

Aus der

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

**Die Bedeutung von Immun-Checkpoint-Molekülen für die
Immunantwort des Neugeborenen**

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

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

vorgelegt von

Riedel, Hannah Kristin

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Leibold

Tag der Disputation: 04.03.2024

Widmung

Für meine geliebten Eltern, Großeltern, Dorothee und Frederik

Für Jakob

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neugeborenenensepsis	1
1.2	Gruppe-B-Streptokokken (GBS)	2
1.3	Besonderheiten des neonatalen Immunsystems	3
1.4	Co-stimulatorische und co-inhibitorische Moleküle	4
1.5	Ziel der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Patientenproben	8
2.1.2	Antikörper	8
2.1.3	Kits für die Separation von Monozyten/ T-Zellen	10
2.1.4	ELISA	10
2.1.5	Chemikalien/ Reagenzien	10
2.1.6	Puffer und Kulturmedien	12
2.1.7	Geräte	13
2.1.8	Software	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Aufreinigung mononukleärer Zellen (PBMCs/ CBMCs) aus Vollblut	14
2.2.2	Magnetische Zellseparation (MACS)	15
2.2.3	Bakterienkultur	16
2.2.4	Zellkultur und Stimulation der mononukleären Zellen	17
2.2.5	Durchflusszytometrie	17
2.2.6	Antikörperfärbung	18
2.2.7	Messung der ROS-Produktion mit DHR/Rhodamin	19
2.2.8	T-Zell-Proliferations-Assay	20

2.2.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	23
2.2.10	Statistische Auswertung	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Beeinflussung der Proliferation von neonatalen und adulten T-Zellen durch GBS-/ LTA-Stimulation.....	25
3.1.1	Verminderte Proliferation adulter T-Zellen nach GBS-Stimulation – ein Effekt von Monozyten und T-Zellen.....	29
3.1.2	Nach GBS-Stimulation erlangen adulte Monozyten suppressive Aktivität	32
3.1.3	Analyse co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Moleküle und Analyse von Effektorenzymen auf Monozyten nach GBS- Stimulation.....	35
3.1.4	Phänotypisierung der T-Zellen nach GBS-Stimulation	39
3.1.5	Gering suppressive Aktivität adulter T-Zellen nach GBS- Stimulation.....	41
3.1.6	PD-L1-Expression adulter und neonataler Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen weiteren Stimulanzen	43
3.1.7	PD-L1-Expression im NSB nach IFN γ -Stimulation.....	45
3.1.8	Expression von löslichem PD-L1 in neonatalem und adultem Plasma.....	46
4	Diskussion	47
4.1	GBS-Stimulation reduziert die T-Zell-Proliferation in PBMCs, nicht aber in CBMCs	48
4.2	Adulte Monozyten erlangten nach GBS-Stimulation eine T-Zell- supprimierende Aktivität im Vergleich zu neonatalen Monozyten	50
4.3	Adulte Monozyten erlangten nach GBS-Stimulation einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu neonatalen Monozyten	51
4.4	Adulte T-Zellen zeigten im Vergleich zu neonatalen T-Zellen einen veränderten Phänotyp nach GBS-Stimulation.....	54
4.5	Veränderte Expression von löslichem PD-L1 im Nabelschnurblut im Vergleich zum Erwachsenenblut.....	55
5	Zusammenfassung	57
6	Summary	59
7	Literaturverzeichnis	60

8	Erklärung zum Eigenanteil	71
9	Veröffentlichungen	72
9.1	Publikationen	72
9.2	Posterpräsentationen	72
10	Danksagung	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Co-stimulatorische und co-inhibitorische Moleküle	5
Abbildung 2: Schema der Dichtegradientenzentrifugation	14
Abbildung 3: Histogramm der T-Zell-Proliferation	20
Abbildung 4: Settings des T-Zell-Proliferations-Assay.....	22
Abbildung 5: Schema eines direkten Sandwich-ELISA	23
Abbildung 6: Proliferation adulter und neonataler mononukleärer Zellen nach GBS-Stimulation	26
Abbildung 7: Proliferation adulter und neonataler mononukleärer Zellen nach LTA-Stimulation	28
Abbildung 8: Adulte T-Zell-Proliferation nach separater GBS-Vorstimulation von Monozyten oder T-Zellen.	30
Abbildung 9: Neonatale T-Zell-Proliferation nach separater GBS-Vorstimulation von Monozyten oder T-Zellen.....	31
Abbildung 10: Einfluss von vorkultivierten Monozyten auf die T-Zell-Proliferation.....	32
Abbildung 11: Inhibition der T-Zell-Proliferation durch GBS-stimulierte adulte Monozyten	34
Abbildung 12: Expression co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Moleküle auf Monozyten nach GBS-Stimulation.....	36
Abbildung 13: Expression von Effektorenzymen auf Monozyten nach GBS-Stimulation	38
Abbildung 14: Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen nach GBS-Stimulation	40
Abbildung 15: Inhibition der T-Zell-Proliferation durch GBS-stimulierte T-Zellen	42
Abbildung 16: PD-L1-Expression von Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen	44
Abbildung 17: PD-L1-Expression von Monozyten nach Stimulation mit IFN γ .	45
Abbildung 18: Konzentration von sPD-L1 im Nabelschnurblut und im Blut von Erwachsenen	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten extrazellulären „Mouse Anti-Human“-Antikörper für die Durchflusszytometrie	8
Tabelle 2: Liste der verwendeten intrazellulären „Mouse Anti-Human“-Antikörper für die Durchflusszytometrie	9
Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits	10
Tabelle 4: Liste der verwendeten ELISAs	10
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	10
Tabelle 6: Liste der verwendeten Puffer und Kulturmedien	12
Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte	13
Tabelle 8: Liste der verwendeten Softwares	13
Tabelle 9: PD-L1-Expression von Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen	43

Abkürzungsverzeichnis

-	fehlend oder negativ
+	zusätzlich oder positiv
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
Arg1	Arginase-1
Art.#	Artikelnummer
BSA	Bovines Serumalbumin
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CBMC	Mononukleäre Zelle aus Nabelschnurblut (cord blood mononuclear cell)
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
DHR	Dihydrorhodamine

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELBW	Extremely Low Birth Weight Infant
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EOS	Early-onset-Sepsis
EOD	Early-onset-Disease
ESBL	Extended spectrum betalactamase
et al.	lat. et alia (und andere)
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
G	Gramm
GBS	Gruppe-B-Streptokokken
h	Stunde (hour)
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
ICM	Immun-Checkpoint-Moleküle
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (inducible nitric oxide synthases)
LOD	Late-onset-Disease
LOS	Late-onset-Sepsis

LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molare Masse
MACS	magnetische Zellseparation (magnetic activated sell sorting)
MDSC	Myeloide Suppressorzelle (myeloid-derived suppressor cell)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MIF	Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (macrophage migration inhibitory factor)
min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	Nicht signifikant
NSB	Nabelschnurblut

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (peripheral blood mononuclear cell)
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-2	Programmed cell death protein 2
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PD-L2	Programmed cell death ligand 2
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin chlorophyll protein
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
p-Wert	Signifikanzwert
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
ROP	Retinopathia praematurorum
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
sCD200	Soluble CD200
SD	Standardabweichung (standard deviation)

sPD-1	Soluble programmed cell death protein 1
sPD-L1	Soluble programmed cell death ligand 1
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SSW	Schwangerschaftswochen
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
Th	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF β	Tumornekrosefaktor-beta
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
vs.	versus (lat.) = gegen(übergestellt)
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
v.o.n.u.	von oben nach unten
VLBWI	very low birth weight infants
ZAP70	Zeta-assoziiertes Protein 70
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Neugeborenenensepsis

Die Neugeborenenensepsis ist eine der wichtigsten Komplikationen bei der Behandlung von Neu- und Frühgeborenen. Der „Global Burden of Disease“ schätzte 2016/2017 die Zahl der jährlichen Fälle weltweit auf 1,3 Millionen [4], was zu 203.000 Sepsis-abhängigen Todesfällen führte [5]. Die Inzidenz der Neugeborenenensepsis korreliert negativ mit dem Geburtsgewicht und dem Gestationsalter [6-9]. In Deutschland liegt die Inzidenz der klinischen Neugeborenenensepsis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500g (very low birth weight infants, VLBWI) bei 30,3%, die der kulturgesicherten Sepsis bei 12,8% [10].

Die Neugeborenenensepsis wird nach Alter des Kindes in eine Early-onset-Sepsis (EOS) und eine Late-onset-Sepsis (LOS) eingeteilt [10].

Die EOS zeigt klinische Manifestationen innerhalb der ersten 72 Lebensstunden [11]. Sie wird durch Pathogene der maternalen rekto-vaginalen Flora verursacht und bereits *in utero* oder durch eine vertikale Transmission bei der Passage durch den Geburtskanal erworben [12-14]. Die häufigsten Erreger der EOS sind *Streptococcus agalactiae* (Gruppe-B-Streptokokken, GBS) und *Escherichia coli* (*E. coli*; 34,6%) [15, 16].

Die LOS zeigt klinische Manifestationen nach den ersten 72 Lebensstunden und wird erst postnatal erworben. Besondere Risikofaktoren für eine LOS sind Frühgeburtlichkeit, niedriges Geburtsgewicht, eine EOS in der Vorgeschichte oder invasive Maßnahmen wie beispielsweise das Vorhandensein eines zentralen Venenkatheters oder eine endotracheale Beatmung [10-12, 17, 18]. Die LOS wird neben GBS durch eine Vielzahl von nosokomialen Keimen verursacht. Insbesondere gram-negative Erreger und Koagulase-negative Staphylokokken spielen hier eine Rolle [10, 15].

Neben einer hohen Mortalität von bis zu 35% [19, 20] sind insbesondere Folgeerkrankungen wie die Entwicklung einer Frühgeborenen-Retinopathie

(Retinopathia praematurorum, ROP), ein persistierender Ductus arteriosus (PDA), die nekrotisierende Enterokolitis (NEC), die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) oder die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) Probleme, die infolge einer Sepsis auftreten und das Leben der betroffenen Frühgeborenen langfristig beeinträchtigen [10].

1.2 Gruppe-B-Streptokokken (GBS)

Streptococcus agalactiae (GBS) ist ein gram-positives β -hämolisierendes Bakterium und wurde in den 1930er Jahren erstmals von Rebecca Lancefield identifiziert [21] und 1938 als humanpathogen eingestuft [22, 23]. GBS können nach ihren Kapselpolysacchariden in zehn Serotypen (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) eingeteilt werden [24, 25]. Besonders für Risikogruppen wie Schwangere, Neugeborene und ältere Menschen (> 65-Jährige) stellen GBS eine Gefahr dar [26].

Weltweit erkranken 0,49‰ aller Neugeborenen an einer Neugeborenenensepsis verursacht durch GBS. Dabei beträgt die Sterblichkeit 1-8,4% für Reifgeborene und 5-20% für Frühgeborene [27, 28]. Etwa 50% der schwangeren Frauen, die eine urogenitale oder gastrointestinale GBS-Kolonisation aufweisen, übertragen diese auf ihr Neugeborenes. Ohne maternale Antibiotika-Prophylaxe entwickeln 1-2% dieser Neugeborenen eine durch GBS verursachte EOS [29, 30]. Daher empfiehlt das „American College of Obstetricians and Gynecologists“ zur Prävention einer GBS-Infektion des Neugeborenen ein pränatales GBS-Screening der Mutter mittels vaginal-rektalem Abstrich zwischen 36 0/7 SSW und 37 6/7 SSW. Beim Vorliegen eines positiven GBS-Screenings wird eine peripartale intravenöse Antibiotikaprophylaxe mit Penicillin mindestens 4h vor der Geburt empfohlen. Bei einer geplanten Sectio caesarea ohne vorherigen Blasensprung kann darauf verzichtet werden [31]. Die Einführung der Antibiotikaprophylaxe führte zu einer Reduktion der Inzidenz einer GBS-EOS von über 80% [32]. Dennoch ist unklar, warum Neugeborene deutlich anfälliger für invasive GBS-Infektionen sind als Erwachsene.

1.3 Besonderheiten des neonatalen Immunsystems

Die Anforderungen an das Immunsystem Neu- und Frühgeborener sind sehr komplex. Vor der Geburt befindet sich der Fetus in einer weitgehend sterilen Umgebung. Zu dieser Zeit ist die Hauptanforderung an das Immunsystem, eine gegenseitige Abstoßungsreaktion zwischen fetalem und mütterlichem Organismus zu vermeiden. Nach der Geburt muss sich das Immunsystem des Neugeborenen rasch umstellen, um den Schutz vor bakteriellen und viralen Infektionen zu gewährleisten [33-36]. Diese speziellen Anforderungen bedingen, dass Neu- und insbesondere Frühgeborene deutlich anfälliger sind für Infektionen als ältere Kinder und Erwachsene [37].

Die Immunantwort des Neugeborenen weist einige Unterschiede zu der des Erwachsenen auf. Auf Seiten der angeborenen Immunität sind beispielsweise Komplementfaktoren vermindert, was zu einer geringeren Aktivierung der angeborenen und der adaptiven Immunität führt [38-40]. Darüber hinaus ist die Granulopoese bei Neugeborenen vermindert und neonatale Neutrophile zeigen funktionelle Einschränkungen, wie beispielsweise eine reduzierte Chemotaxis und verminderte antimikrobielle Eigenschaften [41-43]. Fetale Monozyten exprimieren weniger MHCII, was deren Kapazität Antigene zu präsentieren vermindert [44]. Außerdem exprimieren sie weniger proinflammatorische Oberflächenmoleküle und proinflammatorische Zytokine als Monozyten von Erwachsenen [45-52].

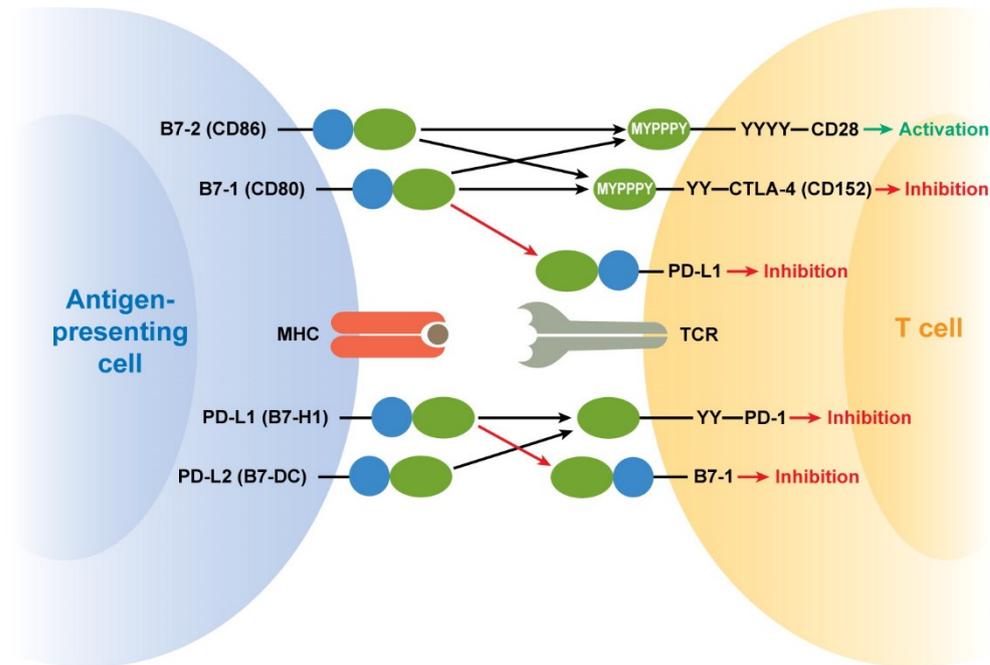
Im Gegensatz zum angeborenen unspezifischen Immunsystem ist die Aufgabe des adaptiven Immunsystems, mittels T- und B-Zellen Pathogene spezifisch zu eliminieren und ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen [53]. Aufgrund einer nur sehr geringen Exposition gegenüber Antigenen *in utero* findet der Großteil der Entwicklung des adaptiven Immunsystems postnatal statt. Unterschiede der adaptiven Immunität des Neugeborenen im Vergleich zum Erwachsenen sind beispielsweise eine verminderte Aktivierbarkeit neonataler zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen [54] und erhöhte Zahlen suppressiv wirkender regulatorischer T-Zellen [55].

1.4 Co-stimulatorische und co-inhibitorische Moleküle

Die Aktivierung von T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen (APCs) erfolgt nach Bindung von über MHC-Moleküle präsentierten Antigenen an den T-Zell-Rezeptor (TCR). Gleichzeitig wird zur Aktivierung der T-Zelle ein zweites Signal benötigt, welches über sogenannte co-stimulatorische Moleküle auf APCs und ihre entsprechenden Rezeptoren auf T-Zellen vermittelt wird. Neben co-stimulatorischen Molekülen gibt es auch co-inhibitorische Moleküle, welche durch Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung vermitteln. Die Balance zwischen co-stimulatorischen und co-inhibitorischen Signalen bestimmt darüber, ob die Immunzelle aktiviert oder inaktiviert wird. Co-inhibitorische und co-stimulatorische Moleküle werden auch als Immun-Checkpoint-Moleküle (ICM) bezeichnet. ICM weisen eine große Vielfalt in ihrer Expression, Struktur und Funktion auf [56-63].

Die bekanntesten Vertreter der co-stimulatorischen Moleküle zählen zur B7:CD28-Familie. CD28 ist ein stark co-stimulatorisch wirkender Rezeptor auf T-Zellen, der an B7-1- (CD80) und B7-2- (CD86) Moleküle auf APCs bindet. Ein weiteres Mitglied der B7:CD28 Familie ist das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4; CD152). Nach Antigenkontakt wird es abhängig von der Stärke des Signals aus einem intrazellulären Vorrat an der immunologischen Synapse zwischen APC und Lymphozyt exprimiert. Es bindet ebenfalls an B7-1- und B7-2-Moleküle, wirkt jedoch als potent co-inhibitorischer Rezeptor [64, 65]. CTLA-4-defiziente Mäuse zeigten einen fatal lymphoproliferativen Phänotyp auf, der zu tödlichen Multiorgan-Gewebserstörungen führt [66]. Der Programmed-death 1 (PD-1; CD279) -Rezeptor ist ebenfalls ein co-inhibitorischer Rezeptor, über den Signale vermittelt werden, die bei der Selbsttoleranz und der Verhinderung von Autoimmunität wichtig sind. PD-1 kann von T-Zellen, B-Zellen [67], NK-Zellen, aktivierten Monozyten und DCs exprimiert werden (zusammengefasst in [3]) und besitzt zwei Liganden: PD-L1 (B7-H1; CD274) und PD-L2 (B7-DC; CD273) [68, 69], welche von APCs exprimiert werden. Es wurde gezeigt, dass PD-1-defiziente Mäuse lymphoproliferative oder autoimmune Krankheiten entwickeln wie beispielsweise Lupus-ähnliche oder kardiale Erkrankungen [70-72].

Einleitung



AR Keir ME, et al. 2008.
Annu. Rev. Immunol. 26:677–704

Abbildung 1: Co-stimulatorische und co-inhibitorische Moleküle

CD28 wirkt über die Bindung von B7-2 oder B7-1 costimulatorisch. CTLA-4 führt durch die Bindung von B7-2 oder B7-1 zu einer Inhibition der T-Zelle. Die bidirektionale B7-1:PD-L1-Interaktion löst inhibitorische Signale in T-Zellen aus. Die Interaktion zwischen PD-L1 oder PD-L2 und PD-1 wirkt ebenfalls inhibitorisch. Quelle [3] (Lizenz ID: 1291908-1)

CD200-Rezeptor (CD200R) ist ein inhibitorischer Immunrezeptor, der vor allem auf myeloiden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und DCs, aber auch auf lymphoiden Zellen wie T- und B-Zellen exprimiert wird und an CD200 bindet [73-75]. Eine CD200-Deletion in Mäusen geht mit einer erhöhten Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen und einer vermehrten myeloiden Entzündungsantwort einher [76].

Die charakteristischen Eigenschaften von ICM werden insbesondere in der Krebstherapie genutzt, um Immun-Escape-Mechanismen von Krebszellen zu verhindern und damit die Immunantwort gegen Tumore oder Leukämiezellen zu verbessern [3].

Einleitung

Aber auch in der Pathogenese der Sepsis und der damit verbundenen Immundysfunktion spielen ICM eine Rolle [77]. Einerseits vermitteln sie im Frühstadium einer Sepsis nach Antigenkontakt über APCs eine Aktivierung von T-Zellen, andererseits kommt es im Rahmen einer Sepsis auch zur Überexpression von co-inhibitorischen Molekülen und damit zu einer T-Zell-Inhibition und Immunsuppression im späteren Stadium der Erkrankung [78, 79].

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des co-stimulatorischen Moleküls CD28 infizierte Mäuse vor einem septischen Schock und dem Tod bewahrte, indem die Expression des antiinflammatorischen IL-10 herauf- und die des proinflammatorischen TNF- α herunterreguliert wurde [80]. Eine Blockade von CTLA-4 verminderte im Mausmodell eine Sepsis-induzierte Apoptose von T-Zellen und verbesserte das Überleben [81].

Für die PD-1/ PD-L1-Achse konnte gezeigt werden, dass die Expression beider Moleküle im Rahmen einer Sepsis erhöht [82] und mit der Morbidität und Mortalität septischer Patienten assoziiert war [83, 84]. Eine Blockade von PD-1- oder PD-L1 im adulten Sepsis-Mausmodell verhinderte eine Sepsis-induzierte Immundysfunktion und verbesserte das Überleben [82, 85, 86].

Es wäre denkbar in der Zukunft Immun-Checkpoint-Regulatoren in der Therapie einer Sepsis einzusetzen, bisher ist die Datenlage hierzu aber noch unzureichend [77]. Über die Rolle von co-inhibitorischen Molekülen bei der Immunregulation im Rahmen der Neugeborenenensepsis ist bisher kaum etwas bekannt.

1.5 Ziel der Arbeit

Trotz intensiver Forschung zur Funktion und den Besonderheiten des neonatalen Immunsystems sind die Mechanismen, die die hohe Infektionsanfälligkeit von Neugeborenen und die Entstehung von postinflammatorischen Folgeerkrankungen nach einer Neugeborenenensepsis bedingen, nur sehr unvollständig verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte einer Stimulation neonataler Immunzellen mit GBS *in vitro* genauer zu untersuchen und so einen Beitrag zum besseren Verständnis der Immunregulation in der Neonatalzeit zu leisten und mögliche neue Ansatzpunkte für die Therapie der Neugeborenenensepsis und die Prävention postinflammatorischer Sepsis-assoziiierter Komplikationen zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Das NSB wurde von gesunden reifen Neugeborenen ($\geq 37+0$ SSW) unmittelbar nach Sectio caesarea oder vaginaler Geburt in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen mit dem schriftlichen Einverständnis der Eltern entnommen. Die Sammlung der Nabelschnurblut-Proben erfolgte anonym, sodass keine Information über Geschlecht, exaktes Gestationsalter oder Geburtsmodus vorlag. Neugeborene, welche aus einem Amnioninfektionssyndrom geboren wurden, wurden nicht eingeschlossen. Peripheres Blut Erwachsener stammte von gesunden, freiwilligen Spendern.

Das Vollblut wurde in 50ml-Röhrchen/ -Spritzen entnommen, die mit 2ml Heparin gefüllt waren und wurde unmittelbar nach Entnahme weiterverarbeitet.

Eine Genehmigung durch die Ethikkommission lag vor (458/2019BO1).

2.1.2 Antikörper

Die Antikörpermengen für die durchgeführten Versuche wurden bei Einführung der Antikörper in der Arbeitsgruppe durch Titration bestimmt.

2.1.2.1 Extrazelluläre Antikörper

Tabelle 1: Liste der verwendeten extrazellulären „Mouse Anti-Human“-Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
CD3 FITC	REA613	Miltenyi, Art.#: 130-113-138
CD3 PerCP	SK7	BD Bioscience, Art.#: 345766
CD4 APC	RPA-T4	BD Bioscience, Art.#: 555349
CD4 PerCp	RPA-T4	BD Bioscience, Art.#: 560650
CD8 PE	SK1	BD Bioscience, Art.#: 345773

Material und Methoden

CD8 PerCp	SK1	BD Bioscience, Art.#: 565310
CD14 APC	MφP9	BD Bioscience, Art.#: 345787
CD14 PE	M5E2	BD Bioscience, Art.#: 555398
CD14 PerCp	TÜK4	Miltenyi, Art.#: 130-113-150
CD19 FITC	Leu-12	BD Bioscience, Art.#: 347543
CD25 FITC	2A3	BD Bioscience, Art.#: 345796
CD56 PerCp	REA196	Miltenyi, Art.#: 130-114-551
CD66b FITC	G10F5	BD Bioscience, Art.#: 555724
CD69 PE	Leu-23	BD Bioscience, Art.#: 347827
CD80 PE	L307.4	BD Bioscience, Art.#: 340294
CD86 PerCp	2331	BD Bioscience, Art.#: 561129
CD152 PE (CTLA-4)	BNI3	BD Bioscience, Art.#: 555853
CD200 PE (OX-2)	OX-104	BioLegend, Art.#: 329205
CD200R APC	OX-108	BioLegend, Art.#: 329308
CD273 PE (B7-DC, PD-L2)	24F.10C12	BioLegend, Art.#: 329606
CD274 APC (B7-H1, PD-L1)	29E.2A3	BioLegend, Art.#: 329707
CD279 APC (PD-1)	NAT105	BioLegend, Art.#: 367406

2.1.2.2 Intrazelluläre Antikörper

Tabelle 2: Liste der verwendeten intrazellulären „Mouse Anti-Human“-Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Herstellerangaben
Anti-ZAP70 PE	1E7.2	BD Bioscience, Art.#: 344635
Arginase-1 PE	658922	R&D Systems, Art.#: IC8026P
IDO PE	700838	R&D Systems, Art.#: IC6030P
iNOS APC (NOS2-AK)	C-11	Santa Cruz Biotechnology, Art.#: sc-7271

2.1.3 Kits für die Separation von Monozyten/ T-Zellen

Die Kits wurden gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits

Kit	Herstellerangaben
CD14 MicroBeads human	Miltenyi, Art.#: 130-050-201
Pan T Cell Isolation Kit human	Miltenyi, Art.#: 130-096-535
Pan Monocyte Isolation Kit human	Miltenyi, Art.#: 130-096-537

2.1.4 ELISA

Die Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Tabelle 4: Liste der verwendeten ELISAs

ELISA	Herstellerangaben
ELISA PD-L1	R&D, Human/ Cynomolgus Monkey PD-L1/B7-H1 Immunoassay, Art.#: DB7H10

2.1.5 Chemikalien/ Reagenzien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Herstellerangaben
Ammoniumchlorid (NH₄Cl)	Sigma Aldrich, 250g, Art.#: 09718-250G
Ampuwa ® Spüllösung	Fresenius, Plastipur Aqua ad injectabilia, Art.#: B23067A
Bicoll Separating Solution	Biochrom GmbH, density: 1,077g/ml, 500ml, Art.#: L6115
BSA	Pan Biotech, Art.#: P06-1402500
CFSE	Invitrogen, Vybrant® CFDA-SE Cell Tracer Kit, Art.#: 864067

Material und Methoden

Columbia-Agar	Sigma Aldrich, Art.#: 27688-100G
Cytofix/ Cytoperm	BD Bioscience, Fixation and Permeabilization, 125ml of 1x Solution, Art.#: 554722
DHR 123	Sigma Aldrich, Art.#: D1054
EDTA	Roth, 250 g, Art#: 8043.1
FACS-Flow	BD Bioscience, 20l, Ref.#: 342003
FCS	Biochrom GmbH, 500 ml, Art.#: S0115
Flow Cytometry Staining Buffer	Thermo Fisher, Art.#: 00-4222-57
Flagellin aus Salmonella typhimurium Stamm 14028 (C _{end} = 1µg/ml)	Sigma Aldrich, Art.#: SRP8029
Heparin-Natrium-5000	Ratiopharm, Injektionslösung, 5x0,2ml (5000I.E./0,2ml)
HSA	Pan Biotech, Art.#: P06-27100
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius, Infusionslösung-Natriumchlorid
IFNγ (C _{end} = 100ng/ml)	R&D, ProDots™ Recombinant Human IFN- γ , 5µg, , Art.#: PRD285
IL-2	R&D, Recombinant human IL-2, Art.#: 202-IL
L-Glutamin	Sigma Aldrich, concentration: 200mM, Art.#: G7513
LPS aus E. coli Stamm 0111:B4 (C _{end} = 1µg/ml)	Sigma Aldrich, Art.#: L3023
LTA aus Staphylococcus aureus (C _{end} = 1µg/ml)	Sigma Aldrich, Art.#: L2515
Natriumazid (NaN₃)	Sigma Aldrich; 20 %ig, Art.#: 609374-500MG

Material und Methoden

OKT3 (C _{end} = 0,25/ 0,01/ 1µg/ml)	Invitrogen, LEAF purified anti-human CD3 (Clone: OKT3), Conc. 1mg/ml, Art.#: 16003785
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, 500ml, Art.#: L1825
Penicilin/Streptomycin	Biochrom GmbH, 50ml, Art.#: A2212
Perm/Wash Buffer	BD Bioscience, 100ml of 10x Solution, Art.#:554723
PHA, Lectin aus Phaseolus vulgaris (C _{end} = 20µg/ml)	Sigma Aldrich, Art.#: L8902
PMA	Sigma Aldrich, Art.#: P1585
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom GmbH, 500ml, Art.#: F1215
SEB (C _{end} = 1µg/ml)	Sigma Aldrich, Art.#: S4881
Spectinomycin	Sigma Aldrich, Art.#: S0692-1ML
Trypanblau 0,4%	Sigma Aldrich, Art.#: T8154-100ML

2.1.6 Puffer und Kulturmedien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Puffer und Kulturmedien

Puffer/ Kulturmedium	Zusammensetzung	Anwendung
FACS-Puffer	FACS-Flow 0,1% NaN ₃	Waschlösung für Antikörperfärbungen
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA/HSA 2 mM EDTA	MACS
RPMI-Medium	RPMI 1640 Medium 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/ Streptomycin	Zellkulturen

2.1.7 Geräte

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Herstellerangaben
autoMACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Hämozytometer SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland
Mikroplatten-Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Zentrifugen	Rotanta 46RS und 460RS; Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.8 Software

Tabelle 8: Liste der verwendeten Softwares

Software	Herstellerangaben
CellQuest Pro Research Software	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
EndNote 20.1.4 (2022)	Thomas Reuters, New York City, USA
FlowJo Version 10	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
GraphPad Prism 8.1.0 (2018)	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Word Version 2210	Microsoft Office, Albuquerque, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Aufreinigung mononukleärer Zellen (PBMCs/ CBMCs) aus Vollblut

Die Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut Erwachsener (PBMCs) und dem Nabelschnurblut (CBMCs) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum. Zur Aufreinigung unter der Sterilbank wurde heparinisiertes Vollblut in einem Verhältnis von 1:1-1:2 mit PBS verdünnt. In einem 50ml Falcon wurde nun 35ml dieses Gemischs langsam auf 15ml Biocoll aufgeschichtet, ohne dabei die Flüssigkeiten zu vermischen. Es folgte eine Zentrifugation für 25 min bei 400rcf und 20°C, nach der folgende Schichten vorlagen (von oben nach unten (v.o.n.u.), Abb. 2): Plasma, mononukleäre Zellen, Biocoll, Granulozyten/Erythrozyten. Mit einer 10ml-Pipette wurde nun die Interphase, welche mononukleäre Zellen beinhaltet, abgenommen, mit PBS auf 50ml aufgefüllt, und anschließend für 10min bei 500rcf und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das resuspendierte Zellpellet in 10ml PBS aufgenommen. Für die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines Hämozytometers (Sysmex) wurden vor dem folgenden Zentrifugationsschritt (10min, 200rcf, 4°C) 100µl der Zellsuspension entnommen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgekippt, das verbliebene Zellpellet resuspendiert und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

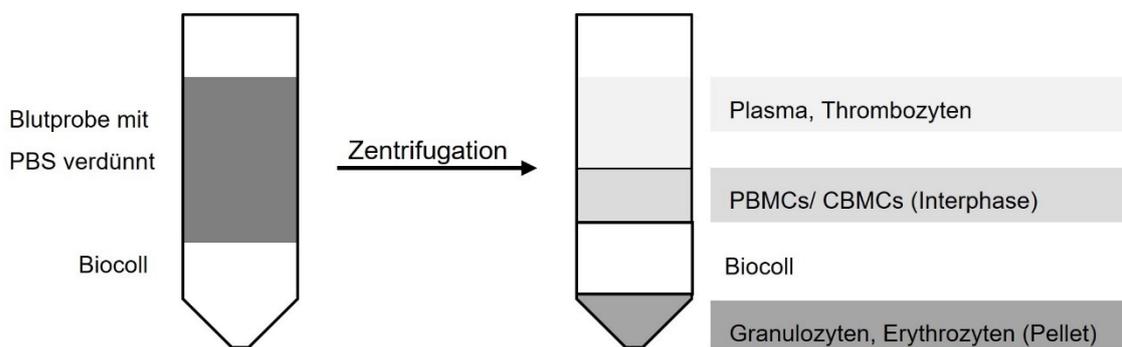


Abbildung 2: Schema der Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient der Separation mononukleärer Zellen und Granulozyten aus Vollblut. Nach Zentrifugation der aufgeschichteten Blutprobe erhält man folgende Schichten (v.o.n.u.): Plasma, mononukleäre Zellen (PBMCs/ CBMCs), Biocoll, Granulozyten und Erythrozyten.

2.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS)

Mithilfe der magnetischen Zellseparation können einzelne Zell-Fractionen anhand ihrer Oberflächenstrukturen aus einem Zellgemisch angereichert werden. Durch die Markierung der Zellen mit Antikörper-gekoppelten Magnetpartikeln (MicroBeads) können diese in einer magnetischen Säule von den nicht markierten Zellen getrennt werden. Die Antikörper-markierten Zellen bleiben in der Säule zurück, wohingegen die nicht-markierten Zellen die Säule ungehindert passieren können [87].

Die Anreicherung von Immunzellen mittels MACS wurde nach Protokollen des Herstellers Miltenyi Biotec am autoMACS-Gerät durchgeführt. Nach der Separation wurde die Reinheit der isolierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2.1 Magnetische Zellseparation von Monozyten

Für die Separation von Monozyten aus mononukleären Zellen wurde das „Pan Monocyte Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec) entsprechend des zugehörigen Herstellerprotokolls verwendet.

Kurz zusammengefasst wurden die mononukleären Zellen (1×10^7 Zellen/ml) in MACS-Puffer gewaschen und das gewonnene Zellpellet in $40 \mu\text{l}$ MACS-Puffer/ 10^7 Zellen aufgenommen. Nach der Zugabe von $10 \mu\text{l}$ „FcR Blocking Reagent“/ 10^7 Zellen und $10 \mu\text{l}$ „Biotin-Antibody Cocktail“/ 10^7 Zellen wurde die Zellsuspension gut vermischt und 5min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden $30 \mu\text{l}$ MACS-Puffer/ 10^7 Zellen und $20 \mu\text{l}$ „Anti-Biotin MicroBeads“/ 10^7 Zellen hinzugefügt und für 10min im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgte dann die Separation am autoMACS Separator mit dem Programm „Depletes“. Die Negativfraktion enthielt die separierten Monozyten.

2.2.2.2 Magnetische Zellseparation von T-Zellen

Die Separation von T-Zellen aus mononukleären Zellen erfolgte mit dem „Pan T Cell Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec) entsprechend des Herstellerprotokolls.

Mononukleäre Zellen wurden für 5min bei 400rcf und 10°C abzentrifugiert und das gewonnene Zellpellet wurde in 40µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen aufgenommen. Anschließend wurden 10µl „Pan T Cell Biotin Antibody Cocktail“/10⁷ Zellen hinzugefügt, gut vermischt und für 5min im Kühlschrank (2-8°C) inkubiert. Es erfolgte nun die Zugabe von 30µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen und 20µl „Pan T Cell MicroBeads Cocktail“/10⁷ Zellen und die Inkubation für 10min im Kühlschrank. Im Anschluss folgte die Separation am autoMACS Separator mit dem Programm „Depletes“. In der Negativfraktion befanden sich die nun isolierten T-Zellen.

2.2.3 Bakterienkultur

Zur Stimulation von mononukleären Zellen wurde in den hier durchgeführten Versuchen der Gruppe-B-Streptokokken-Stamm BSU98 verwendet. Die Bakterien wuchsen für 16h auf einer Columbia-Blut-Agar-Platte mit 5% defibriertem Schafblut und Spectinomycin (150g/ml). Anschließend wurden die Bakterienkolonien in PBS resuspendiert und die Konzentration bestimmt. Bei einer optischen Dichte (OD) von OD⁶⁰⁰ = 1 lagen 1x10⁶ Bakterien/µl vor. Die Hitzeinaktivierung erfolgte im Wasserbad bei 67°C für 30min. Die GBS wurden in Eppendorfgefäßen zu je 1x10⁷ GBS/µl im -80°C-Gefrierschrank bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die „multiplicity of infection“ (MOI) gibt bei Stimulation von Immunzellen mit Bakterien die verwendete Bakterienkonzentration an. Für die Stimulation der Zellen mit inaktivierten GBS wurden diese in einer MOI von 1:50 (das bedeutet 50 Bakterien pro Zelle) eingesetzt.

2.2.4 Zellkultur und Stimulation der mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen oder MACS-angereicherte Monozyten oder T-Zellen aus PBMCs und CBMCs wurden auf 2×10^6 Zellen/ml oder 4×10^6 Zellen/ml (3.1.6) eingestellt und in RPMI-Medium in 6-, 24-, 48- oder 96-Well Mikrotiterplatten bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte entweder mit inaktivierten GBS, mit bakteriellen Oberflächenmolekülen (Lipoteichonsäure (LTA), Lipopolysaccharid (LPS), Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Flagellin), IFN γ oder den Zell-Stimulanzien Phytohämagglutinin (PHA) und OKT3.

Die Stimulationszeit der Versuche zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (s. 3.1.3, 3.1.4, 3.1.6, 3.1.7, 3.2) betrug 18h. Die Stimulationszeit der Proliferationsversuche mit GBS oder LTA (s. 3.1) betrug 72h. Die Vorstimulation der Monozyten/ T-Zellen der Proliferations- und Hemmversuche mit GBS betrug 18h. Anschließend wurden diese aus der Platte genommen und mit den unstimulierten T-Zellen/ Monozyten/ PBMCs unter OKT3-Zugabe für weitere 72h (s. 3.1.1) bzw. 96h inkubiert (s. 3.1.2, 3.1.5).

Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen aus der Mikrotiterplatte entnommen, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert oder für weitere Versuchsschritte verwendet.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die multiparametrische Analyse von Zellpopulationen und die Sortierung (fluorescence associated cell sorting, FACS) von Zellen für weitere Analysen anhand ihrer Fluoreszenz und Lichtstreuung ermöglicht. Die Zellen werden nach ihrer Größe, Granularität und Färbung mit spezifischen Antikörpern charakterisiert.

Für durchflusszytometrische Analysen werden Zellen zunächst mit fluoreszierenden Reagenzien wie Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (z.B. CD3 FITC) oder (DNA-bindenden) fluoreszierenden Farbstoffen versetzt. Im FACS-Gerät werden Zellen zunächst fokussiert, sodass sie einzeln einen Laserstrahl passieren. Das dabei emittierte Streulicht wird dann von einem

Detektor gemessen. Die Messung der Lichtstreuung erfolgt in zwei Richtungen: Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) hängt vom Volumen/ der Größe der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) von der Granularität der Zellen bestimmt wird. Anhand dieser beiden Parameter lassen sich bereits unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung die Blut-Leukozyten wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterscheiden. Der Einsatz von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche gegen Strukturen auf der Oberfläche von Zellen oder im Intrazellulärraum gerichtet sind, ermöglicht dann eine weitere Differenzierung von Zellen. [88].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein FACSCalibur[®] Gerät der Firma BD verwendet. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der CellQuest Pro Research Software[®] (BD) oder der Software FlowJo[®].

2.2.6 Antikörperfärbung

Für die durchflusszytometrische Färbung wurden die zu analysierenden Zellen auf eine Zellzahl von $1-4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Waschschriffe vor und nach der Färbung erfolgten mit Waschpuffer (FACS-Puffer) und Zentrifugation für 5 Minuten bei 350rcf und 4°C.

2.2.6.1 Extrazellulärfärbung

Für die Extrazellulärfärbung wurden die extrazellulären Antikörper in den durch die Arbeitsgruppe festgelegten Mengen zur Zellsuspension hinzugefügt, gevortext und für 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschriffe erfolgte dann die durchflusszytometrische Analyse.

2.2.6.2 Intrazellulärfärbung

Für die Intrazellulärfärbung erfolgte zunächst eine Oberflächenfärbung wie unter 2.2.6.1 beschrieben. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch Zugabe von 200µl Cytofix/Cytoperm fixiert und permeabilisiert. Dies ermöglichte die spätere

Aufnahme der intrazellulären Antikörper in die Zelle. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C erfolgte ein Waschschriff mit 1ml Perm/Wash Lösung. Das resuspendierte Zellpellet wurde nun in 250µl Perm/Wash aufgenommen und in FACS-Röhrchen mit je 50µl Zellsuspension überführt. Nun wurden die intrazellulären Antikörper Zeta-assoziiertes Protein 70 (ZAP70; Positivkontrolle), Arginase-1 (Arg1), induzierte NO-Synthase (iNOS) und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in den entsprechenden Mengen zugegeben und die Röhrchen für 10min bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschriff mit FACS-Puffer konnte nun die Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt werden.

2.2.7 Messung der ROS-Produktion mit DHR/Rhodamin

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann durch Färbung mit dem Farbstoff Dihydrorhodamin 123 (DHR) durchflusszytometrisch bestimmt werden. DHR diffundiert als ungeladener nicht-fluoreszierender ROS-Indikator passiv in die Zelle, wo es an ROS bindet. DHR wird zu kationischem Rhodamin 123 oxidiert, welches in den Mitochondrien lokalisiert eine grüne Fluoreszenz zeigt [89]. Diese kann dann mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

Zur Analyse der ROS-Produktion von PBMCs und CBMCs nach GBS-Stimulation wurden 1×10^6 Zellen für 4h mit GBS stimuliert. Anschließend wurde 1ml der Zellsuspension in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigem RPMI-Medium mit DHR in einer Endkonzentration von 100µM für 5min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Als Positivkontrolle erfolgte eine Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 10µl mit 180µl RPMI; $c_{\text{end}} = 1\mu\text{M}$) für 15min ebenfalls im Wasserbad bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen sofort auf Eis gestellt, mit 1ml eiskaltem PBS gemischt und abzentrifugiert. Nach der Extrazellulärfärbung des resuspendierten Zellpellets mit anti-CD14 konnte die ROS-Produktion durchflusszytometrisch gemessen werden.

2.2.8 T-Zell-Proliferations-Assay

Durch Markierung von Zellen mit dem intrazellulär fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) besteht die Möglichkeit die Zell-Proliferation durchflusszytometrisch zu analysieren. CFSE diffundiert passiv in die Zelle und wird dann intrazellulär kovalent an Proteine gebunden, sodass es für lange Zeit in der Zelle verbleibt. Bei einer Zellteilung wird der CFSE-Farbstoff zur Hälfte an die Tochtergeneration weitergegeben [90]. Aus der resultierenden Verdünnung mit abnehmender Fluoreszenzintensität können Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität gezogen werden.

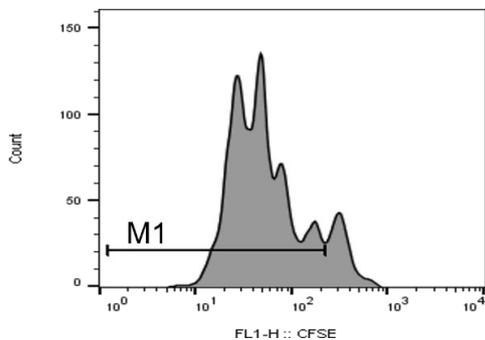


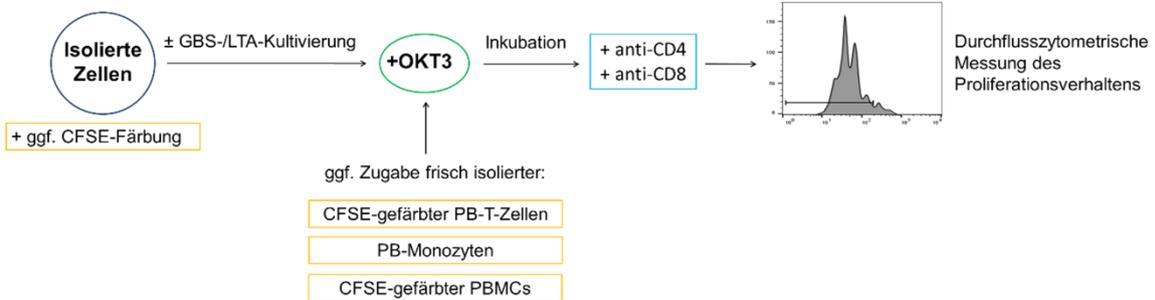
Abbildung 3: Histogramm der T-Zell-Proliferation

Beispielhaft dargestellt ist ein Histogramm der T-Zell-Proliferation. Bei der Zellteilung wird der intrazellulär fluoreszierende CFSE-Farbstoff zur Hälfte an die Tochtergeneration weitergegeben, sodass durch die Farbtintensität die Proliferationsaktivität der Zellen bestimmt werden kann. Auf der x-Achse ist der CFSE-Gehalt innerhalb der T-Zellen und auf der y-Achse die Anzahl der gemessenen Zellen aufgetragen. M1 bezeichnet die proliferierenden Zellen.

Für die Analyse der Zellproliferation wurden PBMCs, CBMCs oder mittels MACS isolierte T-Zellen mit PBS auf eine Zellzahl von max. 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und CFSE in einer Endkonzentration von $2,5 \mu\text{M}$ zugefügt. Die Zellen wurden dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von $500 \mu\text{l}$ FCS, um das überschüssige CFSE zu inaktivieren. Nach Auffüllen mit RPMI-Medium wurde bei 400rcf und 10°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde nun auf 2×10^6 Zellen/ml in entsprechendem Kulturmedium eingestellt. Für die Proliferationsversuche wurde RPMI-Medium mit 10% FCS

Material und Methoden

verwendet, für die Hemmversuche RPMI-Medium mit 10% Spenderserum. Je nach Setting wurde nach der CFSE-Färbung folgendermaßen vorgegangen:



Isolierte Zellen	weiteres Vorgehen	Kultivierung	weiteres Vorgehen	OKT3-Stimulation	Inkubation	Messung
------------------	-------------------	--------------	-------------------	------------------	------------	---------

zu 3.1: Proliferation adulter und neonataler mononukleärer Zellen nach GBS-/LTA-Stimulation

PBMCs	CFSE-Färbung	72h	-	+	72h	Durchflusszytometrische Messung des Proliferationsverhaltens
		72h GBS		+		
		72h LTA		+		
CBMCs		72h		+		
		72h GBS		+		
		72h LTA		+		

zu 3.1.1: Adulte und neonatale T-Zell-Proliferation nach separater GBS-Vorstimulation von Monozyten oder T-Zellen

PB-Monozyten	-	18h	Zugabe frisch isolierter CFSE-gefärbter PB-T-Zellen (2:1-Verhältnis)	+	72h	Durchflusszytometrische Messung des Proliferationsverhaltens		
		18h GBS		+				
CB-Monozyten		18h		+				
		18h GBS		+				
PB-T-Zellen		CFSE-Färbung		18h			Zugabe frisch isolierter PB-Monozyten (1:2-Verhältnis)	+
				18h GBS				+
CB-T-Zellen	18h		+					
	18h GBS		+					

zu 3.1.2: Einfluss von GBS-vorstimulierten adulten und neonatalen Monozyten auf die T-Zell-Proliferation

PB-Monozyten	-	18h	Zugabe frisch isolierter CFSE-gefärbter PBMCs (1:2-Verhältnis)	+	96h	Durchflusszytometrische Messung des Proliferationsverhaltens
		18h GBS		+		
CB-Monozyten		18h		+		
		18h GBS		+		

zu 3.1.5: Einfluss von GBS-vorstimulierten adulten und neonatalen T-Zellen auf die T-Zell-Proliferation

PB-T-Zellen	-	18h	Zugabe frisch isolierter CFSE-gefärbter PBMCs (1:2-Verhältnis)	+	96h	Durchflusszytometrische Messung des Proliferationsverhaltens
	-	18h GBS		+		
CB-T-Zellen	-	18h		+		
	-	18h GBS		+		

Abbildung 4: Settings des T-Zell-Proliferations-Assay

Zu 3.1: Zur Untersuchung der Proliferation adulter und neonataler mononukleärer Zellen nach GBS-/ LTA-Stimulation wurden die CFSE-gefärbten PBMCs/ CBMCs über Nacht mit GBS/ LTA vorinkubiert oder unstimuliert über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit dem monoklonalen Anti-CD3-Antikörper OKT3 ($C_{\text{end}} = 0,25\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Nach 72h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Extrazellulärfärbung der Co-Kultur mit anti-CD4 und anti-CD8. Die T-Zellproliferation konnte nun anhand des CFSE-Gehalts der T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Zu 3.1.1: Zur Untersuchung der adulten und neonatalen T-Zell-Proliferation nach separater GBS-Vorstimulation von Monozyten oder T-Zellen wurden Monozyten und T-Zellen aus Erwachsenenblut (PB-Monozyten, PB-T-Zellen) und aus NSB (CB-Monozyten, CB-T-Zellen) isoliert, die T-Zellen CFSE-gefärbt und jeweils über Nacht mit GBS stimuliert. Zellen ohne GBS-Stimulation dienten als Kontrolle. Anschließend erfolgte die Zugabe frisch isolierter CFSE-gefärbter PB-T-Zellen bzw. PB-Monozyten in eine 96-well-Rundbodenplatte und die Zugabe von OKT3 ($C_{\text{end}} = 0,01\mu\text{g/ml}$). Nach weiteren 72h Inkubation erfolgte die Extrazellulärfärbung und die durchflusszytometrische Messung der T-Zellproliferation.

Zu 3.1.2: Um den Einfluss von GBS-vorstimulierten adulten und neonatalen Monozyten auf die T-Zellproliferation zu untersuchen, wurden Monozyten aus Erwachsenenblut (PB-Monozyten) und aus NSB (CB-Monozyten) jeweils über Nacht mit GBS stimuliert. Zellen ohne GBS-Stimulation dienten als Kontrolle. Am nächsten Tag wurden frisch isolierte CFSE-gefärbte PBMCs hinzugefügt, mit OKT3 ($C_{\text{end}} = 0,01\mu\text{g/ml}$) stimuliert und 96h co-kultiviert. Anschließend erfolgte die Extrazellulärfärbung und die durchflusszytometrische Messung des Proliferationsverhaltens.

Zu 3.1.5.: Um den Einfluss von GBS-vorstimulierten adulten und neonatalen T-Zellen auf die T-Zellproliferation zu untersuchen, wurden T-Zellen aus Erwachsenenblut (PB-T-Zellen) und aus NSB (CB-T-Zellen) jeweils über Nacht mit GBS stimuliert. Zellen ohne GBS-Stimulation dienten als Kontrolle. Am nächsten Tag wurden frisch isolierte CFSE-gefärbte PBMCs hinzugefügt, mit OKT3 ($C_{\text{end}} = 0,01\mu\text{g/ml}$) stimuliert und 96h co-kultiviert. Anschließend erfolgte die Extrazellulärfärbung und die durchflusszytometrische Messung des Proliferationsverhaltens.

2.2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein auf einer enzymatischen Farbreaktion basierendes Nachweisverfahren zur Detektion und Quantifizierung von Antigenen [91, 92]. Beim direkten Sandwich-ELISA bindet ein an eine Mikrotiterplatte gebundener „Capture-Antibody“ das nachzuweisende Antigen. Anschließend wird ein zweiter Enzym-gekoppelter Antikörper hinzugegeben, der bei Hinzufügen eines Farbstoffsubstrats zu einem Farbumschlag führt [93]. Die optische Dichte der Farbreaktion gibt schließlich Auskunft über den Antigen-Gehalt in der Probe.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde Plasma von erwachsenen Spendern und Nabelschnurblut-Plasma auf das Vorhandensein des Antigens PD-L1 untersucht. Das Plasma wurde bis zur Analyse bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

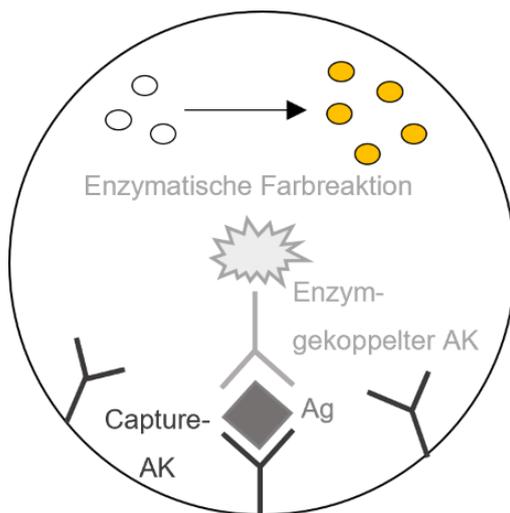


Abbildung 5: Schema eines direkten Sandwich-ELISA

ELISA ist ein Verfahren zum Antigen-Nachweis mit Hilfe eines enzymgekoppelten Antikörpers. Das Antigen bindet über den „Capture-Antibody“ an die Mikrotiterplatte. Ein Enzym-gekoppelter Antikörper bindet an das Antigen, was zur Aktivierung einer enzymatischen Farbreaktion mit Farbumschlag der Probe führt.

2.2.9.1 ELISA PD-L1

Für den Nachweis von löslichem PD-L1 im Serum von Erwachsenenblut und Nabelschnurblut wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA verwendet. Bei

Material und Methoden

diesem ELISA war eine 96-Well Mikrotiterplatte bereits mit dem Capture-Antibody beschichtet. Die Durchführung erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll.

Zunächst wurden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur gebracht und vorbereitet. Nun wurde in jedes Well 50µl eines Verdünnungsreagenz (Assay Diluent RD 1-41) und 100µl der Proben bzw. der PD-L1-Standard-Verdünnungsreihe gegeben. Dann wurde die Platte mit Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abpipettiert und die Platte in vier Durchgängen mit je 300µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Dann wurden 200µl Human/Cynomolgus Monkey B7-H1 Conjugate in jedes Well pipettiert, die Platte erneut mit Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang. Nun wurden 200µl Substrate Solution pro Well hinzugefügt und die Platte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde in jedes Well 50µl Stop Solution pipettiert und im Schüttler vorsichtig durchmischt. Die optische Dichte wurde bei 450nm und 550nm Wellenlänge im Microplate Reader bestimmt.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism Version 8.0 durchgeführt. Die Werte wurden mit dem D'Agostino und Pearson omnibus normality Test auf Gauss'sche Normalverteilung geprüft. Proliferationsversuche und Hemmversuche mit mehr als zwei Gruppen wurden mit Hilfe des Friedman Tests und des Dunn's multiple comparison Tests analysiert. Proliferationsversuche mit zwei Vergleichsgruppen wurden mit dem Wilcoxon-matched-paires signed rank Test analysiert. Für Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert <0,05 angenommen. Im Ergebnisteil sind signifikante Werte folgendermaßen im Text genannt: mean ± Standardabweichung, Stichprobenzahl (n), p-Wert.

3 Ergebnisse

3.1 Beeinflussung der Proliferation von neonatalen und adulten T-Zellen durch GBS-/ LTA-Stimulation

Zunächst wurde untersucht, ob eine Stimulation mit GBS oder LTA die Proliferation von neonatalen und/oder adulten T-Zellen beeinflusst.

Hierfür wurden CBMCs und PBMCs aus NSB und Erwachsenenblut isoliert, für 18h mit GBS oder LTA vorinkubiert und anschließend mit OKT3 in einer Konzentration von 0,25µg/ml stimuliert. Nach weiteren 72h Inkubation wurde das Proliferationsverhalten der CFSE-gefärbten T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

Bei adulten Zellen zeigte sich nach GBS-Stimulation eine deutlich reduzierte Proliferationsaktivität sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen ohne GBS-Stimulation (CD4⁺: 20,2% ± 9,6% versus 58,9% ± 16,2%, n=18, p<0,0001, Abb. 6B; CD8⁺: 27,3% ± 19,3% versus 64,8% ± 18,4% ohne GBS-Vorstimulation, n=16, p<0,001, Abb. 6D). Bei neonatalen Zellen war weder die CD4⁺ noch die CD8⁺ T-Zell-Proliferation durch Vorstimulation mit GBS beeinflusst. Die Histogramme (6A+C) und die Säulendiagramme (6B+D) zeigen die T-Zell-Proliferation im adulten Blut und im Nabelschnurblut mit und ohne Vorstimulation mit GBS.

Ergebnisse

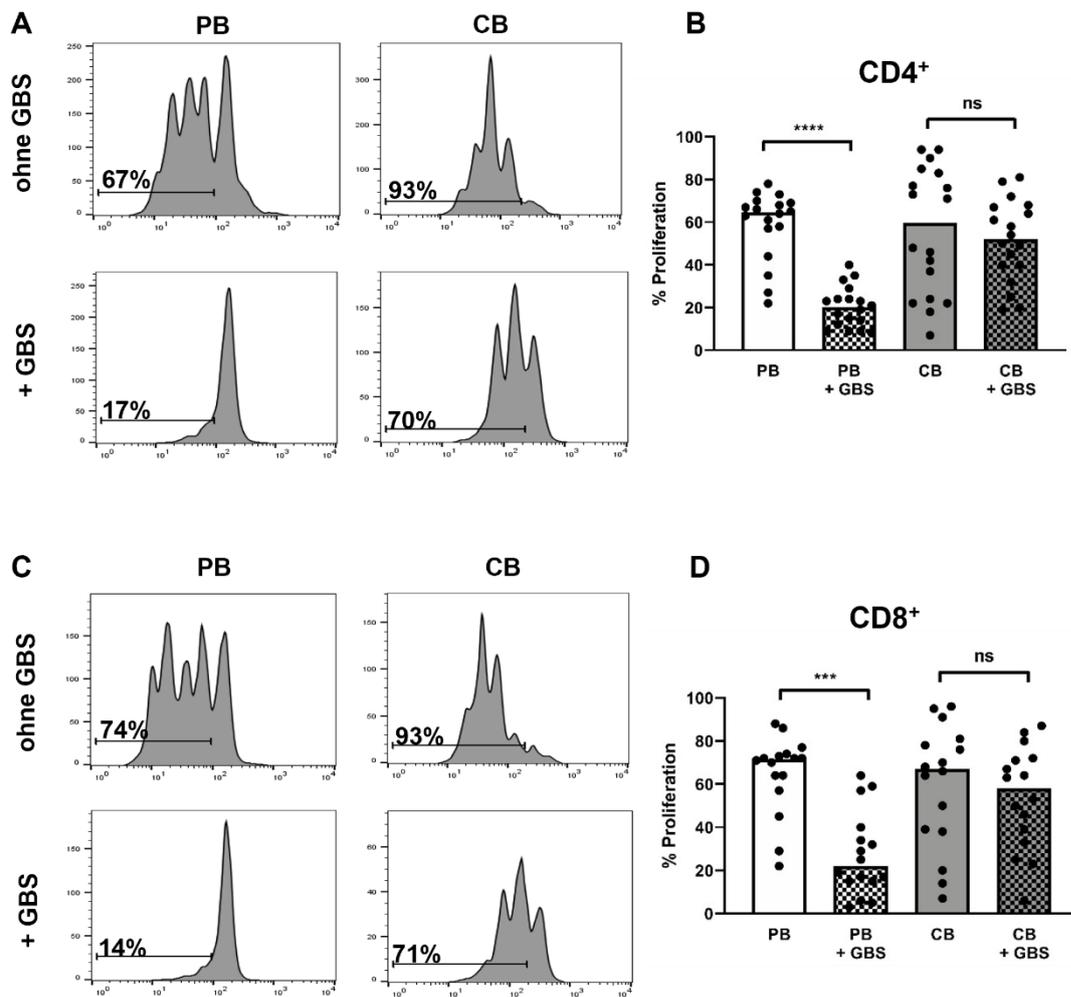


Abbildung 6: Proliferation adulter und neonataler mononukleärer Zellen nach GBS-Stimulation

Mononukleäre Zellen aus NSB reifer Neugeborener (CBMCs) und aus peripherem Blut gesunder Erwachsener (PBMCs) wurden isoliert, CFSE gefärbt und über Nacht mit GBS stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die OKT3-Stimulation. Nach weiteren drei Tagen wurde anhand des CFSE-Gehalts der Zellen die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. PBMCs und CBMCs ohne GBS-Vorstimulation dienten als Kontrollgruppe. A+C: Repräsentative Histogramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (C) aus Erwachsenenblut (PB, linke Histogramme) und NSB (CB, rechte Histogramme) ohne (ohne GBS) oder mit GBS-Stimulation (+GBS). B+D: Punkte-Säulendiagramme zeigen den Anteil proliferierter CD4⁺ (B) und CD8⁺ (D) T-Zellen von allen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in PBMCs (weiße Säulen) und CBMCs (graue Säulen) ohne (einfarbige Säulen) oder mit (karierte Säulen) GBS-Stimulation. Die Diagramme repräsentieren Daten von 18 (B) bzw. 16 (D) unabhängigen Experimenten – jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Probe. *** p<0,001, **** p<0,0001, ns: nicht signifikant; Friedman Test und Dunn's multiple comparison Test. Abbildung modifiziert nach [1, 2].

Ergebnisse

Ähnliche Ergebnisse konnten für das Proliferationsverhalten neonataler und adulter T-Zellen nach LTA-Stimulation gezeigt werden (Abb. 7). Nach LTA-Vorstimulation zeigten adulte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ebenfalls eine verminderte Proliferationsaktivität im Vergleich zu nur OKT3-stimulierten Zellen ($CD4^+$: $26,1\% \pm 15,45\%$ versus $62,5\% \pm 16,4\%$, $n=15$, $p<0,001$, Abb. 7B; $CD8^+$: $38,2\% \pm 19,3\%$ versus $67,7\% \pm 16,5\%$, $n=16$, $p<0,001$, Abb. 7D). Diese Reduktion der T-Zell-Proliferation war bei neonatalen T-Zellen nicht nachweisbar. Tendenziell zeigte sich hier sogar eine erhöhte Proliferationsaktivität nach LTA-Stimulation.

Ergebnisse

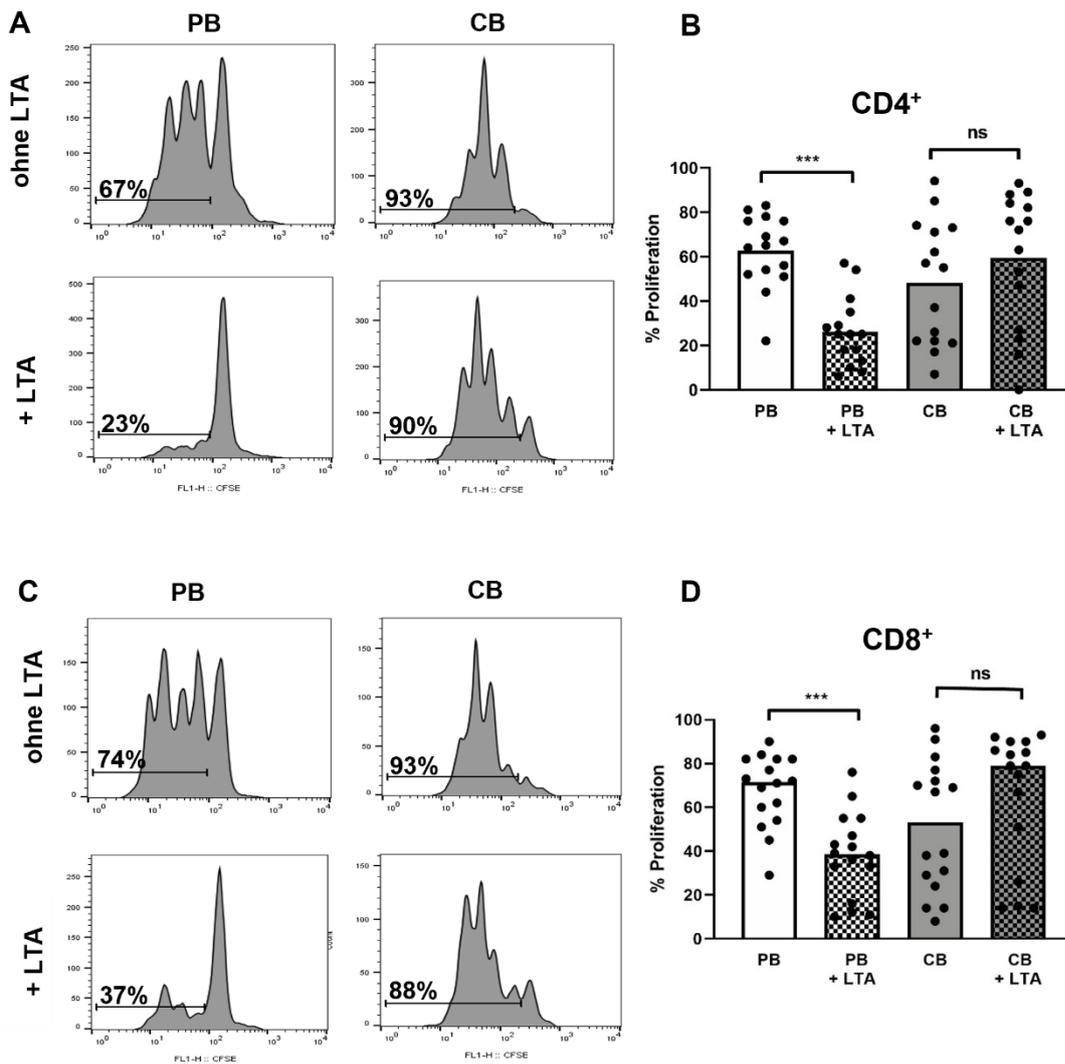


Abbildung 7: Proliferation adulter und neonataler mononukleärer Zellen nach LTA-Stimulation

Mononukleäre Zellen aus NSB reifer Neugeborener (CBMCs) und aus peripherem Blut gesunder Erwachsener (PBMCs) wurden isoliert, CFSE gefärbt und über Nacht mit LTA stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die OKT3-Stimulation. Nach weiteren drei Tagen wurde anhand des CFSE-Gehalts der Zellen die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. PBMCs und CBMCs ohne LTA-Vorstimulation dienten als Kontrollgruppe. A+C: Repräsentative Histogramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (A) und CD8⁺ T-Zellen (C) aus Erwachsenenblut (PB, linke Histogramme) und NSB (CB, rechte Histogramme) ohne (ohne LTA) oder mit LTA-Stimulation (+LTA). B+D: Punkte-Säulendiagramme zeigen den Anteil proliferierter CD4⁺ (B) und CD8⁺ (D) T-Zellen von allen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in PBMCs (weiße Säulen) und CBMCs (graue Säulen) ohne (einfarbige Säulen) oder mit (karierte Säulen) LTA-Stimulation. Die Diagramme repräsentieren Daten von 15 (B) bzw. 16 (D) unabhängigen Experimenten – jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Probe. *** p<0,001, ns: nicht signifikant; Friedman Test und Dunn's multiple comparison Test.

3.1.1 Verminderte Proliferation adulter T-Zellen nach GBS-Stimulation – ein Effekt von Monozyten und T-Zellen

Die Proliferation OKT3-stimulierter T-Zellen ist von der Interaktion zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen, insbesondere Monozyten abhängig. Daher sollte die Frage untersucht werden, ob die verminderte Proliferation adulter T-Zellen nach GBS-Stimulation auf Veränderungen der Monozyten- oder der T-Zell-Funktion zurückzuführen ist.

Hierfür wurden Monozyten und T-Zellen jeweils mittels MACS aus peripherem Blut Erwachsener isoliert und über Nacht mit GBS vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden T-Zellen und Monozyten eines neuen Spenders isoliert und zu den GBS-stimulierten Monozyten bzw. T-Zellen hinzugefügt. Die T-Zellen waren dabei jeweils CFSE-gefärbt. Es folgte dann der Zusatz von OKT3 ($C_{\text{end}} = 0,01\mu\text{g/ml}$) und eine erneute Inkubation der Co-Kultur für drei Tage.

Es zeigte sich, dass sowohl die Vorstimulation von Monozyten als auch die Vorstimulation von T-Zellen zu einer signifikant verminderten T-Zell-Proliferation von CD4^+ und CD8^+ T-Zellen führte (Abb. 8). Die Vorinkubation von Monozyten bewirkte eine etwas stärkere Reduktion der Proliferationsaktivität (CD4^+ : $24,3\% \pm 21,7\%$ versus $39,3\% \pm 21,6\%$, $n=6$, $p<0,05$, Abb. 8A; CD8^+ : $29,2\% \pm 24,6\%$ versus $52,0\% \pm 23,0\%$, $n=6$, $p<0,05$, Abb. 8B) als jene der T-Zellen (CD4^+ : $29,3\% \pm 17,6\%$ versus $47,5\% \pm 19,0\%$, $n=6$, $p<0,05$, Abb. 8C; CD8^+ : $50,2\% \pm 29,8\%$ versus $61,3\% \pm 25,2\%$, $n=6$, $p<0,05$, Abb. 8D).

Die Vorstimulation von neonatalen Monozyten oder neonatalen T-Zellen mit GBS führte hingegen nicht bzw. nur sehr gering zu einer Reduktion der T-Zell-Proliferation (Abb. 9).

Ergebnisse

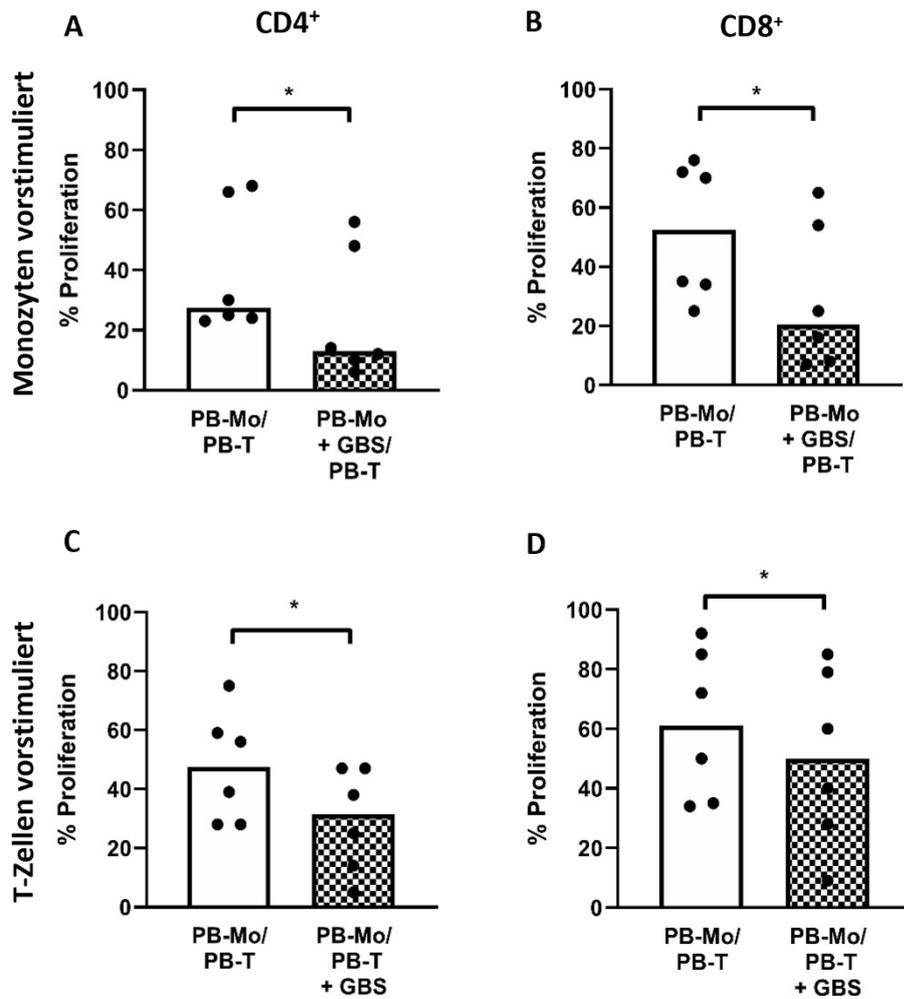


Abbildung 8: Adulte T-Zell-Proliferation nach separater GBS-Vorstimulation von Monozyten oder T-Zellen

Monozyten oder T-Zellen wurden mittels MACS aus PBMCs separiert und über Nacht mit GBS stimuliert. Am nächsten Tag wurden frisch isolierte CFSE-gefärbte T-Zellen in einem 2:1-Verhältnis zu den vorinkubierten Monozyten (A+B) gegeben oder es wurden frisch isolierte Monozyten im Verhältnis 1:2 zu vorinkubierten CFSE-gefärbten T-Zellen (C+D) hinzugefügt. Zellen ohne GBS-Vorstimulation dienen als Kontrolle. Die Co-Kulturen wurden mit OKT3 stimuliert und nach weiteren 72h wurde die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. A+B: Punkte-Säulendiagramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen in Co-Kultur mit Monozyten ohne (einfarbige Säulen) und mit (karierte Säulen) GBS-Vorstimulation. C+D: Punkte-Säulendiagramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Zellen in Co-Kultur mit Monozyten nach Vorstimulation der T-Zellen ohne (einfarbige Säulen) und mit (karierte Säulen) GBS. Die Diagramme repräsentieren Daten von 6 unabhängigen Experimenten – jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Probe. * p<0,05, ns: nicht signifikant; Wilcoxon matched-pairs signed rank Test. Abbildung modifiziert nach [1]

Ergebnisse

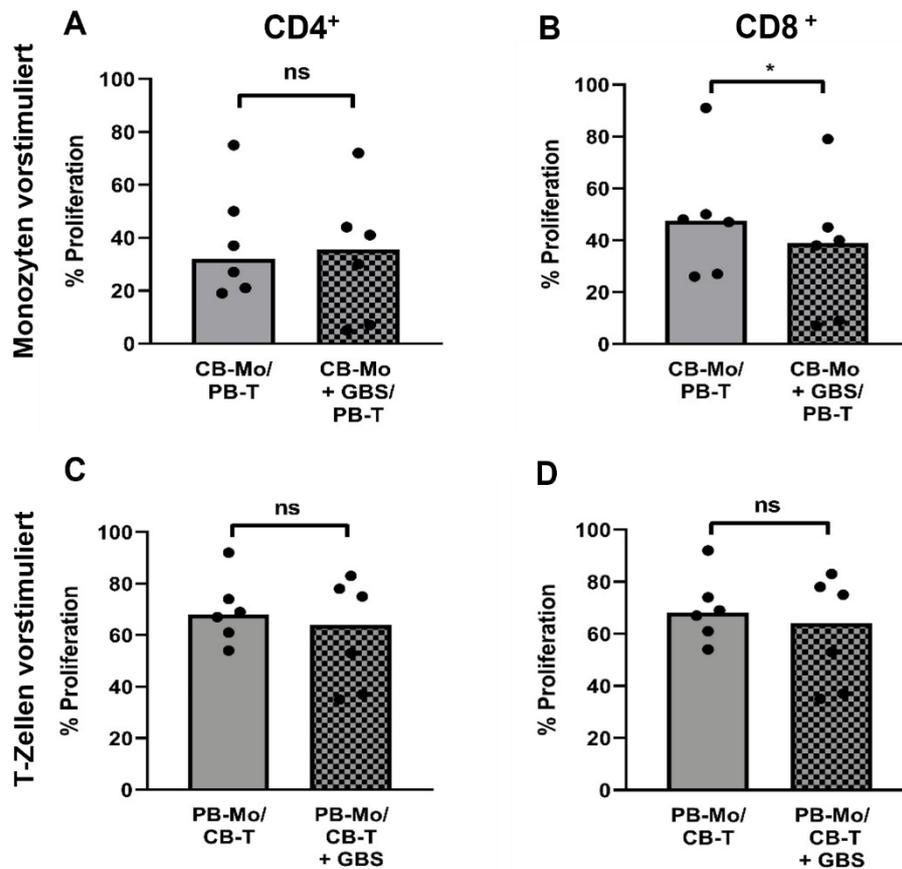


Abbildung 9: Neonatale T-Zell-Proliferation nach separater GBS-Vorstimulation von Monozyten oder T-Zellen

Monozyten oder T-Zellen wurden mittels MACS aus CBMCs separiert und über Nacht mit GBS stimuliert. Am nächsten Tag wurden frisch isolierte CFSE-gefärbte adulte T-Zellen in einem 2:1-Verhältnis zu den vorinkubierten neonatalen Monozyten (A+B) gegeben oder es wurden frisch isolierte adulte Monozyten im Verhältnis 1:2 zu vorinkubierten CFSE-gefärbten neonatalen T-Zellen (C+D) hinzugefügt. Zellen ohne GBS-Vorstimulation dienten als Kontrolle. Die Co-Kulturen wurden mit OKT3 stimuliert und nach weiteren 72h wurde die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. A+B: Punkte-Säulendiagramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) adulten T-Zellen in Co-Kultur mit neonatalen Monozyten ohne (einfarbige Säulen) und mit (karierte Säulen) GBS-Vorstimulation. C+D: Punkte-Säulendiagramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) neonatalen T-Zellen in Co-Kultur mit adulten Monozyten nach Vorstimulation der T-Zellen ohne (einfarbige Säulen) und mit (karierte Säulen) GBS. Die Diagramme repräsentieren Daten von 6 unabhängigen Experimenten – jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Probe. * p<0,05, ns: nicht signifikant; Wilcoxon matched-pairs signed rank Test.

3.1.2 Nach GBS-Stimulation erlangen adulte Monozyten suppressive Aktivität

Um die funktionellen Veränderungen von Monozyten nach GBS-Stimulation weiter zu untersuchen und die Hypothese zu überprüfen, dass adulte Monozyten durch Stimulation mit GBS T-Zell-suppressive Aktivität entwickeln, wurden im nächsten Schritt Hemmversuche mit GBS-stimulierten adulten und neonatalen Monozyten und frisch isolierten PBMCs eines anderen Spenders durchgeführt.

Sowohl unstimulierte adulte als auch unstimulierte neonatale Monozyten zeigten keine T-Zell-suppressive Aktivität (Abb. 10).

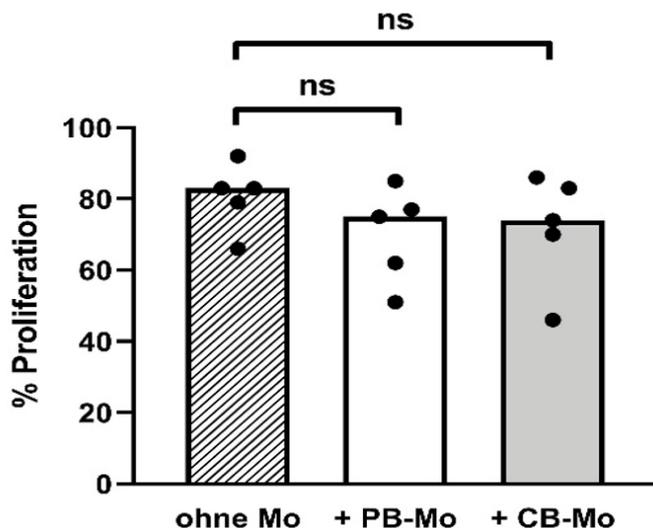


Abbildung 10: Einfluss von vorkultivierten Monozyten auf die T-Zell-Proliferation

Monozyten wurden mittels MACS aus PBMCs und CBMCs gewonnen und über Nacht in Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden sie zu frisch isolierten, CFSE-gefärbten und OKT3-stimulierten PBMCs eines anderen Spenders hinzugefügt. Nach vier Tagen wurde die T-Zell-Proliferation anhand des CFSE-Gehalts durchflusszytometrisch ermittelt. Das Säulendiagramm zeigt die T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von Monozyten (gestreifte Säule) und nach Zugabe adulter (weiße Säule) oder neonataler Monozyten (graue Säule). n=5, ns: nicht signifikant; Friedman Test und Dunn's multiple comparison Test.

Ergebnisse

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen durch die Zugabe GBS-stimulierter Monozyten aus Erwachsenenblut signifikant gehemmt wurde im Vergleich zur Zugabe von unstimulierten Monozyten (Proliferation 47,0% ± 22,2% versus 70,0% ± 13,5%, n=5, p<0,05, Abb.11B). Ein solcher Effekt konnte bei neonatalen Monozyten nicht beobachtet werden (Abb.11B).

Die suppressive Aktivität von Monozyten auf die CD8⁺-T-Zell-Proliferation wurde weder bei adulten noch bei neonatalen Monozyten durch eine GBS-Stimulation beeinflusst (Abb. 11D).

Ergebnisse

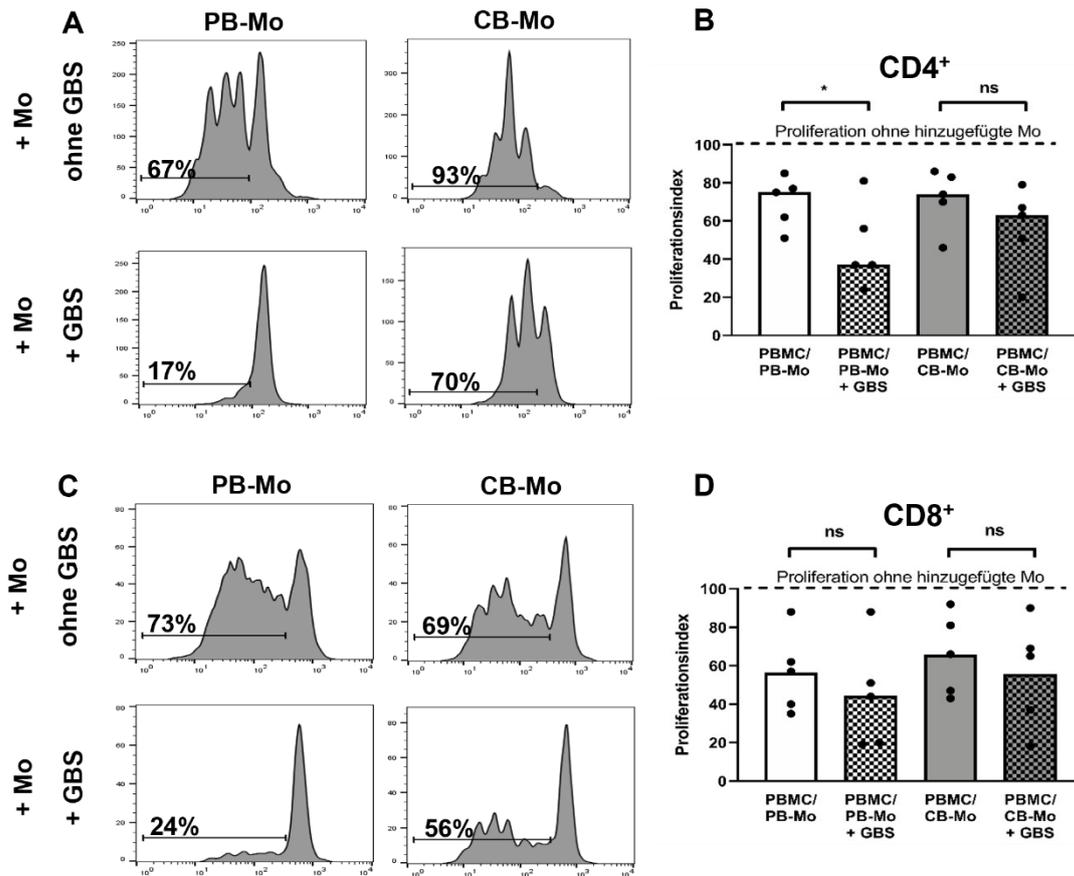


Abbildung 11: Inhibition der T-Zell-Proliferation durch GBS-stimulierte adulte Monozyten

Monozyten wurden mittels MACS aus PBMCs und CBMCs separiert und über Nacht mit GBS stimuliert. Monozyten ohne GBS-Stimulation dienten als Kontrolle. Am nächsten Tag wurden die Monozyten zu frisch isolierten, CFSE-gefärbten und OKT3-stimulierten PBMCs hinzugefügt. Nach vier Tagen wurde die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anhand des CFSE-Gehalts durchflusszytometrisch bestimmt. Der Proliferationsindex wurde als Ratio aus T-Zell-Proliferation mit und ohne Hinzufügen von Monozyten gebildet. A+C: Repräsentative Histogramme zeigen die Proliferation von CD4⁺ (A) und CD8⁺ (C) T-Zellen nach Zugabe von Monozyten aus PBMCs (PB-Mo, linke Histogramme) und aus CBMCs (CB-Mo, rechte Histogramme) ohne (obere Histogramme) oder mit (untere Histogramme) GBS-Vorstimulation. B+D: Punkte-Säulendiagramme zeigen den inhibitorischen Effekt von Monozyten auf die CD4⁺- (B) und CD8⁺- (D) T-Zell-Proliferation. Die gestrichelte Linie zeigt die Proliferation der PBMCs ohne hinzugefügte Monozyten. Weiße Säulen zeigen die T-Zell-Proliferation nach Hinzufügen adulter Monozyten, graue Säulen jene nach Hinzufügen neonataler Monozyten. Einfarbige zeigen die Effekte von Monozyten ohne und karierte Säulen mit GBS-Vorstimulation. n=5, * p<0,05, ns: nicht signifikant; Friedman Test und Dunn's multiple comparison Test. Abbildung modifiziert nach [1].

3.1.3 Analyse co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Moleküle und Analyse von Effektorenzymen auf Monozyten nach GBS-Stimulation

Um Hinweise auf mögliche Mechanismen für das Erlangen der suppressiven Eigenschaften von adulten Monozyten nach GBS-Stimulation zu erhalten, wurde im Weiteren die Expression co-stimulatorischer (CD80, CD86) und co-inhibitorischer (PD-L1 und PD-L2) Moleküle sowie die Expression von Effektorenzymen (Arg1, iNOS, IDO) auf Monozyten und deren Produktion von ROS ohne und mit GBS-Stimulation bestimmt.

Für die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Monozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen GBS-stimulierten Monozyten aus Erwachsenenblut und GBS-stimulierten Monozyten aus NSB (Abb. 12A+B). Im Gegensatz dazu exprimierten adulte GBS-stimulierte Monozyten signifikant mehr PD-L1 im Vergleich zu GBS-stimulierten neonatalen Monozyten (MFI $328,6 \pm 213,7$ versus $24,8 \pm 9,6$, $n=9$, $p<0,0001$, Abb. 12C). Für die PD-L2-Expression ergab sich kein Unterschied (Abb. 12D).

Ergebnisse

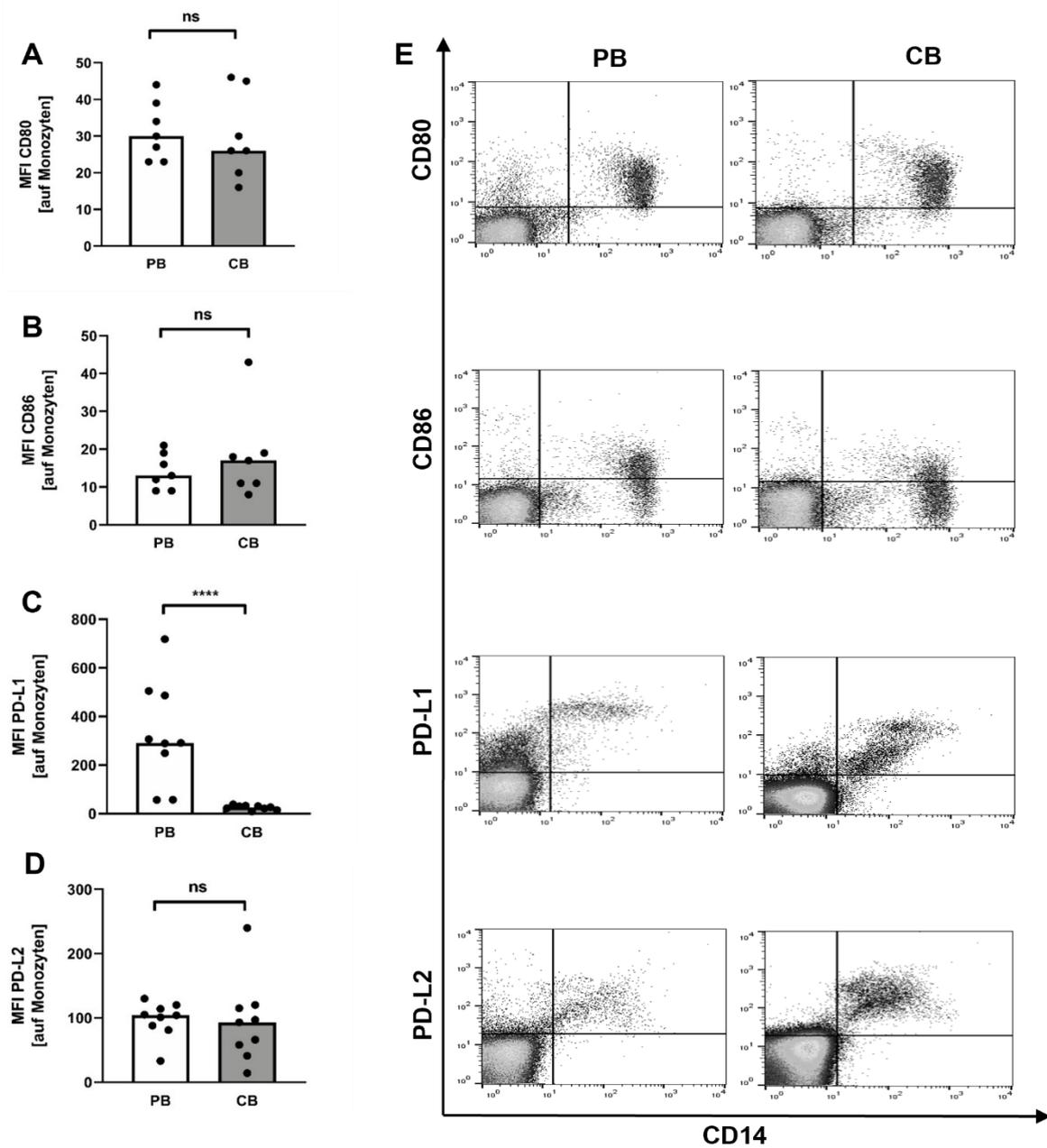


Abbildung 12: Expression co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Moleküle auf Monozyten nach GBS-Stimulation

CBMCs und PBMCs wurden isoliert und über Nacht mit GBS stimuliert. Die Expression von Oberflächenmolekülen (A-D) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Säulendiagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von CD80 (A), CD86 (B), PD-L1 (C) und PD-L2 (D) auf adulten (weiße Säulen) und neonatalen (graue Säulen) Monozyten nach GBS-Stimulation. Die repräsentativen Dot-Plot-Grafiken (E) zeigen die Expression von CD80, CD86, PD-L1 und PD-L2 (y-Achse) auf CD14⁺ adulten (PB) und neonatalen (CB) Monozyten (x-Achse). n=5-9, **** p<0,0001, ns: nicht signifikant; Mann-Whitney-Test. Abbildung modifiziert nach [1].

Ergebnisse

Ebenfalls beobachteten wir keinen Unterschied in der Expression von Arg1 und IDO und der Produktion von ROS (Abb. 13A+C+D) zwischen GBS-stimulierten adulten und neonatalen Monozyten. Dagegen exprimierten neonatale Monozyten nach GBS-Stimulation signifikant mehr iNOS als adulte Monozyten (MFI $177,4 \pm 60,1$ versus $30,0 \pm 12,2$, $n=5$, $p<0,01$, Abb. 13B).

Ergebnisse

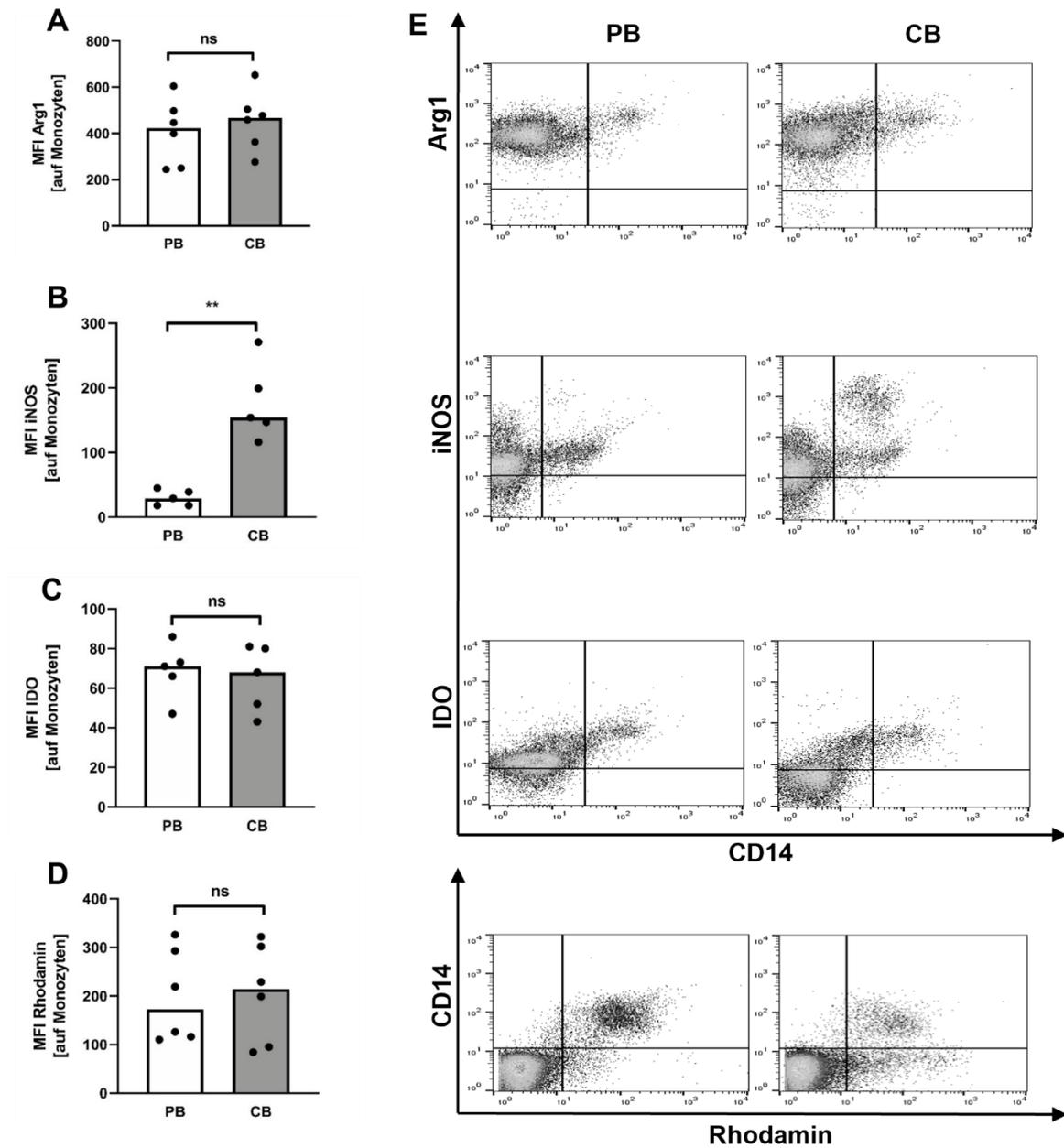


Abbildung 13: Expression von Effektorenzymen auf Monozyten nach GBS-Stimulation

CBMCs und PBMCs wurden isoliert und über Nacht mit GBS stimuliert. Die Expression von intrazellulären Effektorenzymen (A-C) und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (D) wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Säulendiagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Expression von Arg1 (A), iNOS (B), IDO (C) und die ROS-Produktion (D) von adulten (weiße Säulen) und neonatalen (graue Säulen) Monozyten nach GBS-Stimulation. Die repräsentativen Dot-Plot-Grafiken (E) zeigen die Expression von Arg1, iNOS, IDO (y-Achse) auf CD14⁺ adulten (PB) und neonatalen (CB) Monozyten (x-Achse) und die ROS-Produktion (x-Achse) CD14⁺ adulter (PB) und neonataler (CB) Monozyten (x-Achse). n=5-9, ** p<0,01, ns: nicht signifikant; Mann-Whitney-Test. Abbildung modifiziert nach [1].

3.1.4 Phänotypisierung der T-Zellen nach GBS-Stimulation

Auf Seiten der T-Zellen wurde ebenfalls untersucht, ob es nach GBS-Stimulation zu einem veränderten Phänotyp kommt, der die Ursache für die unter 3.1 beobachtete Proliferationshemmung adulter Zellen sein könnte. Hierzu wurde die Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf adulten und neonatalen T-Zellen nach GBS-Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass neonatale T-Zellen nach GBS-Stimulation signifikant weniger CD25 exprimierten als adulte T-Zellen (Abb. 14). Dies galt insbesondere für CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺: MFI 20,0 ± 4,6 versus 37,5 ± 10,46, n=6, p<0,01, Abb. 14A; CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen: MFI 24,8 ± 4,9 versus 41,5 ± 11,4, n=8, p<0,01, Abb. 14C). Die CD25-Expression auf CD8⁺ T-Zellen unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht (Abb. 14E). Auch die Expression von CD69 auf CD3⁺ T-Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen GBS-stimulierten neonatalen und adulten T-Zellen (Abb. 14B).

Ergebnisse

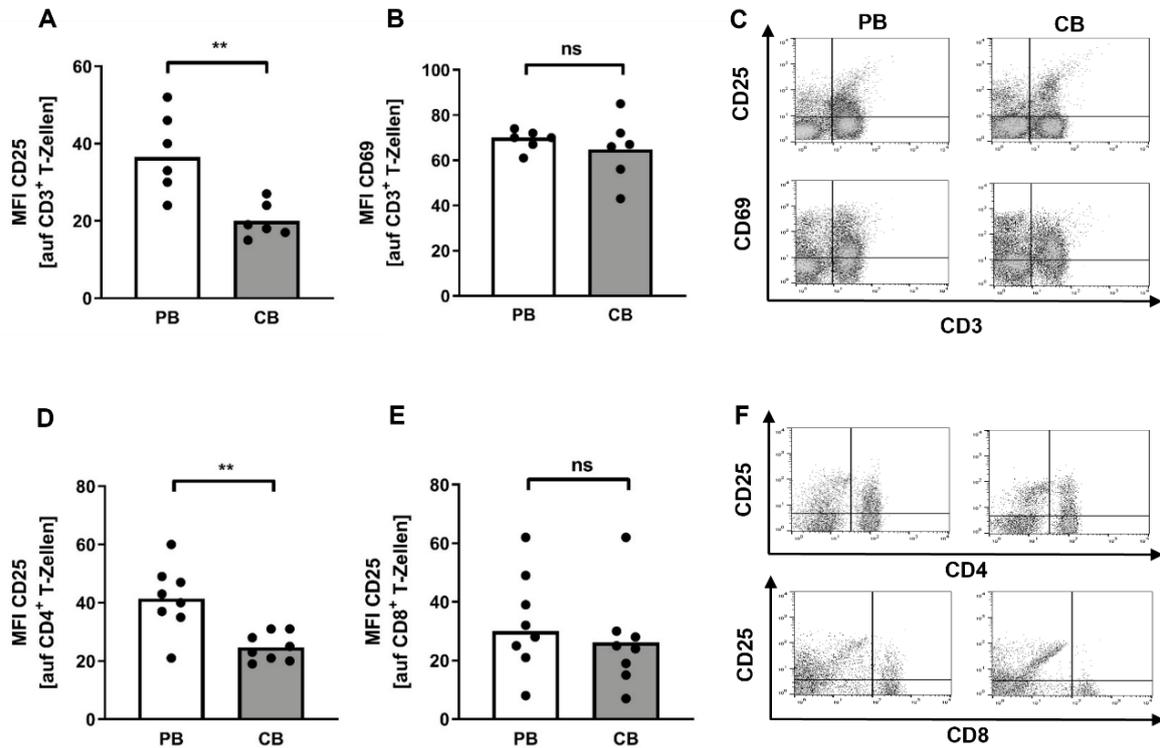


Abbildung 14: Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen nach GBS-Stimulation

CBMCs und PBMCs wurden isoliert und über Nacht mit GBS stimuliert. Zellen ohne GBS-Stimulation dienten als Kontrolle. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD69 auf T-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Expression von CD25 (A) und CD69 (B) auf CD3⁺ T-Zellen und CD25 auf CD3⁺/CD4⁺ (D) und CD3⁺/CD8⁺ (E) T-Zellen aus Erwachsenenblut (weiße Säulen) und aus Nabelschnurblut (graue Säulen) nach GBS-Stimulation. Die repräsentativen Dot-Plot-Grafiken zeigen die Expression von CD25 und CD69 (y-Achse) auf CD3⁺ adulten (PB) und neonatalen (CB) T-Zellen (x-Achse) (C) und die Expression von CD25 (y-Achse) auf CD4⁺ und CD8⁺ adulten (PB) und neonatalen (CB) T-Zellen (x-Achse) (F). n=6-8, **p<0,01, ns: nicht signifikant; Mann-Whitney-Test. Abbildung modifiziert nach [1].

3.1.5 Gering suppressive Aktivität adulter T-Zellen nach GBS-Stimulation

Da CD25 von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, welche ebenfalls suppressiv auf die T-Zell-Proliferation wirken, wurde weiter untersucht, ob die mit GBS stimulierten CD4⁺ T-Zellen ähnlich wie GBS-stimulierte Monozyten die Proliferation von T-Zellen hemmen. Interessanterweise hemmte sowohl die Zugabe von CD4⁺ T-Zellen aus Erwachsenenblut als auch die Zugabe von CD4⁺ T-Zellen aus Nabelschnurblut zu PBMCs die T-Zellproliferation (Abb. 15). Eine Vorstimulation mit GBS steigerte die suppressive Aktivität von CD4⁺ T-Zellen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen CD4⁺ T-Zellen aus adultem Blut und Nabelschnurblut (CD4⁺: PB-T + GBS 41,4% ± 20,5% versus PB-T 53,8% ± 21,4%, CB-T + GBS 39,8% ± 22,57% versus CB-T 50,6 ± 29,32%, n=5, p<0,05, Abb. 15A; CD8⁺: PB-T + GBS 49,0% ± 21,6% versus PB-T 68,6% ± 15,4%, CB-T + GBS 45,2% ± 25,97 versus CB-T 61,6% ± 25,65%, n=5, p<0,05, Abb. 15B).

Ergebnisse

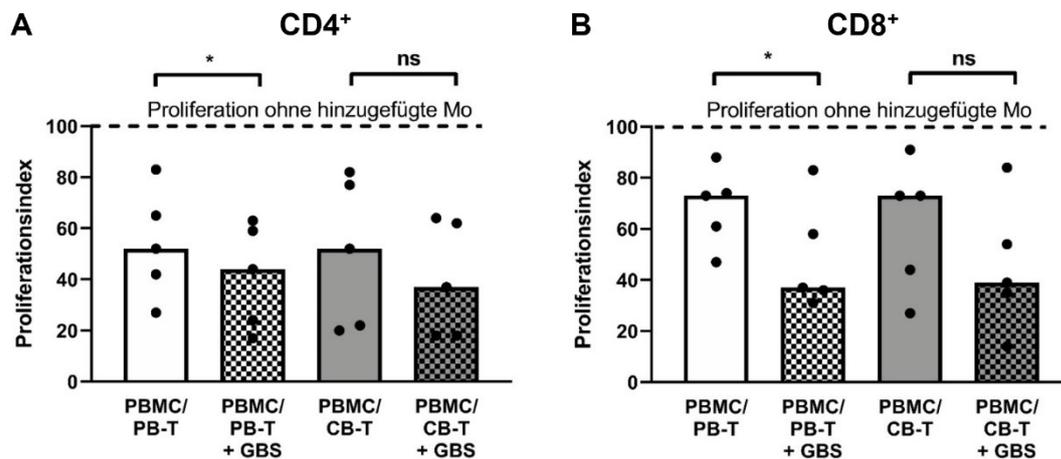


Abbildung 15: Inhibition der T-Zell-Proliferation durch GBS-stimulierte T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen wurden mittels MACS aus CBMCs und PBMCs isoliert und über Nacht mit GBS stimuliert. Zellen ohne GBS-Stimulation dienten als Kontrolle. Die vorinkubierten CD4⁺ T-Zellen wurden am Folgetag zu frisch isolierten, CFSE-gefärbten und OKT3-stimulierten PBMCs gegeben. Nach vier Tagen wurde die CD4⁺- und die CD8⁺-T-Zell-Proliferation anhand des CFSE-Gehalts durchflusszytometrisch ermittelt. Der Proliferationsindex wurde als Ratio aus T-Zell-Proliferation mit und ohne Hinzufügen von T-Zellen gebildet. Die Säulendiagramme zeigen den inhibitorischen Effekt von CD4⁺ T-Zellen auf die CD4⁺- (A) und CD8⁺- (B) T-Zell-Proliferation. Die gestrichelte Linie zeigt die Proliferation ohne Zugabe von CD4⁺ T-Zellen. Weiße Säulen zeigen die Proliferation nach Zugabe adulter CD4⁺ T-Zellen, graue Säulen die Proliferation nach Zugabe neonataler CD4⁺ T-Zellen. Einfarbige Säulen zeigen den Effekt auf die T-Zell-Proliferation von unstimulierten CD4⁺ T-Zellen und karierte Säulen den Effekt von GBS-stimulierten CD4⁺ T-Zellen. n=5, * p<0,05, ns: nicht signifikant; Friedman-Test, Dunn's multiple comparison Test. Abbildung modifiziert nach [1]

3.1.6 PD-L1-Expression adulter und neonataler Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen weiteren Stimulanzen

Schließlich wurde untersucht, ob die verminderte PD-L1-Expression auf neonatalen im Vergleich zu adulten Monozyten spezifisch für die GBS-Stimulation ist oder ob der Effekt auch nach Aktivierung mit anderen Substanzen zu beobachten ist. Es zeigte sich, dass neonatale Monozyten nach Stimulation mit allen untersuchten Stimulanzen weniger PD-L1 exprimierten als adulte Monozyten (Abb. 16).

Tabelle 9: PD-L1-Expression von Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen

Stimulanzen	MFI neonatale vs. adulte Monozyten	Anzahl	p-Wert
LTA C _{end} = 1 µg/ml (Abb. 16A)	MFI 18,4 ± 11,3 versus 63,2 ± 24,8	n=10	p<0,0001
Flagellin C _{end} = 1 µg/ml (Abb. 16B)	MFI 34,3 ± 31,3 versus 155,8 ± 176,3	n=7	p<0,05
PHA C _{end} = 20 µg/ml (Abb. 16C)	MFI 290,3 ± 131,3 versus 614,7 ± 120,0	n=9	p<0,0001
OKT3 C _{end} = 1 µg/ml (Abb. 16D)	MFI 16,6 ± 15,1 versus 355,1 ± 285,8	n=7	p<0,001
LPS C _{end} = 1 µg/ml (Abb. 16E)	MFI 109,3 ± 53,9 versus 356,6 ± 142,0	n=12	p<0,0001
SEB C _{end} = 1 µg/ml (Abb. 16F)	MFI 134,5 ± 73,0 versus 610,0 ± 181,5	n=8	p<0,0001

Ergebnisse

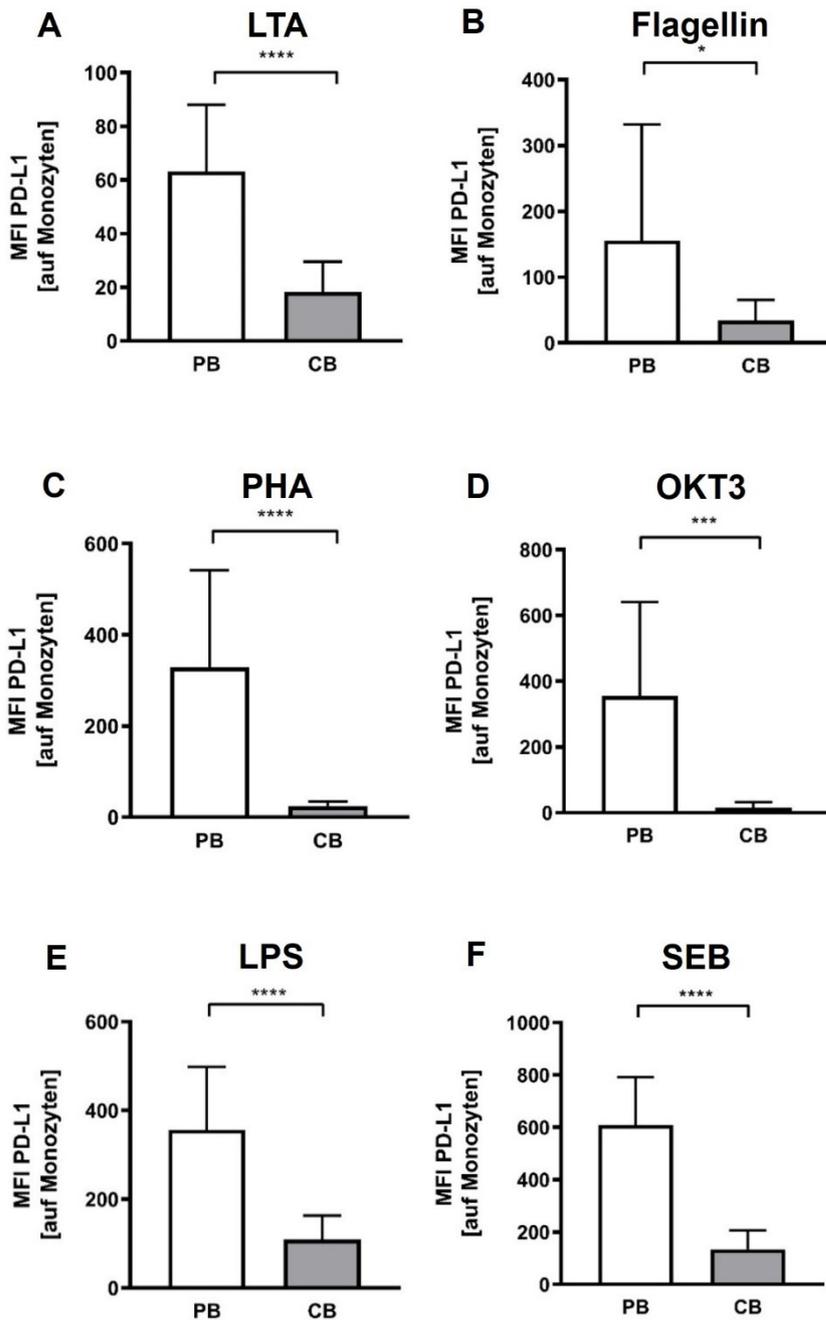


Abbildung 16: PD-L1-Expression von Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen

PBMCs und CBMCs wurden isoliert und über Nacht mit verschiedenen Stimulanzen stimuliert. Am Folgetag wurde die PD-L1-Expression auf Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Säulendiagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der PD-L1-Expression auf adulten (weiße Säulen) und neonatalen (graue Säulen) Monozyten nach Stimulation mit LTA (A), Flagellin (B), PHA (C), OKT3 (D), LPS (E) und SEB (F). n=7-12, * p<0,05, *** p<0,001, **** p<0,0001; Mann-Whitney-Test.

3.1.7 PD-L1-Expression im NSB nach IFN γ -Stimulation

In Arbeiten anderer Gruppen konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von IFN γ im NSB im Vergleich zum Erwachsenenblut vermindert ist [94-96]. Weiterhin ist bekannt, dass IFN γ die Expression von ICM stimuliert [97]. Um herauszufinden, ob die verminderte IFN γ Expression im NSB eine Ursache für die verminderte PD-L1-Expression neonataler Monozyten sein könnte, wurde im nächsten Schritt IFN γ als Stimulus verwendet. Hier zeigte sich, dass unter Stimulation mit IFN γ NSB-Monozyten in gleichem Maße in der Lage waren PD-L1 zu exprimieren wie Erwachsenen-Monozyten (Abb. 17).

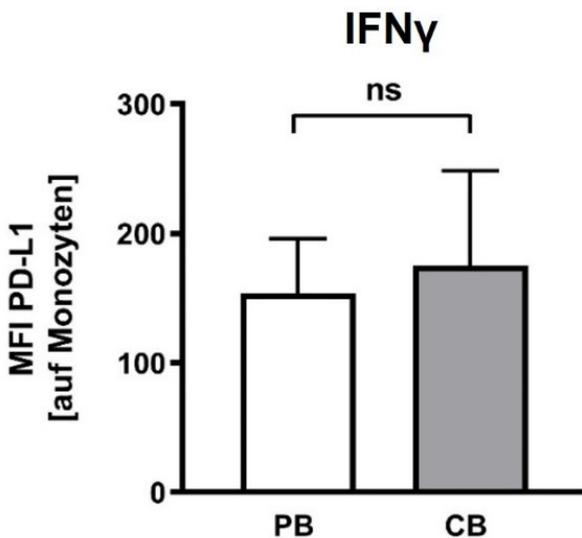


Abbildung 17: PD-L1-Expression von Monozyten nach Stimulation mit IFN γ

PBMCs und CBMCs wurden isoliert und über Nacht mit IFN γ ($c_{end} = 100\text{ng/ml}$) stimuliert. Am Folgetag wurde die PD-L1-Expression auf Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Das Diagramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der PD-L1-Expression auf adulten (weiße Säule) und neonatalen (graue Säule) Monozyten nach IFN γ -Stimulation. $n=6$, ns: nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

3.1.8 Expression von löslichem PD-L1 in neonatalem und adultem Plasma

PD-L1 kann neben der membrangebundenen Form auch in löslicher Form (soluble PD-L1, sPD-L1) vorkommen. Daher wurde zuletzt untersucht, ob neben der geringeren Fähigkeit von neonatalen Monozyten PD-L1 zu exprimieren auch Unterschiede in der Expression von sPD-L1 im Plasma von NSB und Erwachsenenblut vorliegen.

Hier zeigten sich interessanterweise geringfügig höhere Konzentrationen von sPD-L1 im Nabelschnurblutplasma verglichen mit adultem Plasma ($59,5\text{pg/ml} \pm 16,5\text{pg/ml}$ versus $49,7\text{pg/ml} \pm 10,0\text{pg/ml}$, $n=15$, $p<0,05$, Abb. 18).

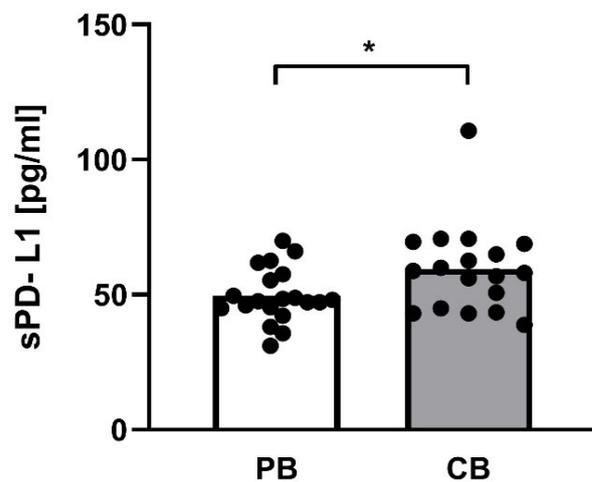


Abbildung 18: Konzentration von sPD-L1 im Nabelschnurblut und im Blut von Erwachsenen

Die Konzentration von sPD-L1 im Plasma von NSB und peripherem Blut gesunder Erwachsener wurde mittels ELISA bestimmt. Die weiße Säule zeigt die Konzentration von sPD-L1 in adultem Plasma (PB), die graue Säule die in Nabelschnurblutplasma (CB). $n=15$, $*p<0,05$; Mann-Whitney-Test, Col stats.

4 Diskussion

Noch immer stellt die neonatale Sepsis einen Hauptfaktor der Mortalität und Morbidität innerhalb der ersten 28 Lebenstage dar. Nach Frühgeburtlichkeit und Geburtskomplikationen ist es die dritthäufigste Todesursache Neugeborener. Trotz einer verbesserten Versorgung und Behandlung versterben jährlich über 400.000 Kinder an einer Neugeborenen-sepsis. Die Ursachen für die besondere Empfindlichkeit Neugeborener für Infektionen und die Regulation des neonatalen Immunsystems sind nur unvollständig verstanden [14, 98-100]. Insbesondere auch die Beendigung von Entzündungsreaktionen scheint bei Neugeborenen gestört zu sein und führt zu einer prolongierten Immunantwort [14, 101]. Postinflammatorische Folgeerkrankungen, wie beispielsweise eine BPD oder eine PVL, sind häufig Folgen einer neonatalen Sepsis und beeinträchtigen die Entwicklung der betroffenen Kinder oft langfristig. GBS gehören zu den häufigsten Erregern der Neugeborenen-sepsis und sind für 40-50% der Fälle verantwortlich [14, 98, 99, 102]. Warum GBS bei Neugeborenen so häufig zu schweren Infektionen führen, ist ebenfalls noch unzureichend verstanden.

In dieser Arbeit wurde die Reaktion neonataler Immunzellen auf eine Stimulation mit GBS im Vergleich zu adulten Immunzellen *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit GBS bei adulten Zellen zu einer deutlichen Reduktion der T-Zellproliferation führt – ein Effekt, der bei neonatalen Zellen nicht beobachtet werden konnte. Diese unterschiedlichen Effekte konnten auf Unterschiede sowohl in der Monozyten- als auch in der T-Zell-Funktion zurückgeführt werden. Adulte Monozyten erlangten nach GBS-Stimulation T-Zell-supprimierende Eigenschaften und exprimierten hohe Level des ICM PD-L1. Neonatale Monozyten wiesen dagegen keine T-Zell-suppressive Aktivität auf und exprimierten nahezu kein PD-L1. Die reduzierte PD-L1 Expression auf neonatalen Monozyten zeigte sich auch nach Stimulation mit anderen Stimulanzen. Interessanterweise waren neonatale Monozyten jedoch nach Stimulation mit IFN γ gut in der Lage, PD-L1 zu exprimieren. Auf Seiten der T-Zellen zeigte sich eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf adulten im Vergleich zu neonatalen Zellen. Unterschiede in der suppressiven Aktivität von CD4⁺ T-Zellen konnten nicht beobachtet werden. Die

Konzentrationen von löslichem PD-L1 waren im Nabelschnurblut im Vergleich zum Erwachsenenblut etwas erhöht.

4.1 GBS-Stimulation reduziert die T-Zell-Proliferation in PBMCs, nicht aber in CBMCs

Unsere Beobachtung einer gesteigerten Proliferation neonataler T-Zellen im Vergleich zu adulten T-Zellen nach GBS-Stimulation stimmt mit Berichten anderer Arbeitsgruppen überein [103, 104]. Risdon et al. beschrieben ein höheres Proliferationsausmaß von T-Zellen aus NSB im Vergleich zu adulten T-Zellen nach Inkubation mit Alloantigenen oder IL-2, IL-4 oder IL-6 [103]. Wang et al. zeigten, dass neonatale T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 schneller proliferierten als T-Zellen älterer Kinder. Diese starke Proliferationskapazität neonataler T-Zellen wurde mit einer hohen IL-2-Sekretion in Zusammenhang gebracht [104]. Im Gegensatz dazu wurde in vorangegangenen Studien die Zytokinproduktion und die zytotoxische Aktivität neonataler T-Zellen im Vergleich zu adulten T-Zellen als vermindert beschrieben [103-106]. Orlikowsky et al. zeigten, dass T-Zellen aus NSB ohne bakterielle Stimulation weniger stark proliferierten als T-Zellen aus Erwachsenenblut, was auf eine verminderte Expression co-stimulatorischer Moleküle auf neonatalen Monozyten zurückgeführt wurde [107]. Daneben enthält Nabelschnurblut immunsuppressiv wirkende Zellen, die ebenfalls zur verminderten T-Zell-Proliferation beitragen könnten [2, 108, 109]. Interessanterweise zeigten unsere Versuche nach GBS- oder LTA-Stimulation eine starke Suppression der Proliferation adulter T-Zellen, wohingegen die Proliferation neonataler T-Zellen unverändert oder sogar erhöht war. Eine Suppression der T-Zell-Proliferation bei Erwachsenen durch bakterielle Antigene oder Bakterien konnte sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden [110-115]. Für Neugeborene existieren diesbezüglich nur wenige Ergebnisse. Majer et al. beobachteten eine vermehrte Proliferation neonataler im Vergleich zu adulten CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit SEB [116]. Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte unsere Arbeitsgruppe in vorangegangenen Arbeiten bereits nachweisen, dass

Diskussion

die Proliferation von CBMCs nach Stimulation mit *E. coli* unbeeinflusst war, während es bei PBMCs zu einer deutlichen Reduktion der T-Zell-Proliferation kam [117]. Damit scheinen neonatale T-Zellen auf den Kontakt mit Pathogenen anders zu reagieren als T-Zellen von Erwachsenen.

Obwohl bekannt ist, dass NSB im Vergleich zu Erwachsenenblut vermehrt suppressive Mechanismen aufweist wie hohe Zahlen immunsuppressiver Zellen wie myeloide Suppressorzellen (Myeloid-derived suppressor cell; MDSC) [108], CD71⁺ erythroide Zellen [118] und T_{regs} [119] und erhöhte Level immunmodulatorisch wirkender löslicher Stoffe wie Adenosin [120], zeigten wir eine verstärkte Proliferation neonataler T-Zellen nach Stimulation mit GBS. Goldberg et al. berichteten ebenfalls von einem stimulatorischen Effekt von LPS auf die T-Zell-Proliferation neonataler Zellen [121]. Dies deutet auf eine hohe inflammatorische Kapazität von CBMCs hin, die wahrscheinlich unter physiologischen Bedingungen durch suppressive Mechanismen reguliert wird. Dies könnte für die verminderte Fähigkeit neonataler Immunzellen, eine Inflammation zu beenden, mitverantwortlich sein und zum erhöhten Risiko der Entwicklung postinflammatorischer Folgeerkrankungen bei Neu- und insbesondere Frühgeborenen beitragen.

In Neonaten scheinen wichtige Funktionen des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise die Chemotaxis Neutrophiler, die Freisetzung aggressiv-lytischer Sauerstoffradikale durch Immunzellen (oxidativer Burst), Neutrophile Extrazelluläre Traps (NETs) [42] und die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten [115] gegenüber Erwachsenen vermindert zu sein. Andere Mechanismen, wie beispielsweise die Phagozytose, sind jedoch bei Frühgeborenen vergleichbar effektiv wie bei Erwachsenen [115]. Ähnliche Beobachtungen wurden für das adaptive Immunsystem gemacht. Während die neonatale TH1-Immunantwort auf einige Pathogene und Vakzine vermindert ist, können Neugeborene beispielsweise gegen das *Cytomegalievirus* (CMV) oder gegen das Bacillus Calmette-Guérin-Vakzin gegen *Mycobacterium bovis* eine der adulten TH1-Immunantwort ähnliche Immunreaktion entwickeln [122]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die neonatale Immunantwort nicht generell

beeinträchtigt ist, sondern dass die Qualität des Stimulus die Immunantwort bestimmt.

4.2 Adulte Monozyten erlangen nach GBS-Stimulation eine T-Zell-supprimierende Aktivität im Vergleich zu neonatalen Monozyten

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die verminderte Proliferation adulter mononukleärer Zellen nach GBS-Stimulation auf veränderte Funktionen sowohl der Monozyten als auch der T-Zellen zurückzuführen war. Adulte Monozyten erlangen nach GBS-Stimulation immunsuppressive Eigenschaften im Vergleich zu neonatalen Monozyten. Die immunsuppressive Aktivität adulter Monozyten während einer Virus-Infektion oder einer Sepsis wurde bereits mehrmals publiziert [123-125].

Für neonatale Monozyten konnte mehrfach beschrieben werden, dass sie weniger proinflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF α im Vergleich zu gesunden Erwachsenen [126, 127] und vermehrt anti-inflammatorische Zytokine (IL-6, IL-10, IL-23) exprimieren, was auf einen anti-inflammatorischen Zustand neonataler Monozyten hinweist [49, 128]. Dazu passend konnten bei Neugeborenen hohe Level löslicher Immunmodulatoren wie Adenosin, Prostaglandine und Sexualhormone vorgefunden werden. Adenosin beispielsweise hemmt die TNF α - und erhöht die IL-6-Produktion. Das vermehrte Vorkommen dieser Substanzen bei Neugeborenen führt wahrscheinlich zu einer Suppression pro-inflammatorischer Immunantworten [129-131].

Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen eine 10fach höhere Expression des proinflammatorischen Zytokins Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (MIF) vorliegt. Ebenfalls ist der MIF in neonatalen Monozyten nach Stimulation mit *E. coli* oder GBS stark erhöht. Eine Inhibition von MIF reduzierte die systemische Inflammation und Mortalität im Modell der murinen Neugeborenenensepsis. Der MIF könnte demnach die neonatale Immunsuppression kompensieren und damit zur Hyperinflammation im Sepsisgeschehen beitragen [132].

Heinemann et al. entdeckten eine spezifische Population inflammatorischer Monozyten in Neugeborenen, die durch S100A8/A9 Alarmine (Damage-associated molecular pattern; DAMP) negativ reguliert wurden. Im Serum Neugeborener finden sich hohe Level dieser Alarmine, die durch neonatale Monozyten bei der Geburt freigesetzt werden und erst nach einigen Wochen absinken. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass neonatale S100A9^{-/-} Mäuse nach Sepsisinduktion durch LPS einen Überlebensnachteil hatten. S100A8/A9 Alarmine übernehmen demnach im Neugeborenen eine regulatorische Rolle im Rahmen der Verhinderung der Geburt-assoziierten Expansion spezifischer inflammatorischer Monozyten und vermindern damit die Anfälligkeit Neugeborener für Hyperinflammation und fatale Sepsis [133].

In Zusammenschau der bisher vorhandenen Literatur und unseren hier präsentierten Ergebnissen kann man annehmen, dass neonatale Monozyten keine intrinsisch verminderten inflammatorischen Kapazitäten im Vergleich zu Erwachsenen aufweisen, stattdessen jedoch durch extrinsische Faktoren kontrolliert werden.

4.3 Adulte Monozyten erlangten nach GBS-Stimulation einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu neonatalen Monozyten

Phänotypisch beobachteten wir eine deutlich reduzierte PD-L1-Expression auf GBS-stimulierten neonatalen Monozyten im Vergleich zu Zellen des Erwachsenen. Diese verminderte PD-L1-Expression zeigte sich auch nach Stimulation mit LTA, Flagellin, PHA, LPS, SEB und OKT3.

Eine andere Studie wies eine vermehrte PD-L1-Expression auf Monozyten von adulten Sepsispatienten nach. Reduzierte Neutrophilen- und Monozytenfunktionen korrelierten positiv mit deren PD-L1-Expression und mit der PD-1-Expression auf CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Die Blockade von PD-L1/PD-1 konnte die Funktionen von Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen und NK-Zellen *in vitro* wiederherstellen. Dies spricht für eine immunsuppressive Bedeutung des PD-L1/PD-1-Signalwegs im Rahmen der Sepsis [134]. Young et al. zeigten im Mausmodell ein verbessertes Überleben während einer neonatalen

polymikrobiellen Sepsis bei Fehlen von PD-1 [135], auch wenn der dafür verantwortliche Zelltyp nicht identifiziert wurde. *In vitro* Studien zeigten, dass die Stimulation von Monozyten gesunder Erwachsener mit Streptokokken Pyrogenic Exotoxin A die Monozyten-medierte Akkumulation von T_{regs} durch PD-L1 förderte [136] und *Streptococcus mitis*, ein Keim der Mundhöhle, durch PD-L1-Induktion auf Monozyten Immunantworten supprimierte [137]. Dies deutet auf eine regulatorische Rolle von PD-L1 auf Monozyten im Rahmen einer Infektion bei Erwachsenen hin. In unseren Versuchen untersuchten wir keine weiterführenden Signalwege der PD-L1-Aktivierung. So können wir nur annehmen, dass die vermehrte PD-L1-Expression adulter Monozyten im Vergleich zu neonatalen Monozyten ein Mechanismus für die Ausbildung ihrer suppressiven Aktivität ist. Die PD-L1-Expression auf neonatalen Monozyten nach bakterieller Stimulation wurde bisher unseres Wissens nach noch nicht untersucht. Zasada et al. zeigten jedoch, dass sämtliche untersuchte Monozyten-Subtypen am 5. Lebenstag PD-1 exprimierten. Daten derselben Studie zeigten, dass bei Frühgeborenen im Rahmen einer LOS vermehrt Monozyten mit PD-1-Expression vorlagen. Besonders im Falle eines septischen Schocks oder eines fatalen Outcomes konnte eine erhöhte PD-1-Expression beobachtet werden [138]. Gollwitzer et al. beschrieben vor Kurzem, dass die PD-L1-Expression auf Immunzellen der Lunge für die Entwicklung von Toleranz gegenüber Allergenen in den ersten Lebenswochen entscheidend ist [139]. Weitere Studien zur Untersuchung der Rolle der PD-1/PD-L1-Achse im Kontext der Immunregulation während der Neugeborenenphase und der Pathogenese von Neugeborenen-sepsis und postinflammatorischen Folgeerkrankungen sind notwendig. Möglicherweise lassen sich daraus in Zukunft präventive oder therapeutische Ansätze entwickeln.

IFN γ ist ein wichtiger Stimulator für die PD-L1-Expression [97]. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits nachweisen, dass die Expression von IFN γ im NSB im Vergleich zum Erwachsenenblut vermindert ist [94-96]. In unseren Versuchen zeigten wir, dass unter Stimulation mit IFN γ NSB-Monozyten in gleichem Maße in der Lage waren PD-L1 zu exprimieren wie Erwachsenen-Monozyten. Die verminderte PD-L1-Hochregulation neonataler Monozyten

könnte demnach mit der verringerten IFN γ -Expression neonataler Zellen nach GBS-Stimulation zusammenhängen [94].

Weiter untersuchten wir die Expression immunsuppressiv wirkender Effektormechanismen (Arg1, iNOS, IDO, ROS) in Monozyten nach Stimulation mit GBS. Diese Effektormechanismen spielen besonders für die immunsuppressive Wirkung sogenannter myeloider Suppressorzellen (MDSC) eine wichtige Rolle. Man unterscheidet hier je nach Expression von Oberflächenmarkern monozytäre von granulozytären MDSC, wobei monozytäre MDSC phänotypisch Monozyten stark ähneln und sich vor allem durch ihre T-Zell-suppressiven Eigenschaften auszeichnen [109, 140]. Daher vermuteten wir, dass die Stimulation von adulten Monozyten mit GBS zu einer Bildung monozytärer MDSC führen könnte. Erstaunlicherweise konnten wir nach GBS-Stimulation keine Unterschiede in der Expression der Effektorenzyme Arg1 und IDO oder der ROS-Produktion adulter Monozyten im Vergleich zu neonatalen Monozyten finden, die die T-Zell-supprimierende Aktivität adulter Monozyten erklären könnten [141]. Stattdessen konnten wir eine vermehrte Expression der NO-Synthase iNOS in Monozyten aus NSB im Vergleich zu adulten Monozyten zeigen. In unserem Setting scheint demnach die NO-Produktion nicht primär für die suppressive Aktivität adulter Monozyten verantwortlich zu sein. Eine erhöhte NO-Produktion nach GBS-Infektion begünstigt möglicherweise das Entstehen einer Pneumonie [142] und eine Störung der Blut-Hirn-Schranke [143]. Eine Sepsis-assoziierte Enzephalopathie entsteht durch Neuroinflammation und ischämische Insulte, die ihrerseits durch dysregulierte periphere Immunantworten bedingt werden können [144]. In neonatalen Mäusen führte die Induktion einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung zur Infiltration peripherer inflammatorischer Monozyten des Gehirns mit resultierenden zerebralen Insulten [145]. Außerdem beeinflussten Monozyten die Entstehung einer BPD [146, 147]. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass eine vermehrte iNOS-Expression neonataler Monozyten im Rahmen einer bakteriellen Infektion an der Entwicklung einer PVL und BPD beteiligt sein könnte. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.4 Adulte T-Zellen zeigten im Vergleich zu neonatalen T-Zellen einen veränderten Phänotyp nach GBS-Stimulation

Nach Stimulation mit GBS zeigten neonatale CD4⁺ T-Zellen ebenfalls eine verminderte Expression von PD-L1 im Vergleich zu adulten T-Zellen. Die Rolle von ICM für die neonatale T-Zell-Antwort besonders während oder nach einer Neugeborenenensepsis ist bisher unzureichend untersucht. Walk et al. untersuchten die Expression von sieben ICM auf neonatalen Zellen, insbesondere auf Zellen des angeborenen Immunsystems. Dabei wiesen sie eine erhöhte Expression von LAIR-1, CD31 und CD200 im Vergleich zu adulten T-Zellen nach und postulierten einen Zusammenhang mit der Abschwächung der adaptiven Immunantwort *in utero* [148]. Miller et al. fanden eine verminderte mRNA und Protein-Expression von CTLA-4 neonataler T-Zellen im Vergleich zu adulten T-Zellen [149]. *In vitro* Studien zeigten eine reduzierte Apoptose von Lymphozyten adulter septischer Patienten und eine Erholung von Effektorzellen nach PD-1- und PD-L1-Blockade [134, 150-152]. In einem Mausmodell mit intrazerebraler Blutung reduzierte PD-L1 die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, verminderte das Zellsterben und verbesserte die Integrität der Blut-Hirn-Schranke [153-155]. Nach unserem Wissen liegen keine Erkenntnisse zur Expression von PD-L1 auf neonatalen T-Zellen vor. Unsere Ergebnisse einer verminderten PD-L1-Expression neonataler im Vergleich zu adulten T-Zellen könnte darauf hinweisen, dass neonatale T-Zellen Schwierigkeiten haben eine einmal initiierte Entzündungsantwort wieder zu beenden. Dies könnte ein Grund für das erhöhte Risiko Neu- und Frühgeborener sein, postinflammatorische Folgeerkrankungen zu entwickeln.

Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus eine vermehrte Expression des Aktivitätsmarkers CD25 auf adulten CD4⁺ T-Zellen nach GBS-Stimulation im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aus NSB.

CD25 (IL-2R α) und CD122 (IL-2R β) sind Untereinheiten des Rezeptors für IL-2 (IL-2R). IL-2 wird v.a. von CD4⁺ T-Zellen nach TCR-Aktivierung produziert. IL-2/IL-2R^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte Lymphozytenproliferation und Anfälligkeit für eine autoimmune Fehlsteuerung auf. Als Hauptgrund für die Autoimmunität scheint ein Defekt in der Bildung regulatorischer T-Zellen zu sein [156].

Die Beobachtung einer vermehrten Lymphozytenproliferation bei defekter IL2/CD25-Achse passt zu unserem Ergebnis der ausgeprägten Proliferation neonataler T-Zellen und ihrer mangelnden CD25-Expression verglichen mit adulten T-Zellen. CD25 ist daneben ein Marker für T_{regs} [156]. Die Rolle von T_{regs} im Kontext der adulten Sepsis ist umstritten: So beschrieben Scumpia et al. erhöhte Level von T_{regs} mit erhöhter suppressiver Funktion als Folge einer Sepsis, was jedoch keine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben im Maus-Modell hatte [157]. Heuer et al. hingegen konnten zeigen, dass der adoptive Transfer *in vitro* stimulierter T_{regs} sowohl präventiv als auch therapeutisch im Rahmen einer Sepsis zu einer signifikant verbesserten bakteriellen Clearance und einem verlängerten Überleben der Mäuse führte [158]. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass in unseren Versuchen zwar Unterschiede in der Expression von CD25 auf neonatalen und adulten T-Zellen nach GBS-Stimulation vorhanden waren, dass der Anteil an T_{regs} sich aber nicht unterschied (diese Untersuchungen wurden im Anschluss an diese Arbeit durchgeführt und sind daher nicht Inhalt der Arbeit) [1]. Auch beobachteten wir keine Unterschiede in der suppressiven Aktivität von GBS-stimulierten neonatalen und adulten T-Zellen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die beobachteten Unterschiede in der Proliferation von neonatalen und adulten T-Zellen nicht auf eine unterschiedlich starke T_{reg}-Induktion zurückzuführen sind.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung der verminderten Hochregulation von CD25 auf neonatalen T-Zellen für die Immunantwort im Rahmen einer Neugeborenenensepsis genauer zu beleuchten.

4.5 Veränderte Expression von löslichem PD-L1 im Nabelschnurblut im Vergleich zum Erwachsenenblut

Zuletzt zeigten wir, dass anders als die membrangebundene Form, lösliches PD-L1 (soluble programmed death ligand 1, sPD-L1) im Nabelschnurblut stärker exprimiert war als im peripheren Blut Erwachsener. Die lösliche Form von PD-L1 entsteht durch Proteolyse von Membran- oder Exosom-gebundenem PD-L1 oder

wird durch alternatives Splicing von PD-L1-mRNA generiert [159]. Eine vermehrte Sekretion von sPD-L1 wurde im Rahmen verschiedener Pathologien wie Krebs [160], pulmonalen Erkrankungen (z.B. idiopathische Lungenfibrose und Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom [161, 162]), chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen oder Virusinfektionen beschrieben [159, 162, 163]. Erhöhte Konzentrationen von sPD-L1 und sPD-1 waren bei Krebserkrankungen mit fortgeschrittenem Stadium und einer schlechten Prognose assoziiert [164]. Hinsichtlich des Vorkommens von sPD-L1 bei Sepsispatienten existieren widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur. Kawamoto et al. beschrieben erhöhte Konzentrationen von sPD-L1, welche mit der Schwere der Sepsis korrelierten [165, 166], während Wilson et al. keinen Unterschied in der Konzentration von sPD-L1 oder sPD-1 zwischen Patienten mit und ohne Sepsis fanden [167]. Andererseits konnten in überlebenden PatientInnen eines Acute Respiratory Distress Syndromes (ARDS) hochregulierte Level von sPD-L1 im Vergleich zu Nicht-Überlebenden nachgewiesen werden. Xu et al. zeigten eine Verminderung der Lungeninflammation durch Verabreichung von sPD-L1 in Mäusen mit ARDS [168]. Diese Daten weisen auf eine protektive Rolle von sPD-L1 im Rahmen des ARDS hin. Interessanterweise zeigten Okuyama et al. erhöhte sPD-L1 Level bei schwangeren Frauen im Vergleich zu den Neugeborenen oder nicht-schwangeren Frauen [169]. Umgekehrt wurden höhere sPD-1 Level im Serum nicht-Schwangerer im Vergleich zum Serum Schwangerer beobachtet. Anders als sPD-L1 inhibiert sPD-1 die Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1 auf T-Zellen kompetitiv. Es wird angenommen, dass die erhöhten sPD-L1 und verminderten sPD-1 Level bei schwangeren Frauen zu einer Immunsuppression und damit zum Aufrechterhalten der feto-maternalen Toleranz beitragen [169-171]. Möglicherweise sind die von uns gezeigten erhöhten sPD-L1-Spiegel im Nabelschnurblut ein „Relikt“ aus der Fetalzeit, wo sie zur fetomaternalen Toleranz beitragen. Die Bedeutung für die Immunantwort im Rahmen der neonatalen Sepsis bleibt unklar.

5 Zusammenfassung

Die Neugeborenenensepsis ist eine der wichtigsten Ursachen für die Mortalität und Morbidität Neugeborener innerhalb der ersten 28 Lebenstage. Postinflammatorische Folgeerkrankungen, welche nach einer Sepsis auftreten, können langfristige Auswirkungen für die betroffenen Kinder haben. Einer der häufigsten Erreger der Neugeborenenensepsis sind GBS. Trotz intensiver Forschung zur Funktion und zu den Besonderheiten des neonatalen Immunsystems sind die Mechanismen, die die hohe Infektionsanfälligkeit von Neugeborenen und die Entstehung von postinflammatorischen Folgeerkrankungen im Rahmen einer Neugeborenenensepsis bedingen, nur sehr unvollständig verstanden. Über die Auswirkungen von GBS auf die Immunfunktionen neonataler Monozyten und T-Zellen im Vergleich zu adulten Immunzellen ist bisher wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die immunologischen Mechanismen im Rahmen einer neonatalen Infektion mit GBS genauer zu untersuchen.

Hierzu wurde ein *in vitro* Infektions-Modell mit GBS und Immunzellen aus dem Nabelschnurblut etabliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine stark reduzierte Proliferationsaktivität adulter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach GBS-Stimulation, welche bei neonatalen Zellen nicht beobachtet werden konnte. Die verminderte Proliferation adulter T-Zellen nach GBS-Stimulation war auf Veränderungen in der Funktion von Monozyten und T-Zellen zurückzuführen. Insbesondere wiesen adulte Monozyten nach GBS-Stimulation suppressive Eigenschaften auf. Phänotypisch exprimierten adulte Monozyten signifikant mehr PD-L1 im Vergleich zu neonatalen Monozyten. Auch nach einer Stimulation mit weiteren bakteriellen Antigenen und unspezifischen Stimulanzen zeigte sich eine verminderte PD-L1-Expression neonataler Monozyten im Vergleich zu adulten Monozyten. Nach IFN γ -Stimulation dagegen waren neonatale Monozyten in gleichem Maße dazu in der Lage PD-L1 zu exprimieren. Auf Seiten der T-Zellen zeigte sich nach GBS-Stimulation eine signifikant verminderte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf neonatalen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu adulten T-Zellen.

Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass neonatale Immunzellen eine hohe inflammatorische Kapazität aufweisen, die unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich durch suppressive Mechanismen reguliert wird, während einer Infektion oder Entzündungsreaktion jedoch für eine prolongierte Immunantwort verantwortlich sein könnte.

6 Summary

Neonatal sepsis is a major cause for neonatal mortality and morbidity within the first 28 days. Post-inflammatory diseases that often occur after sepsis can have long-term effects on affected infants. One of the most common causative pathogens of neonatal sepsis is group B streptococcus (GBS). Despite intensive research on the function and characteristics of the neonatal immune system, the mechanisms that cause the high susceptibility to infections in newborns and the development of post-inflammatory diseases in the context of neonatal sepsis are incompletely understood. Little is known about the effects of GBS on the immune functions of neonatal monocytes and T cells compared to adult immune cells. The aim of this work was to further investigate these mechanisms in the context of infection with GBS.

For this purpose, an *in vitro* infection model with GBS and cord blood immune cells was established. The results of this work show a strongly reduced proliferative activity of adult CD4⁺ and CD8⁺ T cells after GBS stimulation which could not be observed in neonatal immune cells. Reduced proliferation of adult T cells after GBS stimulation was due to effects of monocytes and T cells. Adult monocytes showed suppressive characteristics after GBS stimulation, while neonatal monocytes did not. Phenotypically, adult monocytes expressed significantly more PD-L1 than neonatal monocytes after stimulation with GBS. The stimulation with other bacterial antigens and non-specific stimulants also showed a reduced PD-L1 expression in neonatal monocytes compared to adult monocytes, while after IFN γ stimulation, cord blood monocytes were able to express PD-L1 to the same extent as adult monocytes. On T cells, GBS stimulation led to a significantly reduced expression of the activation marker CD25 on neonatal CD4⁺ T cells compared to adult T cells.

Our results suggest that neonatal immune cells have a high inflammatory capacity that is likely regulated by suppressive mechanisms under physiological conditions but may be responsible for a prolonged immune response during infection or inflammation.

7 Literaturverzeichnis

Artikel:

1. Molnar, K., et al., *Group B streptococci infection model shows decreased regulatory capacity of cord blood cells*. *Pediatr Res*, 2022.
2. Dietz, S., et al., *Expression of immune checkpoint molecules on adult and neonatal T-cells*. *Immunol Res*, 2022.
3. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 677-704.
4. *Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet*, 2018. **392**(10159): p. 1789-1858.
5. *Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *Lancet*, 2018. **392**(10159): p. 1736-1788.
6. Dong, Y. and C.P. Speer, *Late-onset neonatal sepsis: recent developments*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2015. **100**(3): p. F257-63.
7. Stoll, B.J., et al., *Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues*. *Pediatrics*, 2011. **127**(5): p. 817-26.
8. Stoll, B.J., et al., *Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network*. *Pediatrics*, 2010. **126**(3): p. 443-56.
9. Fleischmann, C., et al., *Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis*. *Arch Dis Child*, 2021. **106**(8): p. 745-52.
10. Kostlin-Gille, N., et al., *Epidemiology of Early and Late Onset Neonatal Sepsis in Very Low Birthweight Infants: Data From the German Neonatal Network*. *Pediatr Infect Dis J*, 2021. **40**(3): p. 255-259.
11. Wynn, J.L., et al., *Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis*. *Pediatr Crit Care Med*, 2014. **15**(6): p. 523-8.
12. Rampersaud, R., T.M. Randis, and A.J. Ratner, *Microbiota of the upper and lower genital tract*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012. **17**(1): p. 51-7.
13. Read, J.S., et al., *Prevention of mother-to-child transmission of viral infections*. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2008. **38**(9): p. 274-97.
14. Shane, A.L., P.J. Sanchez, and B.J. Stoll, *Neonatal sepsis*. *Lancet*, 2017. **390**(10104): p. 1770-1780.
15. Bizzarro, M.J., et al., *Neonatal sepsis 2004-2013: the rise and fall of coagulase-negative staphylococci*. *J Pediatr*, 2015. **166**(5): p. 1193-9.
16. Köstlin-Gille, N., et al., *Epidemiology of Early and Late Onset Neonatal Sepsis in Very Low Birthweight Infants: Data From the German Neonatal Network*. *Pediatr Infect Dis J*, 2021. **40**(3): p. 255-259.

17. van den Hoogen, A., et al., *Long-term trends in the epidemiology of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility of causative agents*. Neonatology, 2010. **97**(1): p. 22-8.
18. Bizzarro, M.J., et al., *The impact of environmental and genetic factors on neonatal late-onset sepsis*. J Pediatr, 2011. **158**(2): p. 234-8.e1.
19. Stoll, B.J., et al., *Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics, 2002. **110**(2 Pt 1): p. 285-91.
20. Hornik, C.P., et al., *Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units*. Early Hum Dev, 2012. **88 Suppl 2**(Suppl 2): p. S69-74.
21. Lancefield, R.C., *A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI*. J Exp Med, 1933. **57**(4): p. 571-95.
22. Lancefield, R.C. and R. Hare, *THE SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC STRAINS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI FROM PARTURIENT WOMEN*. J Exp Med, 1935. **61**(3): p. 335-49.
23. Fry, R.M., *FATAL INFECTIONS BY HAEMOLYTIC STREPTOCOCCUS GROUP B*. The Lancet, 1938. **231**(5969): p. 199-201.
24. Slotved, H.C., et al., *Serotype IX, a Proposed New Streptococcus agalactiae Serotype*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 2929-36.
25. Ferrieri, P. and A.E. Flores, *Surface protein expression in group B streptococcal invasive isolates*. Adv Exp Med Biol, 1997. **418**: p. 635-7.
26. Raabe, V.N. and A.L. Shane, *Group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae)*. Microbiol Spectr, 2019. **7**(2).
27. Madrid, L., et al., *Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses*. Clin Infect Dis, 2017. **65**(suppl_2): p. S160-s172.
28. Kimberlin, D.W., *RED Book 2015: Report of the Committee on Infectious Diseases, 30th Edition (2015)*. 2015, American Academy of Pediatrics'.
29. Anthony, B.F., D.M. Okada, and C.J. Hobel, *Epidemiology of group B Streptococcus: longitudinal observations during pregnancy*. J Infect Dis, 1978. **137**(5): p. 524-30.
30. Russell, N.J., et al., *Risk of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease With Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses*. Clin Infect Dis, 2017. **65**(suppl_2): p. S152-S159.
31. *Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797*. Obstet Gynecol, 2020. **135**(2): p. e51-e72.
32. Nanduri, S.A., et al., *Epidemiology of Invasive Early-Onset and Late-Onset Group B Streptococcal Disease in the United States, 2006 to 2015: Multistate Laboratory and Population-Based Surveillance*. JAMA Pediatr, 2019. **173**(3): p. 224-233.
33. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 379-90.
34. McDonagh, S., et al., *Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface*. J Infect Dis, 2004. **190**(4): p. 826-34.

35. Makhseed, M., et al., *Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions*. Hum Reprod, 2001. **16**(10): p. 2219-26.
36. Jack S. Remington, J.O.K., *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 5th Edition ed. 2001, Philadelphia: W. B. Saunders Company.
37. Charité - Universitätsmedizin Berlin, I.f.H.u.U. *Modul NEO-KISS (Surveillance System nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen)*. Available from: <https://www.nrz-hygiene.de/KISS-Modul/KISS/NEO> (Stand 13.06.2023).
38. Firth, M.A., P.E. Shewen, and D.C. Hodgins, *Passive and active components of neonatal innate immune defenses*. Anim Health Res Rev, 2005. **6**(2): p. 143-58.
39. Levy, O., et al., *Enhancement of neonatal innate defense: effects of adding an N-terminal recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein on growth and tumor necrosis factor-inducing activity of gram-negative bacteria tested in neonatal cord blood ex vivo*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5120-5.
40. Pihlgren, M., et al., *Influence of complement C3 amount on IgG responses in early life: immunization with C3b-conjugated antigen increases murine neonatal antibody responses*. Vaccine, 2004. **23**(3): p. 329-35.
41. Levy, O., et al., *Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein*. Pediatrics, 1999. **104**(6): p. 1327-33.
42. Carr, R., *Neutrophil production and function in newborn infants*. Br J Haematol, 2000. **110**(1): p. 18-28.
43. Henneke, P. and R. Berner, *Interaction of neonatal phagocytes with group B streptococcus: recognition and response*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3085-95.
44. 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.
45. Förster-Waldl, E., et al., *Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging*. Pediatr Res, 2005. **58**(1): p. 121-4.
46. Levy, O., et al., *Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4627-34.
47. Yan, S.R., et al., *Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1223-9.
48. De Wit, D., et al., *Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1030-2.
49. Aksoy, E., et al., *Interferon regulatory factor 3-dependent responses to lipopolysaccharide are selectively blunted in cord blood cells*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2887-93.

50. Angelone, D.F., et al., *Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo*. *Pediatr Res*, 2006. **60**(2): p. 205-9.
51. Vanden Eijnden, S., et al., *Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(1): p. 21-6.
52. Chelvarajan, R.L., et al., *Defective macrophage function in neonates and its impact on unresponsiveness of neonates to polysaccharide antigens*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(6): p. 982-94.
53. Ygberg, S. and A. Nilsson, *The developing immune system - from foetus to toddler*. *Acta Paediatr*, 2012. **101**(2): p. 120-7.
54. Risdon, G., et al., *Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(6): p. 2413-7.
55. Tolar, J., K.L. Hippen, and B.R. Blazar, *Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(2): p. 200-6.
56. 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.
57. June, C.H., et al., *T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(12): p. 4472-81.
58. Bretscher, P. and M. Cohn, *A theory of self-nonself discrimination*. *Science*, 1970. **169**(3950): p. 1042-9.
59. Mueller, D.L., M.K. Jenkins, and R.H. Schwartz, *Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 445-80.
60. Liechtenstein, T., et al., *MODULATING CO-STIMULATION DURING ANTIGEN PRESENTATION TO ENHANCE CANCER IMMUNOTHERAPY*. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2012. **12**(3): p. 224-235.
61. Saito, T., T. Yokosuka, and A. Hashimoto-Tane, *Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(24): p. 4865-71.
62. Lafferty, K.J. and A.J. Cunningham, *A new analysis of allogeneic interactions*. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1975. **53**(1): p. 27-42.
63. Zhang, Q. and D.A. Vignali, *Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity*. *Immunity*, 2016. **44**(5): p. 1034-51.
64. Riella, L.V., et al., *Role of the PD-1 pathway in the immune response*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(10): p. 2575-87.
65. Egen, J.G. and J.P. Allison, *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength*. *Immunity*, 2002. **16**(1): p. 23-35.
66. Tivol, E.A., et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. *Immunity*, 1995. **3**(5): p. 541-7.

67. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
68. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
69. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 839-46.
70. Carter, L., et al., *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 634-43.
71. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
72. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.
73. Wright, G.J., et al., *Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3034-46.
74. Rosenblum, M.D., et al., *Characterization of CD 200-receptor expression in the murine epidermis*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(6): p. 1130-8.
75. Rijkers, E.S., et al., *The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 1126-35.
76. Hoek, R.M., et al., *Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200)*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1768-71.
77. Liu, Y.C., S.T. Shou, and Y.F. Chai, *Immune checkpoints in sepsis: New hopes and challenges*. Int Rev Immunol, 2022. **41**(2): p. 207-216.
78. van der Poll, T., et al., *The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(7): p. 407-420.
79. Tamayo, E., et al., *Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock*. Eur Cytokine Netw, 2011. **22**(2): p. 82-7.
80. Wang, R., et al., *CD28 ligation prevents bacterial toxin-induced septic shock in mice by inducing IL-10 expression*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2856-61.
81. Inoue, S., et al., *Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis*. Shock, 2011. **36**(1): p. 38-44.
82. Zhang, Y., et al., *PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction*. Crit Care, 2010. **14**(6): p. R220.
83. Tomino, A., et al., *Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169653.
84. Huang, X., et al., *Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis*. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 1091-9.

85. Ayala, A., et al., *Sepsis-induced potentiation of peritoneal macrophage migration is mitigated by programmed cell death receptor-1 gene deficiency*. J Innate Immun, 2014. **6**(3): p. 325-38.
86. Brahmamdam, P., et al., *Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(2): p. 233-40.
87. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
88. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
89. Yazdani, M., *Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro*. Toxicol In Vitro, 2015. **30**(1 Pt B): p. 578-82.
90. Lyons, A.B., S.J. Blake, and K.V. Doherty, *Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes*. Curr Protoc Cytom, 2013. **Chapter 9**: p. Unit9.11.
91. Lin, A.V., *Direct ELISA*. Methods Mol Biol, 2015. **1318**: p. 61-7.
92. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
93. Crowther, J.R., *ELISA. Theory and practice*. Methods Mol Biol, 1995. **42**: p. 1-218.
94. Joyner, J.L., et al., *Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 974-7.
95. Bryson, Y.J., et al., *Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborns*. Cell Immunol, 1980. **55**(1): p. 191-200.
96. Wilson, C.B., et al., *Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies*. J Clin Invest, 1986. **77**(3): p. 860-7.
97. Alspach, E., D.M. Lussier, and R.D. Schreiber, *Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019. **11**(3).
98. Kan, B., H.R. Razzaghian, and P.M. Lavoie, *An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis*. Trends Mol Med, 2016. **22**(4): p. 290-302.
99. Hibbert, J.E., A. Currie, and T. Strunk, *Sepsis-Induced Immunosuppression in Neonates*. Front Pediatr, 2018. **6**: p. 357.
100. Liu, L., et al., *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. Lancet, 2012. **379**(9832): p. 2151-61.
101. Schrag, S.J., et al., *Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014*. Pediatrics, 2016. **138**(6).
102. Humberg, A., et al., *Preterm birth and sustained inflammation: consequences for the neonate*. Semin Immunopathol, 2020. **42**(4): p. 451-468.

103. Risdon, G., et al., *Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation*. Cell Immunol, 1994. **154**(1): p. 14-24.
104. Wang, X., et al., *Neonates are armed with deviated immune cell proportion and cytokine reduction but higher T cell proliferation potentiality*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018. **50**(9): p. 934-937.
105. Kilpinen, S. and M. Hurme, *Low CD3+CD28-induced interleukin-2 production correlates with decreased reactive oxygen intermediate formation in neonatal T cells*. Immunology, 1998. **94**(2): p. 167-72.
106. Chalmers, I.M., et al., *Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes*. Blood, 1998. **92**(1): p. 11-8.
107. 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.
108. 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.
109. Kostlin-Gille, N. and C. Gille, *Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 584712.
110. Knobloch, J., et al., *A systemic defect in Toll-like receptor 4 signaling increases lipopolysaccharide-induced suppression of IL-2-dependent T-cell proliferation in COPD*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **310**(1): p. L24-39.
111. Sueyoshi, K., et al., *Lipopolysaccharide suppresses T cells by generating extracellular ATP that impairs their mitochondrial function via P2Y11 receptors*. J Biol Chem, 2019. **294**(16): p. 6283-6293.
112. Ufermann, C.M., et al., *Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity During Acute Toxoplasmosis and the Suppressed T Cell Proliferation in Mice*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 184.
113. Saumyaa, et al., *Immunosuppressive property within the Streptococcus pneumoniae cell wall that inhibits generation of T follicular helper, germinal center, and plasma cell response to a coimmunized heterologous protein*. Infect Immun, 2013. **81**(9): p. 3426-33.
114. Dammann, O. and A. Leviton, *Intermittent or sustained systemic inflammation and the preterm brain*. Pediatr Res, 2014. **75**(3): p. 376-80.
115. de Jong, E., et al., *The phenotype and function of preterm infant monocytes: implications for susceptibility to infection*. J Leukoc Biol, 2017. **102**(3): p. 645-656.
116. Majer, C., et al., *PD-1/PD-L1 Control of Antigen-Specifically Activated CD4 T-Cells of Neonates*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(6).
117. Gille, C., et al., *The CD95/CD95L pathway is involved in phagocytosis-induced cell death of monocytes and may account for sustained inflammation in neonates*. Pediatr Res, 2013. **73**(4 Pt 1): p. 402-8.
118. Elahi, S., et al., *Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection*. Nature, 2013. **504**(7478): p. 158-62.

119. 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.
120. Pettengill, M., et al., *Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine*. J Biol Chem, 2013. **288**(38): p. 27315-26.
121. Goldberg, M.R., et al., *Synergy between LPS and immobilized anti-human CD3epsilon mAb for activation of cord blood CD3+ T cells*. Int Immunol, 2007. **19**(1): p. 99-103.
122. Zhang, X., D. Zhivaki, and R. Lo-Man, *Unique aspects of the perinatal immune system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(8): p. 495-507.
123. Zhu, J., et al., *Ly6C(hi) monocytes regulate T cell responses in viral hepatitis*. JCI Insight, 2016. **1**(17): p. e89880.
124. Zhai, N., et al., *Hepatitis C Virus Induces MDSCs-Like Monocytes through TLR2/PI3K/AKT/STAT3 Signaling*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170516.
125. Albertsmeier, M., et al., *Monocyte-Dependent Suppression of T-Cell Function in Postoperative Patients and Abdominal Sepsis*. Shock, 2017. **48**(6): p. 651-656.
126. Currie, A.J., et al., *Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus*. Infect Immun, 2011. **79**(4): p. 1588-96.
127. Berner, R., J. Csorba, and M. Brandis, *Different cytokine expression in cord blood mononuclear cells after stimulation with neonatal sepsis or colonizing strains of Streptococcus agalactiae*. Pediatr Res, 2001. **49**(5): p. 691-7.
128. Kollmann, T.R., et al., *Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7150-60.
129. Levy, O., et al., *The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1956-66.
130. Giannoni, E., et al., *Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns*. Infect Immun, 2011. **79**(7): p. 2690-8.
131. Belderbos, M.E., et al., *Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective*. Pediatr Allergy Immunol, 2013. **24**(2): p. 102-13.
132. Roger, T., et al., *High expression levels of macrophage migration inhibitory factor sustain the innate immune responses of neonates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(8): p. E997-1005.
133. 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.
134. Patera, A.C., et al., *Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(6): p. 1239-1254.

135. Young, W.A., et al., *Improved survival after induction of sepsis by cecal slurry in PD-1 knockout murine neonates*. Surgery, 2017. **161**(5): p. 1387-1393.
136. Giesbrecht, K., et al., *Streptococcal Pyrogenic Exotoxin A-Stimulated Monocytes Mediate Regulatory T-Cell Accumulation through PD-L1 and Kynurenine*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(16).
137. Engen, S.A., et al., *The Regulatory Role of the Oral Commensal Streptococcus mitis on Human Monocytes*. Scand J Immunol, 2018. **87**(2): p. 80-87.
138. Zasada, M., et al., *Analysis of PD-1 expression in the monocyte subsets from non-septic and septic preterm neonates*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0186819.
139. Gollwitzer, E.S., et al., *Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1*. Nat Med, 2014. **20**(6): p. 642-7.
140. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
141. Veglia, F., M. Perego, and D. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells coming of age*. Nat Immunol, 2018. **19**(2): p. 108-119.
142. Natarajan, G., et al., *Nitric oxide and prostaglandin response to group B streptococcal infection in the lung*. Ann Clin Lab Sci, 2007. **37**(2): p. 170-6.
143. Al-Obaidi, M.M.J., et al., *Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system*. Acta Virol, 2018. **62**(1): p. 16-27.
144. Ren, C., et al., *Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression*. J Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 14.
145. Smith, P.L.P., et al., *Peripheral myeloid cells contribute to brain injury in male neonatal mice*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 301.
146. Zaramella, P., et al., *Innate immunity ascertained from blood and tracheal aspirates of preterm newborn provides new clues for assessing bronchopulmonary dysplasia*. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0221206.
147. Lawrence, S.M., J.L. Ruoss, and J.L. Wynn, *IL-17 in neonatal health and disease*. Am J Reprod Immunol, 2018. **79**(5): p. e12800.
148. Walk, J., et al., *Inhibitory receptor expression on neonatal immune cells*. Clin Exp Immunol, 2012. **169**(2): p. 164-71.
149. Miller, R.E., et al., *Reduced CTLA-4 protein and messenger RNA expression in umbilical cord blood T lymphocytes*. Exp Hematol, 2002. **30**(7): p. 738-44.
150. Shankar-Hari, M., M. Fish, and E. Azoulay, *Should we consider blocking the inhibitory immune checkpoint molecules for treating T cell exhaustion in sepsis?* Intensive Care Med, 2020. **46**(1): p. 119-121.
151. Kim, Y.S., et al., *Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6158-69.
152. Galbraith, N.J., et al., *Interferon-gamma increases monocyte PD-L1 but does not diminish T-cell activation*. Cell Immunol, 2020. **357**: p. 104197.

153. Han, R., et al., *PD-L1 (Programmed Death Ligand 1) Protects Against Experimental Intracerebral Hemorrhage-Induced Brain Injury*. *Stroke*, 2017. **48**(8): p. 2255-2262.
154. Shwetank, et al., *PD-1 Dynamically Regulates Inflammation and Development of Brain-Resident Memory CD8 T Cells During Persistent Viral Encephalitis*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 783.
155. Zhao, S., et al., *Regulation of Neuroinflammation through Programed Death-1/Programed Death Ligand Signaling in Neurological Disorders*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 271.
156. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 453-79.
157. Scumpia, P.O., et al., *Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis*. *J Immunol*, 2006. **177**(11): p. 7943-9.
158. Heuer, J.G., et al., *Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 7141-6.
159. Bailly, C., X. Thuru, and B. Quesnel, *Soluble Programmed Death Ligand-1 (sPD-L1): A Pool of Circulating Proteins Implicated in Health and Diseases*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(12).
160. Liu, S., et al., *The Clinical Significance of Soluble Programmed Cell Death-Ligand 1 (sPD-L1) in Patients With Gliomas*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 9.
161. Ancin, B., et al., *The correlation of serum sPD-1 and sPD-L1 levels with clinical, pathological characteristics and lymph node metastasis in nonsmall cell lung cancer patients*. *Turk J Med Sci*, 2022. **52**(4): p. 1050-1057.
162. Jovanovic, D., et al., *Membrane PD-L1 expression and soluble PD-L1 plasma levels in idiopathic pulmonary fibrosis-a pilot study*. *J Thorac Dis*, 2018. **10**(12): p. 6660-6669.
163. Aguirre, J.E., et al., *Matrix metalloproteinases cleave membrane-bound PD-L1 on CD90+ (myo-)fibroblasts in Crohn's disease and regulate Th1/Th17 cell responses*. *Int Immunol*, 2020. **32**(1): p. 57-68.
164. Khan, M., et al., *Soluble PD-1: Predictive, Prognostic, and Therapeutic Value for Cancer Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 587460.
165. Triantafyllou, E., et al., *PD-1 blockade improves Kupffer cell bacterial clearance in acute liver injury*. *J Clin Invest*, 2021. **131**(4).
166. Kawamoto, E., et al., *Integrin and PD-1 Ligand Expression on Circulating Extracellular Vesicles in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis*. *Shock*, 2019. **52**(1): p. 13-22.
167. Wilson, J.K., et al., *Lymphocyte subset expression and serum concentrations of PD-1/PD-L1 in sepsis - pilot study*. *Crit Care*, 2018. **22**(1): p. 95.
168. Xu, J., et al., *Soluble PD-L1 improved direct ARDS by reducing monocyte-derived macrophages*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(10): p. 934.
169. Okuyama, M., et al., *Elevated Soluble PD-L1 in Pregnant Women's Serum Suppresses the Immune Reaction*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 86.

Literaturverzeichnis

170. Enninga, E.A.L., et al., *Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2018. **79**(2).
171. Amancha, P.K., et al., *In vivo blockade of the programmed cell death-1 pathway using soluble recombinant PD-1-Fc enhances CD4+ and CD8+ T cell responses but has limited clinical benefit*. J Immunol, 2013. **191**(12): p. 6060-70.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen im Labor für neonatale Immunologie unter Betreuung von PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Bärbel Spring und Dr. rer. nat. Stefanie Dietz von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5 und 3.1.6 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Stefanie Dietz und Dr. med. Kriszta Molnar durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille.

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

Tübingen, den 30.08.2023

9 Veröffentlichungen

Aus meiner Promotion gingen folgende Originalarbeiten als Veröffentlichungen hervor:

9.1 Publikationen

„Expression of immune checkpoint molecules on adult and neonatal T-cells“;
Dietz S, Molnar K, **Riedel H**, Haag L, Spring B, Orlikowsky TW, Poets CF, Gille C, Köstlin-Gille N. Immunol Res. 2022 Nov 23

„Group B streptococci infection model shows decreased regulatory capacity of cord blood cells“; Molnar K, **Riedel H**, Schwarz J, Dietz S, Spring B, Haag L, Poets CF, Gille C, Köstlin-Gille N. Pediatr Res. 2022 Feb 14

“Reproduced with permission from Springer Nature”

9.2 Posterpräsentationen

Riedel H, Molnar K, Köstlin-Gille N

„Verminderte PD-L1-Expression neonataler Monozyten nach GBS-Stimulation beeinflusst die Immunantwort des Neugeborenen“;

Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen 2020

10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Christian F. Poets für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Neonatologie Tübingen anzufertigen.

Besonders herzlich danken möchte ich meiner Doktormutter PD Dr. med. Natascha Köstlin-Gille für die Bereitstellung des Promotionsthemas, ihre Motivation und ansteckende Begeisterung für die Forschung und ihre fachliche und menschliche Kompetenz, mit der sie mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützte. Ihre hervorragende Betreuung hat meine Zeit im Labor spannend und bereichernd gemacht. In gleichem Maße danke ich Dr. rer. nat. Bärbel Spring und Dr. rer. nat. Stefanie Dietz, die mir stets geduldig bei jedem Problem zur Seite standen und mich mit ihrer fachlichen Kompetenz unterstützten. Ebenfalls möchte ich Dr. med. Kriszta Molnar und allen MitarbeiterInnen des Labors für neonatale Immunologie für die gute Zusammenarbeit danken. Ein großer Dank gilt auch dem IZKF-Promotionskolleg, das mich während der Promotion mit einem Stipendium finanziell unterstützte.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, meiner Familie, Jakob und Familie Kressin für ihre bedingungslose Unterstützung bei all meinen Vorhaben und die Motivation und Ermutigung zur Erstellung dieser Arbeit.