im Zellkern als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen aktivieren (Abbildung 1, rechts).

Unter chronisch hypoxischen Bedingungen, wie sie auch beim Fet in utero vorherrschen, wird HIF-1 $\alpha$  allerdings wieder abgebaut. Dabei spielt vor allem eine Aktivitätssteigerung aller drei bekannten PHDs eine Rolle. Auch der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wird zu Gunsten der Aktivität der PHDs gehemmt (Ginouvès A 2008, Abbildung 1, links).



**Abbildung 1: Regulation von hypoxia-inducible factor - 1  $\alpha$**

Schematische Darstellung der Regulation von HIF-1 $\alpha$  unter akuter und chronischer Hypoxie. Die Abbildung wurde durch PD Dr. Gille erstellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## **1.5 Effektorenzyme der Gr-MDSC und ihre Signalwege**

Gr-MDSC sezernieren, wenn sie aktiviert werden, Arginase-1 und induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Hierbei handelt es sich um Enzyme, welche direkt an der T-Zell-Suppression beteiligt sind und keinen antigenspezifischen Kontakt zwischen den Gr-MDSC und den T-Zellen benötigen. Somit kommt es zu einer unspezifischen Hemmung der T-Zell-Funktion (verminderte Interferon- $\gamma$ -Produktion und Proliferationsstopp). Dies wurde bisher vor allem in Tumorgewebe mit hypoxischer Umgebung beobachtet (Corzo et al. 2007, Gabrilovich/Nagaraj 2009, Ochoa et al. 2007, Rodriguez et al. 2009).

### **1.5.1 Signalweg der iNOS**

Dieses Enzym wird vor allem in Makrophagen und Mikrogliazellen gebildet. Induziert wird die Bildung zum Einen durch Bakterientoxine und zum Anderen durch proinflammatorische Zytokine, wie Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$ . Es katalysiert die Bildung von Stickstoffmonooxid aus L-Arginin. Wie auch die Arginase-1 entzieht iNOS der Umgebung L-Arginin und hemmt somit wie schon oben beschrieben die T-Zell-Funktion.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Gr-MDSC im Nabelschnurblut quantitativ und phänotypisch zu erfassen und Unterschiede zu Gr-MDSC, die aus Blutproben gesunder Erwachsener isoliert wurden, festzustellen. Weiterhin sollte die Enzymproduktion durch Gr-MDSC und deren Einfluss auf die T-Zell-Funktion in Hypoxie und Normoxie untersucht werden, um Erkenntnisse über die Regulation des fetalen Immunsystems zu gewinnen.

Es sollten die Hypothesen überprüft werden, dass (1) im Nabelschnurblut mehr Gr-MDSC zirkulieren als im peripheren Blut gesunder Erwachsener, (2) phänotypische Unterschiede zwischen Gr-MDSC aus Nabelschnurblut und Gr-MDSC aus dem Blut gesunder Erwachsener bestehen, (3) Gr-MDSC aus Nabelschnurblut unter hypoxischen Bedingungen vermehrt Arginase-1 und iNOS exprimieren, (4) Gr-MDSC

aus Nabelschnurblut unter hypoxischen Bedingungen die T-Zell-Proliferation stärker hemmen. Hierzu wurden die Zellen aus Nabelschnurblut und peripherem Blut erwachsener Spender isoliert und anschließend durchflusszytometrisch phänotypisiert, quantifiziert und die oben genannten funktionellen Parameter untersucht.

## **2 Material**

### **2.1 Zellen**

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden aus peripherem Venenblut Erwachsener und dem Nabelschnurblut reifer Neugeborener gewonnen. Als Spender wurden gesunde Erwachsene ausgewählt, die keinen Hinweis auf eine akute Infektion zeigten und nicht chronisch erkrankt waren. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet ein möglichst einheitliches Kollektiv zu bilden. Die Nabelschnurblutentnahme erfolgte durch sterile Punktion der Nabelschnur bei reifen Neugeborenen ohne Anhalt für pränatal erworbene Infektionen. Die schriftliche Einwilligung der Mutter und die Zustimmung der Ethikkommission wurden zuvor eingeholt. (Ethikvotum Nr. 178/2011BO1)

## **2.2 Materialien biologischen Ursprungs**

Bovines Serum Albumin (BSA), lyophilisiert	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Polyglobin (10%)	Bayer, Leverkusen

## **2.3 Materialien nicht biologischen Ursprungs**

Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077)	Biochrom, Berlin
Desferrioxamin (DFO)	Universitätsapotheke Tübingen
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
Heparin-Natrium (5000 I.E./0,5ml)	B. Braun, Melsungen
Interleukin-2	RD Systems
MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
NaCl 0,9%	Fresenius, Bad Homburg
OKT3	Biolegend, San Diego
PBS-Dulbecco (Salzlösung, Phosphatgepuffert)	Biochrom, Berlin
Running Buffer	Universitätsapotheke Tübingen
Tryphanblau	Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium (Very Low Endotoxin)	Biochrom, Berlin

## **2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie und MACS**

Bezogen wurden die Antikörper über Becton Dickinson, Heidelberg. Ausnahmen werden gesondert ausgewiesen.

### Allophycocyanin markiert (APC)

CD 14

### Cyanin markiert (Cy-5)

HLA-DR

CD 33

### DY-485XL markiert

Arginase-1

Dyomics, Jena

Isotypkontrolle

Dyomics, Jena

### Fluorescein-Isothiocyanat markiert (FITC)

CD 66b

CD66b MicroBeads

MiltenyiBiotech,  
Bergisch Gladbach

Carboxyfluorescein dacetat succinimidyl ester (CFSE)

BioLegend, San Diego  
USA

### Phycoerythrin markiert (PE)

CD 14

### Alexafluor markiert

iNOS

Biotechnology, Santa  
Cruz

## **2.5 Glas- und Plastikmaterialien**

Butterfly-21 Venisystems	Abbott, Sligo
Einmalpipetten (5, 10, 25, 45 ml)	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten (24, 48, 96 well)	Costar, Bodenheim
MS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Transferpipette (8-Kanal)	Brand, Wertheim

## **2.6 Geräte**

Brutschrank mit 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments, Stuttgart
Cell Quest Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluorescence activated cell sorter (FACScan)	Becton Dickinson, Heidelberg
Hypoxiewerkbank Invivo 200	Ruskin, England
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
AutoMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld

Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Sterilbank	Heraeus Instruments, Stuttgart
Sysmex Kx-21N und XP-300	Sysmex GmbH, Norderstedt
Vortex	Bender & Hobein AG, USA
Zentrifuge Rotana 46 RS	Hettich, Tuttlingen

### 3 Methoden

#### 3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener und aus Nabelschnurblut isoliert. Das Protokoll folgte dabei der Ficoll-Methode (Böyum 1968). Hierzu wurden jeweils 50 ml Blut benötigt. Sowohl das Vollblut als auch das Nabelschnurblut, welches unmittelbar nach der Abnabelung aus der Nabelschnur entnommen wurde, wurden zur Antikoagulation mit Heparin versetzt.

Die Proben wurden 1:1 mit PBS verdünnt und in 50 ml Falcon-Röhrchen auf 15 ml Trennlösung (Biocoll) geschichtet und bei 400g und 20°C 25 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert.

Der sichtbare Zellring aus mononukleären Zellen wurde mit einer 10 ml Einmalpipette vorsichtig abgesaugt und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde mit ca. 40 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 500g über 10 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das am Boden haftende Zellpellet resuspendiert und erneut mit 20 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 400g über 10 Minuten bei 10°C und 4°C), nachdem eine Probe zur Zellzahlbestimmung am Hämozytometer entnommen wurde (100 µl).

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen entweder in RPMI mit Zusatz von 10% FCS aufgenommen, so dass sich eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml ergab, oder mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in Running Buffer aufgenommen, um Gr-MDSC daraus isolieren zu können. Die Isolation der Zellen erfolgte unter Verwendung einer

Sterilbank. Bei den Versuchen in hypoxischer Umgebung wurde das Nabelschnurblut schon unter hypoxischen Bedingungen (unmittelbar nach der Abnabelung mittels Punktion der Nabelvenen und direktem Verschluss der Probe mittels Parafilm) aus der Nabelvene entnommen und anschließend unter der Hypoxiewerkbank aufbereitet. Das Blut der erwachsenen Spender wurde ebenfalls hypoxisch aufbereitet.

### **3.2 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung während der Aufreinigung mononukleärer Zellen erfolgte mit Hilfe eines automatischen Hämocytometers. Bei Aufreinigung in Hypoxie und nach Zellsortierung mittels AutoMACS erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer. Nach Färbung der Zellen mit Tryphanblau wurden die Zellen in 16 Quadranten gezählt und daraus die Zellzahl pro ml errechnet: Zellzahl x Verdünnungsfaktor  $2 \times 10^4$  = Zellzahl/ml.

### **3.3 Gr-MDSC-Separation durch magnetic cell sorting (MACS)**

Zur magnetischen Zellseparation müssen die Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper (MicroBeads) sind an Eisenmoleküle mit einer Hülle aus Polysacchariden gebunden. Nach Markierung können die Zellen dann anhand ihrer Oberflächenstruktur sortiert werden (Miltenyi et al. 1990). Die Zellen werden auf eine Separationssäule gegeben, welche in einem starken Magnetfeld befestigt ist. Die nicht markierten Zellen werden beim Spülen der Säule nicht zurückgehalten und laufen in ein Falcon-Röhrchen ab, während die markierten Zellen im Magnetfeld haften bleiben. Nach der Spülung wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen können eluiert werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Methode der Positivselektion gearbeitet, weshalb auch nur diese beschrieben wird.

Zur Isolation der Gr-MDSC wurde ein durch Bindung eines MicroBeads gekoppelter Antikörper gegen CD66b (FITC) verwendet.

CD66b gilt als spezifischer Oberflächenmarker für granulozytäre Zellen. Die geringere Dichte von Gr-MDSC im Vergleich zu Granulozyten macht es möglich, Gr-

MDSC aus der mononukleären Zellfraktion nach Dichtegradientenzentrifugation getrennt von reifen Granulozyten zu isolieren.

Die einzelnen Arbeitsschritte zur Markierung der Zellen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden mit 4°C kalten Agenzien und auf Eis durchgeführt.

Zunächst wurden die über Biocoll-Separation gewonnenen Zellen mit Anti-CD66b-FITC Antikörpern gefärbt. Hierzu wurden 10µl des Antikörpers je 10<sup>7</sup> Zellen zugegeben und über 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch Zugabe von kaltem Running Buffer im Überschuss und Zentrifugation bei 300g über 10 Minuten ausgewaschen. Der Überstand wurde nach Zentrifugation verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 90µl Running Buffer resuspendiert und zusammen mit 10µl Anti-CD66b-FITC MicroBeads je 10<sup>7</sup> Zellen nochmals für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen dann in 500µl Running Buffer aufgenommen und auf Eis zum AutoMACS im Chimärismuslabor der Kinderklinik Tübingen transportiert und dort sortiert.

Eine Reinheitskontrolle wurde durchflusszytometrisch über eine Phänotypisierung mit dem CD66b Oberflächenmarker durchgeführt. Die Reinheit betrug zwischen 78 und 97%.

### **3.4 Quantifizierung der Gr-MDSC**

Zur Quantifizierung der Gr-MDSC wurde der prozentuale Anteil der CD66b positiven Zellen vor der Zellkultur aus der wie in 3.1 gewonnenen monozytären Zellfraktion durchflusszytometrisch bestimmt. Dies wurde sowohl für die aus Nabelschnur gewonnenen Zellen, als auch für die aus dem Blut gesunder Erwachsener durchgeführt.

### **3.5 Zellkultur**

#### **3.5.1 Zellkultur zur Bestimmung der Enzymproduktion**

Zur Bestimmung der Enzymproduktion wurden 6 Proben mit jeweils 1ml Zellsuspension in 24 well Mikrotiterplatten eingesetzt. Als Nährmedium diente RPMI-1640 dem 10% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurde.

Eine Platte mit 3 Proben wurde bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, während die Andere bei 37°C und 2% O<sub>2</sub> kultiviert wurde.

Die Probenentnahme erfolgte nach 48 Stunden.

### **3.5.2 Zellkultur mit Desferrioxamin**

Zur Überprüfung des Einflusses von Hypoxie auf die Enzymproduktion der Gr-MDSC wurden einige Versuche mit Desferrioxamin durchgeführt. Desferrioxamin (DFO) ist ein Eisenchelator, der HIF-1 $\alpha$  stabilisiert. Die Prolylhydroxylasen, welche die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF in Normoxie degradieren arbeiten eisenabhängig. Wird ihnen das Eisen nun durch DFO entzogen, kann HIF-1 $\alpha$  nicht mehr dem Abbau im Proteasom zugeführt werden und der Proteinlevel im Zytoplasma steigt an. Im Kern kann nun also, wie auch unter hypoxischen Bedingungen, der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 ans hypoxia responsive element (HRE) binden und zur Transkription hypoxie-induzierbarer Gene führen.

Die Zellen wurden in 24 well Mikrotiterplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. 5 $\mu$ l DFO wurden hinzugefügt. Die Probenentnahme fand nach 3 Stunden statt.

### **3.5.3 Zellkultur zur Bestimmung der T-Zell-Proliferationsrate**

Die T-Zell-Proliferationsrate wurde mit Hilfe eines T-Zell-Proliferations-Assays nach Lyons und Parish (1994) bestimmt.

Zur Bestimmung der T-Zell-Proliferationsrate wurden 120 $\mu$ l einer monozytären Zellsuspension in der sich  $5 \times 10^5$  Zellen/ml befanden in 96 well Mikrotiterplatten eingesetzt. Diese wurden zunächst mit Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester (CFSE) markiert. Hierzu wurden 10 $\mu$ l einer 100 $\mu$ M Lösung CFSE in der Zellsuspension gelöst und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Zugabe von RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum im Überschuss und Zentrifugation bei 300g über 10 Minuten zweifach abgewaschen.

Der Einbau des Farbstoffs in die Zellen wurde über eine erneute Zellzählung verifiziert, da bei diesem Vorgang einige Zellen absterben.

Durch die Markierung mit CFSE kann nach 96-stündiger Zellkultur die T-Zellproliferation bestimmt werden, da der Farbstoff auch auf die entstandenen

Tochterzellen übergeht und somit einzelne Generationen im Durchflusszytometer sichtbar werden. Um die T-Zell-Proliferation zu stimulieren wurden OKT3 und Interleukin 2 in die Zellsuspension gegeben.

Um den Einfluss von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation zu bestimmen wurden den CFSE markierten Zellen aufgereinigte Gr-MDSC in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Neben Versuchsansätzen innerhalb eines biologischen Systems wurden auch Gr-MDSC aus Erwachsenenblut (PBMC) zu Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC) gegeben und Gr-MDSC aus Nabelschnurblut zu Zellen aus Erwachsenenblut. Die einzelnen Versuchsansätze zeigt die folgende Tabelle.

Zellmischung	Verhältnis 1	Verhältnis 2	Verhältnis 3
PBMC / Gr-MDSC aus PBMC	1:1 ( $6 \times 10^5 / 6 \times 10^5$ )	2:1 ( $6 \times 10^5 / 3 \times 10^5$ )	6:1 ( $6 \times 10^5 / 1 \times 10^5$ )
PBMC / Gr-MDSC aus NSB	1:1 ( $6 \times 10^5 / 6 \times 10^5$ )	2:1 ( $6 \times 10^5 / 3 \times 10^5$ )	6:1 ( $6 \times 10^5 / 1 \times 10^5$ )
NSB / Gr-MDSC aus NSB	1:1 ( $6 \times 10^5 / 6 \times 10^5$ )	2:1 ( $6 \times 10^5 / 3 \times 10^5$ )	6:1 ( $6 \times 10^5 / 1 \times 10^5$ )
NSB / Gr-MDSC aus PBMC	1:1 ( $6 \times 10^5 / 6 \times 10^5$ )	2:1 ( $6 \times 10^5 / 3 \times 10^5$ )	6:1 ( $6 \times 10^5 / 1 \times 10^5$ )

Die einzelnen Proben wurden in einem Vollmedium bestehend aus RPMI, 1% Penstrep, 1% L-Glutamin und 10% Serum des erwachsenen Blutspenders kultiviert. Die Gesamtmenge pro well betrug 180µl.

Eine Platte wurde unter normoxischen Bedingungen (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) die Andere unter hypoxischen Bedingungen (37°C und 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 93% N<sub>2</sub>) kultiviert. Nach 96 Stunden erfolgte die Probenentnahme. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die wells der Platte ohne Zellsuspension mit Ampuwa-Lösung bestückt.

### **3.6 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und der Expression angefarbter Antigene auf Ihrer Oberfläche (Volk 1991).

Zur Messung wurde ein FACScan aus dem Hause Becton Dickinson Heidelberg verwendet. Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe der Cell Quest Research Software, ebenfalls von Becton Dickinson, aufgezeichnet und bearbeitet.

### **3.7 Phänotypisierung der Zellen**

Zur Quantifizierung und phänotypischen Bestimmung der Zellen wurden bei den nach Biocoll-Separation gewonnenen mononukleären Zellen verschiedene Oberflächenantigene mit Fluoreszenzfarbstoffen angefarbt. Es wurden 50µl Zellsuspension aus den Kulturplatten entnommen und in 96-well-Platten überführt, so dass sich eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen ergab. Nach Zugabe der Antikörper (siehe nachfolgende Tabelle) erfolgte die Inkubation über 15 Minuten im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 100µl Puffer und ein weiteres Mal mit 200µl Puffer gewaschen.

Nach Überführen mit 200µl Puffer in FACS-Röhrchen erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung.

Probenansatz	Menge Antikörper
Anti-CD66b	1µl
Anti-HLA-DR	5µl nach 1:10 Verdünnung
Anti-CD33	2µl
Anti-CD14	1µl

So konnte zum einen der Anteil an CD66b positiven Zellen, also Gr-MDSC, bestimmt werden und gleichzeitig der Immunphänotyp der Zellen untersucht werden.

### **3.8 Bestimmung der Effektorenzyme Arginase-1 und iNOS**

Die Effektorenzyme wurden an Tag 0 und nach 48 Stunden in Zellkultur, wie in 3.5.1, beschrieben ermittelt. Hierzu wurden 50µl Zellsuspension aus den Kulturplatten entnommen und in 96-well-Platten überführt, so dass sich eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen ergab. Danach erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 300g über 10 Minuten mit 150µl Puffer bestehend aus PBS, 1% FCS und 0,1%  $\text{NaN}_3$ . Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 100µl fix/perm hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe der intrazellulären Antikörper und der Isotypkontrollen.

Probenansatz	Menge Antikörper
Isotypkontrolle Anti-Arginase 1	1µl
Anti-Arginase 1	3µl
Isotypkontrolle Anti-iNOS	1µl
Anti-iNOS	2µl

Anschließend wurden die Zellen erneut bei 37°C für 10 Minuten inkubiert, einmal mit 100µl Puffer und ein weiteres Mal mit 200µl Puffer gewaschen.

Nach Überführen mit 200µl Puffer in FACS-Röhrchen erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

### **3.9 Datenaufbereitung und statistische Auswertung**

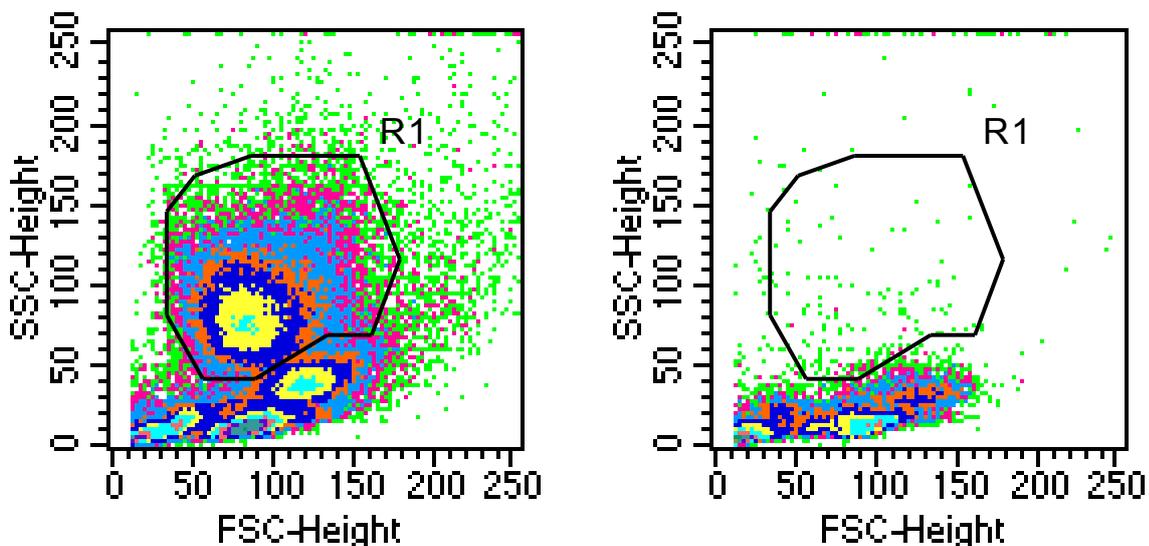
Zur statistischen Analyse wurden T-test, Wilcoxon-Rangsummen-Test und der äquivalente Mann-Whitney-Test verwendet. Der jeweilige Test wird bei den Ergebnisabbildungen separat ausgewiesen. Die Abbildungen und die entsprechenden Werte wurden mit der Software Graphpadprism berechnet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant erachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantitative und Phänotypische Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Gr-MDSC

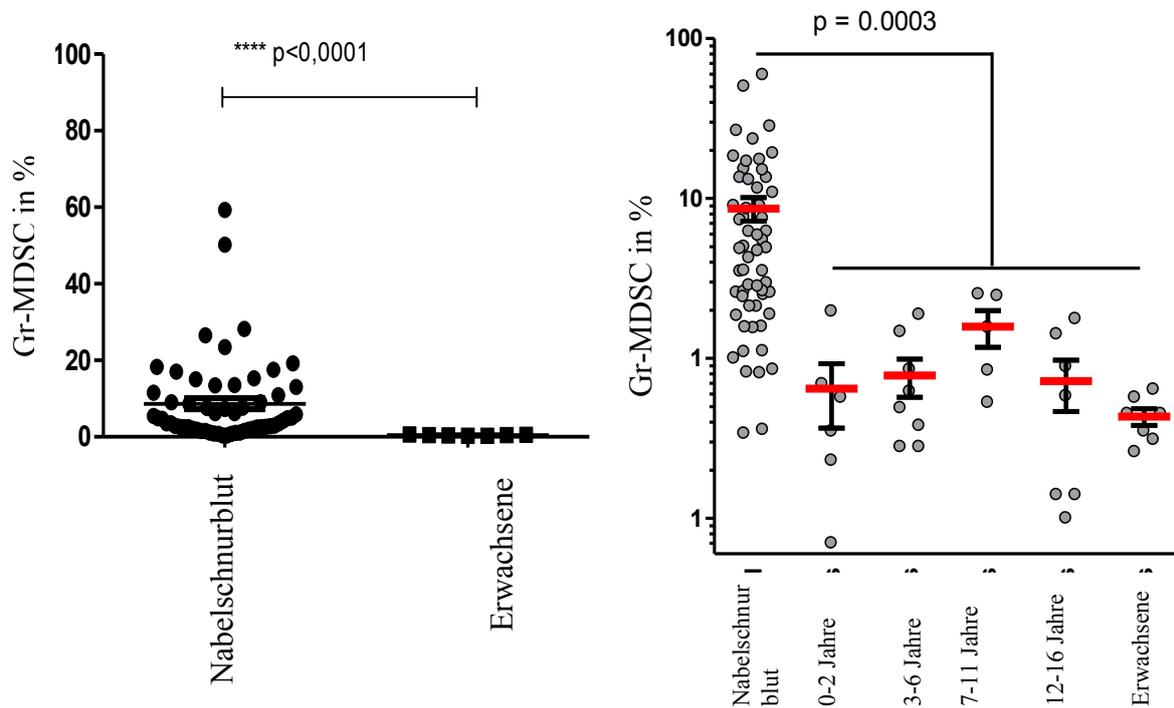
Aus den mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen wurde der prozentuale Anteil der CD66b positiven Zellen aus Nabelschnurblut und aus Blut gesunder Erwachsener bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil an Gr-MDSC in Nabelschnurblut im Gegensatz zum Blut gesunder Erwachsener erhöht war. Im Schnitt fanden sich 1-3 % Gr-MDSC in Erwachsenenblut. Im Nabelschnurblut konnten in Einzelfällen bis zu 60 % nachgewiesen werden. Im Mittel fanden sich 18% Gr-MDSC im Nabelschnurblut.



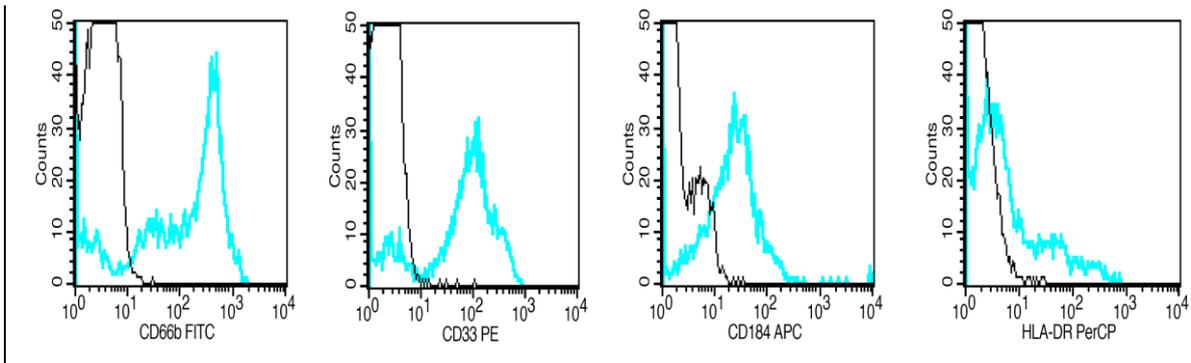
**Abbildung 2: Der Anteil CD66b positiver Zellen ist in Nabelschnurblut deutlich höher als im Blut gesunder Erwachsener**

Darstellung der Gr-MDSC im FACS-Scan. Nach Dichtezentrifugation wurde der prozentuale Anteil der CD66b positiven Zellen in der Fraktion mononukleärer Zellen bestimmt.



**Abbildung 3: Der Anteil CD66b positiver Zellen in Nabelschnurblut ist im Vergleich zum Blut gesunder Erwachsener deutlich erhöht (links). Mit zunehmendem Alter sinkt der Anteil ab und nähert sich dem Niveau im peripheren Blut gesunder Erwachsener an (rechts).**

Nach Dichtezentrifugation wurde der prozentuale Anteil der CD66b positiven Zellen in der Fraktion mononukleärer Zellen bestimmt. Die Durchführung der Versuche in Nabelschnurblut und im peripheren Blut gesunder Erwachsener erfolgte durch mich, die Untersuchung der Blutproben von Kindern im Alter von 0-16 Jahre durch die Kinderklinik in Tübingen. (links:  $n=50$ ,  $p < 0,0001$ , Test: Mann-Whitney-Test, rechts  $n = 91$ ,  $p = 0,0003$ , Test: t-Test). Die linke Abbildung stammt aus dem 2013 veröffentlichten Artikel: Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. Rieber N, Gille C., Köstlin N, Schäfer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heininger V, Alkhaled M, Hector A, Mays L, Kormann M, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Poets CF, Hartl D. Clin.Exp.Immunol. 2013 Oct;174(1):45-52.



**Abbildung 4: Phänotypisierung der MDSC**

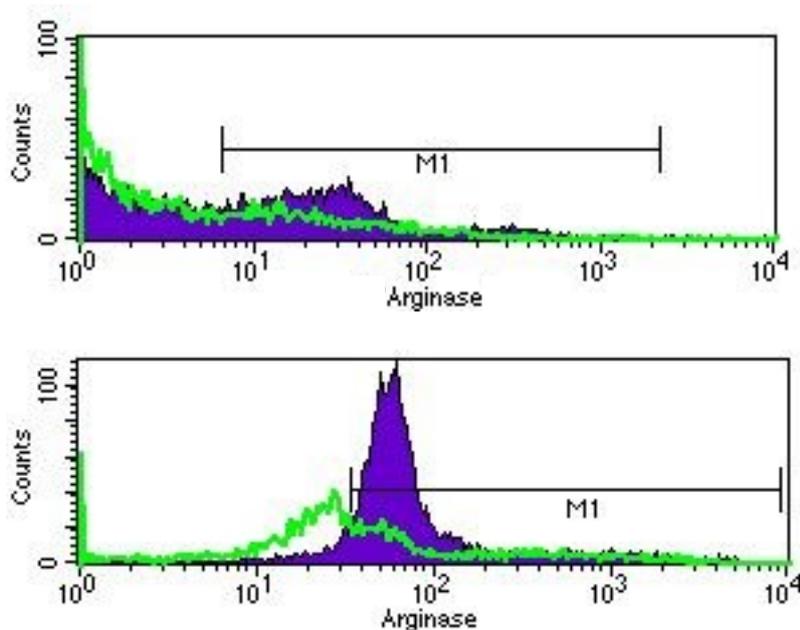
Zur phänotypischen Bestimmung wurden 50µl Zellsuspension aus den Kulturplatten entnommen und in 96-well-Platten überführt, so dass sich eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen ergab. Nach Zugabe der Antikörper CD 66b, CD 33, CD 184 und HLA-DR erfolgte die Inkubation über 15 Minuten im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 100µl Puffer und ein weiteres Mal mit 200µl Puffer gewaschen.

Nach Überführen mit 200µl Puffer in FACS-Röhrchen erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung.

Die Abbildungen stammen aus der gemeinsam mit Herrn Dr. Rieber erstellten Veröffentlichung: Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. Rieber N, Gille C., Köstlin N, Schäfer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heininger V, Alkhaled M, Hector A, Mays L, Kormann M, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Poets CF, Hartl D. Clin.Exp.Immunol. 2013 Oct;174(1):45-52. Der Oberflächenmarker CD 184 wurde in der vorgelegten Arbeit nicht weiter untersucht, und ist daher nicht weiter aufgeführt.

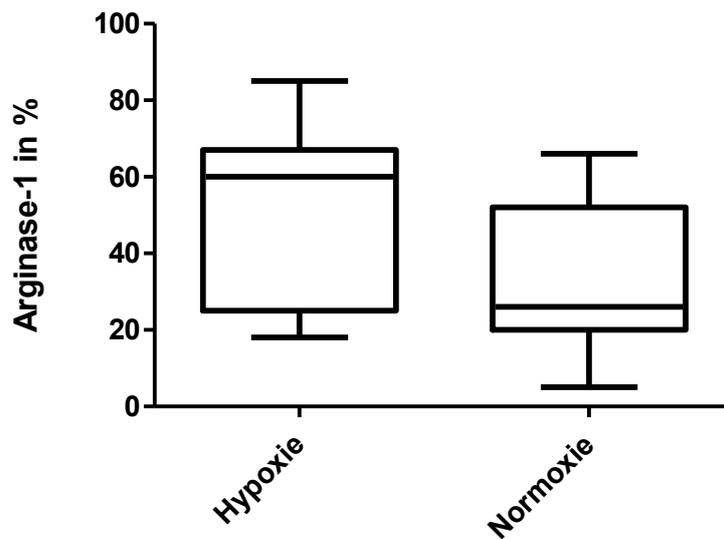
## 4.2 Vermehrte Expression der Effektorenzyme Arginase-1 und iNOS unter hypoxischen Bedingungen

Nach zwei Tagen in Kultur unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Arginase-1 Produktion durch Gr-MDSC aus Nabelschnurblut (CBMC) die in Hypoxie kultiviert wurden erhöht blieb.



**Abbildung 5: Die Arginase-1 Expression ist unter dem Einfluss von DFO erhöht.**

Repräsentative Histogrammdarstellung der Arginase-1 Produktion unter Zugabe von DFO. Die Versuche wurden mit Nabelschnurblut durchgeführt. Nach 3 Stunden erfolgte die Probenentnahme und die Messung. Die Isotypkontrolle ist jeweils grün dargestellt. Im oberen Histogramm ist die Arginase Expression nach Kultur der Zellen ohne die Zugabe von DFO dargestellt. Im unteren Histogramm die Arginase-1 Expression, nachdem der Zellkultur DFO zugegeben wurde.

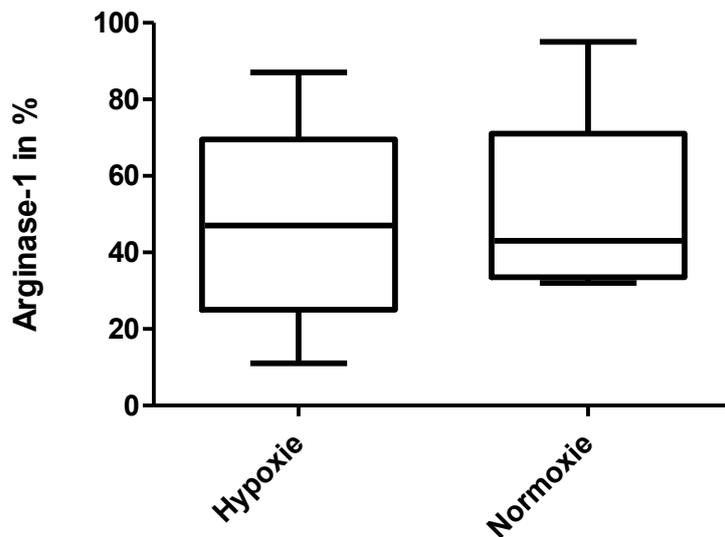


**Abbildung 6: Unter hypoxischen Kulturbedingungen produzierten Gr-MDSC mehr Arginase-1 als in Normoxie.**

CBMC wurden mittels Dichtezentrifugation isoliert und über 48 Stunden unter hypoxischen (2% O<sub>2</sub>) und normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Danach erfolgte die intrazelluläre Färbung der Arginase-1 und die durchflusszytometrische Quantifizierung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Arginase-1 positiver Zellen aller CBMC.

(n=7, p=0,0156, Test: Wilcoxon-Rangsummen-Test)

Bei Kultur der Gr-MDSC aus dem Blut gesunder Erwachsener konnte dies nicht beobachtet werden. Sie produzierten sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie die gleiche Menge an Arginase-1.

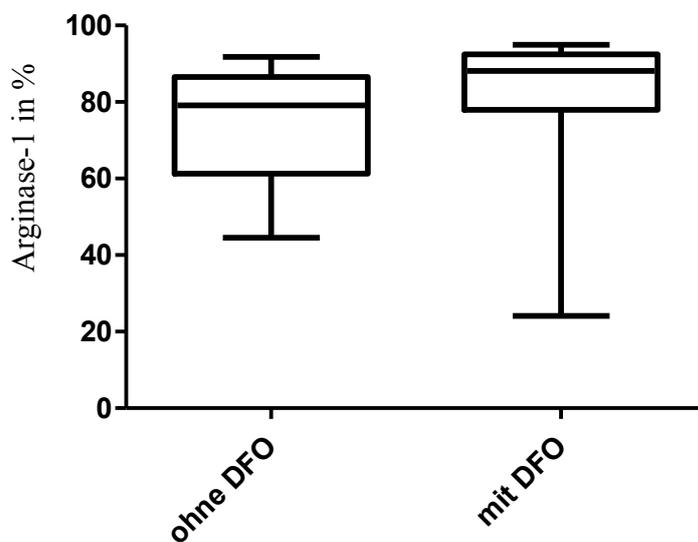


**Abbildung 7: Die Expression von Arginase-1 ist bei Gr-MDSC welche aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener gewonnen wurden und hypoxisch kultiviert wurden nicht höher als unter normoxischen Kulturbedingungen.**

PBMC wurden mittels Dichtezentrifugation isoliert und über 48 Stunden unter hypoxischen (2% O<sub>2</sub>) und normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Danach erfolgte die intrazelluläre Färbung der Arginase-1 und die durchflusszytometrische Quantifizierung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Arginase-1 positiver Zellen aller PBMC.

(n=5, p=1, Test: Wilcoxon-Rangsummen-Test).

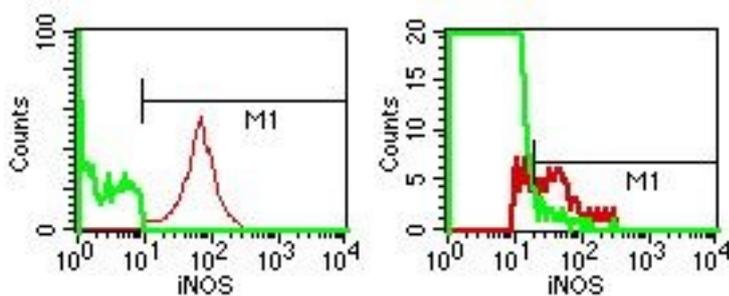
Zur Bestätigung des Einflusses von Hypoxie auf die Expression von Arginase-1 wurden Zellkulturen aus Nabelschnurblut Desferrioxamin zugesetzt und so über die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  Hypoxie-assoziierte Signalwege induziert. Auch hier zeigte sich tendenziell, dass die Expression von Arginase-1 erhöht blieb, die Unterschiede waren allerdings sehr gering und statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 8: Die Arginase-1 Expression von Gr-MDSC ist nach Zugabe von DFO erhöht.**

Die Versuche wurden mit Nabelschnurblut durchgeführt. Nach 3 Stunden erfolgte die Probenentnahme und die Messung (n=8, p>0,05, Test: t-Test).

Bezüglich des Effektorenzyms iNOS konnte gezeigt werden, dass sowohl MDSC aus Nabelschnurblut, als auch MDSC aus dem Blut gesunder Erwachsener iNOS exprimierten. Es zeigten sich jedoch lediglich sehr geringe Unterschiede in der Expression in unterschiedlichen Kulturbedingungen. Die betreffenden Daten wurden statistisch nicht ausgewertet.

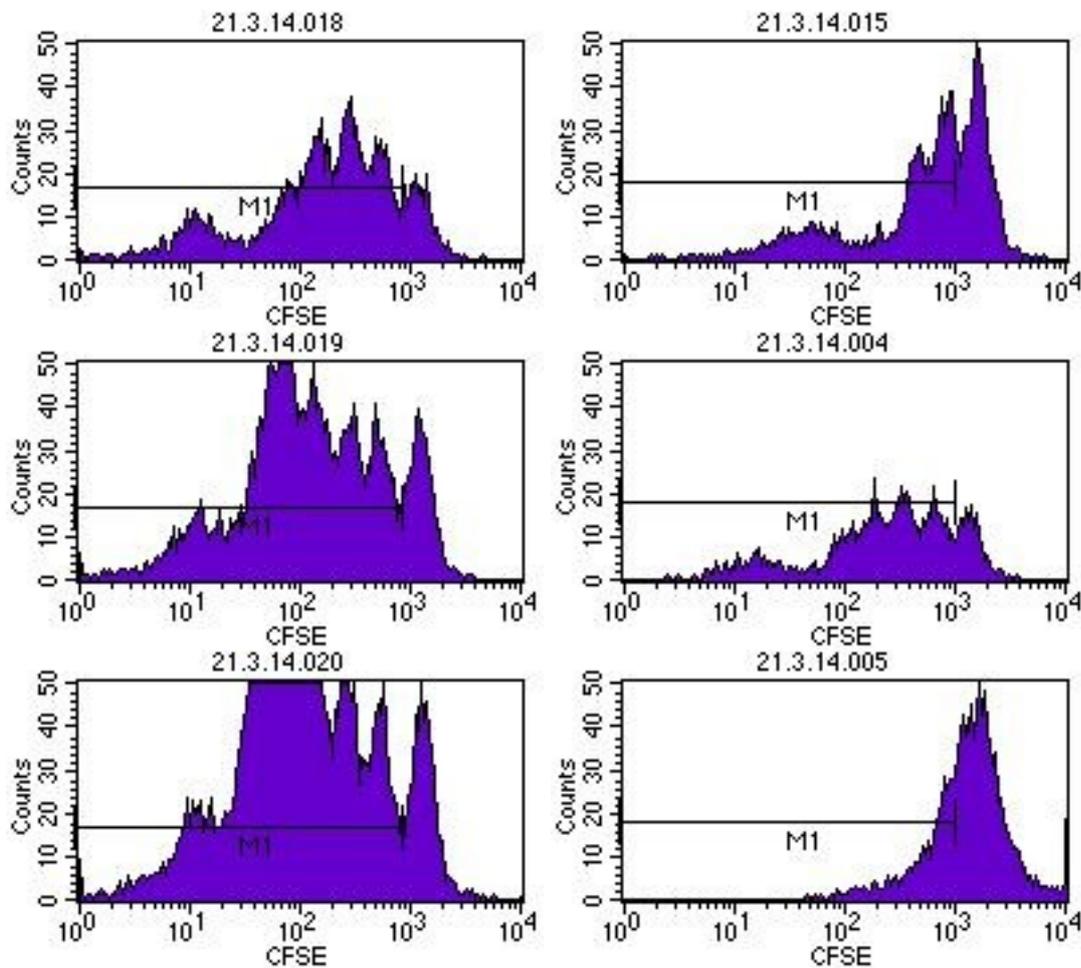


**Abbildung 9: MDSC exprimieren unter hypoxischen und normoxischen Kulturbedingungen iNOS.**

Die untersuchten Gr-MDSC exprimierten iNOS. Die oben gezeigten repräsentativen Histogramme stellen Nachweise von iNOS dar. Insgesamt konnte in den Versuchen nur ein geringer Unterschied festgestellt und iNOS insgesamt auch nur in geringer Menge nachgewiesen werden, weshalb der Nachweis von iNOS nicht weiter verfolgt wurde. Auf Grund von nur wenigen Versuchen erfolgte daher auch keine statistische Auswertung.

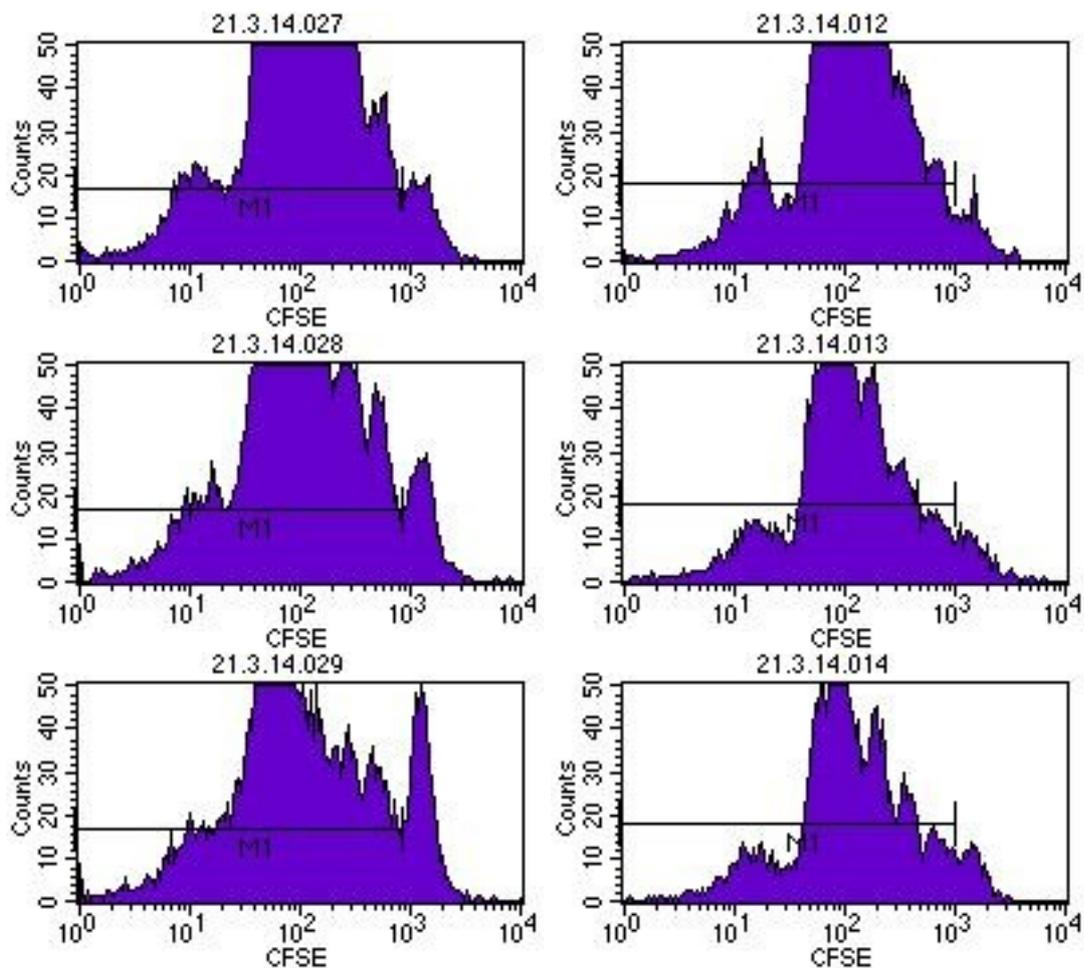
### **4.3 Effekt von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation**

Nach 96 Stunden Zellkultur in 96 well Platten unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-Proliferation in beiden Fällen gehemmt werden konnte. Es zeigte sich insgesamt eine deutlichere Hemmung von CD4-positiven T-Zellen. Die CD8-positiven T-Zellen wurden im autologen System stärker beeinflusst, als in der Kultur mit Gr-MDSC welche aus Nabelschnurblut gewonnen wurden. Insgesamt war die Hemmung durch Gr-MDSC aus Nabelschnurblut geringer ausgeprägt als die Hemmung durch Gr-MDSC aus dem Blut gesunder Erwachsener.



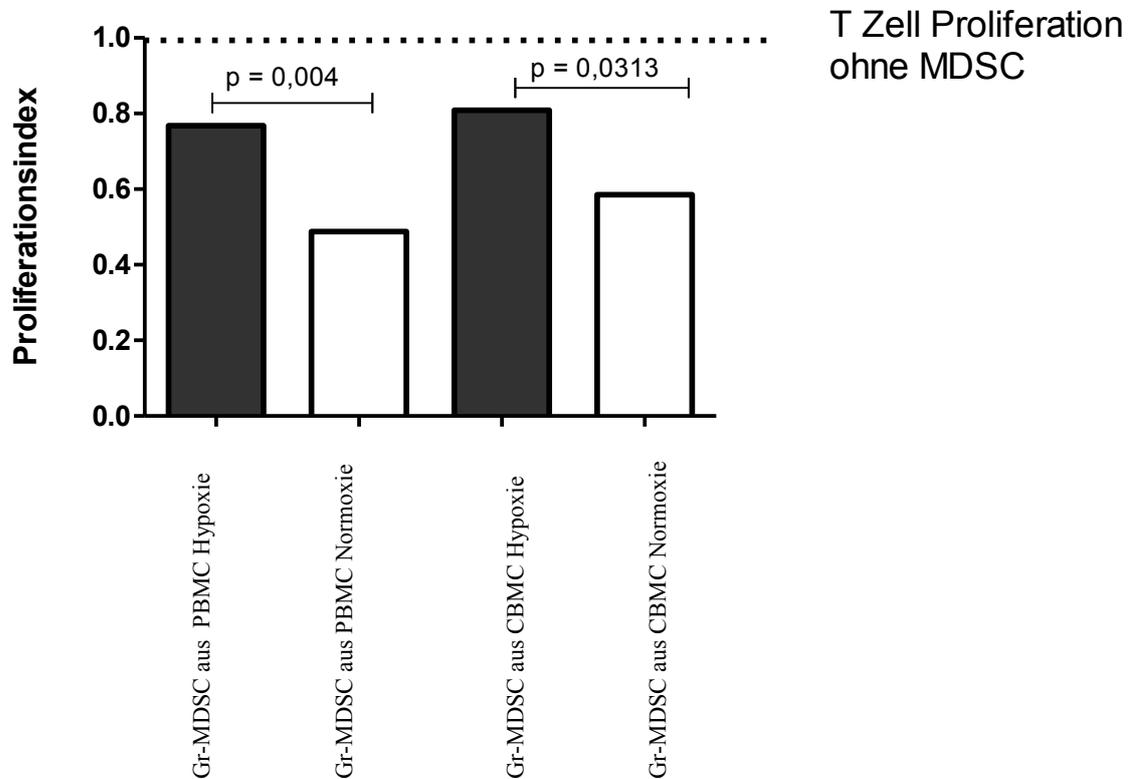
**Abbildung 10: Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener unter normoxischen Bedingungen (rechts) stärker gehemmt als unter hypoxischen Bedingungen (links).**

Die aufgeführten Histogramme zeigen exemplarisch die Proliferationshemmung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter hypoxischen und normoxischen Kulturbedingungen im CFSE-Essay, in Abhängigkeit zum Verhältnis der „Effektorzellen“ Gr-MDSC aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener zu den „Targetzellen“ aus PBMC. Ein Verhältnis von PBMC zu Gr-MDSC 1:1 wird im oberen Histogramm gezeigt, das Verhältnis 1:2 im mittleren und das Verhältnis 1:6 im unteren Histogramm.



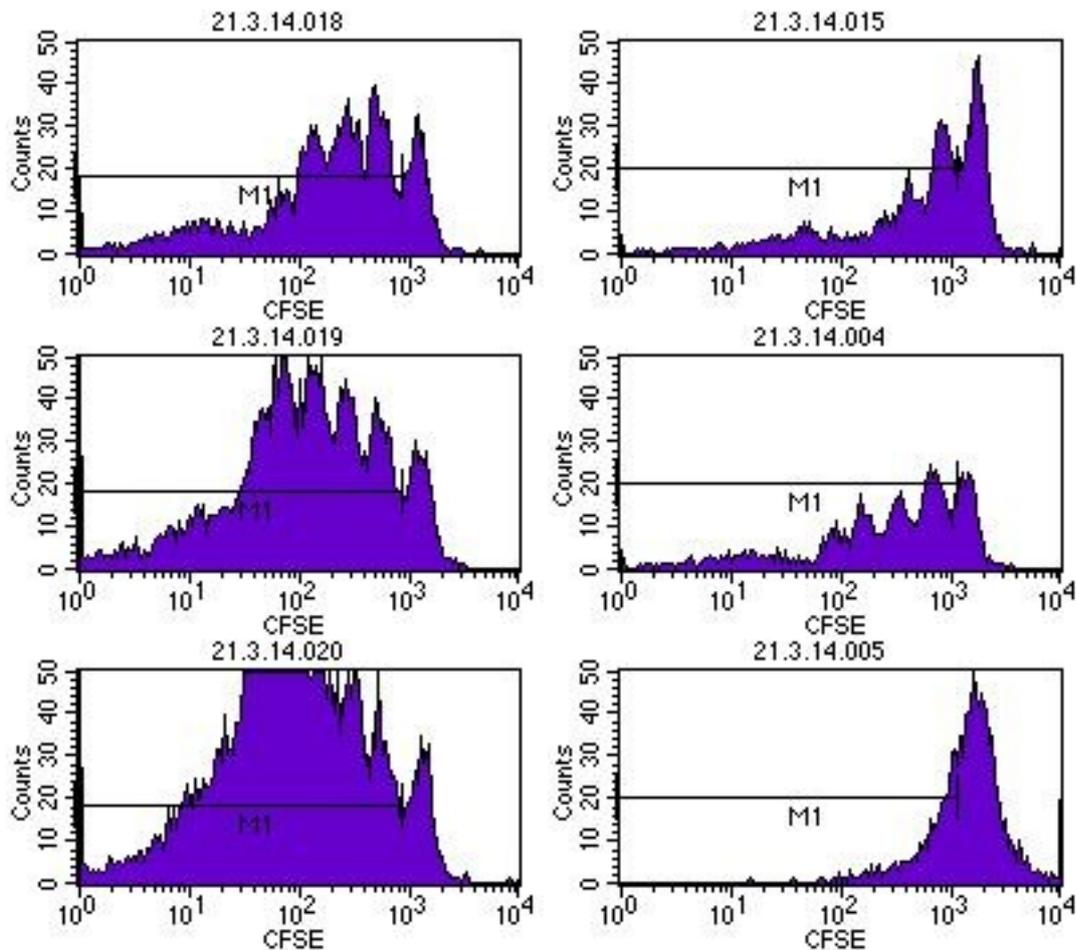
**Abbildung 11: Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem Nabelschnurblut generell nur wenig gehemmt. Unter normoxischen Bedingungen (rechts) zeigte sich jedoch eine stärkere Hemmung als unter hypoxischen Bedingungen (links).**

Die aufgeführten Histogramme zeigen exemplarisch die Proliferationshemmung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Gr-MDSC welche aus Nabelschnurblut gewonnen wurden. Die Verhältnisse PBMC zu Gr-MDSC aus Nabelschnurblut waren 1:1 (oberes Histogramm), 1:2 (mittleres Histogramm) und 1:6 (unteres Histogramm).



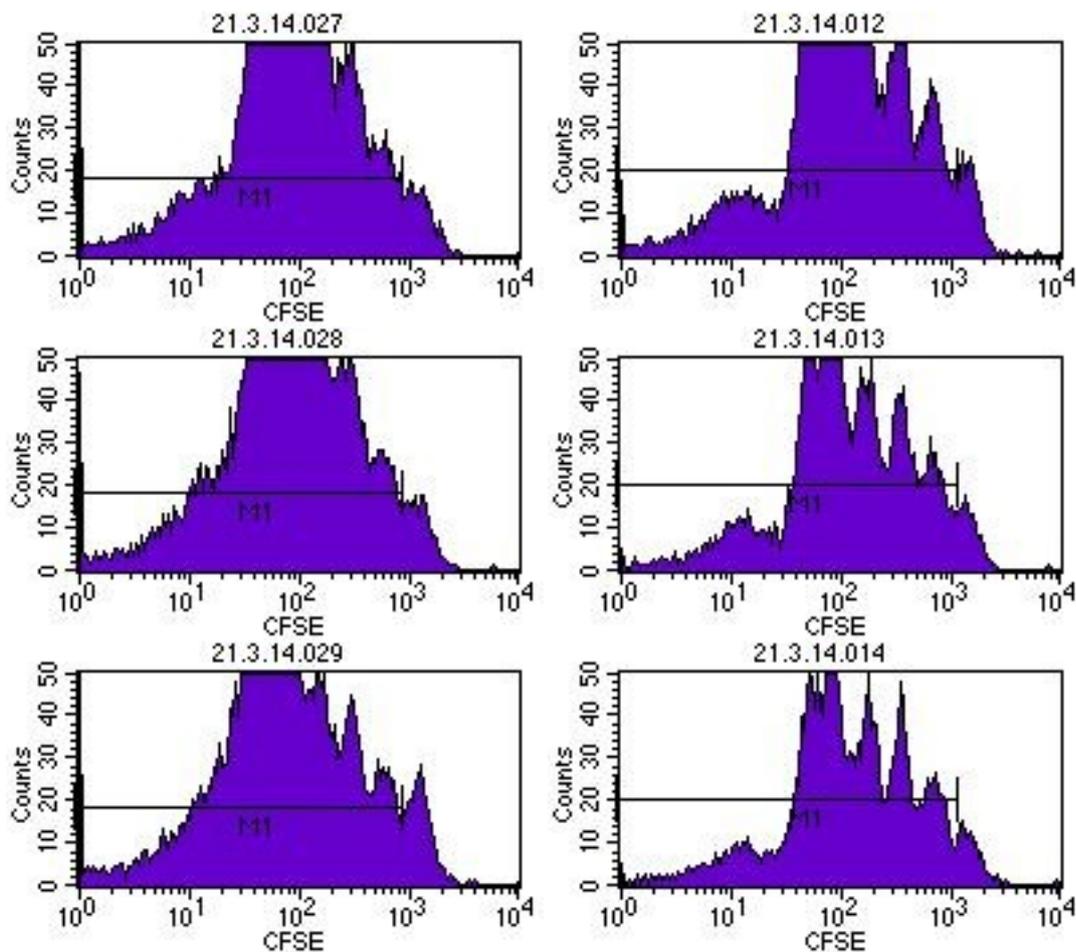
**Abbildung 12: Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird durch Gr-MDSC gehemmt. Unter normoxischen Kulturbedingungen zeigt sich eine stärkere Hemmung als in Hypoxie.**

Um den Einfluss von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation zu bestimmen wurden CFSE markierten Zellen aufgereinigte Gr-MDSC in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Neben Versuchsansätzen innerhalb eines biologischen Systems wurden auch Gr-MDSC aus Erwachsenenblut (PBMC) zu Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC) gegeben und Gr-MDSC aus Nabelschnurblut zu Zellen aus Erwachsenenblut. Ein Teil der Proben wurde unter normoxischen Bedingungen (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) der Andere unter hypoxischen Bedingungen (37°C und 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 93% N<sub>2</sub>) kultiviert (n = 28, Test: Mann-Whitney-Test).

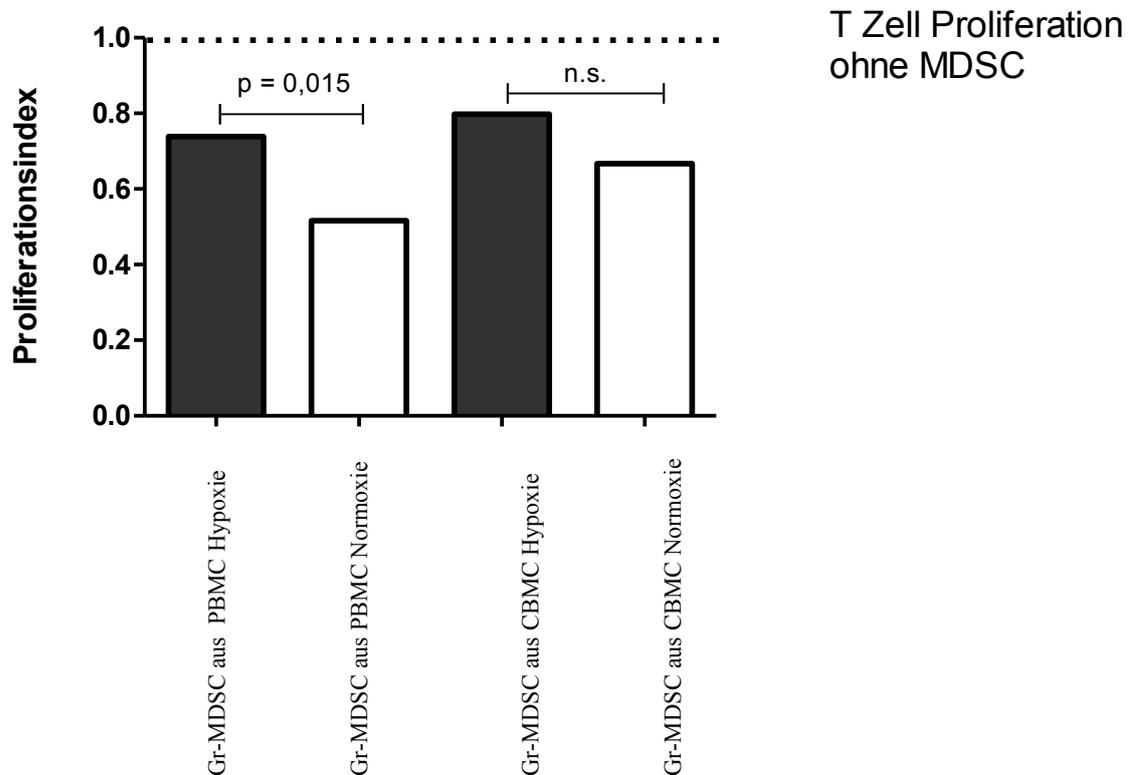


**Abbildung 13: Die Proliferation CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener unter normoxischen Bedingungen (rechts) stärker gehemmt als unter hypoxischen Bedingungen (links).**

Die aufgeführten Histogramme zeigen die Proliferationshemmung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen unter hypoxischen und normoxischen Kulturbedingungen im CFSE-Essay in Abhängigkeit zum Verhältnis PBMC zu Gr-MDSC aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener. Die Verhältnisse „Targetzellen“ aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener zu „Effektorzellen“ Gr-MDSC aus PBMC waren 1:1 (oberes Histogramm), 1:2 (mittleres Histogramm) und 1:6 (unteres Histogramm).



**Abbildung 14: Die Proliferation CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem Nabelschnurblut nur wenig gehemmt. Unter normoxischen Bedingungen (rechts) zeigte sich jedoch eine stärkere Hemmung als unter hypoxischen Bedingungen (links).** Die aufgeführten Histogramme zeigen die Proliferationshemmung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Gr-MDSC, welche aus Nabelschnurblut gewonnen wurden. Die Verhältnisse „Targetzellen“ aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener zu „Effektorzellen“ Gr-MDSC aus Nabelschnurblut waren 1:1 (oberes Histogramm), 1:2 (mittleres Histogramm) und 1:6 (unteres Histogramm).



**Abbildung 15: Die Proliferation CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch Gr-MDSC gehemmt. Unter normoxischen Kulturbedingungen zeigt sich eine stärkere Hemmung als in Hypoxie.**

Um den Einfluss von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation zu bestimmen wurden CFSE markierten Zellen aufgereinigte Gr-MDSC in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Neben Versuchsansätzen innerhalb eines biologischen Systems wurden auch Gr-MDSC aus Erwachsenenblut (PBMC) zu Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC) gegeben und Gr-MDSC aus Nabelschnurblut zu Zellen aus Erwachsenenblut. Ein Teil der Proben wurde unter normoxischen Bedingungen (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) der Andere unter hypoxischen Bedingungen (37°C und 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 93% N<sub>2</sub>) kultiviert (n = 33, Test: Mann-Whitney-Test).

## 5 Diskussion

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Hypothesen überprüft, dass (a) Gr-MDSC im Nabelschnurblut vermehrt vorliegen, dass (b) die Expression von Effektorenzymen vom Sauerstoffgehalt im Blut abhängig sind und dass (c) Gr-MDSC die T-Zell-Proliferation und somit die Immunantwort hemmen können.

Es konnte gezeigt werden, dass (1) der Anteil von Gr-MDSC in Nabelschnurblut im Vergleich zum Blut gesunder Erwachsener erhöht waren und (2) die Expression des Effektorenzyms Arginase-1 in hypoxischer Umgebung erhöht war, während (3) die Expression des Effektorenzyms iNOS nicht von Hypoxie abhängig erschien.

Die T-Zell-Proliferation (4) konnte in den durchgeführten Experimenten gehemmt werden, wobei sich keine stärkere Hemmung unter hypoxischen Bedingungen zeigte.

### **5.1 Quantitative und Phänotypische Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Gr-MDSC**

Zunächst sollte untersucht werden, ob Gr-MDSC im Nabelschnurblut im Vergleich zum Blut gesunder Erwachsener vermehrt sind. Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass in Nabelschnurblut vermehrt CD66b positive Zellen gefunden werden können (siehe Abbildungen 2 und 3). Der Oberflächenmarker CD66b stellt hierbei einen spezifischen Marker für granulozytäre MDSC dar. Zudem konnten Gr-MDSC als CD66b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD184<sup>+</sup> HLA-DR<sup>low</sup> klassifiziert werden (siehe Abbildung 4). Im peripheren Blut gesunder Erwachsener fanden sich 1-3 % Gr-MDSC. Im Nabelschnurblut konnten in Einzelfällen bis zu 60 % nachgewiesen werden. Im Mittel fanden sich 18% Gr-MDSC im Nabelschnurblut. Die Ursache für die große Streuung des Prozentualen Anteils der Gr-MDSC im Nabelschnurblut blieb unklar.

In Kooperation mit der Kinderklinik Tübingen und der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Hartl und Herrn Dr. Rieber konnte zudem gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil an Gr-MDSC im Nabelschnurblut mit zunehmendem Alter sank. (Rieber et al. 2013, Abbildung 3) Der ansteigende Sauerstoffpartialdruck postnatal, kann diese Entwicklung nicht vollständig erklären, da auch die Proben peripheren Blutes von Kindern noch einen erhöhten Anteil an Gr-MDSC aufwiesen.

In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil granulozytärer MDSC im peripheren Blut gesunder Schwangerer erhöht war und postpartal rasch wieder abnahm (Köstlin et al. 2014).

Phänotypische Unterschiede zwischen Gr-MDSC welche aus Nabelschnurblut und Gr-MDSC welche aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener gewonnen wurden, konnten nicht festgestellt werden.

Bisher wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, welche zu einer Akkumulation von Gr-MDSC bei pathologischen Prozessen führen (Agaugué et al. 2011, Lechner et al. 2011, Nakamura et al. 2013, Zhang et al. 2008). Auch im Rahmen einer Schwangerschaft werden Faktoren wie VEGF, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, TGF $\beta$  exprimiert (Andraweera et al. 2012, Dimitriadis et al. 2005, Raghupathy et al. 2009), diese mütterlichen Faktoren, welche vor Allem auch an der fetomaternalen Grenzschicht vorliegen, könnten auch zu einer Akkumulation von Gr-MDSC im Nabelschnurblut führen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten erstmals, dass Gr-MDSC im Nabelschnurblut in erhöhter Anzahl und funktionell aktiv zu finden sind. Nachfolgend wurde dies von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Gervassi et al. 2014, Veglia F 2018).

Die bisherigen Arbeiten haben allerdings für Tumorgewebe gezeigt, dass die hypoxische Umgebung einen Einfluss auf die Ausbildung und Funktion von Gr-MDSC hat. Daraus ergab sich die Fragestellung ob die Expression von Effektorenzymen durch Hypoxie zu beeinflussen ist.

Die Gr-MDSC im Nabelschnurblut könnten eine Rolle zum Schutz des Fetus gegenüber maternalen Antigenen spielen, oder eine frühe Immunantwort des Feten auf unspezifische, vielleicht von der maternalen Seite der Plazenta ausgehende Stimuli sein und als unreife Zellen der reaktiven Myelopoese als Immunregulatoren auftreten, wie dies auch bei erhöhtem Bedarf an myeloiden Zellen im Rahmen von pathologischen Prozessen vorkommt. (Cuenca et al. 2012)

## **5.2 Vermehrte Expression der Effektorenzyme Arginase-1 und iNOS unter hypoxischen Bedingungen**

Es konnte gezeigt werden, dass das Effektorenzym Arginase-1 durch Gr-MDSC aus Nabelschnurblut, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden vermehrt exprimiert wurde (siehe Abbildung 6). Ähnlich war das Ergebnis nach Zugabe von DFO (siehe Abbildung 5 und Abbildung 8). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Effekt des niedrigen Sauerstoffpartialdrucks auf die Arginase-1 Expression möglicherweise über HIF-1 $\alpha$  vermittelt wird. Im Gegensatz dazu war die Expression von Arginase-1 in Gr-MDSC die aus dem Blut gesunder Erwachsener gewonnen wurden in Hypoxie und Normoxie nicht unterschiedlich (siehe Abbildung 7).

Kropf et al. beschrieben, dass neutrophile Zellen (CD15<sup>+</sup> CD14<sup>low</sup>) für die erhöhte Arginase-1 Expression in der Schwangerschaft verantwortlich sein könnten. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Arginase-1 Expression im peripheren Blut von Schwangeren durch eine vermehrte Expression von granulozytären MDSC zu erklären war (Köstlin et al. 2014). Diese Ergebnisse stimmen mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass Arginase-1 exprimierende Gr-MDSC im Nabelschnurblut akkumulieren, überein.

Arginase-1 ist in Makrophagen bereits als Zielgen von HIF-1 $\alpha$  beschrieben worden, in denen es zur Ausbildung eines alternativ aktivierten (M2) Phänotyp beiträgt (Kumamoto M 2017). Umgekehrt wurde bei Mikroglia beschrieben, dass akute Hypoxie die Expression von Arginase-1 herunterreguliert (Zhang et al. 2017). Daher scheint es keine einheitliche Regulation von Arginase-1 durch Hypoxie in myeloiden Zellen zu geben. Möglicherweise spielt deren Differenzierungsgrad eine entscheidende Rolle, was die unterschiedliche Reaktion von Gr-MDSC aus dem Blut Neugeborener und Erwachsener erklären könnte.

Bezüglich der Expression von iNOS konnte kein Einfluss von Hypoxie festgestellt werden. Sowohl Gr-MDSC aus Nabelschnurblut als auch Gr-MDSC aus dem Blut gesunder Erwachsener produzierten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen iNOS in annähernd gleicher Menge (siehe Abbildung 9).

In der Schwangerschaft wurde Stickstoffmonoxid als wichtiger Faktor bei der Gefäßentwicklung und der Regulation von vaskulären Funktionen beschrieben.

(Valdes et al. 2009). Außerdem wurde die Expression von iNOS in murinen embryonalen Stammzellen, Synzytiotrophoblasten und Trophoblasten an der fetomaternalen Grenzschicht beschrieben (Baylis et al. 1999) und es konnte eine Korrelation zwischen der Expression von iNOS und der Abortrate im Mausmodell gezeigt werden (Haddad et al. 1997). Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass maternale Gr-MDSC an der fetomaternalen Grenzschicht erhöhte Mengen iNOS exprimieren (Köstlin et al. 2016). Dies könnte darauf hinweisen, dass Gr-MDSC, welche an der fetomaternalen Grenzschicht akkumulieren, durch andere Faktoren als Hypoxie, beispielsweise gewebeständige Faktoren in ihrer immunmodulatorischen Eigenschaft beeinflusst werden und daher ein anderes Spektrum an Effektorenzymen exprimieren. Allerdings wurde iNOS in myeloiden Zellen als Zielgen von HIF-1 $\alpha$  beschrieben (Cheng 2017).

Die Beobachtung, dass iNOS sich in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen in nur geringer Menge nachweisen ließ und nicht durch Hypoxie beeinflussbar erschien, könnte dadurch erklärt werden, dass eine vermehrte Arginase-1 Expression und die damit verbundene Depletion von Arginin dazu führt, dass nur noch in geringerem Maße Stickstoffmonoxid produziert werden kann. In der dazu bestehenden Literatur wird eine Verschiebung der Funktion der NOS in Richtung der Produktion von Reactive Oxygen Species beschrieben. (Noris et al. 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hypoxie in Gr-MDSC aus Nabelschurblut nicht jedoch in Gr-MDSC aus dem Blut Erwachsener die Expression von Arginase-1 induzieren konnte und sich kein Einfluss auf die iNOS Expression zeigen ließ. HIF-1 $\alpha$  könnte als Transkriptionsfaktor für die Expression von Arginase-1 in Gr-MDSC aus der Nabelschnur eine Rolle spielen.

### **5.3 Effekt von Gr-MDSC auf die T-Zell-Proliferation**

In den hier präsentierten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Gr-MDSC aus der Nabelschnur die T-Zell-Proliferation hemmen (siehe Abbildung 12 und 15). Der hemmende Effekt von Gr-MDSC aus der Nabelschnur war nicht signifikant unterschiedlich zu dem Effekt von Gr-MDSC aus dem Blut gesunder Erwachsener. Sowohl die CD4<sup>+</sup>, als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellproliferation wurde durch Co-Kultur mit Gr-MDSC gehemmt (siehe Abbildungen 10 bis 15). Gr-MDSC könnten damit eine

wichtige Rolle in der fetalen und neonatalen Immunregulation spielen und möglicherweise zur fetomaternalen Toleranz auf der einen Seite und der relativen Immundefizienz des Neugeborenen auf der anderen Seite beitragen. Bisher wurde vor Allem regulatorischen T-Zellen eine Bedeutung im Rahmen der fetomaternalen Toleranz beigemessen. Ihre Rolle wurde in mehreren Studien beschrieben (Arruvito et al. 2010, Ernerudh et al. 2011). Samstein et al. konnten 2012 im Tiermodell zeigen, dass selbst bei vollständiger Depletion aller regulatorischer T-Zellen, die Schwangerschaft trotzdem noch weiter bestand. Dies spricht für die Hypothese, dass am Schwangerschaftserhalt weitere (zelluläre) Mechanismen beteiligt sein müssen. Die funktionelle Verwandtschaft von Gr-MDSC, zu regulatorischen T-Zellen wurde bereits beschrieben (Lindau 2013). Es konnte bereits gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen welche aus Nabelschnurblut gewonnen wurden eine höhere suppressive Potenz aufwiesen, als adulte regulatorische T-Zellen (Godfrey et al. 2005).

Die verschiedenen immunmodulatorischen Zellen im Nabelschnurblut wurden vor Allem im Rahmen der Transplantation von Nabelschnurblut und damit verbundener Graft versus Host Reaktion untersucht. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine deutlich geringere Graft versus Host Reaktion nach Transplantation von Nabelschnurblut, wohingegen die Infektanfälligkeit im Vergleich zu Transplantationen von Zellen, die nicht aus Nabelschnurblut kamen, erhöht war. Für die Immunsuppressive Wirkung wurden hier NK-Zellen, mesenchymale Stroma Zellen und regulatorische T-Zellen beschrieben (Brown/Boussiotis 2009, Kim/Broxmeyer 2012). Die Rolle von Gr-MDSC aus der Nabelschnur im Rahmen von Graft versus Host Reaktionen wurde bisher nicht untersucht. Allerdings wurde bereits beschrieben, dass Gr-MDSC Graft versus Host Reaktionen hemmen können (Zhang 2008). Zusammenfassend zeigten die hier präsentierten Daten, dass Gr-MDSC aus der Nabelschnur effektiv T-Zell Proliferation hemmen konnten. Zusammen mit der zuvor dargestellten Gr-MDSC-Akkumulation lässt sich vermuten, dass Gr-MDSC im Nabelschnurblut eine relevante Rolle in der Immunregulation spielen könnten.

## **5.4 Einfluss von Hypoxie auf die T-Zell-Hemmung**

Entgegen der im Vorfeld formulierten Hypothese, zeigten die durchgeführten Versuche, dass Gr-MDSC welche unter normoxischen Bedingungen in Co-Kultur mit T-Zellen genommen wurden, die T-Zell-Proliferation stärker hemmten, als Gr-MDSC in Co-Kultur unter hypoxischen Bedingungen.

Bezüglich des Einflusses von Hypoxie auf die Hemmung der T-Zellproliferation existieren bisher vor Allem Arbeiten, welche Gr-MDSC aus Tumorumgebung untersuchten (Corzo et al. 2009 und 2010, Gabitass et al. 2011, Lindau et al. 2013, Zarembler/Malech 2005).

Cramer et al. beschrieben 2003 die Rolle von HIF-1 $\alpha$  im Bezug auf die Akkumulation myeloider Zellen im Mausmodell mit induzierten Entzündungsreaktionen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Glykolyse myeloider Zellen abhängig von HIF-1 $\alpha$  war und Motilität, Aggregation und Funktion beeinflusste. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass der prozentuale Anteil an Gr-MDSC im hypoxischen Nabelschnurblut erhöht war und der prozentuale Anteil im peripheren Blut von älteren Kindern unter normoxischen Bedingungen sich dem Niveau gesunder Erwachsener annäherte.

Viele der bisher durchgeführten Studien zum Einfluss von Hypoxie auf die Funktion von Immuneffektorzellen zeigten, dass Hypoxie Zellen des adaptiven Immunsystems zu hemmen (Georgiev et al. 2013, Goda et al. 2003, Neumann et al. 2005, Thiel et al. 2007), während sie Zellen des angeborenen Immunsystems eher zu aktivieren scheint (Anand et al. 2007, Cramer et al. 2003, Peyssonnaud et al. 2005). Corzo et al. untersuchten 2010 spezifisch den Einfluss von Hypoxie auf die T-Zell-Hemmung durch Gr-MDSC. Auch hier konnte ein aktivierender Einfluss der Hypoxie festgestellt werden. Die Ergebnisse der zitierten Studien stehen im Gegensatz zum Ergebnis der hier vorgelegten Arbeit. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt der unterschiedliche Ursprung der untersuchten Gr-MDSC dar. Die zitierten Studien verwendeten murine Zellen, während die hier untersuchten Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut gewonnen wurden. Die hypoxischen Bedingungen in den durchgeführten Versuchen mit 2% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> sollten möglichst ähnliche Bedingungen darstellen, wie sie der Fetus in utero mit einem Sauerstoffpartialdruck

von 10-35 mmHg ausgesetzt ist. Daraus ergeben sich auch methodische Unterschiede zu den im Vorfeld zitierten Studien.

## **5.5 Diskussion der Methoden**

Die Verwendung biologischen Materials impliziert individuelle Unterschiede. Um eine höchstmögliche Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen, wurde bei der Auswahl der Spender auf ein möglichst homogenes Patientenkollektiv geachtet. Erwachsene mit einer akuten Infektion oder einer chronischen Erkrankung wurden nicht einbezogen, es erfolgte jedoch kein serologischer Ausschluss einer subklinischen chronischen Infektion.

Das Nabelschnurblut wurde unmittelbar postpartal aus der Nabelvene entnommen. Die Blutproben für die Versuche zur Enzymexpression unter hypoxischen Bedingungen wurden unter hypoxischen Bedingungen abgenommen und direkt in der Hypoxie-Werkbank aufgereinigt um einen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks im Blut zu verhindern. Bei den verwendeten Blutproben aus Nabelschnurblut gab es keinen Anhalt für Infektionen wie grünes Fruchtwasser oder erhöhte Entzündungsparameter bei der Mutter. Der postnatale klinische Verlauf der Kinder wurde allerdings nicht untersucht.

Die untersuchten mononukleären Zellen wurden frisch isoliert. Der Transport der isolierten Zellen erfolgte auf Eis und unter abgeschlossenen Bedingungen um Reaktionen während der Transportzeit zu verhindern.

Bezüglich der Versuche zur T-Zell-Proliferation muss angemerkt werden, dass die Proben nicht durchgehend unter hypoxischen Bedingungen verarbeitet werden konnten, da die MACS-Sortierung der Gr-MDSC automatisiert erfolgte um eine möglichst hohe Reinheit zu erzielen. Eine Gewinnung der Gr-MDSC über eine manuelle Aufbereitung war auf Grund der engen Platzverhältnisse in der Hypoxie-Werkbank nicht möglich. Technisch bedingt kann nicht ausgeschlossen werden, dass es während der Aufarbeitung der Proben sowie während der Zellkulturzeit zu Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks gekommen ist. Geht man davon aus, dass HIF-1 $\alpha$  eine große Rolle bei der immunsuppressiven Wirkung der Gr-MDSC spielt und dieser Faktor sehr instabil ist, kann es möglich sein, dass die Ergebnisse unter hypoxischen Bedingungen durch einen schwankenden Sauerstoffpartialdruck

verfälscht wurden. Eine durchgehende Aufarbeitung unter hypoxischen Bedingungen könnte andere Ergebnisse liefern.

Die große Streubreite der hemmenden Potenz von Gr-MDSC aus der Nabelschnur könnte dadurch erklärt werden, dass eine Ausdifferenzierung der Gr-MDSC nach einer Studie auf zwei Wegen erfolgen kann. Condamine und Gabrilovic beschrieben 2011 zwei unterschiedliche Signalwege zur Expansion und Aktivierung von Gr-MDSC. Das Vorhandensein von GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-6 und VEGF führte zu einer Expansion unreifer myeloider Zellen, welche aber nicht zu GR-MDSC ausreifen. Die Ausdifferenzierung zu immunsuppressiven Gr-MDSC erfolgte laut Condamine und Gabrilovic erst durch den Einfluss proinflammatorischer Moleküle, wie IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-13 oder TLR Liganden. Da eine phänotypische Unterscheidung dieser beiden Zelltypen jedoch nicht möglich war, könnten bei der Gewinnung der Gr-MDSC im durchgeführten Versuchssetting auch unreife myeloide Zellen erfasst worden sein, welche noch nicht immunsuppressiv wirken. Hier könnte ein nachfolgender Versuchsansatz in dem den CD66b<sup>+</sup> Zellen zum Beispiel IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-13 oder TLR Liganden zugesetzt werden Aufschluss geben.

Bei der Durchführung der Versuche wurden aus bereits bestehender Literatur bekannte Methoden verwendet und lediglich an benötigte Kulturbedingungen angepasst, was einen Vergleich mit anderen Ergebnissen zulässt.

## **5.6 Schlussfolgerung**

Die hier vorgestellten Ergebnisse stützen die Hypothese, dass granulozytäre MDSC eine wichtige Rolle im Bezug auf die fetomaternale Toleranz spielen. Es konnte gezeigt werden, dass (1) der Anteil an Gr-MDSC im Nabelschnurblut im Vergleich zum Blut gesunder Erwachsener erhöht ist, dass (2) diese Gr-MDSC vermehrt das Effektorenzym Arginase-1 produzieren und die Expression von Arginase-1 durch Gr-MDSC aus Nabelschnurblut abhängig vom Sauerstoffpartialdruck scheint. Dieser könnte somit ein Signal zur Immunadaptation des Neugeborenen darstellen, da die Arginase-1 die Proliferation der T-Zellen hemmt. Da beim gesunden Erwachsenen keine Unterschiede in der Expression unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gefunden werden konnten, während in der Literatur der Einfluss der Hypoxie in Tumorumgebung beschrieben wurde, kann davon ausgegangen werden, dass im Versuchssetting mit Tumorzellen noch andere, z.B. gewebeständige,

Faktoren eine Rolle bei der Aktivierung von Gr-MDSC spielen. Auch die in der Arbeitsgruppe gewonnenen Daten zur T-Zell-Hemmung durch Plazentaständige Gr-MDSC, welche eine deutlichere Hemmung zeigten, als Gr-MDSC aus Nabelschnurblut, legen diese Vermutung nahe.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass (3) die Expression des Effektorenzyms iNOS durch Gr-MDSC nicht durch Hypoxie bedingt zu sein scheint. Auch hier gibt es in der Literatur Hinweise auf eine hypoxieabhängige Aktivierung in Tumorumgebung, welche wahrscheinlich auch noch von anderen Faktoren abhängig ist.

Schließlich zeigen die Ergebnisse noch, dass (4) die T-Zell-Proliferation durch Gr-MDSC gehemmt wird. Es zeigte sich jedoch keine bessere Hemmung unter hypoxischen Bedingungen, wie zuvor angenommen.

## 6 Zusammenfassung

Die fetale Inflammationsreaktion intrauterin unterscheidet sich von der des Neugeborenen postpartal. Zu Gunsten des Schwangerschaftserhaltes sind proinflammatorische Prozesse abgeschwächt. Die geringere proinflammatorische Potenz des fetalen Immunsystems wird als „physiologische Unreife“ des Immunsystems zum Schutz vor einer Abstoßungsreaktion gegenüber des semiallogenen mütterlichen Organismus gesehen. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die diese „Dämpfung“ des fetalen Immunsystems bedingen, sind jedoch weitestgehend unklar, ebenso sind die Mechanismen, welche eine fetomaternale Toleranz ermöglichen noch nicht vollständig verstanden.

Gr-MDSC wurden bisher vor Allem in Tumorgewebe untersucht. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen jedoch, dass Gr-MDSC auch im Nabelschnurblut vermehrt vorliegen. In der vorgelegten Arbeit ging es weiterhin darum, ob Hypoxie einen Einfluss auf die durch sie ausgelöste Immunmodulation hat.

Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Gr-MDSC aus Nabelschnurblut unter hypoxischen Bedingungen mehr Arginase-1 exprimieren als unter normoxischen Bedingungen. Dadurch könnten Sie Einfluss auf die Immunantwort nehmen, indem die T-Zell-Proliferation gehemmt wird.

In den durchgeführten Versuchen zur T-Zell-Proliferation konnte zwar eine eindeutige Hemmung nachgewiesen werden, diese zeigte sich aber unter hypoxischen Bedingungen schwächer als unter normoxischen Bedingungen. Dies kann daran liegen, dass die Hypoxie und die Arginase-1 Expression nicht alleine für die Immunmodulation verantwortlich sind. Hier ergibt sich die Fragestellung ob die Immunantwort allein durch Gr-MDSC gehemmt werden kann und welche Rolle die Verzahnung des adaptiven und des angeborenen Immunsystems im Rahmen der fetomaternalen Toleranz spielt, für zukünftige Forschungsansätze. In einer anderen Arbeit der Gruppe konnte gezeigt werden, dass Gr-MDSC auch im Blut von Schwangeren erhöht sind. Auch die Frage, ob ein Vorkommen von mütterlichen und fetalen Gr-MDSC zusammen und nicht nur die fetalen Gr-MDSC allein die Immunantwort modulieren, sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, da die postnatale Adaptation nicht nur durch den ansteigenden Sauerstoffpartialdruck,

sondern eventuell auch durch den Wegfall der mütterlichen Gr-MDSC getriggert sein könnte.

Das Vorhandensein und die Funktion fetaler und neonataler Gr-MDSC scheint durch Hypoxie beeinflussbar zu sein. Der Wechsel zwischen pränataler Hypoxie zu postnataler Normoxie scheint nach den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht allein für die immunsuppressive Wirkung der Gr-MDSC verantwortlich.

## 7 Literaturverzeichnis

Adkins B, Bu Y, Cepero E, Perez R: Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. *J Immunol.* 2000;164:2347–2353.

Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N: Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood* 2011;117(26):7021-31.

Anand RJ, Gripar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, Dubowski T, Sodhi CP, Hackam DJ: Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. *J Leukoc Biol* 2007;82(5):1257-65.

Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT: The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update* 2012;18(4):436-57.

Arruvito L, Sotelo AI, Billordo A, Fainboim L: A physiological role for inducible FOXP3+ TREG cells Lessons from women with reproductive failure. *Clin Immunol* 2010;136(3):432-41.

Baylis SA, Strijbos PJ, Sandra A, Russell RJ, Rijhsinghani A, Charles IG, Weiner CP: Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999;5(3):277-86.

Bøyum A: Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:31-50.

Bose C, Laughon M, Allred EN, Van Marter LJ, O`Shea TM, Ehrenkranz RA, Fichorova R and Leviton A: Blood protein concentrations in the first two postnatal weeks that predict bronchopulmonary dysplasia among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatric research* 2011;69:347-353

Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, Suttman H, Schenck M, Welling J, Zabel P, Lang S: Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol* 2011;89(2):311-7.

Bronte V, Zanovello P: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005;5(8):641-54.

Brown J, Boussiotis VA. Umbilical Cord Blood Transplantation: Basic Biology and Clinical Challenges to Immune Reconstitution. *Clinical immunology* 2008;127(3):286-297.

Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE: Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J. Pathol.* 2002; 196: 204-212.

Chaouat G, Petitbarat M, Dubanchet S, Rahmati M, Ledée N: Tolerance to the foetal allograft? *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):624-36.

Chen N, Field EH. Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation*.1995;59:933–941.

Chen S, Akbar SM, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol* 2011; 166:134–142.

Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N et al.: Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 2008;205:2235–2249.

Cheng Y, Feng Y, Xia Z, Li X, Rong J:  $\omega$ -Alkynyl arachidonic acid promotes anti-inflammatory macrophage M2 polarization against acute myocardial infarction via

regulating the cross-talk between PKM2, HIF-1 $\alpha$  and iNOS. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862(12):1595-1605.

Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol* 2011; 32:19–25.

Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabrilovich DI: HIF-1 $\alpha$  regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2010;207(11):2439-53.

Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, MyCaffrey JC, Gabrilovich DI: Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2009;182(9):5693-701.

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS: HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112(5):645-57.

Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL: A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med* 2011;17(3-4):281-92.

Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA: Cytokines, Chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005;11(6):613-30.

Duffy A, Zhao F, Haile L, Gamrekelashvili J, Fioravanti S, Ma C, Kapanadze T, Compton K, Figg WD, Greten TF: Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62(2):299-307.

Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B: Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008;180(12):7898-906.

Ernerudh J, Berg G, Mjösberg J: Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *Am J Reprod Immunol* 2011;66 Suppl 1:31-43.

Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV: Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science*. 1996;271:1728–1730.

Fortin C, Huang X, Yang Y. NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2012; 189:1843–1849.

Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW: Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(10):1419-30.

Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9(3):162-74.

Georgiev P, Belikoff BG, Hatfield S, Ohta A, Sitkovsky MV, Lukashev D: Genetic deletion of the HIF-1 $\alpha$  isoform I.1 in T cells enhances antibacterial immunity and improves survival in a murine peritonitis model. *Eur J Immunol* 2013;43(3):655-66.

Gervassi A, Lejarcegui N, Dross S, et al. Myeloid Derived Suppressor Cells Are Present at High Frequency in Neonates and Suppress *In Vitro* T Cell Responses. Bueno V, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(9) e107816.

Gille C, Spring B, Tewes LJ *et al.* Diminished response to interleukin-10 and reduced antibody-dependent cellular cytotoxicity of cord blood monocyte-derived macrophages. *Pediatr Res* 2006;60:152–157.

Ginouvès A, Ilc K, Macías N, Pouysségur J, Berra E: PHDs overactivation during chronic hypoxia “desensitizes” HIF $\alpha$  and protects cells from necrosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(12):4745-4750.

Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is essential for cell cycle arrest during hypoxia. Mol Cell Biol 2003;23(1):359-69.

Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB: Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. Blood. 2005 Jan 15; 105(2):750-8.

Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, Espinoza J, Hassan SS: The fetal inflammatory response syndrome. Clin. Obstet. Gynecol. 2007;50(3):652-83.

Greten TF, Manns MP, Korangy F: Myeloid derived suppressor cells in human diseases. Int Immunopharmacol 2011;11(7):802-7.

Haddad EK, Duclos AJ, Anteckla E, Lapp WS, Baines MG: Role of interferon- $\gamma$  in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. Cell Immunol 1997;181(1):68-75.

Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Serody JS, Munn DH, Tolar J, Ochoa AC, Blazar BR: Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. Blood 2010;116(25):5738-47.

Hoehn T, Felderhoff U, Altstaedt J, Obladen M, Bühner C: Hyperoxia- and hypoxia-mediated activation of polymorphonuclear leukocytes: a comparison of cord and adult venous blood Resuscitation 2001; 51 (1): 63 – 68.

Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 1994; 84:4333–4343.

Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I *et al.* Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 2012; 188:1136–1146.

Jin LP, Fan DX, Zhang T, Guo PF, Li DJ: The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2011;66(4):270-8.

Kim Y-J, Broxmeyer HE. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 79:112–126.

Köstlin N, Kugel H, Spring B, Leiber A, Marmé A, Henes M, Rieber N, Hartl D, Poets CF, Gille C: Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur J Immunol* 2014.

Köstlin N, Hofstädter K, Ostermeier AL, Spring B, Leiber A, Haen S, Abele H, Bauer P, Pollheimer J, Hartl D, Poets CF, Gille C: Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. *J Immunol* 2016; 196(3) 1132-1145

Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, Bangham CR, Taylor GP, Herath S, Choi BS, Soler G, Teoh T, Modolell M, Müller I: Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* 2007;37(4):935-45.

Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2010; 185:2273–2284.

Lechner MG, Megiel C, Russell SM, Bingham B, Arger N, Woo T, Epstein AL: Functional characterization of human Cd33<sup>+</sup> and Cd11b<sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med* 2011;9:90.

Leviton A, Damman O and Durum SK: The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. *Ann Neurol* 2005; 58:821-828

Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:379–390.

Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ: The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 2013;138(2):105- 15.

Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H, Dong M: Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS* 2011;119(9):597-604.

Lyons AB, Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171(1):131-7.

Matzinger P: The danger model in its historical context. *Scand. J. Immunol.* 2001; 54, 4–9 10.

Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296, 301–305 10.

Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11(2):1097-0320.

Min B, Legge KL, Caprio JC, Pack CD, Gregg R, McGavin D, Slauson D, Zaghouani H: Neonatal tolerant immunity for vaccination against autoimmunity. *Intern Rev Immunol.* 2000;19:247–264.

Murthy V, Kennea N, et al.: Antenatal infection/inflammation and fetal tissue injury. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2007;21 (3):479 - 489

Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI: Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13(7):828-35.

Nakamura I, Shibata M, Gonda K, Yazawa T, Shimura T, Anazawa T, Suzuki S, Sakurai K, Koyama Y, Ohto H, Tomita R, Gotoh M, Takenoshita S: Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncol Lett.* 2013;5(5):1682-1686.

Neumann AK, Yang J, Biju MP, Joseph SK, Johnson RS, Haase VH, Freedman BD, Turka LA: Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(47):17071-6.

Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porrati F, Benigni A, Picciolo C, Remuzzi G: L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension* 2004;43(3):614-22.

Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, PC: Arginase, Prostaglandins, and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(2): 721s-726s

Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS: HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 2005;115(7):1806- 15.

Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol.* 2007;178:7516–7519.

Piao HL, Tao Y, Zhu R, Wang SC, Tang CL, Fu Q, Du MR, Li DJ: The CXCL12/CXCR4 axis is involved in the maintenance of Th2 bias at the maternal/fetal interface in early human pregnancy. *Cell Mol Immunol* 2012;9(5):423-30.

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E: Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999;196(2):122-30.

Raghupathy R: Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001;13(4):219-27. 71

Raghupathy R, Al-Mutawa E, Al Azemi M, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J: Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J Reprod Immunol* 2009;80 (1-2):91-99

Rieber N, Brand A, Hector A, Graepler-Mainka U, Ost M, Schäfer I, Wecker I, Neri D, Wirth A, Mays L, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Stern M, Hogardt M, Döring G, Riethmüller J, Kormann M, Hartl D: Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 2013;190(3):1276-84.

Rieber N, Gille C, Köstlin N, Schäfer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heininger V, Alkhaled M, Hector A, Mays L, Kormann M, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Poets CF, Hartl D: Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin Exp Immunol* 2013;174(1):45-52.

Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC: Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell

Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer research*. 2009;69(4):1553-1560.

Roemer VM: How to Determine and Use Base Excess (BE) in Perinatal Medicine. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 2007; 211(06):224 – 229.

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M: Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):601-10.

Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY: Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 2012;150(1):29-38.

Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol* 2012;189:5602–5611.

Schulz C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C: Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol* 2004;135:130-136

Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine* 2001;7(8):345 - 350

Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science* 2007

Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, Higgins RD: Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *Jama* 2004; 292:2357-2365

Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, Smith P, Ohta A, Lentsch AB, Lukashev D, Sitkovsky MV: Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS One* 2007; 2(9):e853

Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J: Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:79.

Veglia F, Perego M, Gabrilovich D: Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 2018; 19(2):108-119

Vignesswaran R: Infection and preterm birth: Evidence of a common causal relationship with bronchopulmonary dysplasia and cerebral palsy. *J Paediatr Child Health* 2000; 97:210-215

Volk, H.D., Multiparameteranalysen von mononukleären Zellen mittels Durchflusszytometrie. *Immunologische Arbeitsmethoden* 1991, Jena: Gustav-Fischer Verlag.

Walmsley SR, Cadwallader KA, Chilvers ER. The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol.* 2005; 26:434–439.

Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S: Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996; 97:210-215.

Webster WS, Abela D: The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2007; 81(3):1542-9768.

Zaghouani H, Hoeman CM, Adkins B.: Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol* 2009; 30:585–591.

Zarembek KA, Malech HL: HIF-1 $\alpha$ : a master regulator of innate host defenses? *Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115(7):1702-1704.

Zhang F, Zhong R, Li S, et al. Acute Hypoxia Induced an Imbalanced M1/M2 Activation of Microglia through NF- $\kappa$ B Signaling in Alzheimer's Disease Mice and Wild-Type Littermates. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2017; 9:282.

Zhang W, Liang S, Wu J, Horuzsko A: Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation* 2008; 86(8):1125-34.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
CBMC	Cord Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut
CBP	CREB-binding protein
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetat succinimidyl ester
Cy-5	Cyanin
DFO	Desferrioxamin
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FIH-1	factor inhibiting HIF 1
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony- stimulating factor
HIF-1	hypoxia inducible factor
HIF-1 $\beta$	Untereinheit des hypoxia inducible factor
HIF-1 $\alpha$	Untereinheit des hypoxia inducible factor
HRE	hypoxia responsive element
Hx	Hypoxie
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10

IL-11	Interleukin 11
IL-13	Interleukin13
INF $\gamma$	Interferon-gamma
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
MACS	magnetic cell sorting
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDSC	Myeloid derived supressor cells
MNC	Mononukleare Zellen
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NSB	Nabelschnurblut
Nx	Normoxie
OKT3	monoklonaler Antikörper gegen CD3
P300	binding protein p300
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PHD	Prolyhydroxylase
ROS	reactive oxygen species
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll-like Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von Hippel-Lindau Faktor
VLE-RPMI	very low endotoxin Roswell Park Memorial Institute

## **8.2 *Abbildungsverzeichnis***

Abbildung 1: Regulation von hypoxia-inducible factor - 1  $\alpha$

Abbildung 2: Der Anteil CD66b positiver Zellen ist in Nabelschnurblut deutlich höher als im Blut gesunder Erwachsener

Abbildung 3: Der Anteil CD66b positiver Zellen in Nabelschnurblut ist im Vergleich zum Blut gesunder Erwachsener deutlich erhöht. Mit zunehmendem Alter sinkt der Anteil ab und nähert sich dem Niveau im peripheren Blut gesunder Erwachsener an

Abbildung 4: Phänotypisierung der MDSC

Abbildung 5: Die Arginase-1 Expression ist unter dem Einfluss von DFO erhöht.

Abbildung 6: Unter hypoxischen Kulturbedingungen produzierten Gr-MDSC mehr Arginase-1 als in Normoxie.

Abbildung 7: Die Expression von Arginase-1 ist bei Gr-MDSC welche aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener gewonnen wurden und hypoxisch kultiviert wurden nicht höher als unter normoxischen Kulturbedingungen.

Abbildung 8: Die Arginase-1 Expression von Gr-MDSC ist nach Zugabe von DFO erhöht .

Abbildung 9: MDSC exprimieren unter hypoxischen und normoxischen Kulturbedingungen iNOS.

Abbildung 10: Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener unter normoxischen Bedingungen (rechts) stärker gehemmt als unter hypoxischen Bedingungen (links).

Abbildung 11: Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem Nabelschnurblut generell nur wenig gehemmt. Unter normoxischen Bedingungen (rechts) zeigte sich jedoch eine stärkere Hemmung als unter hypoxischen Bedingungen (links).

Abbildung 12: Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird durch Gr-MDSC gehemmt. Unter normoxischen Kulturbedingungen zeigt sich eine stärkere Hemmung als in Hypoxie.

Abbildung 13: Die Proliferation CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener unter normoxischen Bedingungen (rechts) stärker gehemmt als unter hypoxischen Bedingungen (links).

Abbildung 14: Die Proliferation CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird nach Zugabe von Gr-MDSC aus dem Nabelschnurblut nur wenig gehemmt. Unter normoxischen Bedingungen (rechts) zeigte sich jedoch eine stärkere Hemmung als unter hypoxischen Bedingungen (links).

Abbildung 15: Die Proliferation CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch Gr-MDSC gehemmt. Unter normoxischen Kulturbedingungen zeigt sich eine stärkere Hemmung als in Hypoxie.

### **8.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Probenansätze zur Hemmung der T-Zell-Proliferation

Tabelle 2: Extrazelluläre Färbung

Tabelle 3: Intrazelluläre Färbung

## **8.4 Danksagung**

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, denen ich hier herzlich danken möchte.

Herrn PD Dr. med. Christian Gille danke ich für die Annahme als Doktorand, das überaus spannende Thema und die Begutachtung der Dissertation.

Zudem danke ich ihm für die Betreuung bei dieser herausfordernden Arbeit, die durch steten Ideenaustausch und hohes Engagement geprägt war. Viele Diskussionen und Erklärungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Spring für die Einführung in die Methoden und Arbeitsweisen im Labor. Ihre Ratschläge und die tatkräftige Hilfe bei allen Fragen haben mich immer wieder aufs Neue motivieren können.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. D. Hartl und Dr. N. Rieber danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit beim Erheben einiger Daten. Hier gilt ein ganz besonderer Dank Frau I. Schäfer, dich mich selbst an Wochenenden bei Arbeiten im Labor der Kinderklinik unterstützt hat.

Frau Dr. N. Köstlin und den anderen Doktoranden danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Besonders herzlich danken möchte ich meinen Eltern Norbert und Christa, meinem Bruder Holger und meinem Lebensgefährten Jens, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

## **8.5 Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name	Helen Spieles
Anschrift	Im Kleeacker 19 72072 Tübingen
Tel.	07071/855213
E-Mail	<a href="mailto:helen.spieles@gmx.de">helen.spieles@gmx.de</a>
Geb.	25.05.1985 in Trier
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Berufliche Laufbahn

Seit März 2015	Assistenzärztin
Mai 2010 – Juli 2014	private Pflege
April 2008 – Januar 2012	Tricentenaire a.s.b.l. Luxemburg Gesundheits- und Krankenpflegerin
Oktober 2004 – März 2005	Schwerstbehindertenbetreuung Club Aktiv e.V. Trier
Mai 2004 – April 2005	Tätigkeit in der Gastronomie

### Akademische Laufbahn

Seit März 2015	Assistenzärztin in der Kinder- und Jugendpsychiatrie Tübingen
2008 – 2014	Studium der Humanmedizin Eberhard Karls Universität Tübingen
20.11.2014	Abschluss: Staatsexamen

2005 – 2008

Ausbildung zur Gesundheits- und  
Krankenpflegerin

Krankenhaus der Barmherzigen  
Brüder Trier

Abschluss: Staatsexamen

1995 – 2004

Max-Planck-Gymnasium Trier

Abschluss: Allgemeine

Hochschulreife

1991 -1995

Sankt Cäcilia Grundschule Preist

## 9 Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Gille. Die Versuche wurden von mir durchgeführt.

Die Daten aus Abbildung 4 zum altersabhängigen Anteil von MDSC wurden durch die Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Rieber erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Frau Kathrin Hofstätter war an einem Teil der Durchführung der Versuche zur Bestimmung der T-Zell-Hemmung beteiligt.

Frau Dr. Spring unterstützte mich bei der Etablierung der Versuchsmethoden und leitete mich diesbezüglich an.

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

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

Helen Spieles

Tübingen, den 01.04.2017

## 10 Veröffentlichungen

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

### **Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses.**

Rieber N, Gille C., Köstlin N, Schäfer I, Spring B, Ost M, Spieles H, Kugel HA, Pfeiffer M, Heining V, Alkhaled M, Hector A, Mays L, Kormann M, Zundel S, Fuchs J, Handgretinger R, Poets CF, Hartl D. Clin.Exp.Immunol. 2013 Oct:174(1):45-52.

Zudem wurden Teilergebnisse in einem Vortrag auf der 21. Jahrestagung der DGPI in Würzburg 2013 in Form eines Vortrags präsentiert.