

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

**Granulozytäre MDSC aus dem Nabelschnurblut modulieren
die Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen
zugunsten eines antiinflammatorischen Phänotyps**

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

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

vorgelegt von

Vogelmann, Margit Anja

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. N. Köstlin-Gille
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg
3. Berichterstatter: Professor Dr. R. Adam

Tag der Disputation: 19.05.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Infektionen bei Früh- und Neugeborenen	1
1.2 Besonderheiten des neonatalen Immunsystems	1
1.3 Myeloide Suppressorzellen (MDSC) in der Perinatalzeit	2
1.4 Mechanismen der Aktivierung und Differenzierung von CD4 ⁺ T-Helferzellen	4
1.5 Aktivierung von T-Helferzellen durch Monozyten.....	6
1.6 Ziele der Arbeit.....	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Übersicht über die Vorgehensweise	8
2.2 Patientenkollektiv	8
2.3 Isolation von mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC) und peripherem Blut (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation	9
2.4 Isolation bestimmter Zelltypen aus CBMC/PBMC mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)	10
2.4.1 Positive Selektion von GR-NSB-MDSC aus CBMC	11
2.4.2 Positive Selektion von CD14 ⁺ bzw. CD19 ⁺ Zellen aus PBMC.....	12
2.4.3 Negative Selektion von CD3 ⁺ bzw. CD4 ⁺ Zellen aus PBMC	12
2.5 T-Zell-Proliferationsassay	13
2.6 Co-Kulturen mit GR-NSB-MDSC zur Untersuchung der Polarisierung von CD4 ⁺ T-Helferzellen	14
2.6.1 Co-Kulturen von GR-NSB-MDSC mit PBMC	15

2.6.2	Co-Kulturen mit Transwells	15
2.6.3	Co-Kulturen mit anderen MACS-aufgereinigten Zellarten	15
2.6.4	Co-Kulturen mit Inhibition von MDSC-Effektormechanismen	16
2.6.5	Co-Kulturen mit blockierenden/neutralisierenden Antikörpern	16
2.7	Kultur von CBMC zur Quantifizierung des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf GR-NSB-MDSC	16
2.8	Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Quantifizierung zur Untersuchung der Polarisierung von CD4 ⁺ T-Helferzellen	16
2.8.1	Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen.....	17
2.8.2	Immunfluoreszenzfärbung mit Annexin V	17
2.8.3	Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung der Zytokine IFN- γ und IL-4 zur Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen	18
2.8.4	Extrazelluläre und intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von Tregs	19
2.8.5	Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Quantifizierung des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf GR-NSB-MDSC.....	19
2.9	Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Quantifizierung von MHC-II-Molekülen sowie co-inhibitorischen und co-stimulatorischen Molekülen auf Monozyten nach Inkubation mit GR-NSB-MDSC.....	20
2.10	Statistik	20
3	Ergebnisse.....	22
3.1	GR-NSB-MDSC modulieren die T-Helferzellendifferenzierung in Richtung eines antiinflammatorischen Phänotyps.....	22
3.1.1	GR-NSB-MDSC polarisieren CD4 ⁺ T-Zellen in Richtung Th2-Antworten.....	22
3.1.2	GR-NSB-MDSC induzieren Tregs.....	24

3.2	Die GR-NSB-MDSC-induzierte Suppression von Th1-Zellen benötigt direkten Zellkontakt, ist unabhängig von anderen Zellarten und wird am ehesten durch eine erhöhte Apoptoserate bei Th1-Zellen hervorgerufen.....	25
3.2.1	Die Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC benötigt direkten Zellkontakt	26
3.2.2	An der Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC sind keine anderen Zellarten beteiligt	26
3.2.3	Typische MDSC-Effektormechanismen tragen nicht zur Suppression von Th1-Zellen bei	28
3.2.4	Das co-inhibitorische Molekül PD-L1 ist auf GR-NSB-MDSC exprimiert, eine Blockade der PD-1/PD-L1 Achse führt aber nicht zur Aufhebung der Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC	29
3.2.5	Die Apoptoserate von Th1-Zellen ist bei Inkubation mit GR-NSB-MDSC erhöht, eine Blockade von CD95L zeigt jedoch keinen Effekt	31
3.2.6	Zwischenzusammenfassung I der Ergebnisse.....	33
3.3	Die Th2-Polarisierung durch GR-NSB-MDSC erfolgt über die Expression des Effektormoleküls Arg1 und die Produktion von ROS und ist teilweise abhängig von einer Interaktion mit Monozyten	33
3.3.1	Die Induktion von Th2-Zellen ist größtenteils zellkontaktunabhängig	34
3.3.2	Monozyten beeinflussen die Th2-Induktion.....	34
3.3.3	Die Inhibition der MDSC-Effektormoleküle Arg1 und ROS verringert die Induktion von Th2-Zellen.....	37
3.3.4	Zwischenzusammenfassung II der Ergebnisse.....	39
3.4	Tregs werden teilweise durch iNOS induziert	39
3.4.1	Die Induktion von Tregs ist nicht zellkontaktabhängig	39

3.4.2	Die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC ist unabhängig von anderen Zellarten	40
3.4.3	Bei Inhibition von iNOS ist die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC vermindert	40
3.4.4	Die Blockade von TGF- β und PD-1 führt nicht zu einer Aufhebung der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Tregs.....	41
3.4.5	Zwischenzusammenfassung III der Ergebnisse	42
3.5	GR-NSB-MDSC führen zu einer Verminderung der Expression von MHC-II-Molekülen und zu einer Induktion der Expression co-inhibitorischer Moleküle auf Monozyten	43
3.5.1	GR-NSB-MDSC reduzieren die Expression von MHC-II-Molekülen auf Monozyten	44
3.5.2	GR-NSB-MDSC induzieren co-inhibitorische Moleküle auf Monozyten, die Expression von co-stimulatorischen Molekülen bleibt nahezu unbeeinflusst.....	45
4	Diskussion.....	48
4.1	GR-NSB-MDSC polarisieren CD4 ⁺ T-Zellen in Richtung einer Th2-Antwort und induzieren Tregs	48
4.2	Die Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC benötigt direkten Zellkontakt, ist unabhängig von anderen Zellarten und wird wahrscheinlich durch eine erhöhte Apoptoserate hervorgerufen	50
4.3	Die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird durch die Effektormoleküle Arg1 und ROS hervorgerufen und ist teilweise abhängig von einer Interaktion mit Monozyten	53
4.4	GR-NSB-MDSC induzieren Tregs teilweise durch iNOS	54
4.5	GR-NSB-MDSC führen zu einer Herabregulation von MHC-II-Molekülen auf Monozyten und zu einer Induktion von co-inhibitorischen Molekülen.....	56

4.6	Methodenkritik und Limitationen unseres Systems	58
4.7	Schlussfolgerung	60
5	Zusammenfassung	62
6	Anhang	64
6.1	Charakterisierung von GR-NSB-MDSC	64
6.1.1	Phänotypisierung von GR-NSB-MDSC	64
6.1.2	Nachweis der suppressiven Aktivität von GR-NSB-MDSC	65
7	Literaturverzeichnis	67
	Erklärung zum Eigenanteil.....	75
	Veröffentlichungen	76
	Förderung.....	77
	Danksagung	78

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
Arg1	Arginase 1
CBMC	Cord blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut
CCR4	C-C-Chemokinrezeptor Typ 4, auch CD194
CCR6	C-C-Chemokinrezeptor Typ 6, auch CD196
CD	Cluster of differentiation, „Unterscheidungsgruppen“
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, auch CD183
FACS	Fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FoxP3	Forkhead-box-protein P3
GBS	Gruppe-B-Streptokokken
GR-MDSC	Granulocytic myeloid derived suppressor cells, granulozytäre Suppressorzellen myeloischen Ursprungs
GR-NSB-MDSC	Granulozytäre MDSC aus Nabelschnurblut
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginine
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetic activated cell sorting
MDSC	Myeloid derived suppressor cells, myeloide Suppressorzellen

MFI	Mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-II	Major histocompatibility complex II, Haupthistokompatibilitätskomplex II
MO-MDSC	Monocytic myeloid derived suppressor cells, monozytäre Suppressorzellen myeloischen Ursprungs
NSB-MDSC	MDSC aus Nabelschnurblut
Nor-NOHA	N ^ω -Hydroxy-nor-L-arginine
OKT-3	CD3-spezifischer monoklonaler Antikörper
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PD-L2	Programmed cell death 1 ligand 2
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
Rcf	Relative centrifugal force, relative Zentrifugalkraft
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha, Tumornekrosefaktor-alpha
TGF-β	Transforming growth factor beta, transformierender Wachstumsfaktor-beta
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VLBW	Very low birth weight
1-MT	1-Methyltryptophan

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Aufbaus der Versuche.....	8
Abb. 2:	Isolation von CBMC/PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation..	10
Abb. 3:	Prinzip des Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)	11
Abb. 4:	Reinheit der GR-NSB-MDSC	12
Abb. 5:	GR-NSB-MDSC polarisieren T-Helferzellen in Richtung Th2.....	23
Abb. 6:	GR-NSB-MDSC modulieren die Polarisierung von T-Helferzellen in Richtung Th2	24
Abb. 7:	GR-NSB-MDSC induzieren Tregs	25
Abb. 8:	Die Hemmung von Th1-Antworten benötigt direkten Zellkontakt	26
Abb. 9:	Die Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC ist unabhängig von anderen Zellarten.....	27
Abb. 10:	Klassische MDSC-Effektormoleküle tragen nicht zur Herabregulation von Th1-Zellen bei	28
Abb. 11:	Die Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird nicht durch TGF- β vermittelt	29
Abb. 12:	GR-NSB-MDSC exprimieren das co-inhibitorische Molekül PD-L1 ..	30
Abb. 13:	Die Blockade von PD-1 führt nicht zu einer Aufhebung der Th1- Suppression durch GR-NSB-MDSC.....	31
Abb. 14:	Bei Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC ist die Apoptoserate erhöht.....	32
Abb. 15:	Die Blockade von CD95L hat keinen Effekt auf die GR-NSB- MDSC-vermittelte Th1-Suppression.....	33
Abb. 16:	Die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird größtenteils durch einen zellkontaktunabhängigen Mechanismus vermittelt.....	34
Abb. 17:	An der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Th2-Zellen sind andere Zellarten beteiligt.....	35
Abb. 18:	Monozyten, nicht aber B-Zellen sind an der GR-NSB-MDSC- induzierten Polarisierung von Th2-Zellen beteiligt.....	36

Abb. 19: Die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird durch Blockade von Arg1 und ROS aufgehoben.....	38
Abb. 20: Die Induktion von Tregs benötigt keinen direkten Zellkontakt	39
Abb. 21: Andere Zellarten haben keinen wesentlichen Einfluss auf die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC	40
Abb. 22: Die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC wird durch Blockade von iNOS reduziert	41
Abb. 23: TGF- β und PD-1 haben keinen Einfluss auf die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC.....	42
Abb. 24: GR-NSB-MDSC induzieren eine Herabregulation von MHC-II-Molekülen auf Monozyten	44
Abb. 25: Die GR-NSB-MDSC-vermittelte Herabregulation von MHC-II-Molekülen ist zellkontaktunabhängig.....	45
Abb. 26: GR-NSB-MDSC erhöhen die Expression der co-inhibitorischen Moleküle PDL-1 und PDL-2 auf Monozyten	46
Abb. 27: Die GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion der Expression von PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten ist nicht zellkontaktabhängig	47
Abb. 28: GR-NSB-MDSC modulieren die Differenzierung von T-Helferzellen zugunsten eines antiinflammatorischen Phänotyps.....	60
Abb. 29: Phänotypisierung von humanen GR-NSB-MDSC als CD66b ⁺ /CD33 ⁺ /CD11b ⁺ /HLA-DR ^{-low} /CD14 ⁻ Zellen.....	65
Abb. 30: Nachweis der suppressiven Wirkung von GR-NSB-MDSC auf die Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen.....	66

1 Einleitung

1.1 Infektionen bei Früh- und Neugeborenen

Perinatale Infektionen sind eine der Hauptursachen neonataler Mortalität und Morbidität. In Ländern mit hohem medizinischen Versorgungsstandard beträgt die Inzidenz der Early-onset-Sepsis mit positiver Blut- oder Liquorkultur ca. 1-4 pro 1000 Lebendgeburten, wobei die Rate bei Frühgeborenen umgekehrt zum Gestationsalter ansteigt. Trotz Fortschritten in der Intensivmedizin liegt die Mortalität der Neugeborenenensepsis im Schnitt bei 16%, je niedriger das Gestationsalter desto höher die Mortalität.^[1] Zudem scheinen Infektionen bei Frühgeborenen mit einem schlechteren kognitiven und motorischen Outcome assoziiert zu sein^[2] und gelten zudem als Risikofaktor für die Entstehung von schweren postinflammatorischen Folgeerkrankungen wie bronchopulmonale Dysplasie oder periventrikuläre Leukomalazie.^[3, 4]

1.2 Besonderheiten des neonatalen Immunsystems

Die erhöhte Infektanfälligkeit von Neugeborenen wird vor allem auf eine im Vergleich zum Erwachsenen veränderte Immunantwort zurückgeführt. Lange Zeit wurden die Unterschiede hauptsächlich der Unreife des neonatalen Immunsystems zugeschrieben, sind aber wahrscheinlich eher als Ausdruck der unterschiedlichen Anforderungen *in* und *ex utero* zu sehen.^[5] Der Übergang von der pränatalen in die postnatale Umgebung stellt für das Immunsystem eine große Veränderung dar. Pränatal wächst der Fetus in einer geschützten, nahezu keimfreien Umgebung heran. Um eine Abstoßung des semi-allogenen Feten zu vermeiden, sind inflammatorische Immunantworten supprimiert.^[6, 7] Dieser Zustand scheint auch zur Vermeidung von Gewebeschäden bei physiologisch unter der Geburt entstehenden Inflammationsreaktionen wichtig zu sein.^[5] Postnatal ist das Neugeborene zahlreichen bisher unbekanntem Antigenen ausgesetzt. Einerseits müssen invasive Erreger abgewehrt werden, andererseits muss die Besiedlung der Körperoberflächen mit kommensalen Keimen und damit

die Entwicklung des Mikrobioms ohne zu starke Inflammationsreaktion erfolgen.^[6, 8]

Die Unterschiede des neonatalen Immunsystems zum Immunsystem Erwachsener betreffen sowohl adaptive als auch angeborene Immunantworten.^[9] Bei Neonaten sind beispielsweise die meisten Komplement-Proteine verringert.^[10] Zudem werden neutrophile Granulozyten im Rahmen von Infektionen langsamer nachgebildet und zeigen zahlreiche funktionelle Einschränkungen, wie beispielsweise eine geringere Chemotaxis, verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie eine herabgesetzte Phagozytosefähigkeit.^[9] Durch eine verminderte Expression des Haupthistokompatibilitäts-Komplex II (major histocompatibility complex II, MHC-II) und co-stimulatorischen Molekülen (wie CD80 und CD86) haben neonatale antigenpräsentierende Zellen eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von T- und B-Zellantworten.^[11] Im Unterschied zum Erwachsenen ist die neonatale T-Zellantwort geprägt durch das Überwiegen eher antiinflammatorischer Th2-Antworten und verminderte Th1-Antworten.^[12] Zudem scheint ein vermehrtes Vorkommen von regulatorischen T-Zellen (Tregs) bei Frühgeborenen proinflammatorische Immunantworten zusätzlich zu unterdrücken.^[13]

Diese und weitere Unterschiede zum Immunsystem Erwachsener scheinen zur erhöhten Infektanfälligkeit von Neugeborenen beizutragen. Die immunologischen Mechanismen, welche die Unterschiede zum adulten Immunsystem bedingen, sind bis heute allerdings nur unvollständig verstanden.

1.3 Myeloide Suppressorzellen (MDSC) in der Perinatalzeit

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind eine heterogene Gruppe myeloider Zellen, die hemmend auf andere Immunzellen, insbesondere T-Zellen wirken. MDSC werden zum einen über ihre Oberflächenmarker und zum anderen über ihre Fähigkeit T-Zellantworten zu hemmen, identifiziert. Beim Menschen werden zwei Subtypen unterschieden, monozytäre MDSC (MO-MDSC), welche die Oberflächenmarker CD33 und CD11b für myeloide Zellen und CD14 für Monozyten, aber kein oder nur wenig HLA-DR tragen

(CD33⁺/CD11b⁺/CD14⁺/HLA-DR^{-low}) und granulozytäre MDSC (GR-MDSC), welche kein CD14, dafür aber den granulozytären Marker CD66b exprimieren (CD66b⁺/CD33⁺/CD11b⁺/HLA-DR^{-low}/CD14⁻).^[14] Phänotypisch lassen sich granulozytäre MDSC damit nicht von reifen neutrophilen Granulozyten unterscheiden, können jedoch mittels Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt werden, da GR-MDSC in der Fraktion der mononukleären Zellen sedimentieren.^[15]

MDSC modulieren sowohl angeborene als auch erworbene Immunantworten. Bekannte Mechanismen ihrer inhibitorischen Wirkung sind die Depletion von Arginin durch die Expression der Effektorenzyme Arginase 1 (Arg1) und induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Depletion von Tryptophan durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).^[16] Zudem wurde im Rahmen von Tumorerkrankungen beschrieben, dass MDSC Tregs induzieren und aktivieren können.^[17] Die zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit unklar, bisher wurde die Expression des Oberflächenmoleküls CD40 und die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-10 oder TGF- β durch MDSC mit der Induktion von Tregs in Verbindung gebracht.^[18] Schließlich scheinen MDSC über zahlreiche weitere Wege die Aktivierung und das Überleben von Lymphozyten zu modulieren. Beispielsweise führte die Expression des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf MDSC nach Interaktion mit PD-1 auf T-Zellen zur Hemmung von T-Zellantworten^[19] und die Interaktion zwischen Galectin-9 auf MDSC mit TIM-3 auf T-Zellen zur Apoptose von T-Zellen.^[18]

MDSC sind im Blut gesunder Erwachsener nur in geringer Anzahl nachzuweisen, treten aber unter verschiedenen pathologischen Zuständen, wie Tumorerkrankungen, Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder nach Transplantationen vermehrt auf.^[20, 21] In der Tumorforschung spielen MDSC eine wichtige Rolle, da sie aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung Tumorwachstum und Metastasierung fördern.^[22] In den letzten Jahren konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass GR-MDSC auch in der Plazenta und im Blut Schwangerer sowie im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener in erhöhter Anzahl vorkommen.^[23-26] Im Blut Neugeborener fällt

die Anzahl von GR-MDSC in den ersten 6 Lebenswochen stark ab und erreicht mit ca. 2 Monaten das Niveau von gesunden Erwachsenen.^[24]

Über den Einfluss von MDSC auf das neonatale Immunsystem ist bisher wenig bekannt.^[27] In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass granulozytäre MDSC aus Nabelschnurblut (GR-NSB-MDSC) die T-Zellproliferation hemmen und die Zytotoxizität von NK-Zellen herabsetzen.^[23] Auch Gervassi et al. zeigten den suppressiven Effekt von NSB-MDSC auf die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.^[24] Interessanterweise war eine verminderte Zahl von GR-MDSC im Blut sehr kleiner Frühgeborener assoziiert mit einem vermehrten Auftreten der nekrotisierenden Enterokolitis, einer schweren, oft tödlich verlaufenden Erkrankung des Frühgeborenen-Darms.^[28, 29]

Während MDSC in der Schwangerschaft eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz spielen,^[27, 30] ist ihre Bedeutung beim Neugeborenen derzeit noch unvollständig verstanden. Einerseits könnten sie durch Suppression neonataler Immunantworten zur erhöhten Infektanfälligkeit von Neugeborenen beitragen, andererseits scheinen sie eine wichtige Funktion bei der Regulation von Inflammation, möglicherweise auch im Rahmen der Entwicklung des Mikrobioms, zu haben.^[21]

1.4 Mechanismen der Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen

Die wichtigsten Zielzellen von MDSC sind T-Zellen.^[20] Es ist bereits seit Langem bekannt, dass Neonaten eine im Vergleich zu Erwachsenen unterschiedliche T-Helferzellantwort aufweisen.^[12]

T-Helferzellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des adaptiven und des angeborenen Immunsystems. Sie werden durch den Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen wie zum Beispiel Monozyten aktiviert. Nach Interaktion mit einem über MHC-II präsentierten Antigen und dem T-Zellrezeptor sowie der Aktivierung costimulatorischer Rezeptoren differenzieren sich naive CD4⁺ T-Zellen aus dem Thymus in unterschiedliche T-Helferzell-Subtypen. Welcher T-Helferzell-Subtyp entsteht, hängt von der Intensität der Stimulation

und des Zytokinprofils der Umgebung ab.^[31] Die wichtigsten T-Helferzell-Subtypen sind Th1- und Th2-Zellen, sowie Tregs, Th17-, Th9- Th22- oder folliculäre T-Helferzellen.^[32]

Die verschiedenen T-Helferzell-Subtypen werden charakterisiert durch die von ihnen exprimierten Zytokine, Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren, zudem unterscheiden sie sich in ihrer Funktion. So induzieren Th1-Zellen vor allem über die Aktivierung von Makrophagen mittels INF- γ eher proinflammatorische Immunantworten und sind hauptsächlich für die Abwehr von intrazellulären Erregern relevant.^[33] Th2-Zellen hingegen fördern unter anderem über ihre Leit-Zytokine IL-4 und IL-13 die Aktivierung von B-Zellen, unterstützen Antikörper-Isotypen-Switchs und spielen eine wichtige Rolle in der Parasitenabwehr. Außerdem werden sie auch mit der Entstehung von allergischen Reaktionen und atopischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Durch Suppression von proinflammatorischen Th1-Antworten und Induktion von M2-Makrophagen fördern sie eher antiinflammatorische Typ2-Immunantworten.^[34, 35] Regulatorische T-Zellen entstehen entweder im Thymus (nTreg) oder in der Peripherie aus naiven T-Zellen (iTreg). Sie spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und verhindern durch Suppression anderer T-Effektorzellen und antigenpräsentierender Zellen überschießende Immunantworten.^[33] Th17-Zellen sind vorwiegend für die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen relevant,^[33] während Th22-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr gramnegativer Bakterien spielen. Vor einigen Jahren wurden zudem folliculäre T-Helferzellen beschrieben, die in Lymphfollikeln die Produktion von Antikörpern unterstützen und Th9-Zellen, die bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sind.^[31, 36]

Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass zwischen den T-Helferzell-Subtypen eine gewisse Plastizität besteht. So können sich nach erfolgter Differenzierung unter bestimmten Bedingungen Subtypen ineinander umwandeln. Th1- und Th2-Zellen scheinen dabei relativ stabile Subtypen zu sein, regulatorische T-Zellen oder Th17-Zellen zeigen hingegen eine höhere Plastizität.^[33]

Inwieweit GR-MDSC aus Nabelschnurblut die Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen beeinflussen, war zum Zeitpunkt dieser Promotionsarbeit nahezu unbekannt.

1.5 Aktivierung von T-Helferzellen durch Monozyten

Monozyten gehören zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen und spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen. Nach initialer Stimulation der T-Zellen durch Interaktion eines über MHC-II präsentierten Antigens und dem T-Zellrezeptor werden zur vollständigen Aktivierung weitere co-stimulatorische Signale benötigt. Diese können zum Beispiel durch die auf Monozyten exprimierten Rezeptoren CD80/CD86 vermittelt werden. Neben co-stimulatorischen Rezeptoren werden allerdings auch co-inhibitorische Rezeptoren wie PD-1 oder CTLA-4 exprimiert, die die Aktivierung von T-Zellen hemmen, die Zytokinausschüttung und Proliferation vermindern und die T-Zelldifferenzierung beeinflussen.^[37, 38]

Ob GR-NSB-MDSC die Expression von MHC-II- oder co-stimulatorischen bzw. co-inhibitorischen Molekülen auf Monozyten beeinflussen und somit gegebenenfalls auch indirekt die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen modulieren war ebenfalls bisher nicht bekannt.

1.6 Ziele der Arbeit

Die immunologischen Mechanismen, welche die erhöhte Infektanfälligkeit von Neu- und Frühgeborenen bedingen, sind bis heute nur unvollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob GR-MDSC, die vermehrt im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener vorkommen, zur veränderten Immunantwort von Neugeborenen, insbesondere zur veränderten T-Zellantwort, beitragen. Da im neonatalen Immunsystem ein Überwiegen von Th2-Antworten und zuletzt auch eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen beschrieben wurde, untersuchten wir zunächst, ob (1) GR-NSB-MDSC T-Helferzellantworten in Richtung einer Th2-Antwort verschieben und (2) ob GR-NSB-MDSC eine Induktion von Tregs bewirken. Außerdem wurde untersucht, (3) über welche Mechanismen diese Modulationen der T-Zellantwort vermittelt

werden. Da außerdem bekannt ist, dass neonatale antigenpräsentierende Zellen eine geringere Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung aufgrund einer verminderten Expression von MHC-II-Molekülen und co-stimulatorischen Molekülen besitzen, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Hypothese überprüft, dass (4) GR-NSB-MDSC die Expression von MHC-II-Molekülen, co-stimulatorischen und co-inhibitorischen Molekülen auf Monozyten modulieren.

Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Rolle von MDSC im neonatalen Immunsystem beitragen, um möglicherweise in Zukunft neue präventive oder therapeutische Ansätze für die Behandlung neonataler Infektionen entwickeln zu können und so die Mortalität und Morbidität in der Neonatalperiode zu verringern.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht über die Vorgehensweise

Einleitend ist der grundlegende Aufbau der Experimente schematisch dargestellt.

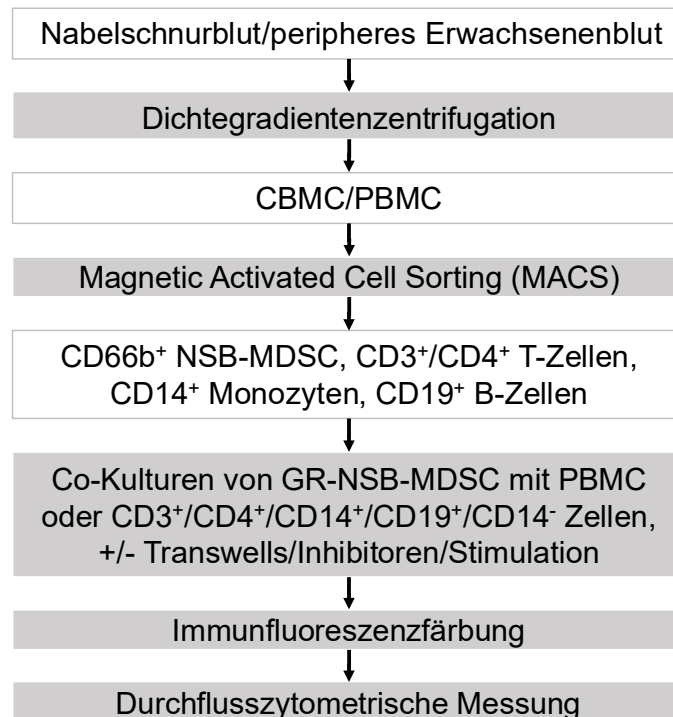


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Versuche

2.2 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurde Nabelschnurblut von reifen, gesunden Neugeborenen unmittelbar nach Kaiserschnittentbindung (Sectio caesarea) gewonnen und mit 4-6 IU Heparin pro ml Nabelschnurblut versetzt (Heparin-Natrium, B. Braun, Melsungen, Deutschland). Neugeborene mit Amnioninfektionssyndrom wurden ausgeschlossen. Die Verwendung des Nabelschnurblutes erfolgte anonymisiert, so dass keine Rückschlüsse auf Geschlecht, genaues Gestationsalter, Indikation für den Kaiserschnitt etc. gezogen werden konnten. Alle Mütter hatten ihr schriftliches, informiertes Einverständnis zur Verwendung des Nabelschnurblutes für das

Forschungsvorhaben gegeben. Eine Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Tübingen lag vor (Projektnummer 178/2011B01). Peripheres Blut von Erwachsenen wurde von gesunden, jungen, freiwilligen Blutspendern abgenommen und ebenfalls heparinisiert.

2.3 Isolation von mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC) und peripherem Blut (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Bei der von Böyum in den 1960er Jahren entwickelten Methode der Dichtegradientenzentrifugation wird mithilfe einer inerten Substanz ein Dichtegradient in einem Zentrifugenröhrchen aufgebaut. Durch Zentrifugation können anschließend verschiedene Zelltypen im Blut aufgrund ihrer Dichte und damit unterschiedlichem Sedimentationsverhalten aufgetrennt werden.^[39]

In unseren Versuchen wurden mononukleäre Zellen (Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und MDSC) aus Nabelschnurblut (cord blood mononuclear cells, CBMC) und peripherem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Zunächst wurde dazu Nabelschnurblut und peripheres Blut im Verhältnis 1:1 bis 1:2 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Dulbecco, Biochrom, Berlin, Deutschland) vermischt und vorsichtig auf 15 ml Biocoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom, Berlin, Deutschland) aufgeschichtet. Sämtliche Arbeiten fanden unter einer Sterilbank (Heraeus GmbH, Stuttgart, Deutschland) statt. Nach Zentrifugation (25 min, 20 °C, 400 rcf, Zentrifuge Rotanta 460 RS, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland) befanden sich Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer hohen Dichte in der untersten Phase, die weniger dichten mononukleären Zellen inklusive GR-NSB-MDSC bildeten eine schmale Phase zwischen Biocoll und Blutplasma (siehe Abb. 2).^[40] Diese Phase wurde mit einer 10 ml Pipette (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) abgenommen. Es folgten zwei Waschschrte, bei denen die CBMC und PBMC in PBS gewaschen wurden (Zentrifuge: 10 min, 10 °C, 500 rcf bzw. 10 min, 4 °C, 400 rcf). Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Hämocytometers (Sysmex KX-21-N, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) oder einer Neubauerzählkammer (Karl Hecht GmbH & Co. KG, „Assistent“, Sondheim/Rhön, Deutschland). Nach

Resuspension in PBS wurden die Zellen bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

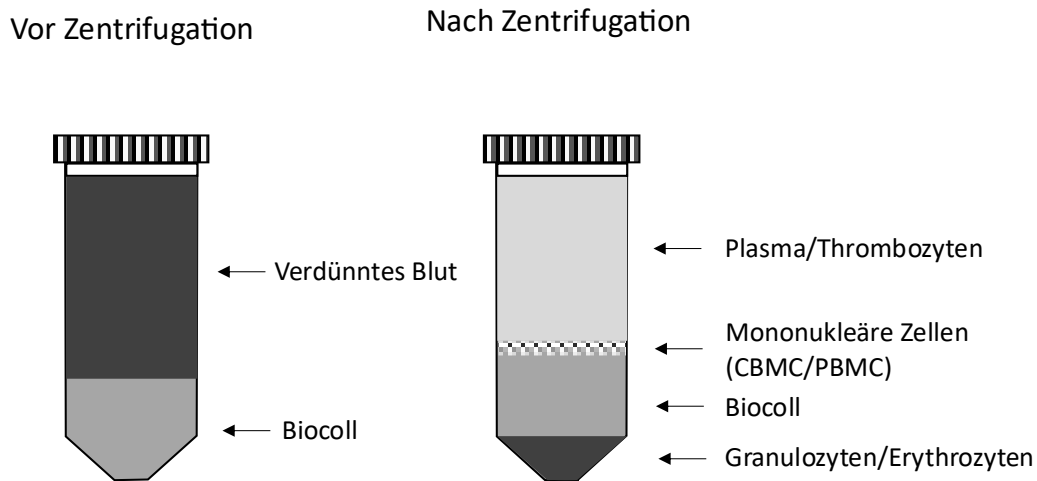


Abb. 2: Isolation von CBMC/PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zustand nach Zentrifugation: die Blutbestandteile sind nach ihrer Dichte aufgetrennt. Die schmale Phase mit CBMC/PBMC wird vorsichtig abpipettiert und weiterverarbeitet.^[40]

2.4 Isolation bestimmter Zelltypen aus CBMC/PBMC mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Das Verfahren des Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) wurde in den 1990er Jahren von der Firma Miltenyi Biotec zur Isolation bestimmter Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene entwickelt. Dabei werden sogenannte MicroBeads verwendet, ca. 100 nm große Magnetpartikel, die über Antikörper an Zelloberflächenantigene gebunden werden. Die mit MicroBeads markierten Zellen werden beim Durchfluss durch eine von einem Hochgradienten-Magnetfeld umgebenen Säule zurückgehalten und können nach Entfernen des Magnetfelds aus der Säule ausgespült werden (siehe Abb. 3). Es können sowohl die markierten Zellen (positive Selektion) als auch die unmarkierten Zellen (negative Selektion) für die weiteren Versuche verwendet werden.^[41]

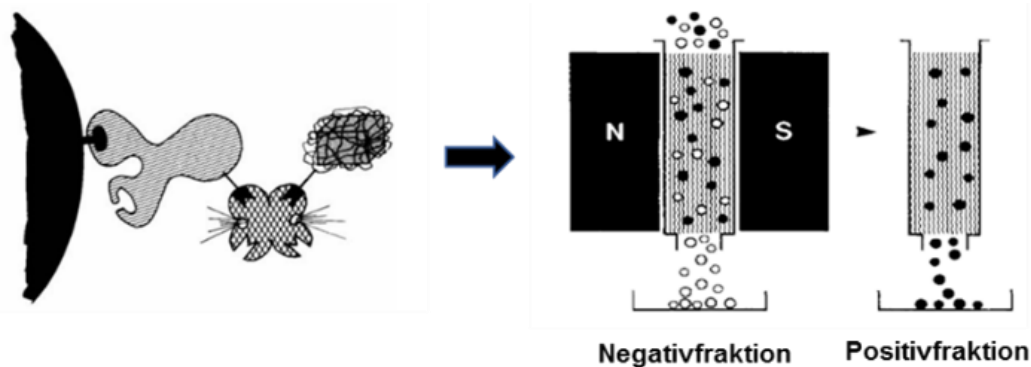


Abb. 3: Prinzip des Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Mit Dextran umhüllte Eisenpartikel (MicroBeads) werden über Antikörper an Zelloberflächenantigene gebunden. Ein magnetisches Feld hält die markierten Zellen bei der Passage durch eine Säule zurück. Nach Aufheben des Magnetfeldes können die markierten Zellen aus der Säule ausgespült werden. Abbildung aus ^[41]

2.4.1 Positive Selektion von GR-NSB-MDSC aus CBMC

Zur Anreicherung von GR-NSB-MDSC aus CBMC mittels MACS wurden CBMC zunächst in MACS Running Buffer (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) gewaschen (Zentrifuge: 10 min, 4 °C, 400 rcf) und anschließend bis zu 1×10^8 steril aufgereinigte CBMC mit 80 µl anti-CD66b FITC Antikörpern (Klon G10F5, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für 10 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit MACS Running Buffer (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 1204 rpm) anschließend wurden die Zellen in 2 ml MACS Running Buffer resuspendiert. Alle verwendeten Reagenzien waren auf 4 °C gekühlt. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter einer Sterilbank statt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit anti-FITC magnetic beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) bei 4 °C und Dunkelheit. Nach einem erneuten Waschschrift zur Entfernung der überzähligen MicroBeads wurden die CD66b⁺ Zellen mit einem autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) über zwei Säulen positiv selektiert. Die Reinheit der GR-NSB-MDSC wurde durchflusszytometrisch (Durchflusszytometer FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ermittelt und lag zwischen 93-98% (siehe Abb. 4). Nach der Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung mit Tryphanblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden die Zellen abzentrifugiert (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 310 rcf) und in einer Konzentration

von 5×10^6 Zellen/ml in Vollmedium (RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin, alle Reagenzien von Biochrom, Berlin, Deutschland) aufgenommen.

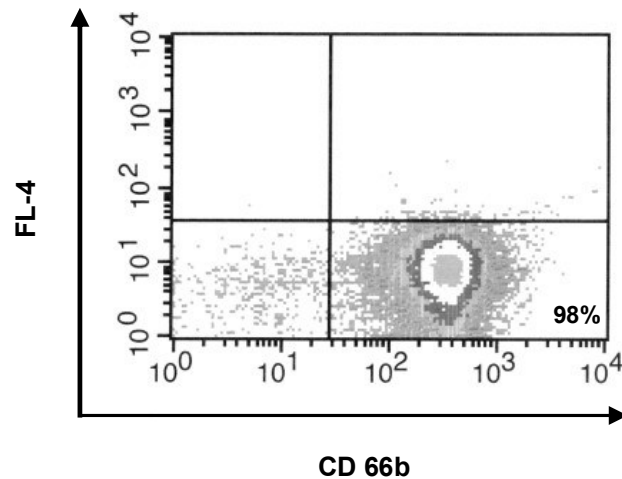


Abb. 4: Reinheit der GR-NSB-MDSC

Die Reinheit der mittels MACS aufgereinigten GR-NSB-MDSC lag zwischen 93-98%.

2.4.2 Positive Selektion von CD14⁺ bzw. CD19⁺ Zellen aus PBMC

Zur Isolation von CD14⁺ Monozyten bzw. CD19⁺ B-Zellen aus PBMC wurde die gewünschte Menge an steril isolierten PBMC zentrifugiert (Zentrifuge: 10 min, 4 °C, 310 rcf) und in 80 µl MACS Running Buffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Alle verwendeten Reagenzien waren auf 4 °C gekühlt. Nach Inkubation für 15 min bei 4 °C in Dunkelheit mit 20 µl CD14 bzw. CD19 MicroBeads pro 10^7 Zellen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) folgte ein Waschschriff (Zentrifuge: 10 min, 4 °C, 310 rcf) mit MACS Running Buffer und die Positiv-Selektion der markierten Zellen mithilfe des autoMACS Pro Separator. Nach Zellzahlbestimmung mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer wurden die Zellen abzentrifugiert (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 310 rcf) und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Vollmedium aufgenommen.

2.4.3 Negative Selektion von CD3⁺ bzw. CD4⁺ Zellen aus PBMC

Um eine Aktivierung der Zellen durch Positivselektion zu vermeiden, wurden die T-Zellen durch negative Selektion mittels MACS nach dem Protokoll von Miltenyi

Biotec angereichert. Dazu wurden PBMC wie oben beschrieben steril isoliert, die gewünschte Menge an PBMC zentrifugiert (Zentrifuge: 10 min, 4 °C, 310 rcf) und die Zellen in 40 µl MACS Running Buffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Alle verwendeten Reagenzien waren auf 4 °C gekühlt. Zur Isolation von CD3⁺ Zellen folgte eine 10-minütige Inkubation bei 4 °C und Dunkelheit mit 10 µl Pan T Cell Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen (Antikörper-Mix gegen CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 und CD235a, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland). Nach erneuter Zugabe von 30 µl MACS Running Buffer pro 10^7 Zellen wurde 20 µl Pan T Cell MicroBead Cocktail (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) pro 10^7 Zellen zugegeben und erneut 10 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte die Negativ-Selektion der Zellen mithilfe des autoMACS Pro Separator. Nach Ermittlung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen abzentrifugiert (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 310 rcf) und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Vollmedium aufgenommen. Die Aufreinigung der CD4⁺ T-Helferzellen erfolgte nach dem gleichen Protokoll, allerdings wurde der CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail (Antikörper-Mix gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und CD235a) und der CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail verwendet (beides von Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland).

2.5 T-Zell-Proliferationsassay

Um die suppressive Wirkung von GR-NSB-MDSC auf die T-Zellproliferation nachzuweisen, führten wir T-Zell-Proliferationsassays nach Lyons und Parish durch.^[42] Dabei wird die Proliferation von T-Lymphozyten mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE; Invitrogen, Heidelberg, Deutschland) durchflusszytometrisch analysiert. Der Farbstoff bindet an intrazelluläre Moleküle und wird bei einer Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, sodass die Stärke der Fluoreszenz mit jeder Generation abnimmt. Dadurch können Tochtergenerationen durchflusszytometrisch von der Ausgangszellgeneration unterschieden werden.^[43]

Zunächst wurden steril isolierte PBMC eines gesunden, erwachsenen Spenders auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in PBS eingestellt und anschließend mit 25 μ l/ml einer 1:50 verdünnten 5 mM CFSE-Lösung (Invitrogen, Heidelberg, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff zu inaktivieren, wurden die Zellen anschließend für 2 Minuten mit 1 ml FCS inkubiert und dann in 10 ml RPMI 1640 gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 310 rcf). Nach Zellzählung und Aufnahme in RPMI 1640 Medium mit 10% autologem Serum des jeweiligen Spenders und 1% Penicillin/Streptomycin folgte die Stimulation der CFSE-gefärbten PBMC mit 100 U/ml Interleukin-2 (IL-2; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) und 1 μ g/ml OKT3 (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland). Die Kultur der Zellen erfolgte in 96-well Rundbodenkulturplatten (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) wobei 60 000 CFSE-gefärbte PBMC entweder mit 30 000 (2:1) oder 15 000 (4:1) GR-NSB-MDSC inkubiert wurden. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte PBMC, als Positivkontrolle stimulierte PBMC ohne GR-NSB-MDSC. Nach 4-tägiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ (Brutschrank: Heraeus Instruments, Stuttgart, Deutschland) wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer, einer 0,1%igen Lösung aus Natriumazid (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und FACS-Flow Sheath Fluid (BD Biosciences, San Diego, USA) gewaschen. Es folgte die extrazelluläre Färbung durch Zugabe von 1 μ l anti-CD4 APC (Klon RPA-T4, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) je Röhrchen und eine 10-minütige Inkubation bei 4 °C und Dunkelheit. Nach einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer wurde die CFSE-Intensität durchflusszytometrisch analysiert.

2.6 Co-Kulturen mit GR-NSB-MDSC zur Untersuchung der Polarisierung von CD4⁺ T-Helferzellen

Um den Einfluss von GR-NSB-MDSC auf die Polarisierung von CD4⁺ T-Helferzellen zu untersuchen, wurden unterschiedlichen Zellpopulationen mit und ohne GR-NSB-MDSC inkubiert.

2.6.1 Co-Kulturen von GR-NSB-MDSC mit PBMC

Es erfolgte die Co-Kultur von in Vollmedium aufgenommenen PBMC (Konzentration: 1×10^6 PBMC/ml) und GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 in 48-well Kulturplatten (0,5 ml/well, Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Als Kontrolle dienten PBMC ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC. Nach Inkubation von 4-5 Tagen bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen entnommen, extra- oder intrazellulär gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.2 Co-Kulturen mit Transwells

Um die Zellkontaktabhängigkeit der Effekte zu untersuchen, erfolgte die Co-Kultur von PBMC mit GR-NSB-MDSC getrennt durch eine Membran (transwell). Dazu wurden PBMC in einer Konzentration von 1×10^6 PBMC/ml in 24-well Kulturplatten (1ml/well, Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit GR-NSB-MDSC in einem 0,4 µm-Transwell (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) im Verhältnis 2:1 für 4-5 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten PBMC ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC und PBMC mit GR-NSB-MDSC in direktem Zellkontakt.

2.6.3 Co-Kulturen mit anderen MACS-aufgereinigten Zellarten

Um zu untersuchen, ob die Effekte von GR-NSB-MDSC auf den T-Zell-Phänotyp direkt oder über andere Zellreihen vermittelt werden, erfolgte die Co-Kultur von GR-NSB-MDSC mit CD3⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen sowie mit einer Kombination aus CD3⁺ T-Zellen und CD14⁺ Monozyten (Verhältnis 2:1) oder einer Kombination von CD3⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen (Verhältnis 2:1) sowie mit CD14-depletierten PBMC. Die einzelnen Zellarten wurden wie oben beschrieben durch positive bzw. negative Selektion angereichert, auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml im jeweiligen Verhältnis eingestellt und mit GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 in 48-well Kulturplatten 4-5 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Ziel-Zellen bzw. Zellgemische ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC.

2.6.4 Co-Kulturen mit Inhibition von MDSC-Effektormechanismen

Zur Blockade von bekannten Mechanismen der inhibitorischen Wirkung von MDSC fügten wir den Co-Kulturen einmalig spezifische Inhibitoren für Arginase 1 (Arg1) (N^ω-Hydroxy-nor-arginine, nor-NOHA, 5 μM, Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), induzierbare NO-Synthetase (iNOS) (N^G-Monomethyl-L-arginine, L-NMMA, 500μM, Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (catalase, 500mIU, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (1-Methyl-DL-tryptophan, 50μM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zu. Als Kontrolle dienten Co-Kulturen ohne Zugabe von Inhibitoren mit und ohne GR-NSB-MDSC.

2.6.5 Co-Kulturen mit blockierenden/neutralisierenden Antikörpern

Um weitere MDSC-Signalwege zu untersuchen, wurden zusätzlich Co-Kulturen mit blockierenden Antikörpern gegen TGF-β (Klon 1D11, 5μg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), CD95L (Klon 100419, 10μg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA) und PD-1 (Nivolumab, 10μg/ml, Bristol-Myers Squibb, New York, USA) inkubiert.

2.7 Kultur von CBMC zur Quantifizierung des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf GR-NSB-MDSC

Zur Bestimmung der Expression des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf GR-NSB-MDSC wurden CBMC in Vollmedium für 24 oder 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und zusätzlich mit 200 ng/ml IFN-γ (R&D Systems, Minneapolis, USA) stimuliert. Als Vergleich dienten unstimulierte Zellen.

2.8 Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Quantifizierung zur Untersuchung der Polarisierung von CD4⁺ T-Helferzellen

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren um Zelltypen anhand ihrer Größe und Granularität oder nach Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen anhand ihrer extra- bzw. intrazellulären Antigene zu unterscheiden. Dazu werden

die zu untersuchenden Zellen einzeln durch eine Messkammer („flow cell“) geleitet, mit einem Laserstrahl angeregt und das entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal von einem Detektor analysiert. Die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Das Ergebnis der Messung kann in einem sogenannten „Dot-plot“, bei dem jeder Punkt einer gemessenen Zelle (genauer: einem gemessenen Ereignis) entspricht, dargestellt werden.

Die Analyse unserer Proben erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), für die Auswertung wurde das Softwareprogramm CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

2.8.1 Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen

Die extrazelluläre immunphänotypische Charakterisierung von CD4⁺ T-Helferzell-Subtypen über die Chemokinrezeptoren CD183, CD194 und CD196 erfolgte basierend auf einem bereits publizierten Protokoll.^[25] Zur Färbung wurden 100 µl Zellsuspension (Konzentration 1x10⁶ Zellen/ml) in FACS-Röhrchen überführt (5 ml round-bottom polystyrene test tubes, BD Falcon, New Jersey, USA) und mit 2,5 µl anti-CD194 FITC (Klon 205410, R&D Systems, Minneapolis, USA), 2 µl anti-CD183 PE (Klon 1C6/CXCR3, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), 3 µl anti-CD4 PerCP (Klon VIT4, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) und 1,5 µl anti-CD196 APC (Klon 11A9, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für 10 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurde der Anteil der CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻ Th1-Zellen und CD4⁺/CD183⁻/CD194⁺/CD196⁻ Th2-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.8.2 Immunfluoreszenzfärbung mit Annexin V

Um Hinweise auf den Einfluss von GR-NSB-MDSC auf die Apoptose von T-Helferzellsubtypen zu bekommen, wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt. Annexin V ist ein zelluläres Protein, das spezifisch an Phosphatidylserin bindet,

ein Phospholipid welches bereits in frühen apoptotischen Stadien einer Zelle von der inneren (zytosolischen) Membranseite auf die äußere (extrazelluläre) Membranseite transloziert wird. Durch Markierung von Annexin V mit einem Fluorochrom können die apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden.^[44]

Zunächst erfolgte ein Waschschrift mit Annexin-Puffer, bestehend aus 2 g Natriumazid (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 81,81 g NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 3,68 g Calciumchloriddihydrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 23,82 g Hepes (C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), mit 1N NaOH (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf einen pH von 7,4 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und Dunkelheit mit folgenden Reagenzien inkubiert: 1 µl anti-Annexin V FITC, 1 µl anti-CD4 APC (Klon RPA-T4), 2 µl anti-CD4 PE (Klon RPA-T4), 0,05 µl anti-Annexin V APC, 2 µl anti-CD183 PE (Klon 1C6/CXCR3), (alle Antikörper von BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), 2,5 µl anti-CD194 FITC (Klon 205410, R&D Systems, Minneapolis, USA). Nach einem erneuten Waschschrift mit Annexin-Puffer folgte die durchflusszytometrische Messung.

2.8.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung der Zytokine IFN- γ und IL-4 zur Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen

Außer über Oberflächenmarker können T-Helferzell-Subtypen auch anhand ihrer Zytokine differenziert werden. Deshalb erfolgte die intrazelluläre Färbung der Leit-Zytokine IFN- γ und IL-4 zur Identifizierung von Th1- bzw. Th2-Zellen nach Co-Kultur mit GR-NSB-MDSC. Dazu wurden die Zellen zunächst 4-6 Stunden mit 4 µl GolgiPlug (BD Bioscience, San Jose, USA) pro 500 µl Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, um eine Akkumulation von Zytokinen im Golgi-Apparat und somit eine bessere durchflusszytometrische Detektierbarkeit zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen mit 1% BSA (Bovines Serumalbumin, Boehringer Mannheim, Deutschland) gewaschen (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 310 rcf) und zur extrazellulären Färbung mit 2 µl anti-CD4 APC 10 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Es folgte die Überführung der Zellen in eine 96-well-Rundbodenkulturplatte (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

und ein erneuter Waschschrift mit 1% BSA. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen 20 min bei 4 °C und Dunkelheit mit 200 µl Fixation/Permeabilization Solution inkubiert und anschließend mit Perm/Wash Buffer (beides von BD Bioscience, San Jose CA, USA) gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C und Dunkelheit mit 3 µl anti-IFN-γ FITC (Klon B27) oder 3 µl anti-IL-4 PE (Klon 8D4-8). Als Kontrolle diente eine ungefärbte Probe und eine Probe mit Färbung von ZAP-70 (Klon 1E7.2) zum Nachweis der gelungenen Permeabilisierung (alle Antikörper von BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA). Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der T-Helferzell-Subtypen.

2.8.4 Extrazelluläre und intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von Tregs

Zur Identifizierung und Quantifizierung von CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Tregs wurde das Human Regulatory T Cell Staining Kit #3 von eBioscience (San Diego, USA) verwendet. Zunächst wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit Staining Buffer zur extrazellulären Färbung mit 5 µl anti-CD4 FITC (Klon RPA-T4) und 5 µl anti-CD25 APC (Klon BC96) 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit Staining Buffer erfolgte bei Raumtemperatur zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen eine 60-minütige Inkubation mit Fixation/Permeabilization Working Solution. Anschließend wurden die Zellen mit Permeabilization Buffer erneut gewaschen und durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit 5 µl anti-FoxP3 PE-Cyanine5 (Klon PCH101) intrazellulär gefärbt. Als Kontrolle diente eine Färbung mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper (Isotype Control PE-Cyanine5). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Permeabilization Buffer erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der Zellen.

2.8.5 Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Quantifizierung des co-inhibitorischen Moleküls PD-L1 auf GR-NSB-MDSC

Zur Quantifizierung des coinhibitorischen Moleküls PD-L1 auf GR-NSB-MDSC wurden 100 µl der wie unter 2.7 beschrieben kultivierten CBMC-Zellsuspensionen mit fluoreszierenden Antikörpern für 10 min bei 4 °C und

Dunkelheit inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: 1 µl anti-CD66b FITC (Klon G10F5, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), 0,1 µl anti-PD-L1 APC (Klon 29E.2A3, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

2.9 Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Quantifizierung von MHC-II-Molekülen sowie co-inhibitorischen und co-stimulatorischen Molekülen auf Monozyten nach Inkubation mit GR-NSB-MDSC

PBMC wurden mit GR-NSB-MDSC wie in 2.6.1. und 2.6.2. beschrieben inkubiert. Zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von MHC-II Molekülen sowie co-inhibitorischen und co-stimulatorischen Molekülen auf Monozyten wurden anschließend je 100 µl Zellsuspension mit fluoreszierenden Antikörpern für 10 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: 0,5 µl anti-CD14 PerCP Cy5.5 (Klon M5E2), 0,25 µl anti-CD14 APC (Klon MΦP9), 1 µl CD80 PE (Klon L307.4), 0,5 µl CD86 PerCP Cy5.5 (Klon 2331 FUN-1), 0,5 µl HLA-DR PerCP Cy5.5 (Klon G46-6) (alle Antikörper von BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), 15 µl anti-HLA-DP FITC (Klon BRAFB6, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), 1 µl anti-HLA-DQ PE (Klon REA303, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland), 0,1 µl anti-PD-L1 APC, 1 µl anti-PD-L2 PE (Klon 24F.10C12, BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA). Anschließend erfolgte nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer (Zentrifuge: 5 min, 4 °C, 310 rcf) die durchflusszytometrische Quantifizierung.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Bei den Experimenten mit Co-Kulturen handelte es sich um verbundene Stichproben. Die Daten wurden zunächst mithilfe des d'Agostino and Pearson omnibus normality test auf Gauss'sche Normalverteilung überprüft. Zur Signifikanztestung wurden der paired t-test bei normalverteilten Daten und der Wilcoxon matched-pairs signed rank test bei nicht normalverteilten Daten verwendet. In den Abbildungen 5 bis 23 sowie in Abbildung 30 sind die Mittelwerte und Standardabweichung

angegeben und dargestellt, in den Abbildungen 24 bis 28 die Mediane. Ab einem p-Wert $< 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Folgende Ergebnisse und Abbildungen wurden bereits veröffentlicht: Abbildungen 5-23 und 28-30 in ^[45] und Abbildungen 24-27 in ^[46].

3.1 GR-NSB-MDSC modulieren die T-Helferzellendifferenzierung in Richtung eines antiinflammatorischen Phänotyps

Beim Neugeborenen sind im Vergleich zum Erwachsenen die T-Zellantworten in Richtung antiinflammatorischer Th2-Antworten verschoben.^[12] Zudem wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Anzahl an Tregs bei Frühgeborenen und Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen erhöht ist.^[13, 47] Die Mechanismen, die zu diesen Veränderungen in der Polarisierung/Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen im neonatalen Immunsystem führen, sind bisher kaum bekannt. Um herauszufinden, ob MDSC diese Veränderungen mitbedingen, untersuchten wir, ob GR-NSB-MDSC die Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen beeinflussen.

3.1.1 GR-NSB-MDSC polarisieren CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th2-Antworten

Um den Einfluss von GR-NSB-MDSC auf die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen zu untersuchen, isolierten wir GR-MDSC mittels MACS aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener und inkubierten sie in Co-Kultur mit PBMC von gesunden Erwachsenen. Die immunphänotypische Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch über die Chemokinrezeptoren CXCR3 (CD183), CCR4 (CD194) und CCR6 (CD196). In Abb. 5A sind die verwendeten Gating-Strategien abgebildet (Th1-Zellen: CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻; Th2-Zellen: CD4⁺/CD183⁻/CD194⁺/CD196⁻). Nach vier- bis fünftägiger Co-Kultur zeigte sich eine signifikante Verringerung des Anteils von Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen bei Inkubation der PBMC mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zur Inkubation von PBMC allein (5,6% ± 4,3% vs. 9,9% ± 3,0%, n = 10, ***p = 0,0003, Abb. 5B). Der Anteil von Th2-Zellen an allen CD4⁺-Zellen war durch die Inkubation mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zur Kontrolle ohne GR-NSB-MDSC signifikant erhöht (15,4% ± 7,3% vs. 10,2 ± 3,8%, n = 10, **p < 0,01, Abb. 5C).

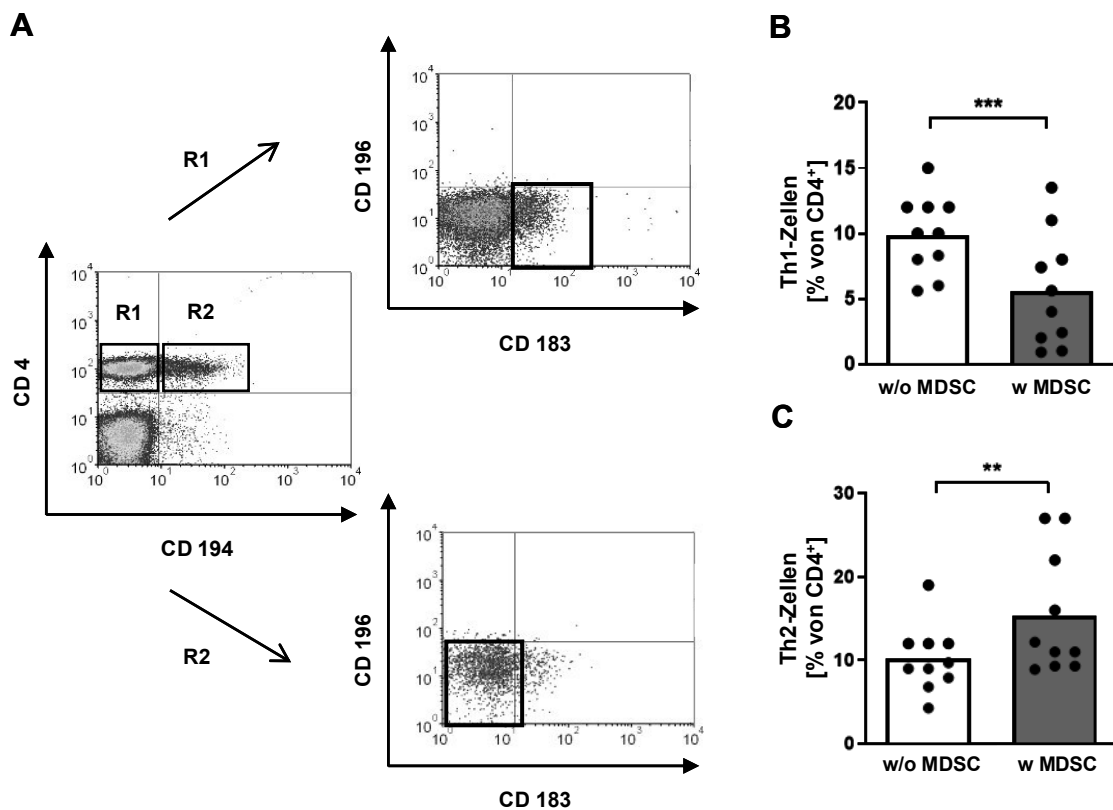


Abb. 5: GR-NSB-MDSC polarisieren T-Helferzellen in Richtung Th2

PBMC von gesunden Erwachsenen wurden sowohl ohne als auch mit GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 für 4-5 Tage kultiviert. Anschließend wurde der Anteil von CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻ Th1-Zellen und CD4⁺/CD183⁻/CD194⁺/CD196⁻ Th2-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **(A)** Gating-Strategie zur Quantifizierung von Th1- und Th2-Zellen. **(B+C)** Die Punkte-Balken Diagramme zeigen den Anteil von Th1-Zellen (B) und Th2-Zellen (C) an allen CD4⁺ Zellen nach vier- bis fünftägiger Kultur von PBMC ohne GR-NSB-MDSC (w/o MDSC) und PBMC in Co-Kultur mit GR-NSB-MDSC (w MDSC). n = 10, *** p = 0,0003, ** p < 0,01, paired t-test.

Dieses Ergebnis bestätigten wir durch intrazelluläre Färbung der Leitzytokine IFN- γ für Th1-Zellen und IL-4 für Th2-Zellen bei gleichem Versuchsansatz. Abbildung 6A zeigt exemplarische Density Plots eines solchen Versuchs. Auch hier zeigte sich eine signifikante Verringerung des Anteils von IFN- γ ⁺ Th1-Zellen bei Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zu PBMC ohne GR-NSB-MDSC (1,5% \pm 2,9% vs. 3,8% \pm 4,9%, n = 14, ***p = 0,0002, Abb. 6B) und eine signifikante Zunahme von IL-4⁺ Th2-Zellen bei Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zu PBMC allein (30,3% \pm 13,5% vs. 10,8% \pm 9,0%, n = 14, ****p < 0,0001, Abb. 6C).

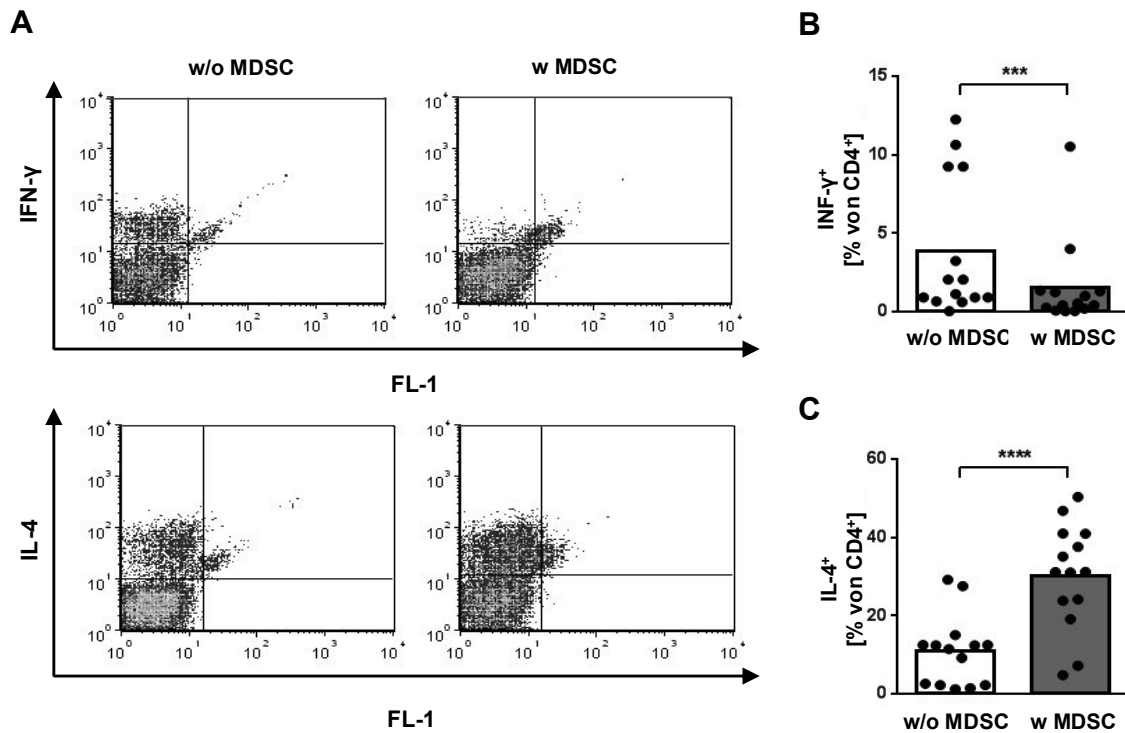


Abb. 6: GR-NSB-MDSC modulieren die Polarisierung von T-Helferzellen in Richtung Th2
 PBMC von gesunden Erwachsenen wurden ohne und mit Zugabe von GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 für 4-5 Tage kultiviert. Nach vier- bis sechsständiger Stimulation mit GolgiPlug wurden die Zellen intrazellulär gefärbt und der Anteil von IFN- γ $^+$ Th1-Zellen und IL-4 $^+$ Th2-Zellen an allen CD4 $^+$ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **(A)** Repräsentative Densityplots für FL-1 vs. IFN- γ sowie FL-1 vs. IL-4 ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC (w/o MDSC) und mit Zugabe von GR-NSB-MDSC (w MDSC). Die Zellen wurden zuvor auf CD4 gated. **(B+C)** Die Punkte-Balken Diagramme zeigen den Anteil von IFN- γ $^+$ Th1-Zellen (B) und IL-4 $^+$ Th2-Zellen (C) an allen CD4 $^+$ Zellen nach vier- bis fünftägiger Kultur von PBMC allein (w/o MDSC/weiße Balken) und PBMC in Co-Kultur mit GR-NSB-MDSC (w MDSC/graue Balken). n = 14, *** p = 0,0002, **** p < 0,0001, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.1.2 GR-NSB-MDSC induzieren Tregs

Um den Einfluss von GR-NSB-MDSC auf die Differenzierung von Tregs zu untersuchen, bestimmten wir bei gleichem Versuchsansatz wie für die Th1/Th2-Polarisierung durchflusszytometrisch den Anteil von FoxP3 exprimierenden CD4 $^+$ /CD25 $^{\text{high}}$ T-Zellen an allen CD4 $^+$ Zellen. Abb. 7A zeigt einen exemplarischen Density Plot eines solchen Versuches nach Gating auf CD4 $^+$ Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Induktion von Tregs durch Kultur von PBMC mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zur Kultur von PBMC allein (3,8% \pm 0,5% vs. 1,8% \pm 0,5%, n = 10, ****p < 0,0001, Abb. 7B).

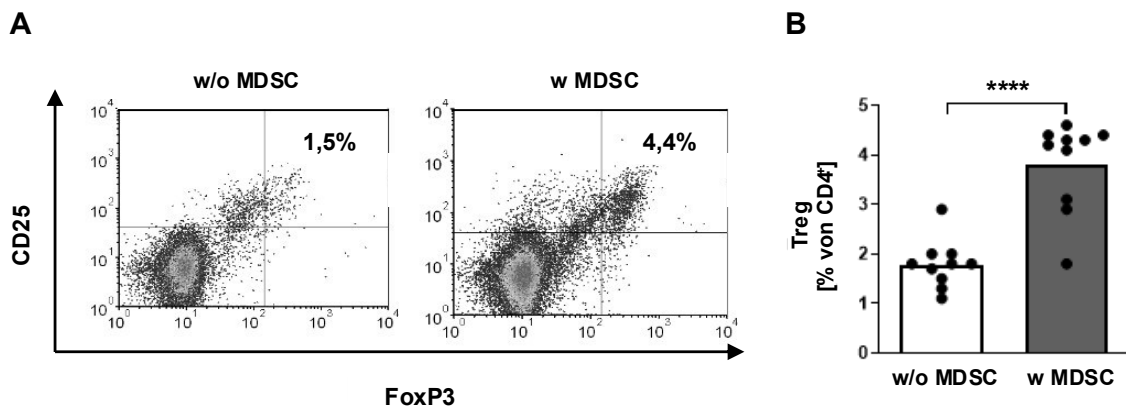


Abb. 7: GR-NSB-MDSC induzieren Tregs

PBMC von gesunden Erwachsenen wurden allein oder nach Zugabe von GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 für 4-5 Tage kultiviert. Danach wurde durchflusszytometrisch der Anteil der $CD4^+/CD25^{\text{high}}/FoxP3^+$ Zellen bestimmt. **(A)** Repräsentative Density Plots für CD25 vs. FoxP3 zeigen den Anteil von Tregs an $CD4^+$ T-Zellen ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC (w/o MDSC) und mit Zugabe von GR-NSB-MDSC (w MDSC). **(B)** Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von $CD25^{\text{high}}/FoxP3^+$ Tregs an $CD4^+$ T-Zellen nach Kultur von PBMC allein (w/o MDSC) und PBMC mit GR-NSB-MDSC in Co-Kultur (w MDSC). $n = 10$, **** $p < 0,0001$, paired t-test.

3.2 Die GR-NSB-MDSC-induzierte Suppression von Th1-Zellen benötigt direkten Zellkontakt, ist unabhängig von anderen Zellarten und wird am ehesten durch eine erhöhte Apoptoserate bei Th1-Zellen hervorgerufen

In den vorangegangenen Versuchen konnten wir zeigen, dass GR-NSB-MDSC zu einer Reduktion von Th1-Zellen führten. Als nächstes sollte untersucht werden über welche Signalwege und Mechanismen dieser Effekt vermittelt wird. Hierzu führten wir zunächst Transwell-Versuche durch und untersuchten, ob direkter Zellkontakt für die Hemmung notwendig ist. Zudem verwendeten wir Co-Kulturen mit aufgereinigten T-Zellen anstatt mit PBMC, um herauszufinden, ob andere Zelltypen an der Interaktion beteiligt sind. Anschließend blockierten wir typische MDSC-Effektormoleküle und weitere für den Effekt infrage kommende Rezeptoren.

3.2.1 Die Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC benötigt direkten Zellkontakt

Um herauszufinden, ob lösliche Faktoren die Hemmung von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC vermitteln, führten wir Transwell-Versuche durch. Dazu inkubierten wir PBMC von erwachsenen Spendern für 4-5 Tage allein, mit GR-NSB-MDSC im direkten Zellkontakt und mit GR-NSB-MDSC in transwells. Hier zeigte sich, dass bei Trennung der Zellen durch eine Membran die Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC aufgehoben wurde (Anteil von Th1-Zellen bei Kultur von PBMC allein $7,5\% \pm 3,7\%$ vs. $7,8\% \pm 4,8\%$ bei Kultur mit GR-NSB-MDSC in transwells, $n = 11$, ns = nicht signifikant, Abb. 8). Für die Vermittlung des hemmenden Effekts von GR-NSB-MDSC auf Th1-Zellen scheint daher direkter Zellkontakt nötig zu sein.

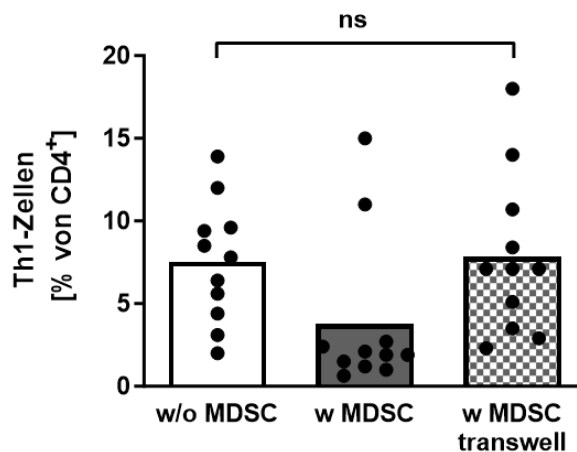


Abb. 8: Die Hemmung von Th1-Antworten benötigt direkten Zellkontakt

PBMC eines gesunden Erwachsenen wurden alleine und unter Zugabe von GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Co-Kultur von PBMC und GR-NSB-MDSC ohne direkten Zellkontakt in transwells ebenfalls im Verhältnis 2:1. Nach vier- bis fünftägiger Inkubation wurden die Zellen extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Das Punkte-Balken Diagramm zeigt den Anteil von Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Inkubation von PBMC allein (w/o MDSC), PBMC mit GR-NSB-MDSC in Co-Kultur (w MDSC) sowie PBMC und GR-NSB-MDSC im transwell assay (w MDSC transwell). $n = 11$, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.2.2 An der Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC sind keine anderen Zellarten beteiligt

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob an der Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC weitere Zellarten außer T-Zellen beteiligt sind. Dazu

wurden aus PBMC von gesunden erwachsenen Spendern CD3⁺ T-Lymphozyten bzw. CD4⁺ T-Helferzellen mittels MACS angereichert. Um eine Aktivierung der T-Zellen durch positive Selektion zu vermeiden, wurden die Zellen durch negative Selektion aufgereinigt und anschließend allein oder mit GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich wie bei der Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC eine signifikante Verringerung des Anteils an Th1-Zellen sowohl bei Inkubation von CD3⁺ als auch von CD4⁺ Zellen mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zu der Kultur ohne GR-NSB-MDSC (6,4% ± 2,4% vs. 12,1% ± 3,6% , n = 7, *p = 0,01, Abb. 9A; 1,7% ± 1,2% vs. 12,6% ± 3,8%, n = 6, *p = 0,02, Abb. 9B). Somit scheint die Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC unabhängig von anderen Zellarten zu sein.

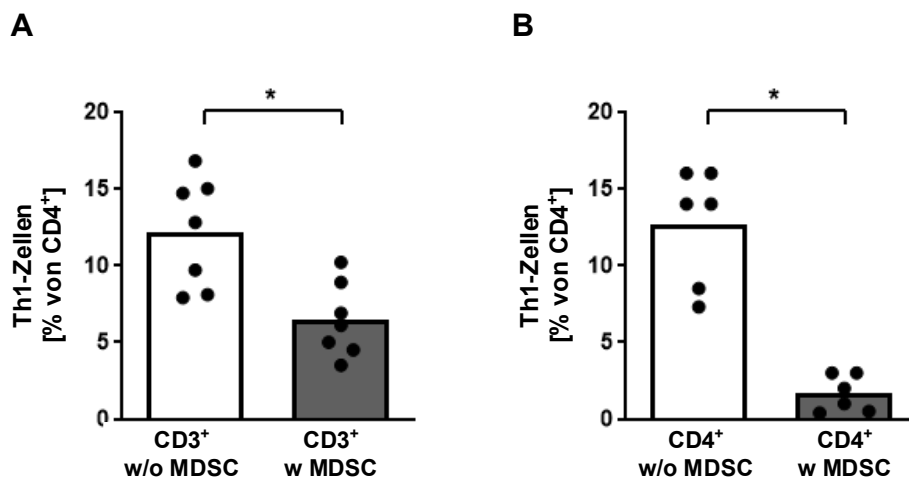


Abb. 9: Die Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC ist unabhängig von anderen Zellarten

Aus PBMC von erwachsenen Spendern negativ selektierte CD3⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen wurden allein oder mit aus CBMC angereicherten GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen den Anteil von CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻ Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Inkubation von CD3⁺ bzw. CD4⁺ Zellen ohne GR-NSB-MDSC (w/o MDSC) und mit GR-NSB-MDSC (w MDSC). n = 7 bzw. n = 6, *p = 0,01 bzw. *p = 0,02, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.2.3 Typische MDSC-Effektormechanismen tragen nicht zur Suppression von Th1-Zellen bei

Bereits bekannte Mechanismen der inhibitorischen Wirkung von MDSC sind die Expression der Effektorenzyme Arg1, iNOS, IDO sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.^[16] Um herauszufinden, ob eines dieser Effektormoleküle an der Th1-Herabregulation beteiligt ist, blockierten wir die Moleküle mit entsprechenden Inhibitoren. Dazu isolierten wir GR-NSB-MDSC mittels MACS und inkubierten sie in Co-Kultur mit PBMC von gesunden Erwachsenen ohne oder mit Zugabe der Inhibitoren für Arg1 (nor-NOHA), iNOS (L-NMMA), ROS (Catalase) und IDO (1-Methyltryptophan). Nach vier- bis fünftägiger Co-Kultur erfolgte die extrazelluläre Färbung sowie die durchflusszytometrische Messung der CD4⁺ T-Zellen. Es zeigte sich, dass keiner der Inhibitoren die durch GR-NSB-MDSC induzierte Herabregulation von Th1-Zellen aufheben konnte (n = 5 oder n = 6, *p < 0,05, ns = nicht signifikant, Abb. 10A+B).

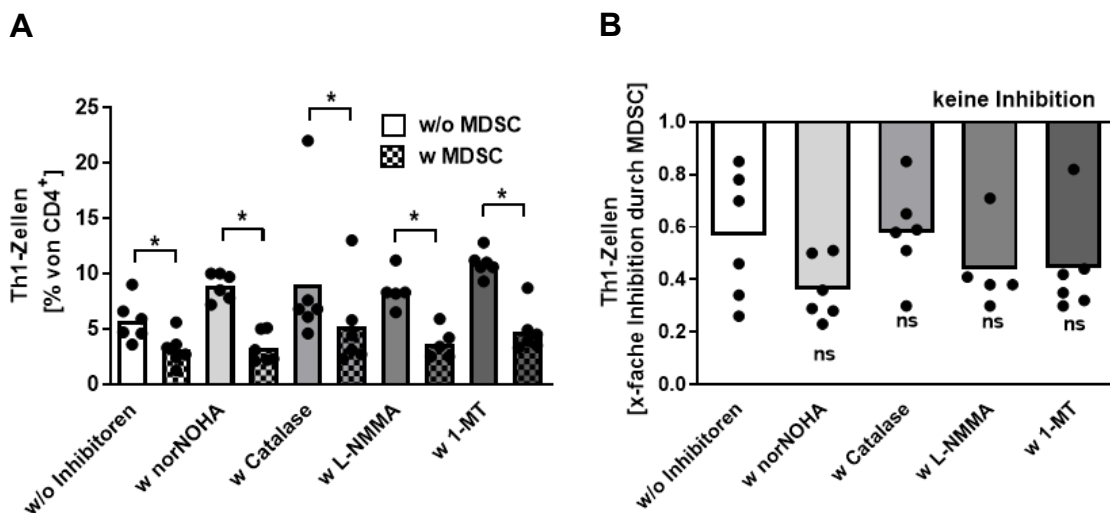


Abb. 10: Klassische MDSC-Effektormoleküle tragen nicht zur Herabregulation von Th1-Zellen bei

GR-NSB-MDSC wurden aus CBMC mittels MACS angereichert und mit PBMC im Verhältnis 1:2 inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Hemmung der MDSC-Effektormechanismen Arg1, ROS, iNOS und IDO durch Zugabe spezifischer Inhibitoren (nor-NOHA, Catalase, L-NMMA, 1-MT). **(A)** Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen paarweise ohne (ausgefüllte Balken) und mit GR-NSB-MDSC (karierte Balken). In weiß sind Zellen ohne Zugabe von Inhibitoren abgebildet (w/o Inhibitoren), in grau Zellen nach Zugabe von verschiedenen Inhibitoren. n = 5 oder n = 6, *p < 0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **(B)** Die Inhibition von Th1-Zellen ist dargestellt als Quotient aus prozentualen Anteil von Th1-Zellen nach Inkubation von PBMC allein und PBMC nach Zugabe von GR-NSB-MDSC ohne und mit Verwendung der entsprechenden Inhibitoren. n = 5 oder n = 6, ns = nicht signifikant im Vergleich zu ohne Inhibitoren, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Ein weiteres von MDSC exprimiertes Effektormolekül ist TGF- β , welches hemmend auf T-Zellfunktionen wirkt^[48] und eine Suppression von Th1-Antworten induzieren kann.^[49] Wir blockierten daher in einem weiteren Ansatz TGF- β durch Zugabe eines blockierenden Antikörpers zu den GR-NSB-MDSC/PBMC Co-Kulturen. Auch hier führte die Zugabe von anti-TGF- β nicht zur Aufhebung der Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC (n = 6, ns = nicht signifikant, Abb.11).

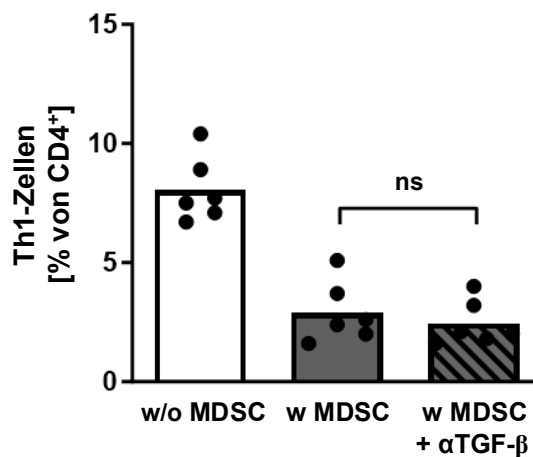


Abb. 11: Die Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird nicht durch TGF- β vermittelt

PBMC von erwachsenen Spendern wurden allein, mit GR-NSB-MDSC sowie mit GR-NSB-MDSC und einem blockierenden Antikörper gegen TGF- β inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den Anteil von CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻ Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Inkubation ohne GR-NSB-MDSC (w/o MDSC), nach Inkubation mit GR-NSB-MDSC (w MDSC) sowie nach Inkubation mit GR-NSB-MDSC und blockierendem Antikörper gegen TGF- β (gestreifter, grauer Balken). n = 6, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.2.4 Das co-inhibitorische Molekül PD-L1 ist auf GR-NSB-MDSC exprimiert, eine Blockade der PD-1/PD-L1 Achse führt aber nicht zur Aufhebung der Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC

Da in Studien gezeigt werden konnte, dass über die PD-1:PD-L1/PD-L2 Achse eine Suppression von Th1-Zellen vermittelt werden kann,^[50, 51] untersuchten wir als nächstes, ob GR-NSB-MDSC das co-inhibitorische Molekül PD-L1 exprimieren. Dazu isolierten wir CBMC aus Nabelschnurblut und inkubierten sie für 24 bzw. 48 Stunden nach Zugabe von 200 ng/ml IFN- γ . Nach extrazellulärer Färbung und durchflusszytometrischer Messung zeigte sich, dass GR-NSB-

MDSC nativ nur in sehr geringem Maße PD-L1 exprimierten. Nach Stimulation mit IFN- γ stieg die Expression jedoch zeitabhängig an (MFI PD-L1: 20 ± 8 vs. 84 ± 11 vs. 126 ± 38 , $n = 5$, $*p < 0,05$, Abb. 12).

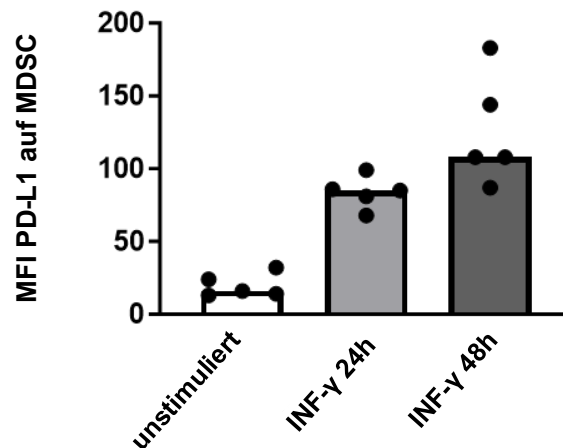


Abb. 12: GR-NSB-MDSC exprimieren das co-inhibitorische Molekül PD-L1

CBMC wurden aus Nabelschnurblut reifer Neugeborener durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert und ohne oder mit Zugabe von 200 ng/ml IFN- γ 24 Stunden bzw. 48 Stunden inkubiert. Nach extrazellulärer Färbung wurde die Expression von PD-L1 auf GR-NSB-MDSC mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von PD-L1 auf unstimulierten GR-NSB-MDSC (hellgrauer Balken), sowie auf mit IFN- γ stimulierten GR-NSB-MDSC nach 24 Stunden (mittelgrauer Balken) bzw. 48 Stunden (dunkelgrauer Balken). $n = 5$, $*p < 0,05$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Um herauszufinden, ob dieses auf GR-NSB-MDSC exprimierte co-inhibitorische Molekül an der Herabregulation von Th1-Zellen beteiligt ist, inkubierten wir PBMC von gesunden Erwachsenen allein und mit GR-NSB-MDSC in Anwesenheit oder Abwesenheit eines blockierenden Antikörpers gegen PD-1. Nach durchflusszytometrischer Analyse zeigte sich, dass die Blockade von PD-1 keine Wirkung auf den durch GR-NSB-MDSC hervorgerufenen suppressiven Effekt auf Th1-Zellen hatte ($n = 5$, ns = nicht signifikant, Abb. 13).

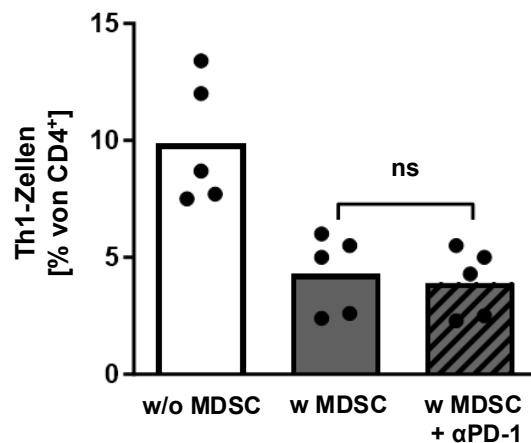


Abb. 13: Die Blockade von PD-1 führt nicht zu einer Aufhebung der Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC

PBMC gesunder Erwachsener wurden ohne GR-NSB-MDSC, mit GR-NSB-MDSC sowie mit GR-NSB-MDSC und einem blockierenden Antikörper gegen PD-1 inkubiert. Nach 4-5 Tagen erfolgte nach extrazellulärer Färbung die durchflusszytometrische Messung der CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻ Th1-Zellen. Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den Anteil der Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Kultur ohne GR-NSB-MDSC (weißer Balken), mit GR-NSB-MDSC (grauer Balken) und mit GR-NSB-MDSC und Zugabe eines blockierenden Antikörpers gegen PD-1 (gestreifter, grauer Balken). n = 5, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.2.5 Die Apoptoserate von Th1-Zellen ist bei Inkubation mit GR-NSB-MDSC erhöht, eine Blockade von CD95L zeigt jedoch keinen Effekt

Zuletzt überprüften wir die Hypothese, dass die MDSC-induzierte Verminderung von Th1-Zellen durch Induktion von Apoptose verursacht wird. Dazu inkubierten wir PBMC von gesunden Erwachsenen mit GR-NSB-MDSC. Nach vier- bis fünftägiger Kultur quantifizierten wir apoptotische Zellen durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-Färbung. Der prozentuale Anteil von apoptotischen Annexin V⁺ Zellen an allen CD4⁺ war nach Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC signifikant höher als nach Kultur von PBMC allein (9,7 % ± 1,8% vs. 5,8% ± 2,7%, n = 6, *p = 0,02, Abb. 14A). Die zusätzliche Färbung der Zellen mit anti-CD183 und anti-CD194 zur Differenzierung von CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻ Th1-Zellen und CD4⁺/CD183⁻/CD194⁺ Th2-Zellen zeigte, dass die Apoptoserate bei Zugabe von GR-NSB-MDSC bei Th1-Zellen tendenziell höher war, allerdings war der Unterschied nicht signifikant (Anteil der Annexin V⁺ Zellen an allen CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻ Th1-Zellen nach Inkubation ohne und mit GR-NSB-MDSC: 9,2% ± 2,8% vs. 12,7% ± 2,8%, n = 6, ns = nicht signifikant, Abb. 14B).

Der Anteil der Annexin V⁺ Zellen an allen CD4⁺/CD183⁻/CD194⁺ Th2-Zellen zeigte nach Inkubation ohne und mit GR-NSB-MDSC keine Veränderung (1,6% ± 0,8% vs. 1,5% ± 0,5%, n = 6, ns = nicht signifikant, Abb. 14C).

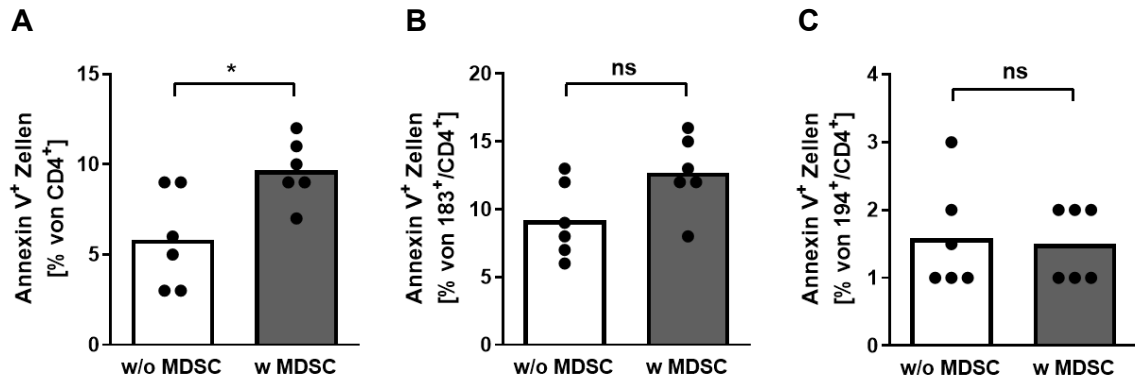


Abb. 14: Bei Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC ist die Apoptoserate erhöht

PBMC von erwachsenen Spendern wurden allein und mit GR-NSB-MDSC inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. **(A)** Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von Annexin V⁺ apoptotischen Zellen an allen CD4⁺ Zellen ohne (weißer Balken) und mit GR-NSB-MDSC (grauer Balken). n = 6, p = 0,02, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **(B+C)** Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil von Annexin V⁺ apoptotischen Zellen an allen CD4⁺/CD183⁺/CD4⁺ Th1 Zellen (B) und CD4⁺/CD183⁻/CD194⁺ Th2-Zellen (C) ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken) und mit GR-NSB-MDSC (graue Balken). n = 6, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Die Induktion von Apoptose über den extrinsischen Weg wird über Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie vermittelt. Der bekannteste Rezeptor aus dieser Familie ist der sogenannte Fas-Rezeptor oder CD95, welcher über Bindung an den Fas-Liganden (FasL oder CD95L) Apoptose auslöst. Dieser wird auf verschiedenen Zellarten exprimiert, unter anderem auch auf T- und B-Zellen.^[52] Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Verminderung von Th1-Zellen auf eine GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion von Apoptose über den CD95/CD95L-Signalweg zurückzuführen ist, inkubierten wir PBMC allein und mit GR-NSB-MDSC mit oder ohne blockierenden Antikörper gegen CD95L. Nach vier- bis fünftägiger Co-Kultur erfolgte die extrazelluläre Färbung und durchflusszytometrische Messung. Dabei zeigte sich, dass die Blockade von CD95L nicht zur Aufhebung der Th1-Suppression durch GR-NSB-MDSC führte (n = 5, ns = nicht signifikant, Abb. 15).

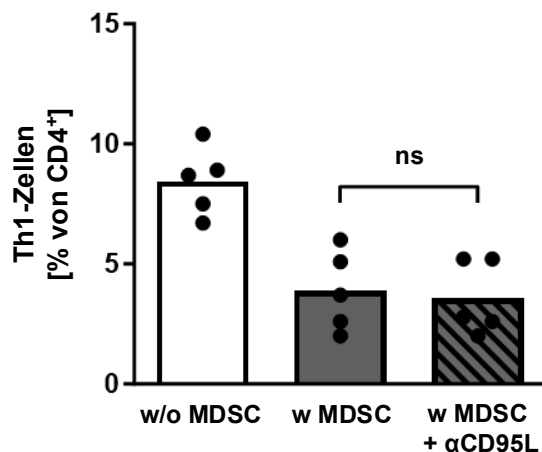


Abb. 15: Die Blockade von CD95L hat keinen Effekt auf die GR-NSB-MDSC-vermittelte Th1-Suppression

PBMC gesunder Erwachsener wurden allein oder mit GR-NSB-MDSC in Anwesenheit oder Abwesenheit eines blockierenden Antikörpers gegen CD95L inkubiert. Nach 4-5 Tagen erfolgte nach extrazellulärer Färbung die durchflusszytometrische Quantifizierung der CD4⁺/CD183⁺/CD194⁻/CD196⁻ Th1-Zellen. Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den Anteil der Th1-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Kultur ohne GR-NSB-MDSC (weißer Balken), mit GR-NSB-MDSC (grauer Balken) und nach Zugabe von GR-NSB-MDSC und blockierendem Antikörper gegen CD95L (gestreifter, grauer Balken). n = 5, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.2.6 Zwischenzusammenfassung I der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass der Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC ein zellkontaktabhängiger und direkter Mechanismus ohne Mitwirkung anderer Zelltypen zugrunde zu liegen scheint. Der Effekt könnte auf eine GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion von Apoptose in Th1-Zellen zurückzuführen sein, der genaue Mechanismus bleibt allerdings unklar.

3.3 Die Th2-Polarisierung durch GR-NSB-MDSC erfolgt über die Expression des Effektormoleküls Arg1 und die Produktion von ROS und ist teilweise abhängig von einer Interaktion mit Monozyten

Die Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC führte neben der Suppression von Th1-Zellen, auch zu einer Erhöhung des Anteils von Th2-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen. Um auch hier Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus zu erhalten, führten wir ebenfalls Transwellversuche und Co-Kultur-Versuche mit

aufgereinigten Zellreihen durch. Anschließend wurden analog zu den Versuchen mit Th1-Zellen typische MDSC-Effektormoleküle blockiert.

3.3.1 Die Induktion von Th2-Zellen ist größtenteils zellkontaktunabhängig

In Transwellversuchen konnten wir zeigen, dass es auch nach Trennung von GR-NSB-MDSC und PBMC durch eine Membran zu einer Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC kam ($6,2\% \pm 2,0\%$ bei Inkubation von PBMC allein, $7,9\% \pm 2,9\%$ bei Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC durch Transwell getrennt, $n = 11$, $**p = 0,008$, Abb. 16).

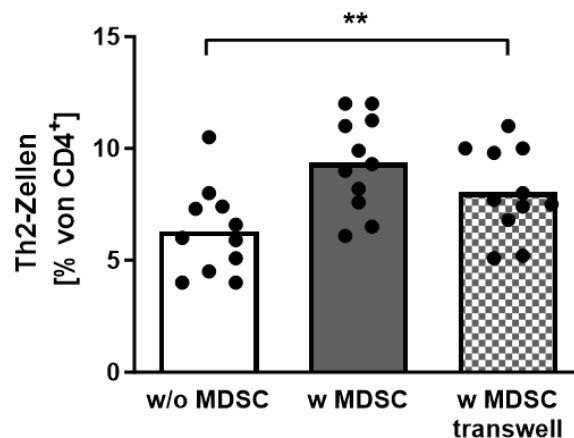


Abb. 16: Die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird größtenteils durch einen zellkontaktunabhängigen Mechanismus vermittelt

PBMC eines gesunden Erwachsenen wurden allein, in direktem Zellkontakt mit GR-NSB-MDSC, sowie mit GR-NSB-MDSC getrennt durch Transwells inkubiert. Nach vier- bis fünftägiger Kultur wurde der Anteil von $CD4^+/CD183^-/CD194^+/CD196^-$ Th2-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Das Diagramm zeigt den Anteil von Th2-Zellen an allen $CD4^+$ Zellen nach Inkubation von PBMC allein (w/o MDSC), PBMC mit GR-NSB-MDSC in Co-Kultur (w MDSC) sowie PBMC und GR-NSB-MDSC im transwell assay (w MDSC transwell). $n = 11$, $**p = 0,008$, paired t-test.

3.3.2 Monozyten beeinflussen die Th2-Induktion

Um herauszufinden, ob andere Zellarten außer T-Zellen an der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Th2-Zellen beteiligt sind, reicherten wir $CD3^+$ T-Lymphozyten bzw. $CD4^+$ T-Helferzellen durch Negativ-Selektion aus PBMC an und inkubierten sie allein oder mit GR-NSB-MDSC. Es zeigte sich bei den Versuchen mit $CD3^+$ Zellen eine Verringerung der Th2-Induktion durch GR-NSB-MDSC ($13,4\% \pm 5,3\%$ bei Inkubation von PBMC allein vs. $16,3\% \pm 6,2\%$ bei

Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC, $n = 8$, $**p = 0,008$, Abb. 17A), bei den Versuchen mit $CD4^+$ Zellen sogar eine vollständige Aufhebung ($15,8\% \pm 12,9$ vs. $16,8\% \pm 11,6\%$, $n = 6$, $ns =$ nicht signifikant, Abb. 17 B). Somit scheinen andere Zellarten für diesen Effekt essentiell zu sein.

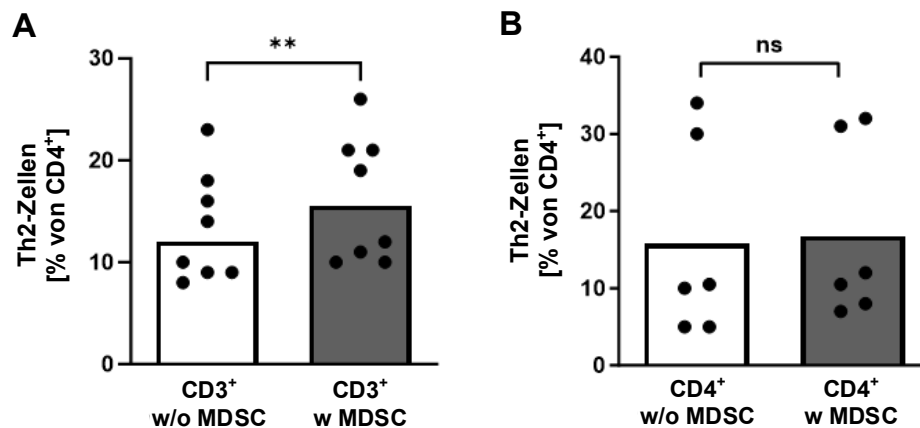


Abb. 17: An der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Th2-Zellen sind andere Zellarten beteiligt

Aus PBMC von erwachsenen Spendern negativ selektierte $CD3^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen wurden allein und mit GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen den Anteil von $CD4^+/CD183^-/CD194^+/CD196^-$ Th2-Zellen an allen $CD4^+$ Zellen nach Inkubation von $CD3^+$ bzw. $CD4^+$ Zellen ohne GR-NSB-MDSC (w/o MDSC) und mit GR-NSB-MDSC (w MDSC). $n = 8$ bzw. $n = 6$, $**p = 0,008$ bzw. $ns =$ nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Um herauszufinden, welche anderen Zelltypen an dem Th2-induktiven Effekt von GR-NSB-MDSC beteiligt sind, isolierten wir mittels Negativselektion $CD3^+$ T-Zellen und mittels Positivselektion $CD19^+$ B-Zellen und $CD14^+$ Monozyten aus PBMC von gesunden Erwachsenen, da diese beiden Zelltypen neben T-Zellen die größten Zellfraktionen in PBMC bilden. Wir inkubierten anschließend $CD3^+$ Zellen allein und mit GR-NSB-MDSC sowie $CD3^+$ Zellen zusammen mit $CD14^+$ Monozyten bzw. $CD19^+$ B-Zellen jeweils mit GR-NSB-MDSC. Während die Zugabe von B-Zellen keinen Effekt zeigte, wurde durch die Zugabe von angereicherten Monozyten die Th2-Induktion durch GR-NSB-MDSC signifikant verstärkt ($12,8\% \pm 6,2\%$ bei Inkubation von $CD3^+$ Zellen allein, $15,0\% \pm 6,8\%$ bei Inkubation mit GR-NSB-MDSC und $17,8\% \pm 7,9\%$ bei Inkubation mit GR-NSB-MDSC und Monozyten, $n = 6$, $*p = 0,02$, Abb. 18A). Die Inkubation $CD14^+$

depletierter PBMC mit und ohne GR-NSB-MDSC ergab entsprechend zum vorigen Ergebnis eine verringerte Th2-Induktion durch GR-NSB-MDSC bei den PBMC ohne Monozyten ($15,9\% \pm 2,8\%$ bei Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC vs. $13,0\% \pm 3,9\%$ bei Inkubation von CD14-depletierten PBMC mit GR-NSB-MDSC, $n = 8$, $**p = 0,003$, Abb. 18B).

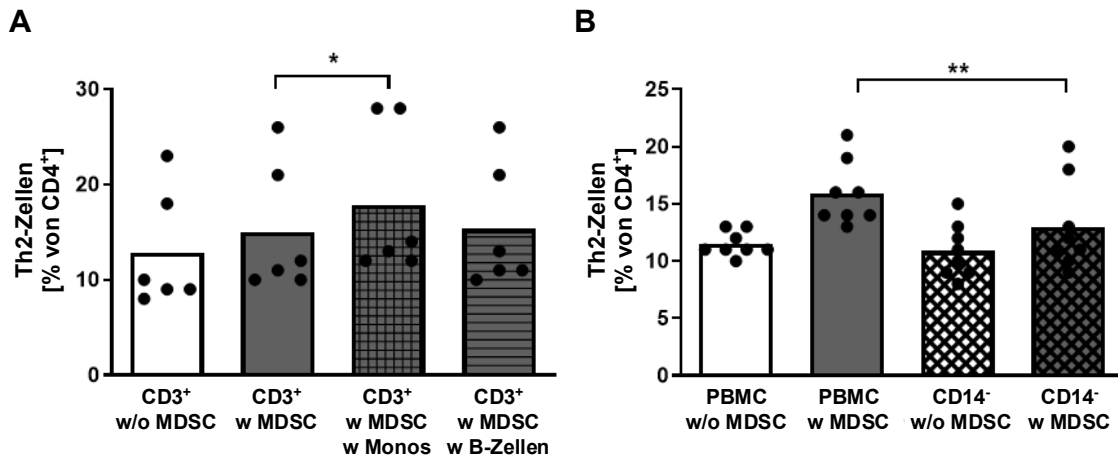


Abb. 18: Monozyten, nicht aber B-Zellen sind an der GR-NSB-MDSC-induzierten Polarisierung von Th2-Zellen beteiligt

PBMC von gesunden Erwachsenen, negativ selektierte CD3⁺ Zellen ohne oder mit selektierten CD14⁺ Monozyten oder CD19⁺ B-Zellen, sowie CD14 depletierte PBMC wurden ohne und mit GR-NSB-MDSC inkubiert. Nach 4-5 Tagen erfolgte nach extrazellulärer Färbung die durchflusszytometrische Quantifizierung der CD4⁺/CD183⁺/CD194⁺/CD196⁻ Th2-Zellen. **(A)** Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den Anteil der Th2-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Kultur von CD3⁺ Zellen ohne GR-NSB-MDSC (weißer Balken), mit GR-NSB-MDSC (grauer Balken) und nach Zugabe von GR-NSB-MDSC und CD14⁺ Zellen bzw. CD19⁺ Zellen (kariierter bzw. gestreifter grauer Balken) ($n = 6$, $*p = 0,02$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test). **(B)** Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den Anteil der Th2-Zellen an allen CD4⁺ Zellen nach Kultur von PBMC (einfarbige Balken) und CD14⁻ depletierten PBMC (karierte Balken) ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken) und mit GR-NSB-MDSC (graue Balken). $n = 8$, $**p = 0,003$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.3.3 Die Inhibition der MDSC-Effektormoleküle Arg1 und ROS verringert die Induktion von Th2-Zellen

Ebenso wie in den Versuchen zur Suppression von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC untersuchten wir für die GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion von Th2-Zellen, ob eines der klassischen MDSC-Effektormoleküle an diesem Effekt beteiligt war. PBMC von gesunden Erwachsenen wurden dazu allein und mit GR-NSB-MDSC mit oder ohne Inhibitoren für Arg1 (nor-NOHA), iNOS (L-NMMA), ROS (Catalase) und IDO (1-Methyltryptophan) inkubiert. Die Blockade des Enzyms Arg1 durch den Inhibitor nor-NOHA führte zu einer Reduktion der durch GR-NSB-MDSC hervorgerufenen Th2-Induktion (1,1fache Induktion bei Inkubation mit norNOHA vs. 1,4fache Induktion ohne Inhibitor, $n = 6$, * $p = 0,04$ im Vergleich zum Versuch ohne Inhibitoren, Abb. 19B). Auch die Blockade von ROS mittels Catalase verringerte tendenziell die GR-NSB-MDSC-vermittelte Th2-Induktion, allerdings war dieser Effekt nicht statistisch signifikant ($n = 6$, ns = nicht signifikant, Abb. 19B). Die Zugabe der Inhibitoren L-NMMA für iNOS und 1-MT für IDO zeigte keinen Einfluss auf die GR-NSB-MDSC-vermittelte Th2-Induktion. Gleichzeitige Zugabe der Inhibitoren nor-NOHA und Catalase führte zu einer vollständigen Aufhebung der Th2-Induktion durch GR-NSB-MDSC (1,5fache Induktion bei Inkubation ohne Inhibitoren, 1,2fache Induktion bei Inkubation mit norNOHA, fehlende Induktion bei Inkubation mit norNOHA und Catalase, $n = 5$, * $p = 0,03$, Abb. 19C). Zur Bestätigung des Ergebnisses wurden die CD4⁺ T-Zellen auch mittels intrazellulärer Zytokinfärbung quantifiziert. Korrespondierend zu den Ergebnissen der Extrazellulärfärbung zeigte sich nach Zugabe von nor-NOHA keine Induktion von Th2-Zellen mehr (4,8fache Induktion ohne Inhibitoren, keine Induktion mit norNOHA, $n = 5$, * $p = 0,03$, Abb. 19D).

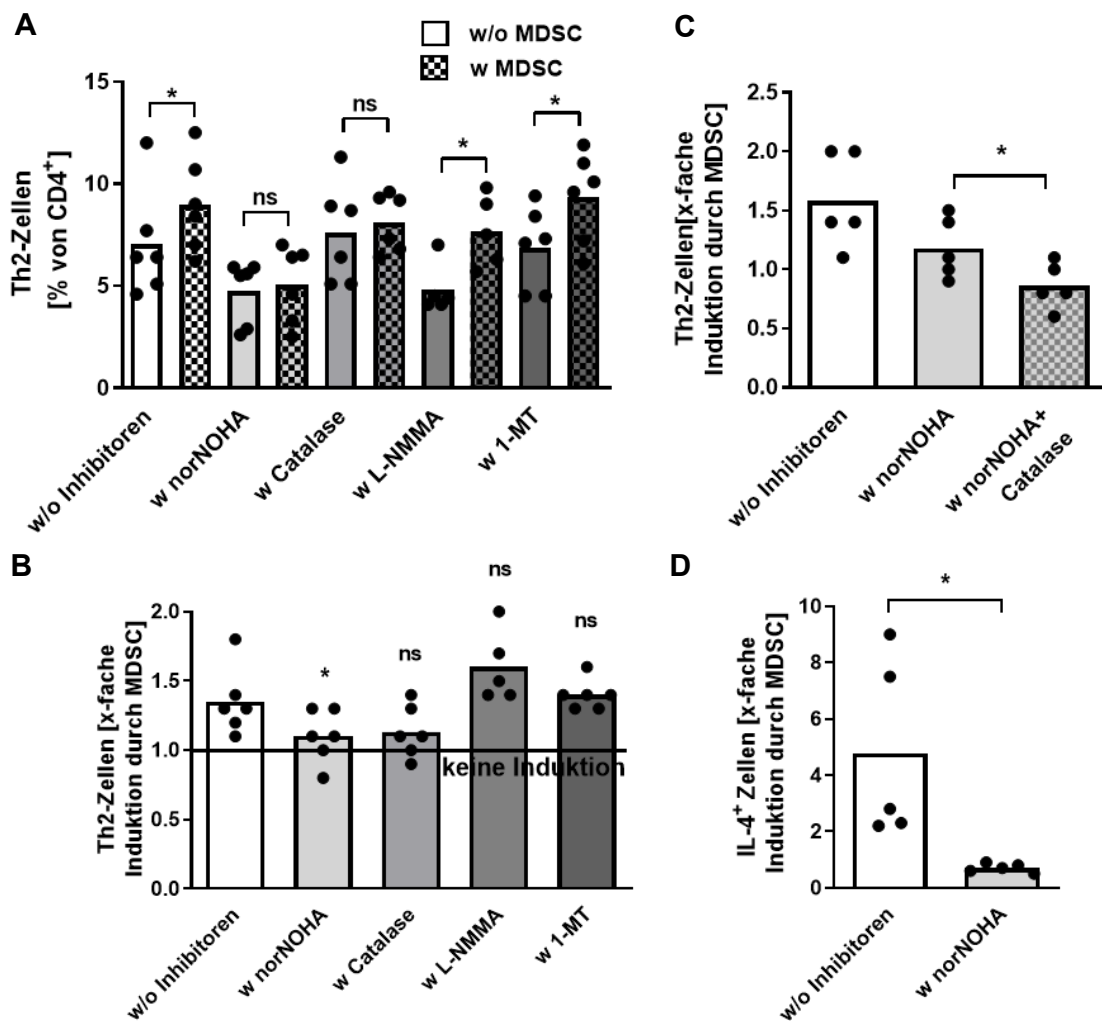


Abb. 19: Die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird durch Blockade von Arg1 und ROS aufgehoben

PBMC gesunder Erwachsener wurden allein und mit GR-NSB-MDSC inkubiert. Außerdem erfolgte eine Hemmung der MDSC-Effektormechanismen Arg1, ROS, iNOS und IDO durch Zugabe entsprechender spezifischer Inhibitoren (nor-NOHA, Catalase, L-NMMA, 1-MT). Nach 4-5 Tagen erfolgte nach extra- bzw. intrazellulärer Färbung die durchflusszytometrische Quantifizierung der Th2-Zellen. **(A)** Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von Th2-Zellen an allen CD4⁺ Zellen paarweise ohne (ausgefüllte Balken) und mit GR-NSB-MDSC (karierte Balken). In weiß sind die Zellkulturen ohne Zugabe von Inhibitoren abgebildet (w/o Inhibitoren), in den dunkler werdenden Grautönen Zellkulturen mit Zugabe der Inhibitoren nor-NOHA (w norNOHA), Catalase (w Catalase), L-NMMA (w L-NMMA) und 1-MT (w 1-MT). n = 5 bzw. n = 6, *p < 0,05, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **(B)** Die Induktion von Th2-Zellen ist dargestellt als Quotient aus prozentualem Anteil von Th2-Zellen nach Inkubation von PBMC allein und PBMC nach Zugabe von GR-NSB-MDSC ohne (weißer Balken) und mit Verwendung der entsprechenden Inhibitoren (graue Balken). n = 5 oder n = 6, * p = 0,04, ns = nicht signifikant im Vergleich zu ohne Inhibitoren, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **(C)** Darstellung der Induktion von Th2-Zellen als Quotienten nach Inkubation von PBMC allein und PBMC nach Zugabe von GR-NSB-MDSC ohne Inhibitoren (weißer Balken) und mit Verwendung von norNOHA sowie norNOHA und Catalase in Kombination (graue Balken). n = 5, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **(D)** Das Punkte-Balken Diagramm zeigt die GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion von IL-4⁺ Th2-Zellen als Quotienten ohne (weißer Balken) und mit Zugabe von nor-NOHA (hellgrauer Balken). n = 5, * p = 0,03, paired t-test.

3.3.4 Zwischenzusammenfassung II der Ergebnisse

Zusammenfassend konnten wir im zweiten Teil unserer Versuche zeigen, dass die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC durch die Expression von Arg1 und die Produktion von ROS vermittelt wurde und teilweise abhängig von einer Interaktion mit Monozyten war.

3.4 Tregs werden teilweise durch iNOS induziert

Im nächsten Schritt sollte der Mechanismus der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Tregs genauer untersucht werden. Dabei wurde analog zu den Versuchen zur Th1-Suppression und Th2-Induktion vorgegangen.

3.4.1 Die Induktion von Tregs ist nicht zellkontaktabhängig

In Transwell-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC Zellkontakt-unabhängig erfolgte. Der Anteil der Tregs in der Kultur ohne GR-NSB-MDSC betrug $2,0\% \pm 0,5\%$ vs. $4,7\% \pm 0,3\%$ bei Kultur mit GR-NSB-MDSC in transwells ($n = 5$, $*p < 0,001$, Abb. 20).

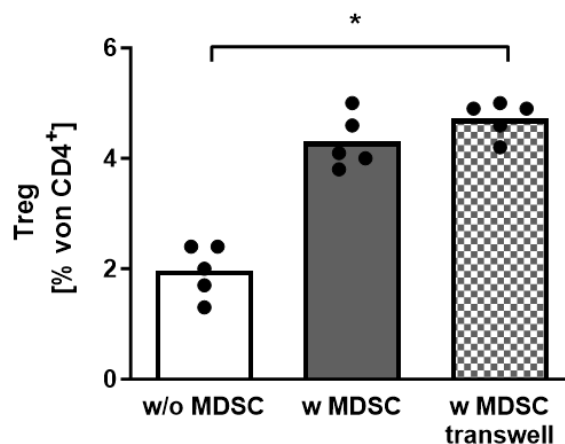


Abb. 20: Die Induktion von Tregs benötigt keinen direkten Zellkontakt

PBMC von gesunden Erwachsenen wurden allein, in direktem Zellkontakt mit GR-NSB-MDSC, sowie mit GR-NSB-MDSC getrennt durch Transwells inkubiert. Nach vier- bis fünftägiger Kultur wurde der Anteil von $CD4^+/CD25^{high}/FoxP3^+$ Tregs durchflusszytometrisch bestimmt. Das Punkte-Balken Diagramm zeigt den Anteil von Tregs an allen $CD4^+$ Zellen nach Inkubation von PBMC allein (w/o MDSC), PBMC mit GR-NSB-MDSC in Co-Kultur (w MDSC) sowie PBMC und GR-NSB-MDSC im transwell assay (w MDSC transwell). $n = 5$, $*p < 0,001$, paired t-test.

3.4.2 Die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC ist unabhängig von anderen Zellarten

In Co-Kultur-Versuchen von GR-NSB-MDSC mit negativ selektierten CD3⁺ T-Lymphozyten anstelle von PBMC zeigte sich, dass es auch hier zu einer deutlichen Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC kam (2,0% ± 1,1% ohne GR-NSB-MDSC vs. 4,9% ± 1,2% mit GR-NSB-MDSC, n = 5, *p < 0,01, Abb. 21). Damit scheint der Effekt von GR-NSB-MDSC auf Tregs unabhängig von anderen Zelltypen zu sein.

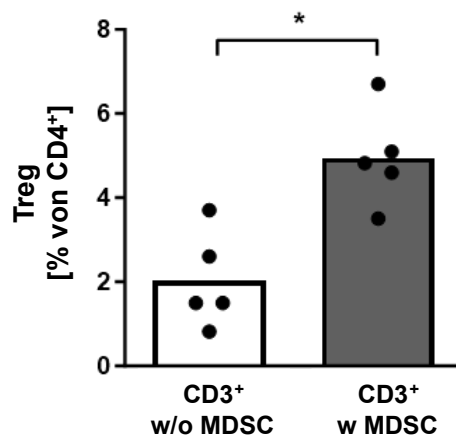


Abb. 21: Andere Zellarten haben keinen wesentlichen Einfluss auf die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC

Aus PBMC von gesunden, erwachsenen Spendern negativ selektierte CD3⁺ T-Zellen wurden allein und mit GR-NSB-MDSC im Verhältnis 2:1 inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurden die Zellen extra- und intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den Anteil von CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Tregs an allen CD4⁺ Zellen nach Inkubation von CD3⁺ Zellen ohne GR-NSB-MDSC (w/o MDSC) und mit GR-NSB-MDSC (w MDSC). n = 5, *p = 0,01, paired t-test.

3.4.3 Bei Inhibition von iNOS ist die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC vermindert

Um lösliche Botenstoffe zu identifizieren, welche die Treg-Induktion durch GR-NSB-MDSC vermitteln, blockierten wir erneut die klassischen MDSC-Effektorenzyme Arg1, iNOS, IDO sowie die Produktion von ROS. Die Blockade des Enzyms iNOS mit L-NMMA führte zu einer signifikanten Reduktion der durch GR-NSB-MDSC hervorgerufenen Treg-Induktion (1,9fache Induktion ohne Inhibitor vs. 1,3fache Induktion nach Zugabe von L-NMMA, n = 5, * p < 0,05, Abb.

22B). Bei Zugabe von Catalase zeigte sich auch ohne GR-NSB-MDSC eine deutliche Induktion von Tregs, die jedoch durch die Zugabe von GR-NSB-MDSC eher wieder rückläufig war. Die Inhibitoren nor-NOHA und 1-MT zeigten keinen Einfluss auf die Treg-Induktion.

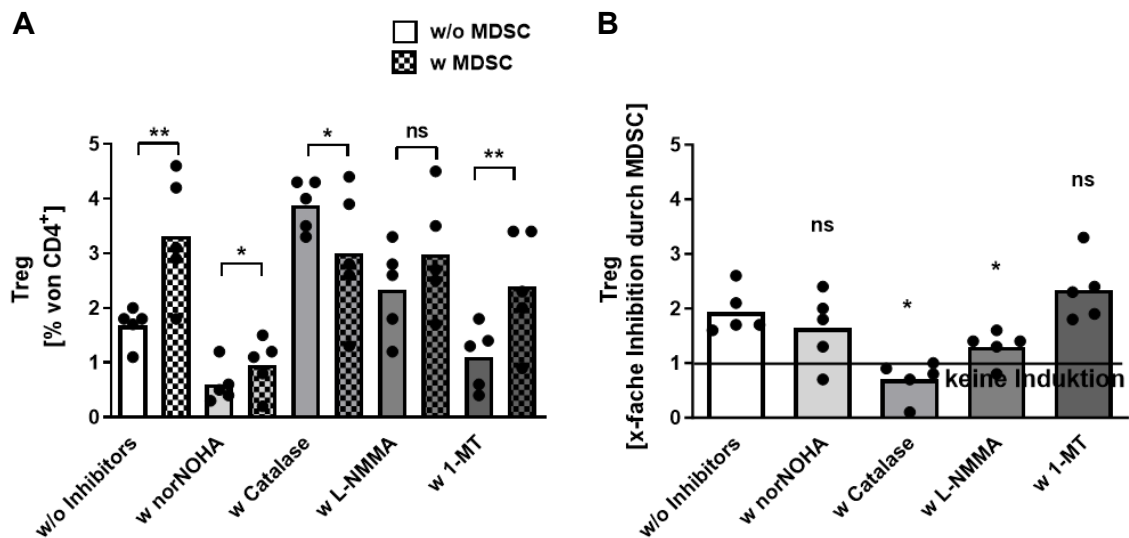


Abb. 22: Die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC wird durch Blockade von iNOS reduziert

PBMC gesunder Erwachsener wurden allein und mit GR-NSB-MDSC inkubiert. Außerdem erfolgte eine Hemmung der MDSC-Effektormechanismen Arg1, ROS, iNOS und IDO durch Zugabe entsprechender spezifischer Inhibitoren (nor-NOHA, Catalase, L-NMMA, 1-MT). Nach 4-5 Tagen erfolgte nach extrazellulärer Färbung die durchflusszytometrische Quantifizierung der Tregs. **(A)** Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von Tregs an allen CD4⁺ Zellen paarweise ohne (ausgefüllte Balken) und mit GR-NSB-MDSC (karierte Balken). In weiß sind Zellkulturen ohne Zugabe von Inhibitoren abgebildet (w/o Inhibitors), in den dunkler werdenden Grautönen sind Zellkulturen mit Zugabe von Inhibitoren dargestellt. n = 5, **p < 0,01, *p < 0,05, ns = nicht signifikant, paired t-test. **(B)** Die Induktion von Tregs ist dargestellt als Quotient aus prozentualem Anteil von Tregs nach Inkubation von PBMC allein und PBMC nach Zugabe von GR-NSB-MDSC ohne (weißer Balken) und mit Verwendung der entsprechenden Inhibitoren (graue Balken). n = 5, *p < 0,05, ns = nicht signifikant im Vergleich zu ohne Inhibitoren, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.4.4 Die Blockade von TGF-β und PD-1 führt nicht zu einer Aufhebung der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Tregs

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die zu einer Induktion von Tregs führen können, wie beispielsweise die Expression von TGF-β oder die Interaktion von PD-1 mit dem Liganden PD-L1.^[53] Daher blockierten wir in unseren PBMC/GR-NSB-MDSC Co-Kulturen als nächstes TGF-β und PD-1 durch Zugabe der entsprechenden blockierenden Antikörper. In diesen

Versuchen hatte weder die Blockade von TGF- β noch die Blockade von PD-1 einen Einfluss auf die von GR-NSB-MDSC vermittelte Induktion von Tregs (n = 5 bzw. n = 4, **p < 0,01 bzw. *p = 0,02, Abb. 23 A+B).

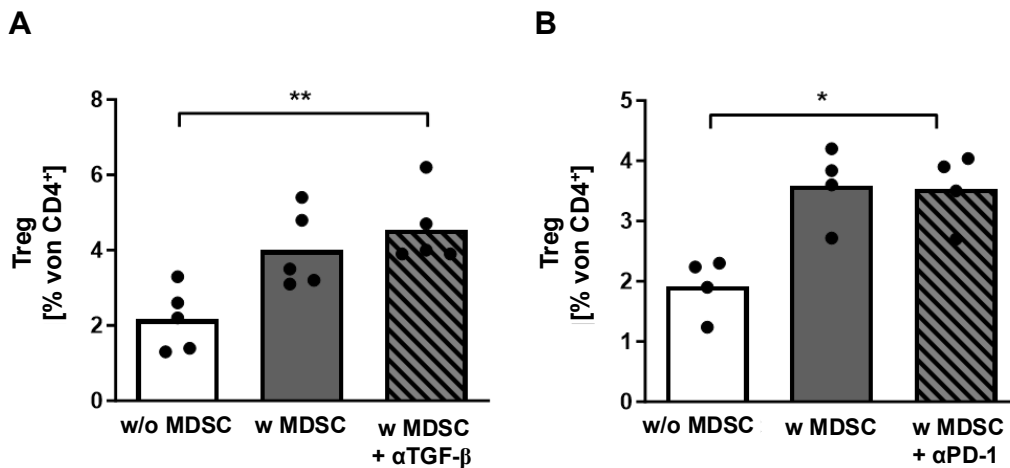


Abb. 23: TGF- β und PD-1 haben keinen Einfluss auf die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC

PBMC gesunder Erwachsener wurden allein, mit GR-NSB-MDSC sowie mit GR-NSB-MDSC und blockierenden Antikörpern gegen TGF- β bzw. PD-1 inkubiert. Nach 4-5 Tagen erfolgte nach extrazellulärer Färbung die durchflusszytometrische Messung der CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Tregs. Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen den Anteil der Tregs an allen CD4⁺ Zellen nach Kultur ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken), mit GR-NSB-MDSC (graue Balken) und nach Zugabe von GR-NSB-MDSC und blockierendem Antikörper gegen TGF- β (A) bzw. PD-1 (B) (grau schraffierte Balken). n = 5 bzw. n = 4, **p = 0,004, *p = 0,02, paired t-test.

3.4.5 Zwischenzusammenfassung III der Ergebnisse

Im dritten Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC zellkontaktunabhängig und durch einen von anderen Zellarten unabhängigen Mechanismus vermittelt wurde. Die Blockade von iNOS führte zu einer teilweisen Aufhebung des Effektes. Die Blockade von TGF- β und PD-1 zeigte keinen Effekt, sodass der vollständige Mechanismus unklar bleibt.

3.5 GR-NSB-MDSC führen zu einer Verminderung der Expression von MHC-II-Molekülen und zu einer Induktion der Expression co-inhibitorischer Moleküle auf Monozyten

Neben den Versuchen zur Wirkung von GR-NSB-MDSC auf die Differenzierung von T-Helferzellen untersuchten wir den Einfluss von GR-NSB-MDSC auf den Phänotyp von Monozyten. Dabei sollte die Hypothese überprüft werden, dass GR-MDSC aus dem Nabelschnurblut die Expression von MHC-II- bzw. von co-stimulatorischen/co-inhibitorischen Molekülen auf Monozyten modulieren und so möglicherweise deren Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen beeinflussen.

3.5.1 GR-NSB-MDSC reduzieren die Expression von MHC-II-Molekülen auf Monozyten

Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von T-Zellen durch Monozyten ist die Interaktion von über MHC-II-Moleküle präsentierte Antigene und dem T-Zell-Rezeptor. Um den Einfluss von GR-NSB-MDSC auf die Expression der MHC-II-Moleküle HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ auf Monozyten zu untersuchen, inkubierten wir PBMC gesunder, erwachsener Spender mit und ohne GR-NSB-MDSC. Nach vier- bis fünftägiger Co-Kultur zeigte sich eine signifikante Verringerung der Expression aller HLA-Moleküle auf Monozyten nach Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC im Vergleich zur Inkubation von PBMC allein (HLA-DR: MFI 140 vs. 730, **p = 0,008, HLA-DQ: MFI 165 vs. 1430, *p = 0,02, HLA-DP: MFI 140 vs. 535, *p = 0,02, n = 7 bzw. n = 6, Abb. 24).

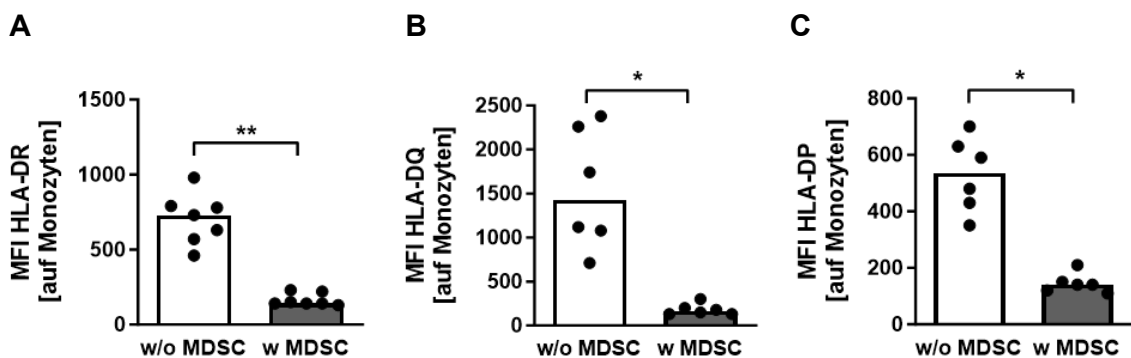


Abb. 24: GR-NSB-MDSC induzieren eine Herabregulation von MHC-II-Molekülen auf Monozyten

PBMC gesunder Erwachsener wurden allein und mit GR-NSB-MDSC inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurde nach extrazellulärer Färbung die Expression der MHC-II-Moleküle durchflusszytometrisch bestimmt. Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der MHC-II-Moleküle HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP nach Kultur von PMBC ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken) und mit GR-NSB-MDSC (graue Balken). n = 7 bzw. n = 6, **p = 0,008 HLA-DR, *p = 0,02 HLA-DP/HLA-DQ, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Um Hinweise auf die Zellkontaktabhängigkeit dieses Effekts zu erhalten, führten wir Transwell-Versuche durch. Die Versuche zeigten, dass die GR-NSB-MDSC-vermittelte Herabregulation von MHC-II-Molekülen auf Monozyten zellkontaktunabhängig war (n = 7 bzw. n = 5, *p < 0,05, **p < 0,01, Abb. 25).

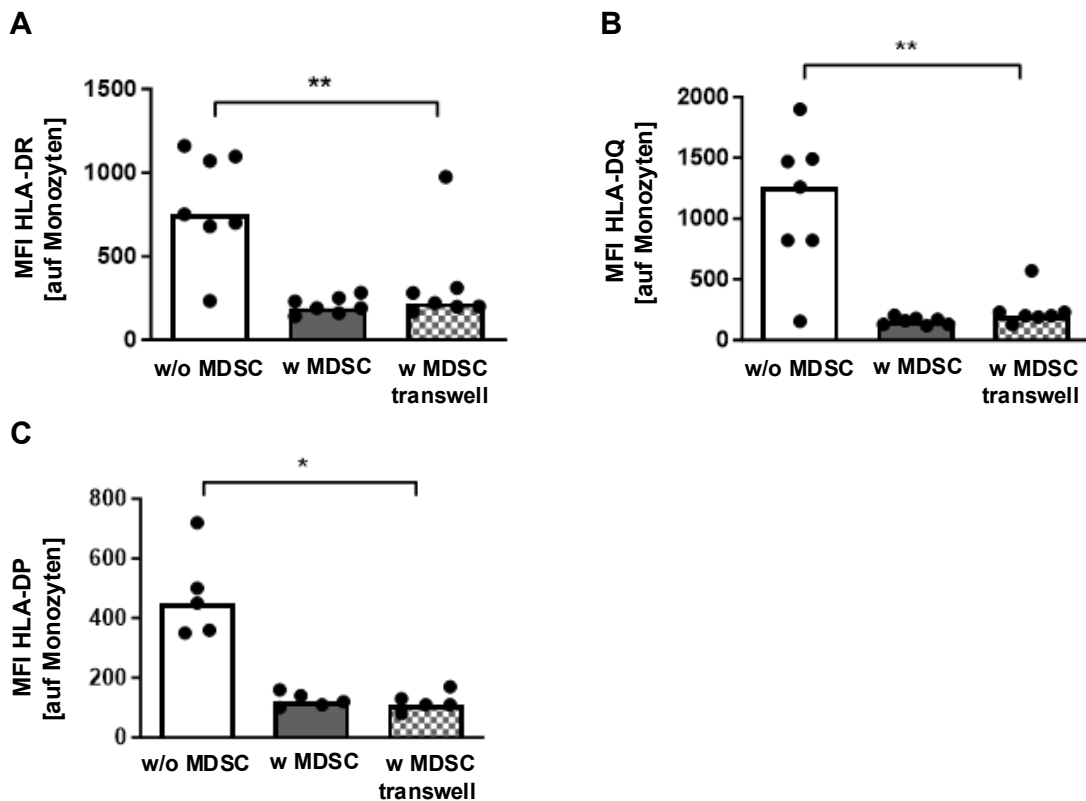


Abb. 25: Die GR-NSB-MDSC-vermittelte Herabregulation von MHC-II-Molekülen ist zellkontaktunabhängig

PBMC eines gesunden Erwachsenen wurden allein, in direktem Zellkontakt mit GR-NSB-MDSC, sowie mit GR-NSB-MDSC getrennt durch Transwells inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurde nach extrazellulärer Färbung die Expression der MHC-II-Moleküle durchflusszytometrisch bestimmt. Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der MHC-II-Moleküle HLA-DR (**A**), HLA-DQ (**B**) und HLA-DP (**C**) nach Kultur von PBMC ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken), mit GR-NSB-MDSC (graue Balken) sowie PBMC und GR-NSB-MDSC im transwell assay (karierte Balken). n = 7 bzw. n = 5, *p < 0,05, **p < 0,01, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

3.5.2 GR-NSB-MDSC induzieren co-inhibitorische Moleküle auf Monozyten, die Expression von co-stimulatorischen Molekülen bleibt nahezu unbeeinflusst

Neben der Interaktion von MHC-II und dem T-Zellrezeptor spielen bei der Aktivierung von T-Zellen co-stimulatorische und co-inhibitorische Moleküle eine wichtige Rolle. Daher untersuchten wir als nächstes, ob GR-NSB-MDSC auf die Expression der co-inhibitorischen Moleküle PD-L1 und PD-L2 oder die der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Monozyten Einfluss nehmen. Das Vorgehen entsprach dabei dem unter 3.5.1 beschriebenen Versuchsaufbau. Bei

Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC war die Expression von PD-L1 auf Monozyten um das 6-fache erhöht im Vergleich zu Kultur von PBMC allein (MFI 1730 vs. 290, n = 7, **p = 0,008, Abb. 26A), die Expression von PD-L2 stieg um das 1,5-fache an (MFI 460 vs. 270, n = 6, *p = 0,02, Abb. 26B). Die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Monozyten zeigte sich hingegen durch Co-Kultur mit GR-NSB-MDSC kaum verändert. (MFI CD80: 90 bei Inkubation ohne GR-NSB-MDSC vs. 130 bei Inkubation mit GR-NSB-MDSC, MFI CD86: 120 bei Inkubation ohne GR-NSB-MDSC vs. 160 bei Inkubation mit GR-NSB-MDSC, n = 7, *p < 0,05, Abb. 26 C+D).

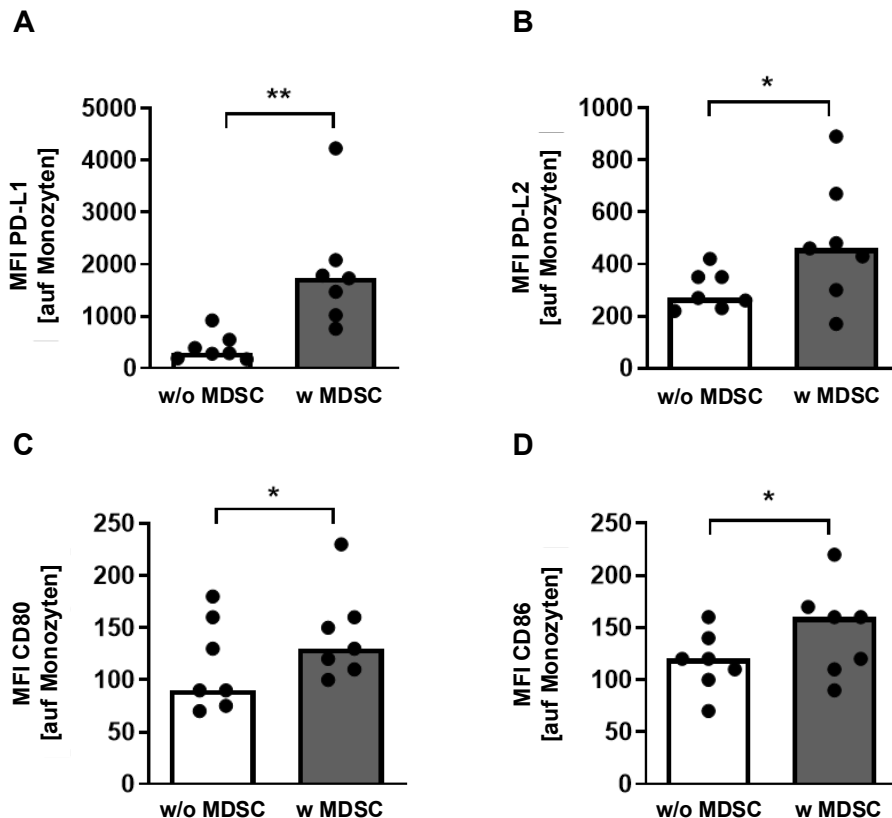


Abb. 26: GR-NSB-MDSC erhöhen die Expression der co-inhibitorischen Moleküle PDL-1 und PDL-2 auf Monozyten

PBMC gesunder Erwachsener wurden allein und mit GR-NSB-MDSC inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurde nach extrazellulärer Färbung die Expression der co-inhibitorischen Moleküle PD-L1 und PD-L2 sowie der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt. **(A+B)** Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von PDL-1 und PDL-2 nach Kultur von PMBC ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken) und mit GR-NSB-MDSC (graue Balken). n = 7, **p = 0,008, *p = 0,02, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **(C+D)** Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD80 und CD86 nach Kultur von PMBC ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken) und mit GR-NSB-MDSC (graue Balken). n = 7, *p < 0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Transwell-Versuche zeigten, dass die Trennung von GR-NSB-MDSC und PBMC durch eine Membran nicht zur Aufhebung der Induktion von PD-L1 oder PD-L2 führte (n = 8 bzw. n = 7, *p < 0,5, ns = nicht signifikant, Abb. 27A+B).

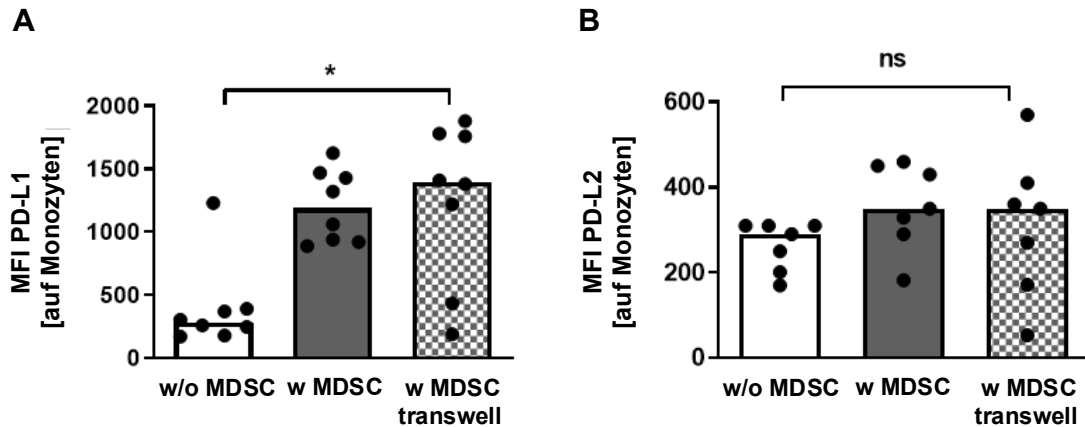


Abb. 27: Die GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion der Expression von PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten ist nicht zellkontaktabhängig

PBMC eines gesunden Erwachsenen wurden allein, in direktem Zellkontakt mit GR-NSB-MDSC, sowie mit GR-NSB-MDSC getrennt durch Transwells inkubiert. Nach 4-5 Tagen wurde nach extrazellulärer Färbung die Expression der co-inhibitorischen Moleküle PD-L1 und PD-L2 durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der co-inhibitorischen Moleküle PD-L1 (A) und PD-L2 (B) auf Monozyten nach Kultur von PMBC ohne GR-NSB-MDSC (weiße Balken), mit GR-NSB-MDSC (graue Balken) sowie PBMC und GR-NSB-MDSC im transwell assay (karierte Balken). n = 8 bzw. n = 7, *p < 0,5, ns = nicht signifikant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

4 Diskussion

Neugeborene zeigen eine verminderte Fähigkeit zur Infektabwehr. Sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem bestehen im Vergleich zu Erwachsenen zahlreiche Unterschiede, wobei die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen bis heute nur unzureichend verstanden sind. Daher wurde in dieser Arbeit die Hypothese überprüft, dass MDSC, die vermehrt in Nabelschnurblut vorkommen, durch ihre immunsuppressive Wirkung zu den Unterschieden im neonatalen Immunsystem und zur erhöhten Infektanfälligkeit bei Neugeborenen beitragen. Dazu untersuchten wir den Einfluss von MDSC aus dem Nabelschnurblut auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Helferzellen sowie auf den Phänotyp von Monozyten. Da vorangegangene Arbeiten unserer Gruppe gezeigt hatten, dass granulozytäre MDSC im Nabelschnurblut im Vergleich zu monozytären MDSC in deutlich größerer Anzahl vorkommen, verwendeten wir für unsere Versuche GR-NSB-MDSC.^[23]

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass (1) GR-NSB-MDSC T-Helferzellen in Richtung antiinflammatorischer Th2-Antworten polarisierten und zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen führten, (2) die GR-NSB-MDSC-induzierte Herabregulation von Th1-Zellen zellkontaktabhängig aber unabhängig von anderen Zellarten war und am ehesten durch eine erhöhte Apoptoserate bei Th1-Zellen hervorgerufen wurde, (3) die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC durch die Moleküle Arg1 und ROS vermittelt wurde und teilweise von Monozyten abhängig war, (4) GR-NSB-MDSC Tregs teilweise über iNOS induzierten und (5) GR-NSB-MDSC zu einer Herabregulation von MHC-II-Molekülen und einer gesteigerten Expression von co-inhibitorischen Molekülen führten und damit möglicherweise die Fähigkeit von Monozyten T-Zellen zu aktivieren reduzieren.

4.1 GR-NSB-MDSC polarisieren CD4⁺ T-Zellen in Richtung einer Th2-Antwort und induzieren Tregs

Wir konnten zeigen, dass die Co-Kultur von GR-NSB-MDSC mit PBMC gesunder Erwachsener zu einer Reduktion des Anteils an Th1-Zellen und einer Induktion

von Th2-Zellen führte. Diese Ergebnisse passen zu früheren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe, die zeigten, dass auch GR-MDSC, welche aus der humanen Plazenta isoliert wurden, eine Polarisierung in Richtung Th2 hervorriefen.^[25] Andere Arbeitsgruppen wiesen in verschiedenen Studien eine Korrelation zwischen erhöhten MDSC Zahlen und Th2-typischen Zytokinen bzw. mRNA bei Tumorpatienten nach.^[54-56] Eine direkte Induktion von Th2-Zellen und die Verringerung von Th1-Zellen durch MDSC wurde in experimentellen Mausmodellen für Knochenmarktransplantation, Influenzainfektion und Sepsis gezeigt.^[57-59] Beim Menschen konnte eine MDSC-induzierte Abnahme der IFN- γ Produktion durch Th1-Zellen in *in-vitro*-Versuchen mit monozytären MDSC von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom gezeigt werden. Umgekehrt zeigte eine andere Studie, dass es nach Depletion von CD33⁺ MDSC in PBMC HIV-positiver Patienten zu einer Zunahme der IFN- γ Produktion durch T-Zellen kam.^[49, 60] Entgegen unseren Ergebnissen bewirkten MDSC in Mausmodellen für Asthma und induziertem stumpfen Thoraxtrauma eine Verschiebung der T-Helferzellpopulation in Richtung Th1-Zellen.^[61-63] Eine Bestätigung dieser Daten im Menschen ist nach unserem Kenntnisstand derzeit noch ausstehend. In Anbetracht dieser unterschiedlichen Ergebnisse scheint der Einfluss von T-Helferzellen durch MDSC möglicherweise von den jeweiligen Umgebungsbedingungen abhängig zu sein.

Neben der Polarisierung in Richtung Th2-Antworten zeigte sich in unseren Versuchen eine Induktion von CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ Tregs durch GR-NSB-MDSC. Tregs wirken wie MDSC über verschiedenste Mechanismen immunsuppressiv auf andere T-Zellen. In der Schwangerschaft kommen sie in erhöhter Zahl vor und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der materno-fetalen Toleranz.^[64] Passend zu unseren Ergebnissen, die zeigen, dass MDSC, welche in hohen Zahlen beim Neugeborenen vorkommen, Tregs induzieren können, konnte gezeigt werden, dass die Zahl an Tregs bei Neu- und Frühgeborenen erhöht ist.^[13] Hinsichtlich ihrer Funktion für die Immunregulation des Neu- und Frühgeborenen scheinen Tregs essentiell für die gesunde Entwicklung des Mikrobioms des Darms^[65] und der Haut^[66] zu sein und sich protektiv auf die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis auszuwirken.^[67]

Andererseits wurde eine erhöhte Anzahl von Tregs bei Frühgeborenen mit Sepsis und bronchopulmonaler Dysplasie nachgewiesen.^[47, 68] So bleibt es bisher unklar, ob erhöhte Zahlen von Tregs günstig oder ungünstig für Neu- und Frühgeborene sind. Zur Interaktion zwischen MDSC und Tregs existieren zahlreiche Arbeiten, die meisten entstanden im Rahmen der Tumorforschung. Centuori et al. beschreiben eine Hemmung der Induktion von Tregs durch granulozytäre MDSC aus tumortragenden Mäusen nach Stimulation mit TGF- β .^[69] Alle anderen uns bekannten Studien in unterschiedlichsten Pathologien mit vermehrtem Vorkommen von MDSC (Tumor, HIV/HBV-Infektion, Nierentransplantation, rheumatoide Arthritis, Schwangerschaft) konnten sowohl im Mausmodell als auch in humanen Proben eine Induktion von Tregs durch monozytäre oder granulozytäre MDSC nachweisen.^[53, 70-77]

Zusammenfassend kann aus unseren Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass GR-NSB-MDSC beim Neonaten wahrscheinlich nicht nur direkt immunsuppressiv auf andere Immunzellen wirken, sondern auch indirekt durch eine Induktion von Tregs.

4.2 Die Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC benötigt direkten Zellkontakt, ist unabhängig von anderen Zellarten und wird wahrscheinlich durch eine erhöhte Apoptoserate hervorgerufen

Wir konnten zeigen, dass die GR-NSB-MDSC-vermittelte Verminderung von Th1-Zellen zellkontaktabhängig und unabhängig von anderen Zellarten war. Der Effekt ist möglicherweise auf eine Induktion von Apoptose in Th1-Zellen zurückzuführen, der genaue Mechanismus bleibt jedoch unklar.

Die Blockade der klassischen MDSC-Effektormoleküle Arg1, iNOS, ROS oder IDO zeigte in unseren Versuchen keinen Effekt auf die Reduktion von Th1-Zellen. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen an MDSC von Patienten mit akutem Koronarsyndrom und hepatozellulärem Karzinom in denen die Blockade von Arginase mittels nor-NOHA bzw. die Zugabe von Arginin die MDSC-vermittelte Herabregulation von Th1-Zellen zumindest teilweise aufhob.^[49, 78] Diese

unterschiedlichen Ergebnisse sind am ehesten durch verschiedene Versuchsbedingungen zu erklären, könnten aber auch darauf hindeuten, dass MDSC in unterschiedlichen Pathologien unterschiedliche Effektormechanismen aktivieren.

Als nächstes untersuchten wir, ob GR-NSB-MDSC die Verminderung von Th1-Zellen durch TGF- β vermitteln. TGF- β ist ein weiteres bekanntes Effektormolekül von MDSC,^[79] welches auch in membrangebundener Form exprimiert werden kann.^[80] Einige Studien beschreiben, dass TGF- β die Expression von INF- γ in CD4⁺ Zellen vermindert und zu einer Verschiebung des Phänotyps in Richtung Th2 führt.^[81, 82] Allerdings führte die Blockade von TGF- β mittels Antikörper in unseren Experimenten zu keiner Aufhebung des durch GR-NSB-MDSC verursachten Effektes.

In Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse zu einer Verminderung von Th1-Antworten führte und dieser Effekt durch Blockade von PD-1 reversibel war.^[51, 83] PD-1 gehört zur Familie der co-inhibitorischen Moleküle und findet sich auf vielen Immunzellen insbesondere auch auf CD4⁺ T-Zellen.^[84] Zudem wurde in den letzten Jahren eine Expression der Liganden PD-L1 und PD-L2 außer auf T- und B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen im Rahmen von Entzündungsreaktionen auch auf MDSC nachgewiesen.^[85-87] Im Einklang mit diesen Studien ergaben unsere Versuche, dass GR-NSB-MDSC nativ kaum, nach Stimulation mit INF- γ jedoch durchaus PD-L1 exprimierten. In einem murinen Tumormodell führte die Blockade von PD-L1 auf MDSC in Hypoxie nicht jedoch in Normoxie zur teilweisen Aufhebung der Suppression von INF- γ ⁺ CD4⁺ und CD8⁺ Zellen.^[88] Bei Versuchen mit MDSC von HIV-positiven Patienten konnte die MDSC-vermittelte Hemmung der INF- γ -Produktion stimulierter CD8⁺ T-Zellen ebenfalls mittels Blockade von PD-L1 aufgehoben werden.^[89] In unseren Co-Kulturen zeigte die Blockade von PD-1 allerdings keinen Effekt. Da in allen anderen Studien stimulierte T-Zellen verwendet wurden und unsere Untersuchungen ergaben, dass GR-NSB-MDSC in unstimuliertem Zustand nur wenig PD-L1 exprimieren, vermuten wir, dass PD-L1-vermittelte Effekte von MDSC nur nach Stimulation nachweisbar sind, nicht jedoch in unserem Versuchsansatz.

Die Inkubation von PBMC mit GR-NSB-MDSC führte in den eigenen Experimenten zu einer erhöhten Apoptoserate in CD4⁺ T-Zellen, insbesondere in den CD183⁺ Th1-Zellen. Somit könnte eine Induktion von Apoptose durch GR-NSB-MDSC zur Th1-Herabregulation beitragen. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien anderer Gruppen, in denen MDSC sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen in CD3⁺, bzw. CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen Apoptose auslösten.^[90-93] Bei zwei Studien war der Effekt zellkontaktabhängig, in den anderen wurde der Mechanismus nicht untersucht. Apolloni et al. konnten keinen der typischen Apoptosewege, wie TNF- α , CD95/CD95L oder TRAIL, als Ursache identifizieren,^[92] wohingegen in den Experimenten in Tumormodellen von Zhu et al., Xia et al. und Hailemichael et al. die MDSC-vermittelte Apoptose von CD8⁺ Zellen nach Blockade von INF- γ bzw. CD95L aufgehoben werden konnte (INF- γ verursachte eine starke CD95L-Induktion).^[94-96] In unseren GR-NSB-MDSC/PBMC-Co-Kulturen führte die Blockade von CD95L nicht zu einer Aufhebung der Th1-Herabregulation. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien verwendeten wir jedoch keine CD8⁺ T-Zellen, sondern CD4⁺ T-Zellen. Zudem lag in den Tumormausmodellen ein inflammatorisches Milieu zugrunde, während wir unstimulierte T-Zellen inkubierten. Da CD95L stark durch INF- γ induziert wird, könnte die fehlende Induktion von CD95L auf GR-NSB-MDSC in unserem Modell eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Der TIM-3/Galectin-9 Signalweg wurde ebenfalls mit der Apoptose bzw. Herabregulation von Th1-Zellen in Verbindung gebracht.^[97] Allerdings war auf unseren GR-NSB-MDSC Galectin-9 nur minimal exprimiert (Daten sind nicht gezeigt), sodass wir diesen Mechanismus nicht weiter untersuchten.

Die Expression von IL-6 durch MDSC scheint ein weiterer möglicher Mechanismus der MDSC-induzierten Herabregulation von Th1-Zellen zu sein.^[98] Da IL-6 ein löslicher Botenstoff ist und in unseren Versuchen die Th1-Herabregulation zellkontaktabhängig war, kam dieser Mechanismus in unserem Modell jedoch nicht als Erklärung in Frage und wurde daher nicht weiter untersucht.

Damit bleibt der genaue Mechanismus für die Hemmung von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC unklar. Am ehesten scheint eine Apoptoseinduktion durch

MDSC hierfür verantwortlich zu sein. In Zukunft könnten weitere Experimente, in welchen die Apoptose-Signalwege genauer untersucht werden, dazu beitragen den Mechanismus genauer zu verstehen.

4.3 Die Induktion von Th2-Zellen durch GR-NSB-MDSC wird durch die Effektormoleküle Arg1 und ROS hervorgerufen und ist teilweise abhängig von einer Interaktion mit Monozyten

In anderen Studien, die eine Induktion von Th2-Zellen durch MDSC beschrieben, wurde der zugrundeliegende Mechanismus nicht untersucht.^[57-59] Hinsichtlich der Wirkung von Arginase ist jedoch bekannt, dass M2-Makrophagen (diesem Makrophagensubtyp werden im Gegensatz zu M1-Makrophagen eher anti-inflammatorische Effekte zugeschrieben) durch Arg1 und die Verstoffwechslung von Arginin eine verstärkte Produktion von Th2-typischen Zytokinen wie zum Beispiel IL-4 induzieren.^[99] Zudem konnte in Studien in Tumormodellen gezeigt werden, dass vor allem granulozytäre MDSC über die Expression von Arg1 eine L-Arginindepletion verursachen und dadurch die Proliferation von aktivierten T-Zellen hemmen.^[100] Wir fügen nun hinzu, dass granulozytäre MDSC aus dem Nabelschnurblut die Induktion von Th2-Zellen zum Teil durch die Expression von Arg1 vermitteln.

In den von uns durchgeführten Versuchen zeigten ROS hinsichtlich der GR-NSB-MDSC-vermittelten Induktion von Th2-Zellen einen synergistischen Effekt mit Arg1. Die Freisetzung von ROS ist ein bekannter Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von MDSC auf T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen.^[101] Bislang konnte unter anderem gezeigt werden, dass aus MDSC freigesetzte ROS die T-Zellproliferation vermindern^[102] sowie hemmenden Einfluss auf die antigenspezifische Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen haben.^[103] Tang et al beschrieben zudem, dass dendritische Zellen mittels ROS eine Verschiebung von CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th2-Antworten bewirken.^[104] Dies unterstützt unsere Ergebnisse, dass auch von MDSC produzierte ROS diesen Effekt hervorzurufen scheinen.

Die GR-NSB-MDSC-vermittelte Polarisation in Richtung Th2-Antworten war in unseren Versuchen zum Teil abhängig von Monozyten, während B-Zellen keinen Einfluss auf den Effekt hatten. Über die Interaktion von MDSC und Monozyten/Makrophagen ist bislang wenig bekannt. Im Tumor-Mausmodell bewirkten MDSC durch Verminderung der Expression von IL-12 in Makrophagen zellkontaktabhängig eine Polarisierung von M1-Makrophagen in Richtung eines M2-Phänotyps.^[105] Diese MDSC-vermittelte Polarisierung in Richtung M2-Makrophagen konnte auch in *in-vivo*- und *in-vitro*-Versuchen mit adipösen Mäusen nachgewiesen werden.^[96] Während M1-Makrophagen eher mit der Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und der Induktion von Th1-Antworten in Verbindung gebracht werden, werden M2-Antworten mit der Expression von antiinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und der Induktion von Th2-Antworten assoziiert.^[99] In unseren Transwell-Versuchen zeigte sich eine leicht verminderte GR-NSB-MDSC-vermittelte Induktion von Th2-Zellen im Vergleich zu den Versuchen ohne Transwells. Wir schließen daraus, dass dieser Anteil möglicherweise auf eine zellkontaktabhängige Induktion von Th2-Zellen durch Monozyten zurückzuführen ist. Wahrscheinlich induzieren GR-MDSC aus dem Nabelschnurblut unseren Ergebnissen nach Th2-Zellen potentiell über zwei Wege: einerseits über einen direkten, zellkontaktunabhängigen Weg mittels Expression von Arg1 und ROS, und andererseits über einen indirekten von Monozyten abhängigen, zellkontaktabhängigen Mechanismus.

4.4 GR-NSB-MDSC induzieren Tregs teilweise durch iNOS

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die Induktion von Tregs durch GR-NSB-MDSC zumindest teilweise durch die Expression von iNOS vermittelt wird. Die derzeit verfügbare Literatur bezüglich des Mechanismus einer Treg-Induktion durch MDSC ist widersprüchlich. Es ist uns keine Studie bekannt, in der von MDSC exprimierte iNOS mit der Induktion von Tregs in Verbindung gebracht worden wäre. In einer Studie von Park et al.^[77] an Mäusen mit induzierter rheumatoider Arthritis hob die Zugabe von anti-IL10 eine Induktion von Tregs durch MDSC auf, die Zugabe des iNOS-Inhibitors L-NMMA zeigte

dagegen keinen Effekt auf die MDSC-vermittelte Induktion von Tregs. Ähnliche Ergebnisse ergaben zwei weitere Studien in Tumormausmodellen.^[72, 75]

Neben iNOS blockierten wir als weiteres klassisches MDSC-Effektormolekül Arginase mittels nor-NOHA. Die Blockade hatte in unseren Versuchen keinen Effekt auf die Induktion von Tregs. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und denen von Park et al., die ebenfalls keinen Effekt einer Blockade von Arginase auf eine MDSC-vermittelte Treg-Induktion zeigten, führte die Blockade von Arginase in einer Studie von Serafini et al. in einem Tumormausmodell zur Aufhebung einer MDSC-vermittelten Induktion von Tregs.^[75]

Jitschin et al.^[70] beschrieben eine teilweise über IDO-vermittelte Induktion von Tregs durch MDSC, während wir keinen Effekt durch Blockade von IDO zeigen konnten. Allerdings verwendeten Jitschin et al. monozytäre MDSC von Tumorpatienten, sodass die unterschiedlichen Ergebnisse den verschiedenen MDSC-Populationen geschuldet sein könnten.

Da ROS in einer Studie als essentiell für die Induktion von Tregs durch Makrophagen beschrieben wurden,^[106] blockierten wir ROS mittels Catalase. Überraschenderweise führte die Blockade auch ohne Zugabe von MDSC zu einer starken Induktion von Tregs, die zusätzliche Zugabe von GR-NSB-MDSC ergab eine leichte Hemmung des Effekts. Somit bleibt unklar, ob die fehlende Induktion von Tregs durch MDSC auf die Blockade von radikalen Sauerstoffspezies zurückzuführen ist, oder ob die starke Induktion von Tregs durch den Inhibitor selbst nicht mehr durch die MDSC-Wirkung verstärkt werden konnte.

Auch TGF- β wurde in der Literatur als wichtiger Botenstoff zur Induktion von Tregs beschrieben.^[107, 108] Daher blockierten wir auch dieses Molekül mittels Antikörper. Im Einklang mit den Ergebnissen von Serafini^[75] und Park^[77] zeigte die Blockade keine Aufhebung des Effektes von GR-NSB-MDSC auf die Treg-Induktion. Im Gegensatz dazu konnten andere Gruppen im Rahmen einer HBV-Infektion und im Rahmen der Schwangerschaft eine MDSC-vermittelte Induktion von Tregs auf TGF- β zurückführen.^[53, 76]

Im Mausmodell wurde beschrieben, dass PD-1 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von induzierten regulatorische T-Zellen spielt.^[109] In unseren Versuchen blieb die Zugabe eines anti-PD1-Antikörpers allerdings wirkungslos. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Jitschin et al. ^[70]

In zwei kürzlich erschienenen Veröffentlichungen konnte mit einer Blockade von IL-10 eine MDSC-vermittelte Induktion von Tregs aufgehoben werden. ^[76, 77] Da es sich bei IL-10 um einen löslichen Botenstoff handelt, wäre eine Untersuchung in Zukunft in unserem Modell gegebenenfalls lohnenswert.

Zusammenfassend bleibt der genaue Mechanismus der MDSC-vermittelten Induktion von Tregs unklar. Infrage kommen sowohl lösliche Botenstoffe, wie TGF- β , IL-10 oder Arginase. Andererseits beschrieben Arbeiten auch eine zellkontaktabhängige Induktion, z.B. über CD40-CD40L Interaktionen.^[110, 111] Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsansätze in den verschiedenen Studien (monozytäre vs. granulozytäre MDSC, *in-vitro* vs. *in-vivo* Versuche, stimulierte vs. unstimulierte T-Zellen, unterschiedliche Krankheitsmodelle) ist es möglich, dass in unterschiedlichen Situationen verschiedene Mechanismen den gleichen Effekt zeigen könnten. Weitere Studien sind erforderlich, um diesen Sachverhalt zu untersuchen.

4.5 GR-NSB-MDSC führen zu einer Herabregulation von MHC-II-Molekülen auf Monozyten und zu einer Induktion von co-inhibitorischen Molekülen

Über die Wirkung von MDSC auf Monozyten ist bislang wenig bekannt. Sinha et al. und Xia et al. beschrieben, dass MDSC im Mausmodell die Produktion von inflammatorisch wirkendem IL-12 von Makrophagen supprimieren und einen eher antiinflammatorischen M2 Phänotyp fördern.^[96, 105] Wir fügen nun hinzu, dass GR-NSB-MDSC eine Herabregulation der MHC-II-Moleküle HLA-DR, -DQ und -DP und eine Induktion der co-inhibitorischen Moleküle PDL-1 und PDL-2 auf Monozyten bewirken. Somit könnten MDSC indirekt zu einer verminderten T-Zellaktivierung beitragen.

Die in unseren Co-Kulturen aus GR-NSB-MDSC und PMBC gezeigte Herabregulation von MHC-II-Molekülen auf Monozyten differiert zu Untersuchungen im murinen Tumormodell von Lacotte et al. in denen MDSC eine leichte Induktion von MHC-II-Molekülen auf Kupffer-Zellen bewirkten.^[112] Kupffer-Zellen sind in der Leber ansässige Makrophagen, die nicht im Knochenmark gebildet werden und deren Funktionen sich teilweise von einwandernden Makrophagen unterscheiden.^[113] Dies könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Resultate sein. Umgekehrt stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit mehreren Studien, die eine im Vergleich zu Erwachsenen verminderte Expression von HLA-DR auf neonatalen Monozyten zeigten.^[114-116] Eine stark verminderte Expression von HLA-DR Molekülen scheint in VLBW-Frühgeborenen mit einem erhöhten Infektionsrisiko assoziiert zu sein.^[117] Außerdem wurde beschrieben, dass die Expression von HLA-DR in Neugeborenen mit Infektion deutlich vermindert ist im Vergleich zu gesunden Neugeborenen.^[114, 118] MDSC, die während einer Sepsis in Neonaten in erhöhter Zahl vorkommen,^[119] könnten zu diesen Effekten beitragen.

Während GR-NSB-MDSC in unseren Versuchen zu einer Induktion der co-inhibitorischen Moleküle PD-L1 und PD-L2 auf Monozyten führten, blieb die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nahezu unverändert. Eine Induktion von PD-L1 durch MDSC wurde zuvor schon in Tumormausmodellen bei Kupfferzellen gezeigt.^[112, 120] Allerdings sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar, da es sich bei Kupfferzellen wie oben bereits erwähnt um einen speziellen Makrophagen-Subtyp handelt. Zwischenzeitlich konnte in unserer Gruppe gezeigt werden, dass die Expression von PD-L1 auf Monozyten von Erwachsenen nach Stimulation mit Streptokokken der serologischen Gruppe B (GBS) deutlich höher lag im Vergleich zu Monozyten aus Nabelschnurblut.^[121] Die Literatur hinsichtlich der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf neonatalen beziehungsweise adulten Monozyten ist widersprüchlich. Die meisten Gruppen berichten von einer verminderten Expression von CD80 auf neonatalen Monozyten, während die Ergebnisse bei der Expression von CD86 sehr differieren.^[122-126] Nach Stimulation scheinen neonatale Monozyten im Vergleich zu adulten Monozyten

eine verminderte Induktion von CD80/86 zu zeigen.^[127] In unseren Untersuchungen beeinflussten GR-NSB-MDSC die Expression von CD80/86 auf Monozyten kaum, der verminderten Expression dieser co-stimulatorischen Moleküle auf neonatalen Monozyten scheint daher ein anderer Mechanismus zugrunde zu liegen.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse könnten MDSC durch Herabregulation von MHC-II-Molekülen und Induktion von co-inhibitorischen Molekülen dazu beitragen, dass neonatale Monozyten eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellantworten haben. Diese Hypothese konnte in nachfolgenden Untersuchungen unserer Gruppe in *in-vitro*-Versuchen bestätigt werden.^[46] Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass GR-NSB-MDSC neben der direkten Suppression von T-Zellantworten auch indirekt die Aktivierung von T-Zellen negativ beeinflussen.

4.6 Methodenkritik und Limitationen unseres Systems

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von GR-NSB-MDSC auf die Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen sowie auf den Phänotyp von Monozyten umfassend untersucht. Es gibt jedoch auch verschiedene Limitationen unseres Systems.

Das verwendete Nabelschnurblut wurde von gesunden, reifen Neugeborenen direkt nach primärer oder sekundärer Sectio caesarea verarbeitet. Ausgeschlossen waren Kinder mit Verdacht auf Amnioninfektionssyndrom oder Kinder von Müttern mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen wie Präeklampsie oder HELPP-Syndrom. Andere mütterliche Vorerkrankungen wie zum Beispiel (Schwangerschafts-) Diabetes stellten keine Kontraindikation zum Einschluss in die Studie dar, könnten jedoch die Ergebnisse beeinflusst haben. Blutproben für die Gewinnung von PBMC wurden von gesunden, erwachsenen Spendern entnommen. Laborchemische Untersuchungen zum Ausschluss einer akuten subklinischen Infektion wurden jedoch nicht durchgeführt.

Eine weitere Einschränkung der Studie stellt die ausschließliche Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von MDSC aus Nabelschnurblut, nicht jedoch

von MDSC aus postnatal abgenommenem Blut dar. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die MDSC-Zahlen in Neugeborenen nach den ersten 4 Lebenswochen zurückgehen.^[24] Aufgrund des geringen Probenvolumens sind funktionelle Versuche mit neonatalen MDSC aus postnatalen Blutabnahmen nahezu unmöglich. Wir können daher nur vermuten, dass granulozytäre MDSC in der postnatalen Phase über dieselben Eigenschaften verfügen, wie zum Zeitpunkt der Geburt.

Bei einigen in den Versuchen verwendeten Zellsubtypen wie zum Beispiel GR-NSB-MDSC und Tregs bestehen zudem Schwierigkeiten bei der Isolation und Diskurse über die Zellcharakterisierung. Bei humanen MDSC sind bislang keine MDSC-spezifischen Marker oder Marker-Kombinationen bekannt. Die Trennung von granulozytären MDSC und neutrophilen Granulozyten kann nur über ihre Dichte mittels Dichtegradientenzentrifugation erfolgen. Neutrophile Granulozyten besitzen eine höhere Dichte als GR-MDSC, allerdings können aktivierte Granulozyten an Dichte verlieren und dann mit mononukleären Zellen sedimentieren.^[15] Um eine starke Verunreinigung der in unseren Versuchen verwendeten GR-NSB-MDSC mit Granulozyten auszuschließen, führten wir zusätzlich funktionelle Versuche mittels T-Zellproliferations-Assays durch, um anhand der suppressiven Eigenschaft nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um MDSC handelte. Auch für Tregs ist bisher kein spezifischer Oberflächen-Marker bekannt. Übereinstimmend zu vorherigen Publikationen klassifizierten wir Tregs als CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺-Zellen.^[13] Allerdings können auch aktivierte T-Effektorzellen CD25 und FoxP3 exprimieren und somit die Ergebnisinterpretation erschweren. Alternative Charakterisierungen beinhalten beispielsweise zusätzlich den Marker CD127^{low/-} zur Identifizierung von Tregs, welcher in unseren Versuchen jedoch nicht verwendet wurde.^[128]

In dieser Arbeit wurde jeder Versuch mindestens fünfmal durchgeführt. Die geringe Fallzahl ist dem Umstand geschuldet, dass es sich größtenteils um funktionelle Versuche handelte, die mit einem hohen Aufwand verbunden sind. Eine größere Fallzahl könnte die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen.

Zuletzt handelt es sich bei unseren Experimenten um *in-vitro*-Versuche. Die Ergebnisse sollten in Zukunft mittels *in-vivo*-Studien beispielsweise im Mausmodell bestätigt werden.

4.7 Schlussfolgerung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass GR-NSB-MDSC die Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zugunsten eines antiinflammatorischen Phänotyps beeinflussen. Hinsichtlich der Modulation der T-Helferzellendifferenzierung scheinen die zugrunde liegenden Mechanismen für die verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen unterschiedlich zu sein. Während die Herabregulation von Th1-Zellen durch GR-NSB-MDSC auf einen zellkontaktabhängigen Mechanismus und am ehesten auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen war, wurde die Induktion von Th2-Zellen durch Arg1 und ROS vermittelt und war teilweise abhängig von Monozyten. Tregs wurden hingegen mindestens teilweise über iNOS induziert (siehe zusammenfassende Abb. 28).

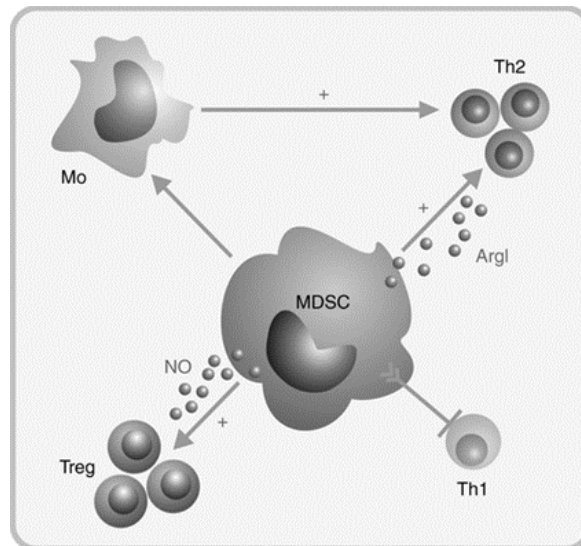


Abb. 28: GR-NSB-MDSC modulieren die Differenzierung von T-Helferzellen zugunsten eines antiinflammatorischen Phänotyps

GR-NSB-MDSC hemmen die Differenzierung von Th1-Zellen über einen zellkontaktabhängigen Mechanismus, weitere Zellarten sind nicht involviert. GR-NSB-MDSC induzieren Th2-Zellen durch die Expression des Effektorenzyms Arg1 und die Produktion von ROS. Dieser Effekt war teilweise abhängig von einer Interaktion mit Monozyten. GR-NSB-MDSC induzieren Tregs teilweise über eine Expression von iNOS. Die Ergebnisse zeigen, dass MDSC über eine Vielzahl von Mechanismen verfügen, mit der sie T-Zellantworten hin zu einem eher antiinflammatorischen Phänotyp modulieren.

Zudem veränderten GR-NSB-MDSC die Expression von MHC-II- und co-inhibitorischen Molekülen auf Monozyten zugunsten eines antiinflammatorischen Phänotyps. Der hier zugrundeliegende Mechanismus wurde nicht weiter untersucht.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass MDSC adaptive und angeborene neonatale Immunantworten modulieren können. Allerdings bleibt ihre Rolle im neonatalen Immunsystem weiterhin unklar. Zum einen scheinen MDSC wichtig, um überschießende Immunreaktionen während der bakteriellen Besiedlung des Darmes und der Haut von Neonaten zu verhindern^[22] und könnten protektiv bei inflammatorischen Erkrankungen wie der nekrotisierenden Enterokolitis wirken.^[28, 29] Andererseits könnten ihre suppressiven Eigenschaften dazu beitragen, die Infektanfälligkeit von Neonaten zu erhöhen. Ob MDSC während einer neonatalen Sepsis durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften eher protektiv wirken oder schaden, ist unklar.^[129, 130] Weitere Studien sind daher notwendig, um zu evaluieren, ob die Hemmung oder Förderung von MDSC-Funktionen einen positiven Einfluss auf inflammatorische Erkrankungen des Neu- und Frühgeborenen, wie die neonatale Sepsis, die bronchopulmonale Dysplasie oder die periventrikuläre Leukomalazie hat. Auf Basis dieser Erkenntnisse könnten zukünftig therapeutische Strategien entwickelt werden, um MDSC-Funktionen entsprechend zu modulieren und damit zur Reduktion der neonatalen Morbidität und Mortalität beizutragen.

5 Zusammenfassung

Bei Neu- und insbesondere Frühgeborenen treten Infektionen gehäuft auf und verlaufen oft schwer. Perinatale Infektionen sind eine der Hauptursachen neonataler Mortalität und Morbidität und gelten als Risikofaktor für die Entstehung inflammatorischer Folgeerkrankungen wie periventrikuläre Leukomalazie oder bronchopulmonale Dysplasie. Die verminderte Fähigkeit zur Infektabwehr wird vor allem auf quantitativ und qualitativ veränderte neonatale Immunantworten zurückgeführt. Im Vergleich zu Erwachsenen zeigen beispielsweise neonatale antigenpräsentierende Zellen eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zell-Antworten, T-Helferzellantworten sind in Richtung von eher antiinflammatorischen Th2-Antworten verschoben. Die immunologischen Mechanismen, die diese Veränderung im neonatalen Immunsystem bedingen, sind bisher unzureichend verstanden.

Myeloide Suppressorzellen sind eine heterogene Gruppe myeloider Zellen, die immunsuppressiv auf andere Immunzellen wirken und physiologischer Weise vermehrt im Nabelschnurblut vorkommen. Über den Einfluss von NSB-MDSC auf die immunologischen Prozesse in der Neugeborenenzeit ist bisher wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, ob und mit welchen Mechanismen GR-MDSC aus dem Nabelschnurblut die Aktivierung und Differenzierung von T-Helferzellen beeinflussen. Wir konnten zeigen, dass GR-NSB-MDSC Th1-Antworten möglicherweise durch Induktion von Apoptose hemmen und mittels der Effektormoleküle Arg1 und ROS Th2-Zellen induzieren. Außerdem induzierten GR-NSB-MDSC Tregs, zum Teil vermittelt durch das Effektorenzym iNOS. In Monozyten bewirkten GR-NSB-MDSC eine verminderte Expression von MHC-II-Molekülen und eine erhöhte Expression von co-inhibitorischen Molekülen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass MDSC neonatale Immunantworten nicht nur generell hemmen, sondern gezielt modulieren. Ob sich diese Modulation günstig oder ungünstig für das Neugeborene auswirkt, bleibt unklar. In Zukunft könnte die Beeinflussung von MDSC-Funktionen genutzt werden, um neonatale

Immunantworten zu verändern und damit möglicherweise entzündliche Erkrankungen des Neugeborenen günstig zu beeinflussen.

6 Anhang

6.1 Charakterisierung von GR-NSB-MDSC

MDSC sind eine heterogene Gruppe aus myeloiden Zellen, die zum einen über ihre Oberflächenmarker und zum anderen über ihre Fähigkeit die T-Zellproliferation zu hemmen, charakterisiert werden. Die Abgrenzung zu anderen Zellarten, insbesondere Granulozyten ist aufgrund bisher nicht bekannter spezifischer MDSC-Oberflächenmoleküle erschwert.^[15] Daher erfolgte eine Phänotypisierung und funktionelle Untersuchung der für die Versuche verwendeten GR-NSB-MDSC.

6.1.1 Phänotypisierung von GR-NSB-MDSC

Menschliche granulozytäre MDSC werden allgemein beschrieben als CD66b⁺/CD33⁺/CD11b⁺/HLA-DR^{low}/CD14⁻ Zellen.^[14, 16] Abbildung 29A zeigt einen repräsentativen Density Plot nach Anfärbung von CD66b⁺ GR-NSB-MDSC aus CBMC. Die GR-NSB-MDSC zeigten eine hohe Expression des granulozytären Markers CD66b, des myeloiden Markers CD33 sowie des Markers 11b. Die Oberflächenmarker CD14 und HLA-DR waren schwach exprimiert (siehe Abb. 29B).

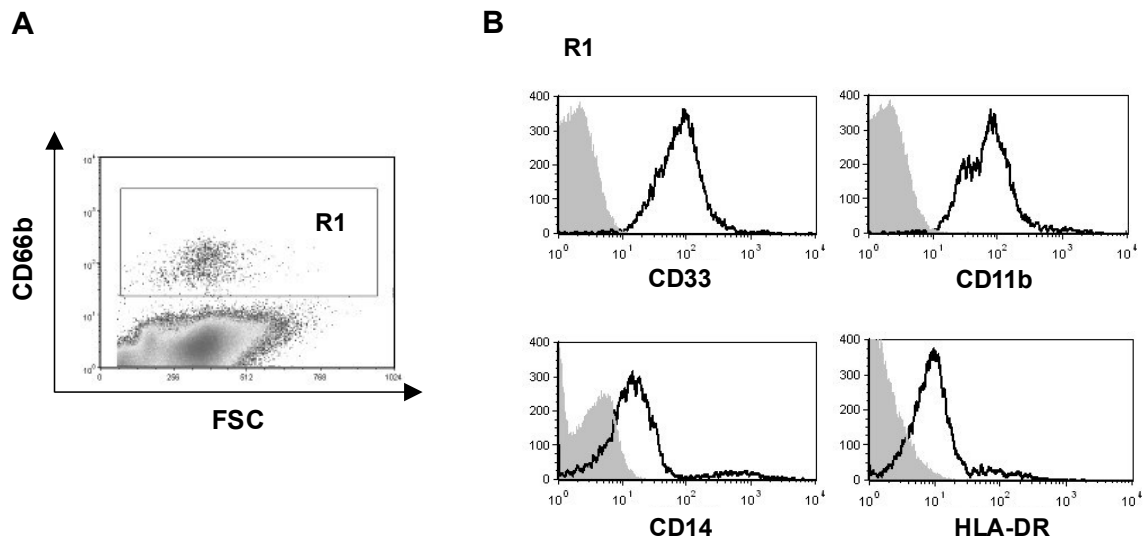


Abb. 29: Phänotypisierung von humanen GR-NSB-MDSC als CD66b⁺/CD33⁺/CD11b⁺/HLA-DR^{-low}/CD14⁻ Zellen

CBMC wurden per Dichtegradientenzentrifugation aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener angereichert, extrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Density-plot mit FSC und CD66b. R1 zeigt die CD66b⁺ GR-NSB-MDSC. **(B)** Histogramm-Plots zeigen die Expression der Oberflächenmarker CD33, CD11b, CD14 und HLA-DR auf CD66b⁺ GR-NSB-MDSC aus Gate R1 (weiß, Negativkontrollen in hellgrau).

6.1.2 Nachweis der suppressiven Aktivität von GR-NSB-MDSC

Ein weiteres wichtiges Merkmal von MDSC in der Abgrenzung zu anderen Zellarten (insbesondere zu reifen Granulozyten) ist die Fähigkeit, die Proliferation von T-Zellen zu supprimieren. Daher führten wir zum Nachweis der suppressiven Wirkung der aus Nabelschnurblut isolierten CD66b⁺ Zellen zusätzlich zu den anderen Versuchen T-Zell-Proliferationsassays durch. Dazu wurden GR-NSB-MDSC mittels Dichtegradientenzentrifugation sowie MACS aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener angereichert und mit CFSE-gefärbten und mit OKT3/IL-2 stimulierten PBMC von gesunden Erwachsenen inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte CFSE-gefärbte PBMC (Negativkontrolle) und stimulierte CFSE-gefärbte PBMC ohne MDSC (Positivkontrolle). In Abb. 30A sind exemplarische Histogramme eines Proliferationsversuchs abgebildet. Abb. 30B zeigt den jeweiligen Proliferationsindex, der aus dem Verhältnis von T-Zell-Proliferation mit GR-NSB-MDSC und T-Zell-Proliferation ohne GR-NSB-MDSC bestimmt wurde, wobei die T-Zell Proliferation ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC auf einen Wert von 100% festgesetzt war. Im Vergleich zur CD4⁺ T-Zell-

Proliferation ohne GR-NSB-MDSC zeigte sich bei Zugabe von GR-NSB-MDSC eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation auf $71\% \pm 8,3\%$ (PBMC:MDSC 4:1) bzw. auf $64\% \pm 8,9\%$ (PBMC:MDSC 2:1) ($n = 6$, $*p = 0,016$ bzw. $n = 8$, $**p = 0,0039$, Abb. 30B).

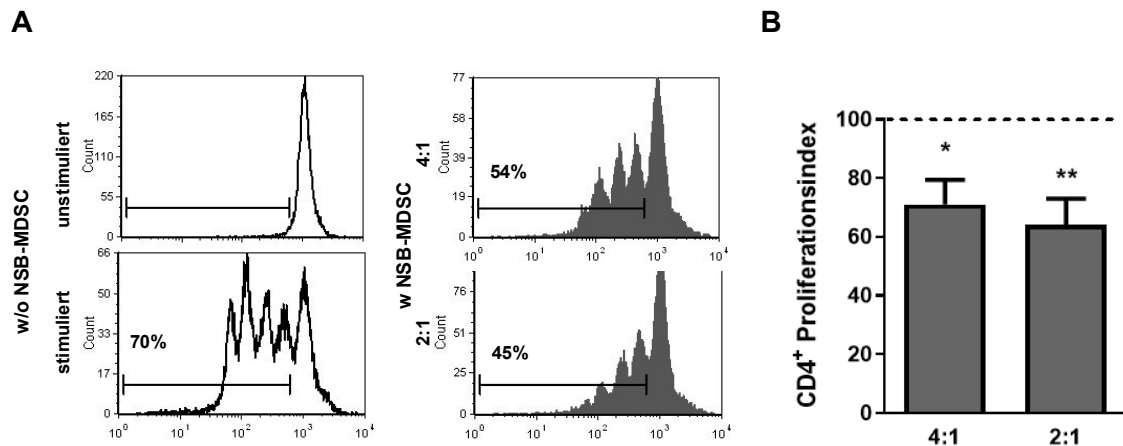


Abb. 30: Nachweis der suppressiven Wirkung von GR-NSB-MDSC auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen

CFSE-markierte und mit OKT3 und IL-2 stimulierte PBMC gesunder Erwachsener wurden mit durch MACS angereicherte GR-NSB-MDSC im Verhältnis 4:1 und 2:1 inkubiert. Nach vier- bis fünftägiger Kultur wurde die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen anhand der CFSE-Intensität bestimmt. **(A)** Die weißen Histogramme zeigen die Proliferation von stimulierten und unstimulierten CD4⁺ T-Zellen ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC, die dunklen Histogramme zeigen die Proliferation von stimulierten CD4⁺ T-Zellen nach Zugabe von GR-NSB-MDSC im Verhältnis 4:1 und 2:1. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt den Proliferationsindex nach Zugabe von GR-NSB-MDSC im Verhältnis 4:1 und 2:1. Dieser wurde berechnet aus dem Verhältnis von T-Zell-Proliferation mit GR-NSB-MDSC und T-Zell Proliferation ohne Zugabe von GR-NSB-MDSC, wobei die T-Zell-Proliferation ohne GR-NSB-MDSC auf einen Wert von 1 festgesetzt wurde (gestrichelte Linie). $n = 6$, $*p = 0,016$ bzw. $n = 8$, $**p = 0,0039$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Somit konnten wir zeigen, dass diese CD66b⁺/CD33⁺/CD14^{low}/HLA-DR^{low/-} Zellen sowohl den Phänotyp als auch die suppressive Wirkung von MDSC besaßen und daher dieser Zellgruppe zuzurechnen waren.

7 Literaturverzeichnis

1. Shane, A.L., P.J. Sánchez, and B.J. Stoll, *Neonatal sepsis*. Lancet, 2017. **390**(10104): p. 1770-1780.
2. van Vliet, E.O., et al., *Perinatal infections and neurodevelopmental outcome in very preterm and very low-birth-weight infants: a meta-analysis*. JAMA Pediatr, 2013. **167**(7): p. 662-8.
3. Adams-Chapman, I. and B.J. Stoll, *Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant*. Curr Opin Infect Dis, 2006. **19**(3): p. 290-7.
4. Kalikkot Thekkevedu, R., M.C. Guaman, and B. Shivanna, *Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology*. Respir Med, 2017. **132**: p. 170-177.
5. Kollmann, T.R., et al., *Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny*. Immunity, 2017. **46**(3): p. 350-363.
6. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 379-90.
7. Yu, J.C., et al., *Innate Immunity of Neonates and Infants*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1759.
8. Tsafaras, G.P., P. Ntontsi, and G. Xanthou, *Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System*. Front Pediatr, 2020. **8**: p. 5.
9. Basha, S., N. Surendran, and M. Pichichero, *Immune responses in neonates*. Expert Rev Clin Immunol, 2014. **10**(9): p. 1171-84.
10. Grumach, A.S., et al., *Complement profile in neonates of different gestational ages*. Scand J Immunol, 2014. **79**(4): p. 276-81.
11. Langrish, C.L., et al., *Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(1): p. 118-23.
12. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
13. Pagel, J., et al., *Regulatory T cell frequencies are increased in preterm infants with clinical early-onset sepsis*. Clin Exp Immunol, 2016. **185**(2): p. 219-27.
14. Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy, *Myeloid derived suppressor cells in human diseases*. International immunopharmacology, 2011. **11**(7): p. 802-807.
15. Bronte, V., et al., *Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12150.
16. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
17. Lindau, D., et al., *The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells*. Immunology, 2013. **138**(2): p. 105-15.

18. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
19. Ballbach, M., et al., *Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells*. Immunol Lett, 2017. **192**: p. 1-6.
20. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
21. Veglia, F., E. Sanseviero, and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity*. Nat Rev Immunol, 2021. **21**(8): p. 485-498.
22. Veglia, F., M. Perego, and D. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells coming of age*. Nat Immunol, 2018. **19**(2): p. 108-119.
23. Rieber, N., et al., *Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses*. Clin Exp Immunol, 2013. **174**(1): p. 45-52.
24. Gervassi, A., et al., *Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107816.
25. Kostlin, N., et al., *Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype*. J Immunol, 2016. **196**(3): p. 1132-45.
26. Köstlin, N., et al., *Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2582-91.
27. Köstlin-Gille, N. and C. Gille, *Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 584712.
28. Liu, Y., et al., *Lactoferrin-induced myeloid-derived suppressor cell therapy attenuates pathologic inflammatory conditions in newborn mice*. J Clin Invest, 2019. **129**(10): p. 4261-4275.
29. He, Y.M., et al., *Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation*. Nat Med, 2018. **24**(2): p. 224-231.
30. Ahmadi, M., et al., *MDSCs in pregnancy: Critical players for a balanced immune system at the feto-maternal interface*. Cell Immunol, 2019. **346**: p. 103990.
31. Ivanova, E.A. and A.N. Orekhov, *T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 327470.
32. Geginat, J., et al., *Plasticity of human CD4 T cell subsets*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 630.
33. Zhu, J., *T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(10).
34. Walker, J.A. and A.N.J. McKenzie, *T(H)2 cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 121-133.
35. Gieseck, R.L., 3rd, M.S. Wilson, and T.A. Wynn, *Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 62-76.
36. Cosmi, L., et al., *T helper cells plasticity in inflammation*. Cytometry A, 2014. **85**(1): p. 36-42.

37. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
38. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 591-619.
39. Böyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
40. Au - Emontzpohl, C., et al., *Isolation of Endothelial Progenitor Cells from Healthy Volunteers and Their Migratory Potential Influenced by Serum Samples After Cardiac Surgery*. JoVE, 2017(120): p. e55192.
41. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
42. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
43. Filby, A., et al., *Appraising the suitability of succinimidyl and lipophilic fluorescent dyes to track proliferation in non-quiescent cells by dye dilution*. Methods, 2015. **82**: p. 29-37.
44. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
45. Köstlin, N., et al., *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype*. Immunology, 2017. **152**(1): p. 89-101.
46. Dietz, S., et al., *Cord blood granulocytic myeloid-derived suppressor cells impair monocyte T cell stimulatory capacity and response to bacterial stimulation*. Pediatr Res, 2019. **86**(5): p. 608-615.
47. Correa-Rocha, R., et al., *Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7*. Pediatr Res, 2012. **71**(5): p. 590-7.
48. Lechner, M.G., D.J. Liebertz, and A.L. Epstein, *Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2273-84.
49. Hoechst, B., et al., *A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 234-43.
50. Guleria, I., et al., *A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 231-7.
51. Dulos, J., et al., *PD-1 blockade augments Th1 and Th17 and suppresses Th2 responses in peripheral blood from patients with prostate and advanced melanoma cancer*. J Immunother, 2012. **35**(2): p. 169-78.
52. Sharma, K., et al., *Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand*. Pharmacol Ther, 2000. **88**(3): p. 333-47.
53. Kang, X., et al., *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain feto-maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4+CD25-T cells by activation of the TGF-beta/beta-catenin pathway*. Mol Hum Reprod, 2016. **22**(7): p. 499-511.

54. Gabitass, R.F., et al., *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): p. 1419-30.
55. Gonda, K., et al., *Myeloid-derived suppressor cells are increased and correlated with type 2 immune responses, malnutrition, inflammation, and poor prognosis in patients with breast cancer*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(2): p. 1766-1774.
56. Gao, J., et al., *Infiltration of alternatively activated macrophages in cancer tissue is associated with MDSC and Th2 polarization in patients with esophageal cancer*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e104453.
57. Messmann, J.J., et al., *In vitro-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity*. *Blood*, 2015. **126**(9): p. 1138-48.
58. Jeisy-Scott, V., et al., *Increased MDSC accumulation and Th2 biased response to influenza A virus infection in the absence of TLR7 in mice*. *PloS one*, 2011. **6**(9): p. e25242-e25242.
59. Delano, M.J., et al., *MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)/CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis*. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1463-74.
60. Wang, L., et al., *Expansion of myeloid-derived suppressor cells promotes differentiation of regulatory T cells in HIV-1+ individuals*. *AIDS (London, England)*, 2016. **30**(10): p. 1521-1531.
61. Hüsecken, Y., et al., *MDSCs are induced after experimental blunt chest trauma and subsequently alter antigen-specific T cell responses*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 12808-12808.
62. Song, C., et al., *Passive transfer of tumour-derived MDSCs inhibits asthma-related airway inflammation*. *Scand J Immunol*, 2014. **79**(2): p. 98-104.
63. Arora, M., et al., *TLR4/MyD88-induced CD11b+Gr-1 int F4/80+ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung*. *Mucosal immunology*, 2010. **3**(6): p. 578-593.
64. Somerset, D.A., et al., *Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset*. *Immunology*, 2004. **112**(1): p. 38-43.
65. Dzidic, M., et al., *Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate*. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 2018. **6**(3): p. 56.
66. Scharschmidt, T.C., et al., *A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes*. *Immunity*, 2015. **43**(5): p. 1011-1021.
67. Pang, Y., et al., *Impairment of regulatory T cells in patients with neonatal necrotizing enterocolitis*. *Int Immunopharmacol*, 2018. **63**: p. 19-25.
68. Pagel, J., et al., *Increased Regulatory T Cells Precede the Development of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 565257.
69. Centuori, S.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF-beta-induced differentiation of*

- CD4+CD25+FoxP3+ Tregs from CD4+CD25-FoxP3- T cells.* J Leukoc Biol, 2012. **92**(5): p. 987-97.
70. Jitschin, R., et al., *CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs.* Blood, 2014. **124**(5): p. 750-60.
 71. Wang, L., et al., *Expansion of myeloid-derived suppressor cells promotes differentiation of regulatory T cells in HIV-1+ individuals.* Aids, 2016. **30**(10): p. 1521-1531.
 72. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host.* Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
 73. Luan, Y., et al., *Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion.* Am J Transplant, 2013. **13**(12): p. 3123-31.
 74. Hoechst, B., et al., *Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells.* Blood, 2011. **117**(24): p. 6532-41.
 75. Serafini, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells.* Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5439-49.
 76. Pal, S., et al., *Myeloid-derived suppressor cells induce regulatory T cells in chronically HBV infected patients with high levels of hepatitis B surface antigen and persist after antiviral therapy.* Aliment Pharmacol Ther, 2019. **49**(10): p. 1346-1359.
 77. Park, M.J., et al., *Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3753.
 78. Wang, Y., et al., *Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Acute Coronary Syndrome.* Cellular Physiology and Biochemistry, 2015. **35**(1): p. 292-304.
 79. Kumar, V., et al., *The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment.* Trends Immunol, 2016. **37**(3): p. 208-220.
 80. Li, H., et al., *Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1.* J Immunol, 2009. **182**(1): p. 240-9.
 81. Bellone, G., et al., *Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients.* Am J Pathol, 1999. **155**(2): p. 537-47.
 82. Lin, J.T., et al., *TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet.* J Immunol, 2005. **174**(10): p. 5950-8.
 83. Li, J., et al., *PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment.* Cancer Res, 2015. **75**(3): p. 508-518.
 84. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.* Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.

85. Lei, G.S., C. Zhang, and C.H. Lee, *Myeloid-derived suppressor cells impair alveolar macrophages through PD-1 receptor ligation during Pneumocystis pneumonia*. Infect Immun, 2015. **83**(2): p. 572-82.
86. Ruan, W.S., et al., *Early Activation of Myeloid-Derived Suppressor Cells Participate in Sepsis-Induced Immune Suppression via PD-L1/PD-1 Axis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1299.
87. Lu, C., et al., *The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells*. Oncoimmunology, 2016. **5**(12): p. e1247135.
88. Noman, M.Z., et al., *PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 781-90.
89. Zhang, Z.N., et al., *Myeloid-Derived Suppressor Cells Associated With Disease Progression in Primary HIV Infection: PD-L1 Blockade Attenuates Inhibition*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2017. **76**(2): p. 200-208.
90. Moline-Velazquez, V., et al., *Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2011. **21**(6): p. 678-91.
91. Dugast, A.S., et al., *Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 7898-906.
92. Apolloni, E., et al., *Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6723-30.
93. Li, H., et al., *Myeloid-derived suppressor cells suppress CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in autoimmune hepatitis*. Mol Med Rep, 2015. **12**(3): p. 3667-3673.
94. Hailemichael, Y., et al., *Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺ T cell sequestration, dysfunction and deletion*. Nat Med, 2013. **19**(4): p. 465-72.
95. Zhu, J., et al., *Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1404.
96. Xia, S., et al., *Gr-1⁺ CD11b⁺ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity*. J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23591-9.
97. Zhu, C., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
98. Tsukamoto, H., et al., *Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression*. Cancer Immunol Res, 2013. **1**(1): p. 64-76.
99. Mills, C.D., *Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages*. Frontiers in immunology, 2015. **6**: p. 212-212.
100. Rodríguez, P.C. and A.C. Ochoa, *Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives*. Immunological reviews, 2008. **222**: p. 180-191.

101. Ohi, K. and K. Tenbrock, *Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 2499-2499.
102. Zhang, H., et al., *Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell proliferation in human extranodal NK/T cell lymphoma: a novel prognostic indicator*. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 2015. **64**(12): p. 1587-1599.
103. Nagaraj, S., et al., *Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer*. *Nat Med*, 2007. **13**(7): p. 828-35.
104. Tang, X., et al., *Fat embolism in hemoglobin SC disease: A case report with brief review of the literature*. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2017. **1**(1): p. 2-4.
105. Sinha, P., et al., *Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response*. *J Immunol*, 2007. **179**(2): p. 977-83.
106. Kraaij, M.D., et al., *Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by anti-inflammatory macrophages*. *Mol Immunol*, 2011. **49**(3): p. 549-57.
107. Fu, S., et al., *TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(10): p. 1614-27.
108. Fantini, M.C., et al., *Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis*. *Gut*, 2006. **55**(5): p. 671-80.
109. Chen, X., et al., *PD-1 regulates extrathymic regulatory T-cell differentiation*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(9): p. 2603-16.
110. Pan, P.Y., et al., *Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(1): p. 99-108.
111. Siret, C., et al., *Deciphering the Crosstalk Between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 3070.
112. Lacotte, S., et al., *Impact of myeloid-derived suppressor cell on Kupffer cells from mouse livers with hepatocellular carcinoma*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(11): p. e1234565.
113. Kinoshita, M., et al., *Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice*. *J Hepatol*, 2010. **53**(5): p. 903-10.
114. Birle, A., C.T. Nebe, and P. Gessler, *Age-related low expression of HLA-DR molecules on monocytes of term and preterm newborns with and without signs of infection*. *J Perinatol*, 2003. **23**(4): p. 294-9.
115. Gille, C., et al., *Monocytes derived from humanized neonatal NOD/SCID/IL2Rγ(null) mice are phenotypically immature and exhibit functional impairments*. *Hum Immunol*, 2012. **73**(4): p. 346-54.
116. Hegge, I., et al., *Functional analysis of granulocyte and monocyte subpopulations in neonates*. *Mol Cell Pediatr*, 2019. **6**(1): p. 5.
117. Palojärvi, A., et al., *Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants*. *Pediatr Res*, 2013. **73**(4 Pt 1): p. 469-75.

118. Kanakoudi-Tsakalidou, F., et al., *Flow cytometric measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(3): p. 402-7.
119. Schwarz, J., et al., *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period*. Clin Exp Immunol, 2018. **191**(3): p. 328-337.
120. Ilkovitch, D. and D.M. Lopez, *The liver is a site for tumor-induced myeloid-derived suppressor cell accumulation and immunosuppression*. Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5514-21.
121. Molnar, K., et al., *Group B streptococci infection model shows decreased regulatory capacity of cord blood cells*. Pediatr Res, 2022. **92**(5): p. 1407-1416.
122. Grozdics, E., et al., *B7 costimulation and intracellular indoleamine 2,3-dioxygenase expression in umbilical cord blood and adult peripheral blood*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(10): p. 1659-65.
123. Dreschers, S., et al., *Impaired functional capacity of polarised neonatal macrophages*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 624.
124. Winterberg, T., et al., *Distinct phenotypic features of neonatal murine macrophages*. Eur J Immunol, 2015. **45**(1): p. 214-24.
125. Hikita, N., et al., *Cell surface antigens of neonatal monocytes are selectively impaired in basal expression, but hyperresponsive to lipopolysaccharide and zymosan*. J Reprod Immunol, 2019. **136**: p. 102614.
126. Jones, C.A., J.A. Holloway, and J.O. Warner, *Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy*. J Reprod Immunol, 2002. **56**(1-2): p. 45-60.
127. Orlikowsky, T.W., et al., *Expression and regulation of B7 family molecules on macrophages (MPhi) in preterm and term neonatal cord blood and peripheral blood of adults*. Cytometry B Clin Cytom, 2003. **53**(1): p. 40-7.
128. Rodríguez-Perea, A.L., et al., *Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents*. Clin Exp Immunol, 2016. **185**(3): p. 281-91.
129. Leiber, A., et al., *Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with Escherichia coli*. Eur J Immunol, 2017. **47**(6): p. 1009-1021.
130. Heinemann, A.S., et al., *In neonates S100A8/S100A9 alarmins prevent the expansion of a specific inflammatory monocyte population promoting septic shock*. Faseb j, 2017. **31**(3): p. 1153-1164.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung Neonatologie unter der Betreuung von Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille und Herrn PD Dr. Christian Gille durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille mit meiner Beteiligung.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille und Frau Dr. Bärbel Spring von der Verfasserin eigenständig durchgeführt. Die in den Abbildungen 14 und 29 gezeigten Experimente erfolgten durch Frau PD Dr. N. Köstlin-Gille. Sie wurden mit ihrer Genehmigung in diese Dissertationsschrift aufgenommen, um das Thema umfassend darzulegen.

Abbildung 28 wurde nach unseren Vorgaben durch Peter-Michael Weber, Graphiker an der Uniklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Köstlin-Gille.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig unter Anleitung durch Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

M. Vogelmann

Veröffentlichungen

Mehrere Abbildungen der Dissertationsschrift wurden bereits wie folgt publiziert:

1. Köstlin, N., M. Vogelmann, B. Spring, J. Schwarz, J. Feucht, C. Härtel, T.W. Orlikowsky, C.F. Poets, and C. Gille, *Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype*. Immunology, 2017. 152(1): p. 89-101.
2. Dietz, S., J. Schwarz, M. Vogelmann, B. Spring, K. Molnár, T.W. Orlikowsky, F. Wiese, U. Holzer, C.F. Poets, C. Gille, and N. Köstlin-Gille, *Cord blood granulocytic myeloid-derived suppressor cells impair monocyte T cell stimulatory capacity and response to bacterial stimulation*. Pediatr Res, 2019. 86(5): p. 608-615.

Die Veröffentlichung erfolgt mit Erlaubnis von Springer Nature.

Teile der Arbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

1. Posterpräsentation beim Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen 2016
Titel: *MDSC aus dem Nabelschnurblut beeinflussen die Differenzierung von T-Helferzellen*
2. Vortrag auf der 42. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) 2016 in Frankfurt am Main.
Titel: *Infektanfälligkeit bei Neugeborenen: Myeloide Suppressorzellen (MDSC) aus dem Nabelschnurblut induzieren Th2- und Treg-Zellen und hemmen Th1-Zellen*
3. Posterpräsentation auf dem Pediatric Academic Societies (PAS) Meeting 2017 in San Francisco, USA.
Titel: *Myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate the polarization of T-helper-cells towards an anti-inflammatory phenotype*

Förderung

Die Arbeit wurde unterstützt durch ein Forschungsstipendium des IZKF-Promotionskollegs der Medizinischen Fakultät Tübingen (Stipendium Nr. E.05.00433)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt und damit zum Gelingen beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Poets für seine fortwährende Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, sehr herzlich bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Gille für die Überlassung des interessanten Themas und seine Betreuung als Doktorvater. In gleichem Maße möchte ich mich bei Frau PD Dr. Natascha Köstlin-Gille für die intensive Betreuung und spätere Übernahme als Doktorandin bedanken. Ihr Engagement und ihre Unterstützung ermöglichten mir einen umfassenden Einblick in die Grundlagenforschung. In besonders positiver Erinnerung habe ich die vielen gemeinsamen Stunden im Labor, die Ideen, Gespräche und Diskussionen der Ergebnisse sowie die gemeinsamen Kongressteilnahmen. Durch die intensive Betreuung gehörte die Erstellung der Dissertation zum schönsten Teil meines Studiums und hat meine Begeisterung für die Forschung und die Neonatologie nachhaltig gefördert.

Frau Dr. Bärbel Spring möchte ich für die strukturierte Einarbeitung, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor danken.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner engsten Familie für die fortwährende Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.